

**Analyse der Wirkung von Angiopoietin-2  
auf das Gefäßsystem der Netzhaut in  
verschiedenen Tiermodellen**

**Dissertation**

Zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

Dem Fachbereich Biologie, Chemie und Geowissenschaften  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

**Patrick Wagner**

Bad Nauheim

Juni 2004

Vom Fachbereich Biologie, Chemie und Geowissenschaften  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
als Dissertation angenommen im Juni 2004

Dekan: Prof. Dr. Jürgen Mayer  
1. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Clauss  
2. Gutachter: Prof. Dr. Klaus Theo Preissner

*Der erste Schluck aus dem Becher der Natur  
führt zum Atheismus,  
aber auf dem Grund wartet Gott.*

Werner Heisenberg

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>Seite</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Das Gefäßsystem	1
1.1.1 Hierarchie und Bau der Blutgefäße	1
1.1.2 Embryogenese des Gefäßsystems	2
1.1.3 Der Perizyt	3
1.2 Die Netzhaut	4
1.2.1 Bau der Netzhaut	4
1.2.2 Vaskuläre Versorgung der Netzhaut	6
1.3 Die Diabetische Retinopathie	8
1.3.1 Molekulare Mechanismen der Gefäßschädigung durch Hyperglykämie	11
1.4 Regulation von Endothelzellfunktion durch Rezeptortyrosinkinasen	13
1.4.1 VEGF bindende Rezeptortyrosinkinasen	14
1.4.2 Eph Rezeptortyrosinkinasen und die Ephrine	15
1.4.3 Tie Rezeptortyrosinkinasen	16
1.4.4 Die Angiopoietine	17
1.5 Die Maus als molekularbiologisches Modell	20
1.6 Ziel dieser Arbeit	21
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>22</b>
2.1 Geräte und Chemikalien	23
2.1.1 Verwendete Geräte	23
2.1.2 Verwendete Verbrauchsmaterialien	23
2.1.3 Puffer, Lösungen, Chemikalien, Enzyme	24
2.1.4 Verwendete Primer und Plasmide	26
2.2 Präparation der Versuchstiere	27
2.2.1 Transgene Mäuse	27
2.2.1.1 Angiopoietin-2 <i>knock out</i> Mäuse	28
2.2.1.2 „Ops/hAng-2 Mäuse“	28
2.2.1.3 „P-lacZ Mäuse“	29
2.2.2 Intravitreale Protein-Injektion	30
2.2.3 Entnahme und Präparation der Netzhaut	31
2.2.4 $\beta$ -Galaktosidase Färbung der Netzhaut	32
2.2.5 Enzymatische Netzhaut-Digestion	33
2.2.6 PAS Färbung (Perjodsäure-Schiff-Reaktion)	34
2.2.7 Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Netzhautgefäße	35
2.3 Bearbeitung von Nukleinsäuren	37
2.3.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)	37
2.3.1.1 Genotypisierung mittels PCR	37

2.3.1.2	PCR zur Charakterisierung der Transkriptionsaktivität eines Gewebes im Rahmen einer RT-PCR	38
2.3.2	Gelelektrophoretische Größenfraktionierung von DNA-Fragmenten	39
2.3.3	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	39
2.3.3.1	Isolierung und Aufreinigung von RNA	40
2.3.3.2	Reverse Transkription	40
2.3.3.3	Quantifizierung von Ribonukleinsäuren	40
2.4	Immunologische Methoden	41
2.4.1	Immunhistochemie	41
2.4.1.1	Gewebepräparation	41
2.4.1.2	Anfertigung von histologischen Schnitten	41
2.4.1.3	Immunologischer Nachweis von Proteinen <i>in situ</i>	42
2.4.2	Immunoblot (Western blot)	43
2.4.2.1	Gewinnung von Proteinextrakten	43
2.4.2.2	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen (SDS-PAGE)	44
2.4.2.3	Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen	45
2.4.2.4	Immunologischer Proteinnachweis	46
2.4.3	Immunologische Perizytendarstellung	47
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>48</b>
3.1	Angiopoietin-2: Beteiligung an der Vaskularisierung der reifenden Netzhaut	48
3.1.1	Aktivität des Angiopoietin-2 Promoters in der reifenden Netzhaut in Angiopoietin-2 <i>LacZ knock in</i> Mäusen	49
3.1.2	Analyse der Gefäßstrukturen homozygoter Angiopoietin-2 <i>knock out</i> Mäuse	50
3.1.2.1	Darstellung des Gefäßnetzes von Angiopoietin-2 <i>knock out</i> Mäusen mittels LacZ Färbung der Netzhaut	51
3.1.2.2	Dreidimensionale Analyse der Kapillarmorphologie von Angiopoietin-2 <i>knock-out</i> Mäusen mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie.	51
3.1.2.3	Kapillarbäume von Angiopoietin-2 <i>knock out</i> Mäusen in Retina-Digestionen	53
3.2	Intravitreale Proteininjektionen	56
3.2.1	Netzhautdigestion nach Injektion von Angiopoietin-2 in die Ratte	56
3.2.1.1	Dosisabhängiger Perizytenabfall nach Injektion von Angiopoietin-2	57
3.2.1.2	Hemmung der Angiopoietin-2 Wirkung durch Tie-2-Ig-Chimäre	58
3.2.2	LacZ-Färbung der Retina nach Injektion von rekombinantem Angiopoietin-2 in P-lacZ Mäuse	58
3.3	Transgene Mäuse	60
3.3.1	Erzeugung und Analyse transgener Ops/hAng2 Mäuse	61
3.3.1.1	RT-PCR zum Nachweis der Transgenexpression auf RNA-Ebene	61
3.3.1.2	Identifikation eines humanspezifischen Angiopoietin-2 Antikörpers	63
3.3.1.3	Westernblot zum Nachweis von humanen Angiopoietin-2 in der Retina	64
3.3.1.4	Immunohistologie zur Lokalisierung der Transgenexpression	65
3.3.1.5	Perizytenabfall von den Netzhautkapillaren transgener Mäuse	66
3.3.1.6	Zunahme azellulärer Kapillaren in Ops/hAng-2 Mäusen	69

3.3.1.7	Dreidimensionale Darstellung der Netzhautgefäße von Ops/hAng-2 Mäusen mittels Fluoreszenzmikroskopie	70
3.3.1.8	Fokale Akkumulation von niedermolekularen Fluorophoren in der Retina von Ops/hAng-2-Mäusen	70
3.3.2	Erzeugung und Analyse doppeltransgener Ops/hAng2 x P-lacZ Mauslinien	71
3.3.2.1	LacZ-Färbung der Retina von Ops/hAng2 x P-lacZ Mäusen	72
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>76</b>
4.1	Rolle von Angiopoietin-2 während der postpartalen Vaskularisierung der Netzhaut	76
4.1.1	Die Gefäßstruktur der Retina in der Angiopoietin-2 <i>knock out</i> Maus	78
4.2	Das transgene Opsin-hAng-2 Maus-Modell	81
4.2.1	Eignung des Modells zur Beantwortung der Fragestellung	82
4.2.2	Nachweis der Transgen-Expression	83
4.3	Darstellung der Angiopoietin-2-Effekte in Netzhautdigestionen	84
4.3.1	Angiopoietin-2 verursacht Perizytenabfall	84
4.3.2	Angiopoietin-2 erhöht die Anzahl azellulärer Kapillaren	86
4.4	Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Gefäßnetze in Ops/hAng-2 Mäusen	87
4.5	Das transgene P-LacZ-Modell	89
4.5.1	Intravitreale Injektion von Angiopoietin-2 in P-LacZ Mäuse	89
4.5.2	Einkreuzung der P-LacZ Tiere in Ops/hAng-2 Mäuse	91
4.6	Die Rolle von Angiopoietin-2 in der Diabetischen Retinopathie	91
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>94</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>96</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>110</b>
7.1	Abkürzungen	110
7.2	Bildnachweis	112
7.3	Basenabfolge des rekombinanten „Ops/hAng-2“-Konstrukts (2820Bp)	112
7.4	Lebenslauf	114
7.5	Danksagung	115
7.6	Publikationen und Postervorträge	116
7.7	Ehrenwörtliche Erklärung	117

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Gefäßsystem

Höhere Organismen haben im Laufe der Evolution zwei geschlossene Gefäßsysteme entwickelt, die miteinander in Verbindung stehen. So sammelt das Lymphsystem als blind endendes Röhrengeflecht das in der Körperperipherie anfallende Gewebwasser (Lymphe) und transportiert es über die herznahen Venen zurück zum Herzen. Auf diese Weise beteiligen sich die Lymphgefäße auch am Transport von Nahrungsbestandteilen wie z.B. Fetten vom Darm zur Leber. Regionale Lymphknoten filtern die Lymphe. Da in ihnen auch Lymphozyten und Makrophagen zur Abwehr von pathogenen Antigenen aktiv sind, werden Lymphknoten zum Immunsystems eines Organismus gerechnet. Der Bau von Lymphgefäßen ähnelt dem von Blutgefäßen (s.u.); es existiert ein einschichtiges Endothel, die Gefäßwand besteht z.T. aus glatten Muskelzellen und man findet Klappen, die als Ventile einen gerichteten Lymphtransport ermöglichen.

Neben dem Lymphsystem existiert in Wirbeltieren ein geschlossenes kardiovaskuläres Blutgefäßsystem, das neben der Sauerstoffversorgung auch dem Transport von Nährstoffen, Stoffwechselprodukten und Hormonen dient. Bei den Säugern besitzen die Gefäße zusätzlich zu oben genannten Funktionen auch die Aufgabe der Temperaturregulation und stellen ebenfalls einen wesentlichen Bestandteil des Immunsystems dar. Im Zentrum des kardiovaskulären Systems steht das Herz als Saug-Druck-Pumpe, das als ein unwillkürlich gesteuertes, autonomes Organ einen steten Blutfluss ermöglicht. Das Blutvolumen zirkuliert in zwei „parallel“ angelegten Kreisläufen, dem kleinen Lungenkreislauf, der der Sauerstoffanreicherung des Blutes dient, und dem großen Körperkreislauf. Der Blutfluß erfolgt innerhalb von Gefäßen, die sich in Arterien, Venen und Kapillaren einteilen lassen. Venen leiten Blut zum Herzen; Blut, das dem Herzen zugeleitet wird, ist ungeachtet seines Sauerstoffgehalts somit als venös zu bezeichnen, arterielles Blut fließt in Arterien vom Herzen weg.

### 1.1.1 Hierarchie und Bau der Blutgefäße

Am Bau der Wand größerer Gefäße sind drei Schichten beteiligt, die *Tunica intima* (einschichtiges Plattenepithel aus Endothelzellen), *Tunica media* (glatte Muskelzellen und Bindegewebe) und die *Tunica adventitia*. Arterien besitzen im Vergleich zu Venen eine

stärkere Muskelschicht; die Wandstärke der Venen ist eher gering und lässt auf ihre Funktion als Blutreservoir schließen. Allerdings verfügen die meisten Venen im Gegensatz zu Arterien über Venenklappen und unterscheiden sich auch auf molekularer Ebene von arteriellen Gefäßen durch einen spezifischen Besatz molekularer Marker. Die Kapillaren stehen als Ort des Stoffaustauschs in direktem Kontakt zum umgebenden Gewebe. Ihr Lumen wird von einer einlagigen Endothelzellschicht umkleidet, auf der perivaskuläre Zellen, sog. Perizyten, sitzen. Das Kapillarbett zeigt je nach Lokalisation und Funktion unterschiedliche Durchlässigkeit für Blutbestandteile. So ist die Blut-Hirn-Schranke fast völlig undurchlässig, das gefensterte Endothel der Nierenglomerulie für Moleküle, die kleiner als 70 kDa sind, hingegen permeabel. Alle Gefäße sind von einer einschichtigen Endothelzellschicht ausgekleidet. Endothelzellen haben im Organismus mannigfaltige Funktionen. So verhindern sie im gesunden Gefäß, daß es zu einer Gerinnung des Blutes kommt [Esmon und Owen 1981]. Bei der Verwundung eines Gefäßes und folgender Koagulation spielen Endothelzellen ebenfalls eine Rolle [Esmon 1993]. Auch Änderungen in der Hämodynamik können über Endothelzellen Einfluß auf den Spannungszustand der glatten Muskelzellen in den Gefäßwänden haben [Cooke et al. 1991].

### 1.1.2 Embryogenese des Gefäßsystems

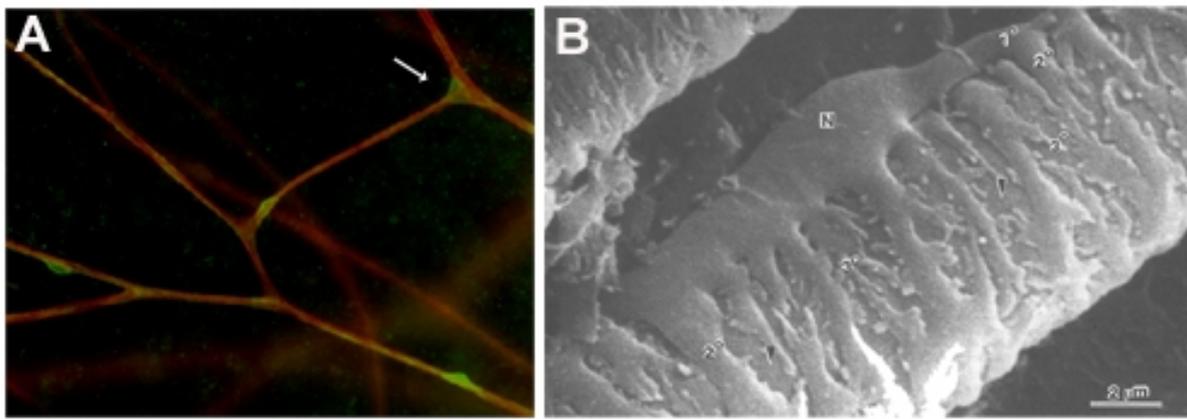
Das kardiovaskuläre System ist während der Embryonalentwicklung das erste sich entwickelnde Organsystem. Mesodermale Vorläuferzellen bilden Aggregate, die auch als Blutinseln bezeichnet werden. Aus den in der Peripherie gelegenen Zellen der Blutinseln entwickeln sich Angioblasten, im Zentrum gelegene Vorläuferzellen differenzieren sich zu embryonalen Blutzellen. Aus den Angioblasten entwickeln sich Endothelzellen. Die Fusion von Blutinseln resultiert in der Bildung erster primitiver Gefäße. Diese Bildung eines vorläufigen, primitiven Gefäßsystems aus *in situ* differenzierenden Angioblasten bezeichnet man als Vaskulogenese [Risau et al. 1991; von Schulte 1914]. Ihr gegenüber steht die Angiogenese. Hierbei erfolgt die Gefäßneubildung ausschließlich aus bereits existierenden Gefäßen [Hertig 1935]. Es lassen sich zwei Arten der Angiogenese unterscheiden. Bei dem einen Typ sproßen aus einem vorhandenen Gefäß neue Gefäße in das umgebende Gewebe aus (*sprouting*) [Risau 1997]. Die zweite Art der Gefäßneubildung erfolgt durch Intussuszeption bereits bestehender Gefäße. Hierbei spaltet sich ein Gefäß durch Invagination von Bindegewebe, Perizyten und glatten Muskelzellen in zwei Tochtergefäße auf [Burri et al. 1990, Patan et al. 1996]. Im Rahmen der Angiogenese kommt es zu Interaktionen zwischen

Endothelzellen und den umgebenden Perizyten. Die entsprechenden Vorgänge werden durch PDGF-B (*platelet-derived growth factor*) und seinen Rezeptor PDGFR- $\beta$ , die Rezeptor-Tyrosinkinase Tie-2 (*tyrosine kinases with Ig and EGF homology domains*) und ihre Liganden, die Angiopoietine sowie vermutlich weitere Faktoren vermittelt. Ausgereifte, stabile Gefäße zeichnen sich durch Besatz perivaskulärer Zellen aus. Im adulten Organismus erfolgt die Gefäßneubildung vorwiegend über Angiogenese.

### 1.1.3 Der Perizyt

Perizyten sind mesenchymale, kontraktile Zellen, die mit ihren langen pseudopodienartigen Zellfortsätzen die Endothelzellen umschlingen (s. **Abb. 1**) und je nach Gewebe sehr heterogen sind. So existiert für diese Zellart eine Fülle von Synonymen, wie z.B. Ito-Zellen, Mesangium-Zelle oder Myofibroblast. Der zelluläre Ursprung von Perizyten ist unklar. Entweder gehen sie aus mesenchymalen Vorläuferzellen hervor [Nehls et al. 1992] oder entwickeln sich durch De-Differenzierung aus arteriellen Glatten Muskelzellen [Nicosia et al. 1995]. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass während der Entwicklung funktioneller Gefäße perivaskulär gelegene mesenchymale Zellen durch direkten Einfluß der Endothelzellen in Perizyten-Vorläuferzellen umgewandelt werden [Hellström et al. 1999] (was sich in der Expression von PDGF-Rezeptor-beta zeigt, s.u.). Im Gegensatz zu perivaskulären glatten Muskelzellen werden Perizyten und Endothelzellen von der gleichen Basalmembran umhüllt. Perizyten produzieren eine Fülle von vasoaktiven Substanzen (z.B. Angiopoietin-1 unter hypoxischen Bedingungen oder nach Stimulation durch VEGF [Park et al. 2003]) und können selbst als Vorläuferzellen von anderen perivaskulären Zellen fungieren. Nach ihrer Lokalisation lassen sich drei Formen von Perizyten unterscheiden: präkapilläre, kapilläre und postkapilläre. Nur die prä- und postkapillären Perizyten exprimieren  $\alpha$ -smooth muscle actin [Nehls et al. 1991]. Je höher der Blutdruck und je dichter die Endothelzellbarriere ist, desto mehr Perizyten finden sich pro Kapillarfläche (so ist der Perizytenbesatz in den Netzhautkapillaren relativ hoch [Sims 1986]). Außerdem fördert ein niedriger O<sub>2</sub>-Partialdruck das Wachstum von Perizyten [Schor et al. 1986]. Perizyten wirken stabilisierend auf das Gefäßsystem; so haben sie auf Endothelzellen antiproliferativen Einfluß [Orlidge et al. 1987; Miyazato et al. 1991] und vermindern ihre Migration [Sato et al. 1989]. Es ist bekannt, daß von Endothelzellen gebildeter PDGF-B (*platelet-derived growth factor*) [Collins et al. 1985, Mudhar et al. 1993] positiven Einfluß auf die Rekrutierung und Proliferation von Perizyten hat [Heldin et al. 1992]. Perizyten aktivierter Gefäße (z.B. Wundheilung) exprimieren verstärkt PDGF-Rezeptor-beta [Sundberg et al.

1993]. PDGF-B/PDGF-Rezeptor-beta *knock out* Mäuse zeigen eine starke Abnahme des Perizytenbesatzes der Netzhautkapillaren. Perizytenabfall wiederum bewirkt eine Instabilisierung und Schwächung der Gefäßwand, es kommt zur Ausbildung von Gefäßanomalien wie Mikroaneurysmen und sog. azellulären Kapillaren, in denen die Endothelzellen abgestorben sind [Enge et al. 2002, Hammes et al. 2002, Hellström et al. 2001, Lindahl et al. 1997]. Das Abfallen von Perizyten wird folglich bei verschiedenen mikrovaskulären Erkrankungen beobachtet. So ist es ein frühes pathologisches Ereignis bei der proliferativen diabetischen Retinopathie [Speiser et al. 1968].



### Abb. 1 Auf Kapillaren sitzende Perizyten

**A) Immunologische Darstellung von Perizyten:** Durch Fluorophor-Markierung eines perizyten-detektierenden Antigens (NG-2 CSP [Ozderdem et al. 2002], grün) lassen sich Perizyten gut darstellen. Die Kapillaren fluoreszieren nach TRITC-Isolectin-Immersionfärbung rötlich. Die Perizyten scheinen den Gefäßen „aufzusitzen“ und finden sich u.a. an Gefäßaufzweigungen (Pfeil).

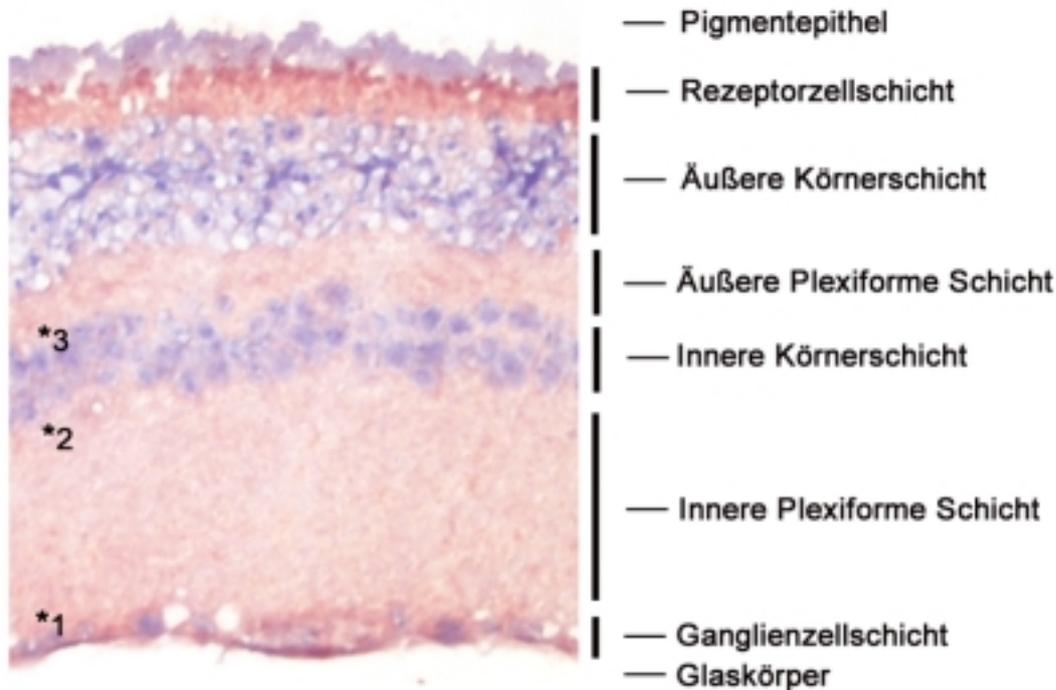
**B) Elektronenmikroskopische Aufsicht:** Man erkennt deutlich die pseudopodienartigen Zytoplasmaausläufer, mit denen der Perizyt die Endothelzellen umschließt. (N = Perizyt ► = Endothel x° = Aufzweigung x. Grades; nach Kühnel, „Taschenatlas der Zytologie“, Thieme Verlag)

## 1.2 Die Netzhaut

### 1.2.1 Bau der Netzhaut

Der Augapfel (*Bulbus oculi*) besteht im Inneren aus der Linse und dem Glaskörper (*Corpus vitreum*), der von drei Häuten umschlossen wird. Im vorderen Bereich sind dies u.a. Hornhaut (*Cornea*), Iris und *Corpus ciliare*. Der hintere Bereich besteht aus Lederhaut (*Sclera*), Aderhaut (*Choroidea*) und Netzhaut (*Retina*). Die Netzhaut gliedert sich in *Stratum pigmentosum* (Pigmentepithel), *Stratum neuroepitheliale* (Rezeptorzellschicht) und *Stratum*

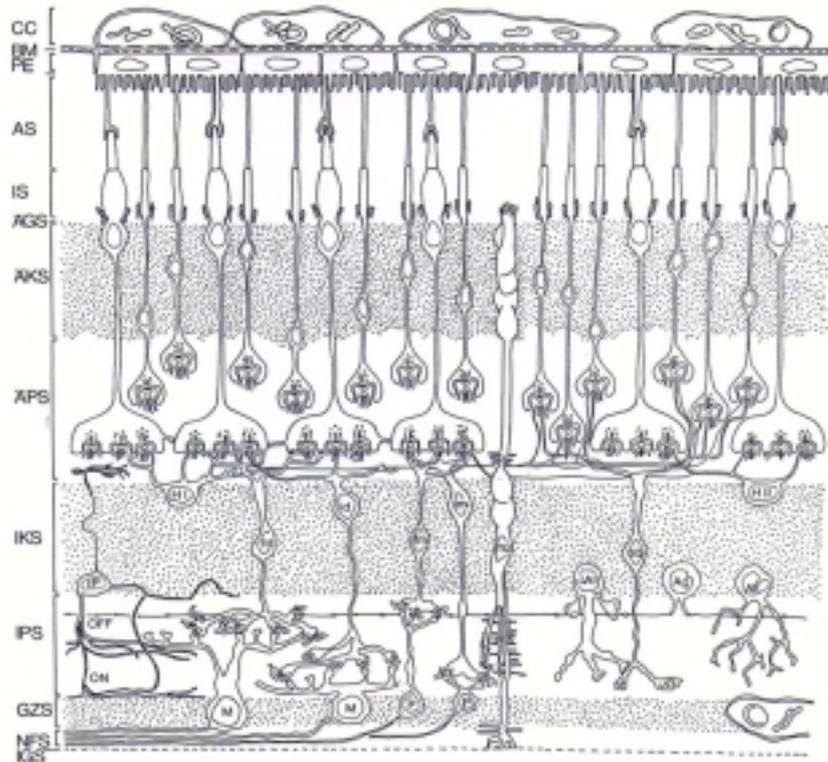
*nervosum* (Plexiforme Schichten, Körnerschichten und Ganglienzellschicht). Die genaue Gliederung des *Stratum nervosum* ist **Abb. 2** zu entnehmen.



**Abb. 2** Transversalschnitt durch die Netzhaut

Transversalschnitt durch die Netzhaut einer Maus. Die Hematoxylin-Färbung zeigt die verschiedenen Zellschichten; deutlich heben sich die Perikarien der unterschiedlichen Neuronen in den Körnerschichten hervor. Die Sterne markieren die drei Gefäßnetze (1 = oberflächliche Gefäßnetz der Ganglienzellschicht, 2 = mittleres Kapillarbett der inneren plexiformen Schicht, 3 = tiefes Kapillarbett der inneren Körnerschicht).

Während der Embryogenese stülpt sich das diencephale Augenbläschen ein und wird zum Augenbecher mit seinem inneren und äußeren Blatt, aus dem sich das Pigmentepithel und die Retina entwickeln. Wegen dieser Inversion der Retina müssen die einfallenden Lichtquanten das gesamte *Stratum nervosum* durchtreten, bevor sie die eigentlichen Photorezeptoren erreichen. Die Plexiformen Schichten repräsentieren die Zellfortsätze der Neuronen, wohingegen die Körnerschichten die Perikaryen dieser Zellen darstellen. Neben den Neuronen, die der Signalverarbeitung und Weiterleitung dienen (Stäbchen, Zapfen, Bipolarzellen, Horizontalzellen, amakrine Zellen und Ganglienzellen) gibt es noch die interplexiformen Zellen und die Müller Zellen (s. **Abb. 3**). Dies sind Gliazellen, die sich durch die gesamte Netzhaut strecken und Stützfunktion haben.



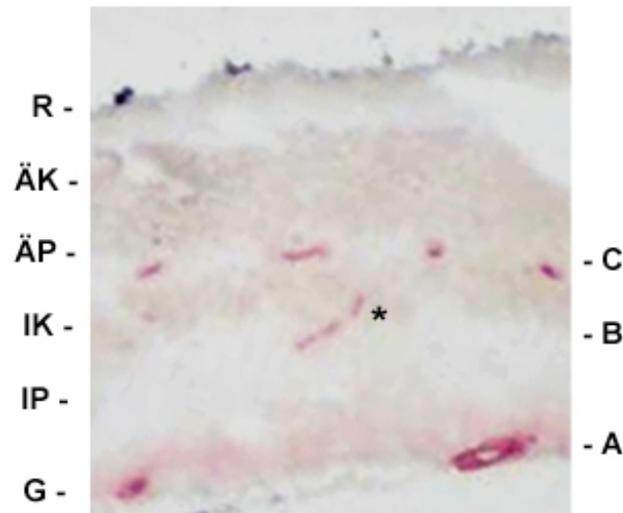
**Abb. 3 Schematische Darstellung verschiedener Zelltypen der Retina und die von ihnen gebildeten Schichten**

Dargestellt sind die unterschiedlichen Zelltypen und ihre Verschaltung innerhalb der Netzhaut. (**Mz** = Müller Zelle, **H** = Horizontalzelle, **A** = amakrine Zelle, **NFS** = Nervenfaserschicht, **GZS** = Ganglienzellschicht, **IPS** = innere plexiforme Schicht, **IKS** = innere Körnerschicht, **ÄPS** = äußere plexiforme Schicht, **ÄKS** = äußere Körnerschicht, **IS** = innere Schicht der Rezeptorzellschicht, **AS** = äussere Schicht der Rezeptorzellschicht, **PE** = Pigmentepithel, **BM** = Basalmembran, **CC** = Choroidale Zellen (aus Benninghoff, „Lehrbuch der Anatomie“, Urban & Schwarzenberg)

### 1.2.2 Vaskuläre Versorgung der Netzhaut

Die vaskuläre Versorgung der Retina erfolgt durch zwei Gefäßsysteme (s. **Abb. 5**): Der äußere Bereich der Netzhaut wird bis zur äußeren Begrenzung der inneren Körnerschicht durch Diffusion von einem Kapillarnetz der Choroidea (*Lamina choriocapillaris*) versorgt. Dieses Gefäßnetz speist sich zum einen aus den *Aa. Ciliares posteriores breves*, die aus der Tiefe der Aderhaut (*Choroidea*) entspringen, zum anderen aus rekurrierenden Gefäßästen der *Aa. Ciliares anteriores* sowie *Aa. ciliares posteriores longae* aus dem Bereich der *ora serrata*. Die Sauerstoffdiffusion erfolgt durch die Bruch'sche Membran, welche die Choroideakapillaren von dem Pigmentepithel der Retina trennt und somit an der Aufrechterhaltung der Blut-Retina-Schranke (Barriere zwischen systemischem Blutfluß und der Netzhaut) beteiligt ist. Die inneren Schichten der Netzhaut erhalten ihre Blutversorgung aus insgesamt vier Hauptästen der *A. centralis retinae*, die zentral aus dem *N. opticus* austritt. Die größeren Gefäße liegen innerhalb der Ganglienzellschicht. Die Vaskularisierung der

gesamten Netzhaut erfolgt durch Aussprossen von Endothelzellen entlang eines Astrozytennetzwerkes via Angiogenese [Gariano 2003, Fruttiger 2002]. Von dort aus sprießen kleinere Gefäße in die Tiefe und bilden das mittlere (innere plexiforme Schicht) und das tiefe Kapillarnetz (Übergang innere Körnerschicht zu äußerer plexiformen Schicht) zwischen Tag P8 (8. postnataler Tag) und P12.

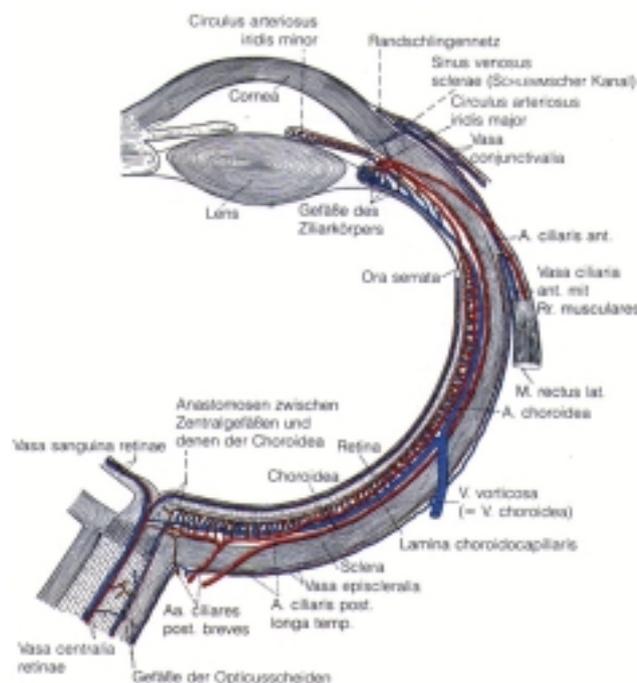


#### Abb. 4 Gefäßebenen der Netzhaut

In der Immunhistologischen Abbildung sind die einzelnen Schichten der Netzhaut und die darin verlaufenden Gefäßbetten (rot) zu sehen. Der Stern markiert eine Kapillare, die das mittlere mit dem tiefen Kapillarnetz verbindet (G = Ganglienzellschicht, IP = innere plexiforme Schicht, IK = innere Körnerschicht, ÄP = äußere plexiforme Schicht, ÄK = äußere Körnerschicht, R = Rezeptorzellschicht, A = Lage der oberflächlichen Gefäße, B = Lage der mittleren Kapillaren, C = Lage der tiefen Kapillaren). (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Frau Dr. Jihong Lin)

Der bei der korrekten Vaskularisierung der Retina beteiligte Astrozytenverband exprimiert VEGF-A (*vascular endothelial growth factor-A*). Die an der Spitze der „sprouts“ gelegene „tip cell“ bildet Filopodien aus, auf denen VEGF-Rezeptor-2 (Flk-1) nachweisbar ist. Die tip cell erfasst und „orientiert sich“ mit Hilfe der Filopodien entlang eines VEGF-A Gradienten [Gerhardt et al 2003, Dorrell, et al. 2002]. Die eigentliche Proliferationszone liegt hinter der tip cell in Form der sogenannten „stalk cell“, welche durch die Proliferation auch zur Ausbildung des eigentlichen Gefäßlumens führt. In der Maus ist die Vaskularisierung an Tag P18 endgültig abgeschlossen. Die ausgereiften Kapillaren bestehen im Querschnitt aus einem einzelligen Endothelzellverband, der von Perizyten umgeben ist. Die Reifung der Netzhautgefäße geht von einem dichten embryonalen Gefäßplexus aus, der aus Endothelzellverbänden besteht und bereits sehr früh fertiggestellt ist. Dieses Kapillarnetz soll nach bisheriger Meinung erst nach einem gewissen Zeitraum von Perizyten besiedelt werden

[Benjamin et al. 1998] (primäre Aufzweigungen an Tag P10, sekundäre und tertiäre Aufzweigungen an Tag P18). Dabei würden  $\alpha$ -smooth-muscle-actin positive Zellen (Perizyten-Vorläuferzellen) in arterio-venöser Richtung entlang der Arteriolen auf die Kapillaren zu wandern. In dem Zeitfenster, in dem das Gefäßnetz keinen Perizytenbesatz besitzt, wären die Kapillaren nach dieser Theorie für bestimmte Reize anfällig, nach späterer Auflagerung von Perizyten jedoch nicht mehr. So käme es nach Beginn verstärkter Gefäßdurchblutung in der Netzhaut zu physiologischer relativer Hyperoxie, was zu einem Verschluss und einer Regression von Gefäßen führen würde. VEGF antagonisiere diesen Effekt und beschleunige die Perizyten-Rekrutierung, wirke somit protektiv auf das unreife Kapillarnetz. Neuere Studien hingegen widerlegen diese Theorie und zeigen, dass sich Perizyten bereits auf den aktiv aussprossenden Gefäßen befinden und die Endothelzellen nicht erst sekundär von perivaskulären Zellen besiedelt werden [Gerhardt et al. 2003].



### Abb. 5 Gefäßversorgung der Netzhaut

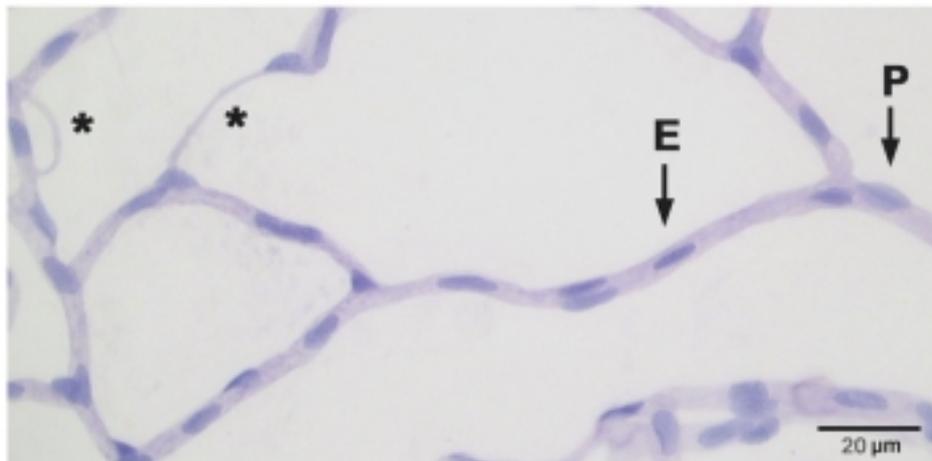
Die Zeichnung zeigt die vaskuläre Versorgung des Auges. Hervorzuheben ist die *Arteria centralis retinae*, die aus dem Zentrum des *Nervus opticus* entspringt und die inneren Schichten der Netzhaut versorgt. Die Versorgung des äußeren Gewebes erfolgt durch Diffusion aus den *Aa. Ciliares*. (nach Benninghoff, Lehrbuch der Anatomie, Urban & Schwarzenberg)

## 1.3 Die Diabetische Retinopathie

Diabetes mellitus („honigsüßer Durchfluss“) ist eine endokrinologische Erkrankung, die in zwei Formen auftritt. Der seltenere Typ 1 betrifft vor allem junge Menschen und geht mit

einem autoimmunvermitteltem absoluten Insulinmangel einher. Typ 2 ist mit weiteren Stoffwechselerkrankungen (Adipositas, Hypertonie, Dyslipoproteinämie, Hyperurikämie) Bestandteil des „Metabolischen Syndroms“ der heutigen Überflußgesellschaft. Pathogenetisch handelt es sich hierbei um einen relativen Insulinmangel (Sekretionsstörung), vergesellschaftet mit einer peripheren Insulinresistenz [Ginsberg 2000]. Beide Typen gehen mit einer ausgeprägten Hyperglykämie einher, die letztlich zu Mikro- und Makroangiopathien führen kann [UKPDS 1998]. Die Makroangiopathie zeigt sich in arteriosklerotisch veränderten Gefäßen, die zu den klinischen Zeichen der koronaren Herzkrankheit (KHK), des Hirnschlags (Apoplex) oder der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) führen können.

Die Mikroangiopathie offenbart sich hauptsächlich als Glomerulosklerose (Kimmelstiel-Wilson), Neuropathie und Retinopathie. Ein sehr frühes morphologisches Zeichen der Diabetischen Retinopathie ist verminderter Zell-Zellkontakt zwischen Endothelzellen und perivaskulären Zellen mit anschließendem Perizytenabfall von den Kapillaren [Cogan et al. 1961, Speiser et al. 1968, Dodge et al. 1992].



### Abb. 6 Azelluläre Kapillare

Die Abbildung zeigt bei starker Vergrößerung Kapillaren der Netzhaut nach Digestion und PAS-Färbung. Aufgrund der verschiedenen Färbeeigenschaften kann man Endothelzellen von Perizyten unterscheiden. Merkmale von Perizyten sind neben dem bevorzugten Sitz an Gefäßgabelungen die blässere Färbung des Cytoplasmas und die „Stufenbildung“ durch Aufsitzen auf den Endothelzellen. Deren Kern zeigt in der PAS-Färbung eine intensivere Färbung und ist mehr lang als breit. Weiterhin erkennt man zwei azelluläre Kapillaren, die aufgrund von Gefäßokklusion ihre Funktion eingebüßt haben (E = Endothelzellkern, P = Perizyt, \* = azelluläre Kapillare).

Hohe Glukosekonzentrationen führen zu verschiedenen Stoffwechselveränderungen (s.u.); so werden z.B. *advanced glycation end products* (AGEs) durch nichtenzymatische

Glykosylierung gebildet und letztlich auch die Expression von NF- $\kappa$ B (*nuclear factor-kappaB*) in den Perizyten erhöht, die daraufhin apoptotisch zugrunde gehen [Romeo et al. 2002]. Im späteren Stadium der diabetischen Retinopathie folgt die Ausbildung von Mikroaneurysmen und sog. azellulären Kapillaren (s. **Abb. 6**); zusätzlich kommt es zu einer Verdickung der Basalmembran [Engerman et al 1989, Hammes et al. 2002]. Die Gabe von Antioxidantien wie z.B. Vitamin E und Vitamin C [Kowluru et al.2001] oder Aldose Reduktase Inhibitoren [Kador et al. 1988] verringern im Experiment die Degeneration von Perizyten und reduzieren die Ausbildung von azellulären Kapillaren.

Durch Erhöhung der Gefäßpermeabilität kommt es im weiteren Verlauf zu intravitrealen, hämorrhagischen Blutungen (s. **Abb. 7**) und Netzhautödemen [Moss et al. 1988].

Die beschriebenen Gefäßanomalien führen u.a. zu Ablösung der Netzhaut oder zur Ischämie (Blutleere) bestimmter Netzhautbezirke. Die resultierende Hypoxie induziert die Expression von VEGF, was zu verstärkter Neovaskularisierung der Retina führen kann. So kommt es in Patienten, die über Jahre an manifestem Diabetes mellitus Typ 1 leiden, im fortgeschrittenen Stadium über die krankhaften Veränderungen der Netzhautgefäße in vielen Fällen zur Erblindung [Klein et al. 1984].



### **Abb. 7 Augenhintergrundveränderungen bei der diabetischen Retinopathie**

**A)** Neovaskularisierung der Retina: Deutlich ist das neugebildete, pathologische Gefäßsystem zu erkennen, das aus der *A. centralis retinae* fächerförmig entspringt.

**B)** Intravitreale hämorrhagische Blutung: Die flächenhafte Blutung aus insuffizienten Gefäßen führt im Patienten zum Visusverlust oder teilweisen Erblindung. (aus Lang, G. „Augenheilkunde“, Thieme Verlag)

Da die vaskulären Veränderungen des Typ 2 Diabetikers initial ohne belastende klinische Symptome einhergehen und schleichend fortschreiten, wird die Gefährlichkeit dieser Erkrankung in der Bevölkerung oft unterschätzt.

### **1.3.1 Molekulare Mechanismen der Gefäßschädigung durch Hyperglykämie**

Es existieren mehrere Hypothesen, wie Hyperglykämie auf molekularer Ebene zur Schädigung der Gefäße führt [Brownlee 2001, Hammes 2003] (s. **Abb. 8**). Wahrscheinlich sind jedoch alle der unten genannten Stoffwechselwege letztlich Folge der Akkumulation von reaktiven Sauerstoffradikalen und Superoxiden in der Atmungskette [Nishikawa et al. 2000]. Im einzelnen kommt es aufgrund der Hyperglykämie zu einer Zunahme des Stoffumsatzes im Citratzyklus. Daraus folgt eine Anreicherung der Protonendonatoren NADH und FADH<sub>2</sub>. Diese verstärken das elektrochemische Potential der oxidativen Phosphorylierung (den Protonengradient über die innere Mitochondrienmembran der Atmungskette), was letztlich zu einer verstärkten Bildung von Superoxiden führt. Diese führen über die Hemmung der Glycerinaldehyd-3-Phosphatase in der Glykolyse wiederum zu einem Anstieg von intermediären Stoffwechselprodukten („C<sub>3</sub>-Zucker“), die über alternative pathogene Stoffwechselwege auch zu den vaskulären Erscheinungsbildern des Diabetes mellitus führen (s.u.). Die pathologische Anreicherung dieser „C<sub>3</sub>-Zucker“ in der Glykolyse kann durch Benfotiamin (fettlösliches Thiamin-Derivat) verhindert werden [Hammes et al. 2003], indem die Zucker durch Aktivierung einer Transketolase in „harmlose“ Produkte überführt werden, und somit nicht mehr als Substrat für die pathogenen Stoffwechselwege zur Verfügung stehen.

### **Erhöhter Glukoseumsatz im Polyol-Stoffwechselweg**

Bei Hyperglykämie kommt es über Aktivierung der Aldolreduktase unter Verbrauch von NADPH zu einer verstärkten Umwandlung von Glukose zu Sorbitol. Sorbitol selbst ist schlecht membrangängig und verursacht intrazellulär osmotischen Stress, wird aber unter Umwandlung von NAD<sup>+</sup> in NADH weiter zu Fructose oxidiert. Eine erhöhte NADH-Konzentration führt ihrerseits wiederum zur Inhibierung der GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase), was in einer Akkumulierung von Triosephosphaten mündet [Williamson et al. 1993]. Diese wiederum begünstigen die Bildung von advanced glycation end products (AGEs) und Diacylglycerin (DAG), was wiederum die Proteinkinase C aktiviert (s.u.). Eine durch die Aktivierung der Aldolreduktase induzierte Verminderung von

reduzierendem NADPH benachteiligt die Genese von reduziertem Glutathion, was im Cytosol zur Verminderung von oxidativem Stress gebraucht wird.

### **Bildung von *Advanced glycation end products* (AGEs)**

Desweiteren finden sich in den Gefäßen diabetischer Tiere (und Patienten) erhöhte Mengen von *advanced glycation end products* (AGEs) [Stitt et al. 1997]. Diese werden durch intrazelluläre Hyperglykämie gebildet [Degenhardt et al. 1998]. Das geschieht zum einen durch Autooxidation von Glukose zu Glyoxal [Wells-Knecht et al. 1995], zum anderen durch Bildung von Spaltprodukten der Triosephosphate (Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Dihydroxyaceton-Phosphat) [Thornalley 1990]. Glyoxal und die Triosephosphat-Spaltprodukte reagieren mit den Aminogruppen bestimmter Proteine letztlich zu den eigentlichen AGEs. Diese modifizieren Komponenten der extrazellulären Matrix, was zu einer erhöhten Plasmafiltration durch die A. carotis [Huijberts et al. 1993] und zur Verminderung der Endothelzelladhäsion führt [Haitoglou et al. 1992]. Auch führt nichtenzymatische Glykosylierung direkt zu Veränderungen der endothelialen Basalmembran. Desweiteren bewirken AGEs über Bindung an endotheliale AGE-Rezeptoren die Synthese von reaktiven Sauerstoffradikalen, eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B, indirekt den programmierten Zelltod von Perizyten [Yamagishi et al. 2002] und verstärkte Expression von VEGF [Lu et al. 1998] und Angiopoietin-2 [Okamoto, et al. 2002]. Weiterhin führen bestimmte AGE-Inhibitoren, wie z.B. Aminoguanidin, zu einer Verminderung der mikroangiopathischen Veränderungen im Auge [Hammes et al. 1991].

### **Aktivierung der Proteinkinase C**

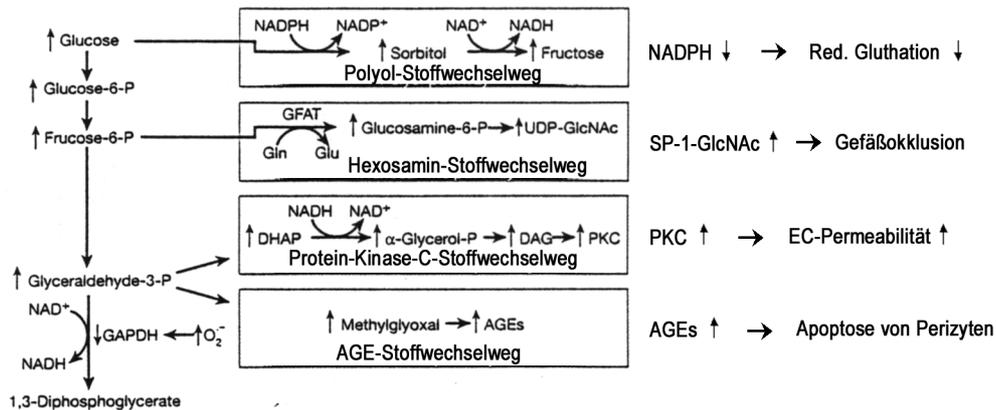
Hyperglykämie führt weiterhin zu einer Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) über verstärkte intrazelluläre Synthese von DAG [Koya et al. 1998] oder durch Aktivierung von AGE-Rezeptoren [Portilla et al. 2000]. Diese Vorgänge bewirken u.a. abnormen Blutfluss innerhalb der Netzhaut [Ishii et al. 1996] und erhöht die Permeabilität von Endothelzellen [Hempel et al. 1997].

### **Vermehrter Hexoseamin-Stoffwechsel**

Letztlich kann Hyperglykämie über Einschleusung von Fructose-6-Phosphat in den Hexoseamin-Stoffwechselweg positiven Einfluß auf die Expression gefäßschädigender Substanzen nehmen. So kommt es zu einer Glykosylierung des Transkriptionsfaktors SP-1,

was daraufhin zu einer verstärkten Expression von TGF- $\beta$  [Kolm-Litty et al. 1998] und PAI-1 führt [Du et al. 2000, Chen et al. 1998, Kadonaga et al. 1988]. TGF- $\beta$  verursacht eine Überproduktion von extrazellulärer Matrix, die eine Gefäßokklusion zur Folge hat.

Die Entgiftung gefäßschädigender Substanzen erfolgt über das Glyoxalase-System. So kommt es zu einer Blockade der Hyperglykämie-induzierten Angiopoietin-2 Expression in der Netzhaut, wenn die Glyoxalase überexprimiert wird.



### Abb. 8 Molekulare Mechanismen der Zellschädigung durch Hyperglykämie

Das Schema zeigt die verschiedenen Stoffwechselprodukte des Glukoseabbaus und ihre intrazelluläre Wirkung (Details s. Text). Die gemeinsame Ursache des erhöhten Durchsatzes der pathogenen Stoffwechselwege ist die unphysiologische Akkumulation von reaktiven Superoxiden in der Atmungskette der Mitochondrien. (modifiziert nach Brownlee et al. 2001).

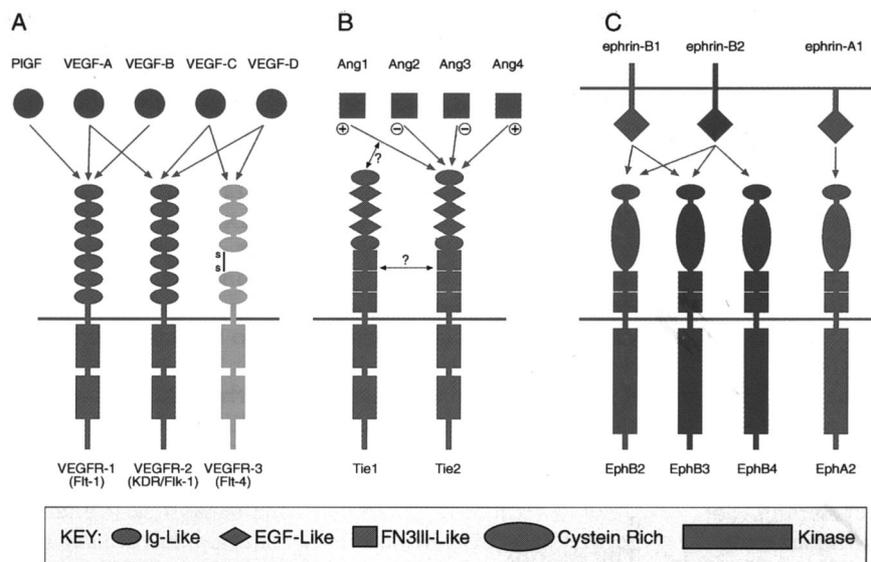
Wie beschrieben, existieren verschiedene Erklärungen für den gefäßschädigenden Effekt chronischer Hyperglykämie. Allerdings sind die dargestellten Mechanismen letztlich nicht endgültig bewiesen. So konnte in einer anderen Studie gezeigt werden, daß hohe Glukose-Konzentrationen und Gabe von AGEs zu keiner oxidativen Schädigung und Absterben von Perizyten führen [Assero 2001]. Allerdings spricht vieles dafür, daß die vier dargestellten Mechanismen in der Pathogenese der diabetischen Angiopathie eine entscheidende Rolle spielen und letztlich auf die erhöhte Synthese von Superoxiden in der Elektronentransportkette der Mitochondrien zurückzuführen sind.

## 1.4 Regulation von Endothelzellfunktion durch Rezeptortyrosinkinasen

Als membranständige Proteine leiten Rezeptortyrosinkinasen nach Bindung ihres Liganden Information weiter in das Zellinnere. Die extrazelluläre Bindung des Liganden führt in der Regel zur Dimerisierung und anschließenden Autophosphorylierung des Rezeptors auf seiner

cytoplasmatischen Seite [Schlessinger et al. 1992]. Über intrazelluläre Signaltransduktionsketten wird letztlich die Transkriptionsrate einer ganzen Reihe von Genen verändert, deren Expression wiederum für bestimmte Eigenschaften oder Funktionen der Endothelzelle verantwortlich sind. Regulativen Einfluß auf die Wirkung der Rezeptortyrosinkinasen kann neben der Veränderung ihrer Expressionsrate auch die regulierte Dephosphorylierung durch Phosphotyrosinphosphatasen (wie z.B. VE-PTP) oder die proteolytische Abspaltung der Extrazellulärdomänen haben [Jeffers et al. 1997; Vecchi et al. 1996, Reusch et al. 2001].

Im Folgenden werden Gruppen von Rezeptortyrosinkinasen vorgestellt, die Einfluß auf das vaskuläre System haben (s. **Abb. 9**). Der Focus ist jedoch auf die Tie-Rezeptortyrosinkinasen und ihre Liganden, die Angiopoietine, gerichtet, da in dieser Arbeit die Wirkung eines Angiopoietins auf das Gefäßsystem untersucht werden soll.



**Abb. 9 Rezeptortyrosinkinasen der Endothelzellen mit ihren jeweiligen Liganden**

Abgebildet sind einige der bei Gefäßprozessen beteiligten Rezeptortyrosinkinasen-Familien.  
**A)** Die Vertreter der VEGF (*vascular endothelial growth factor*) mit den entsprechenden Rezeptoren.  
**B)** Die Angiopoietine mit den Tie-Rezeptoren (*tyrosine kinases with Ig and EGF homology domains*).  
**C)** Die Ephrine und ihre jeweiligen Bindungspartner. (nach Gale et al. 1999).

### 1.4.1 VEGF bindende Rezeptortyrosinkinasen

Einfluß auf die Gefäßentwicklung und Funktion haben im Besonderen Mitglieder der gefäßendothelspezifischen *vascular endothelial growth factor*-Rezeptoren (VEGFR-1 [Flt-1], VEGFR-2 [Flk-1/KDR] und VEGFR-3 [Flt-4]) [de Vries et al. 1992; Joukov et al. 1996;

Millauer et al. 1993; Terman et al. 1992], wobei VEGFR-3 im adulten Säugetier bevorzugt in lymphatischem Endothel exprimiert wird [Kukk et al. 1996]. Für die genannten Rezeptoren existieren 6 bekannte Liganden, PlGF sowie VEGF-A bis -E, von denen der am besten untersuchte VEGF-A an Flt-1 und Flk-1 bindet. VEGF-A wirkt über Flk-1 mitogen und chemotaktisch auf Endothelzellen [Waltenberger et al. 1994, Ferrara et al. 1992] und ist *in vivo* zunächst unverzichtbar für eine korrekte Vaskulogenese während der Embryonalentwicklung [Shalaby et al. 1995; Carmeliet et al. 1996; Ferrara et al. 1996]. Außerdem konnte gezeigt werden, daß VEGF die Permeabilität von Gefäßen erhöht [Berse et al. 1992, Conolly et al. 1992] und in Anwesenheit von Angiopoietin-2 Angiogenese induziert [Asahara et al. 1998]. Unter Einfluß von AGEs [Lu et al. 1998] oder hypoxischen Bedingungen [Shweiki et al. 1992, Pierce et al. 1995] wird VEGF in der Netzhaut hochreguliert. Dies führt zu verstärkter Neovaskularisation im Auge. Dieser Effekt konnte ebenfalls nach Überexpression von VEGF in der Retina beobachtet werden [Okamoto et al. 1997, Ohno-Matsui et al. 2002]. Wird VEGF jedoch inhibiert, kommt es zu einer verminderten Neovaskularisation innerhalb der Netzhaut [Aiello et al. 1995]. VEGF beschleunigt weiterhin indirekt die Perizyten-Rekrutierung und kann somit protektiv auf das unreife Kapillarbett der Netzhaut wirken [Benjamin et al. 1998]. Zusätzlich beeinflusst VEGF das Tie-System, indem es förderlich auf die proteolytische Abspaltung der Tie-1 Extrazellulärdomäne und damit die Erzeugung löslicher Rezeptoreinheiten wirkt [Yabkowitz et al. 1999], sowie zur Expression eines inkompletten Tie-1 Rezeptors in Endothelzellen führt [Tsiamis et al. 2002]. (Zum Überblick über die VEGF-Familie: s. Neufeld et al. 1999, Carmeliet und Collen, 1999).

### **1.4.2 Eph Rezeptortyrosinkinasen und die Ephrine**

Neben den genannten RTKs existiert weiterhin die große Gruppe der Eph-Rezeptoren mit 14 Vertretern bei Säugetierspezies, sowie deren Liganden, den Ephrinen. Die 8 bekannten Ephrine werden in zwei Gruppen unterteilt, die Ephrin A und B Untergruppen [Gale et al. 1996]. Die Ephrine wirken dabei nicht als lösliche Liganden, sondern sind membranassoziiert [Davis et al. 1994], wodurch ein bidirektionales *signaling* zwischen Zellen möglich wird [Holland et al. 1996]. Die Ephrine und ihre Rezeptoren werden nicht nur auf Endothelzellen exprimiert, sondern sind auch in Neuronen bei der Axonausbildung und Zielfindung [O'Leary et al. 1999] sowie bei vielen morphogenetischen Prozessen während der Embryonalentwicklung beteiligt. Während der embryonalen Gefäßentwicklung spielen sie

aufgrund der Membranständigkeit sowohl des Rezeptors als auch des Liganden eine bemerkenswerte Rolle. Es konnte gezeigt werden, daß Ephrin-B2 im arteriellen System exprimiert wird, sein Rezeptor, EphB4 (der ausschließlich Ephrin-B2 bindet), jedoch im venösen System nachweisbar ist [Wang et al. 1998]. Ephrin-B2 spielt nachweislich bei der Gefäßplexusbildung im Dottersack sowie im Gehirn und dem nachfolgenden Gefäßumbau eine Rolle, was *knock out* Studien (Ausschalten der betreffenden Gene) zeigen [Wang et al. 1998]. Die auftretenden Defekte ähneln denen, die auftreten, wenn Angiopoietin-1 oder sein Rezeptor, Tie-2, ausgeschaltet wird [Sato et al. 1995, Suri et al. 1996].

### 1.4.3 Tie Rezeptortyrosinkinasen

Als weitere Familie der Rezeptortyrosinkinasen mit Einfluß auf das kardiovaskuläre System sind die im adulten Tier endothelzellspezifischen *tyrosine kinases with Ig and EGF homology domains* 1 und 2 (Tie-1 bzw. Tie-2) zu nennen. Der Aufbau der Rezeptortyrosinkinasen ist Abb. 9 zu entnehmen. Tie-1 wird u.a. während der Embryogenese exprimiert [Sato et al. 1993], Liganden für diese Rezeptortyrosinkinase sind nicht bekannt; Tie-1 *knock out* Mäuse zeigen einen letalen Phänotyp mit starken Hämorrhagien und defekter Gefäßintegrität [Patan 1998, Puri et al. 95, Sato et al. 95]. Tie-2 hingegen exprimieren sämtliche Endothelzellen eines Organismus in allen Entwicklungsstadien, wobei die Expression in bereits etablierten Gefäßen geringer ist. Größere Gefäßen exprimieren in Relation zu kleineren jedoch stärker [Dumont et al. 1992; Schnürch und Risau 1993]. Während der Tumorangio-genese wird die Tie-2 Expression hochreguliert [Wong et al. 1997, Peters et al. 1998, Takahama et al. 1999]. Für die gefäßspezifische Expression des Tie2-Gens ist eine 303 Bp große Sequenz innerhalb des im ersten Intron gelegenen Enhancers alleine ausreichend [Schläger 1998].

Durch Bindung eines Liganden dimerisiert der Rezeptor. Dabei kann es offenbar auch zu heterotypischen Interaktionen zwischen Tie-1 und Tie-2 kommen [Marron et al. 2000]. Ist der Ligand aktivierend, wird die Rezeptortyrosinkinase anschließend autophosphoryliert. Somit wird der downstream gelegene, intrazelluläre Signalweg aktiviert. Als erstes bindet Dok-R an den phosphorylierten Tie-2 Rezeptor. Ein weiterer *second messenger*, Nck, bindet Dok-R und aktiviert die p21-aktivierende Kinase (Pak) [Master et al. 2001].

Tie-2 *knock out* Mäuse zeigen einen unvollkommenen Umbau („remodelling“) von Gefäßen in dem Plexus des Dottersacks und des Gehirns sowie unzureichende Trabekularisierung des Herzens. Die Tiere versterben zwischen Tag E9.5 und E10.5 [Dumont et al. 1994; Sato et al. 1995; Suri et al. 1996]. Die VEGF-abhängige, zu einem einfachen Gefäßnetz führende

Vaskulogenese ist von einem Tie-2 oder *Ang1-knock out* nicht betroffen. Das Angiotensin/Tie-System ist somit entscheidend für den Umbau, die Reifung und die Stabilisierung des kardiovaskulären Systems. Weiterhin bewirkt VEGF die Ausbildung zweier verschiedener Formen des Tie-1/Tie-2 Heterodimers in Endothelzellen [Tsiamis et al. 2002]. Intravitreale Injektion von löslichem Tie2 (sTie2-Fc) verhindert im Maus-Modell Ischämie-induzierte Neovaskularisierung der Netzhaut [Takagi et al. 2003]. Die lösliche Form kommt allerdings auch physiologischer Weise im Organismus vor und ist in Patienten mit koronarer Herzkrankheit erhöht [Chung et al. 2003].

### 1.4.4 Die Angiotensine

Liganden für Tie-2 sind die Angiotensine [Davis et al. 1996], von denen vier verschiedene Vertreter bekannt sind, die alle an Tie-2 binden. Die Bindung erfolgt über die C-terminale, fibrinogen-ähnliche Domäne der Angiotensine, die Oligomerisierung über ihre N-terminale coiled-coil Domäne. Ang-2 ist ein glykosyliertes, 75 kD großes Protein, das aus 496 Aminosäuren besteht und mit Angiotensin-1 ca. 60% Homologie zeigt. Es wird von Endothelzellen gebildet, in Weibel-Palade-Körpern gespeichert [Fiedler et al. 2004] und wirkt autokrin auf seinen endothelzellspezifischen Rezeptor, vornehmlich nach Bildung von Homodimeren und deren Multimeren [Procopio et al. 1999]. Die Sequenz des humanen Angiotensin-2 ist zu 85% mit der des murinen Proteins identisch. Expression von Angiotensin-2 findet sich physiologischer Weise in Bereichen, wo Gefäßumbau stattfindet. So z.B. während der Vaskularisierung der Netzhaut (s.u.), bei der Neuorganisation von Gefäßen des Ovars im weiblichen Reproduktionszyklus [Maisonpierre et al. 1997, Goede et al. 1998], oder in den Gefäßen von Tumoren [Stratmann et al. 1998, Holash et al. 1999]. Angiotensin-1 hingegen wird von mesenchymalen Zellen gebildet, wirkt somit parakrin und ist während der Embryogenese und im adulten Organismus am stärksten im Herzen exprimiert [Suri et al. 1996, Maisonpierre et al. 1997, Gale et al. 2002]. Es assoziiert zu Homotrimeren und entsprechenden Multimeren [Procopio et al. 1999]. Eine gentechnisch synthetisierte Variante von Angiotensin-1 (Ang-1\*) bildet keine Multimere, kann aber dennoch Tie-2 aktivieren [Maisonpierre et al. 1997]. Das murine Angiotensin-3 und das humane Angiotensin-4 werden von entsprechenden Genloci auf den syntenen Abschnitten der jeweiligen Maus und menschlichen Chromosomen kodiert, jedoch stimmen die beiden Proteine in ihrer Aminosäuresequenz letztlich nur zu 54% überein [Valenzuela et al. 1999], was sich auch in ihren unterschiedlichen Auswirkungen auf Tie-2 widerspiegelt. Der

überwiegende Teil aktueller Publikationen zu den Angiopoietinen behandelt jedoch Angiopoietin-1 und Angiopoietin-2.

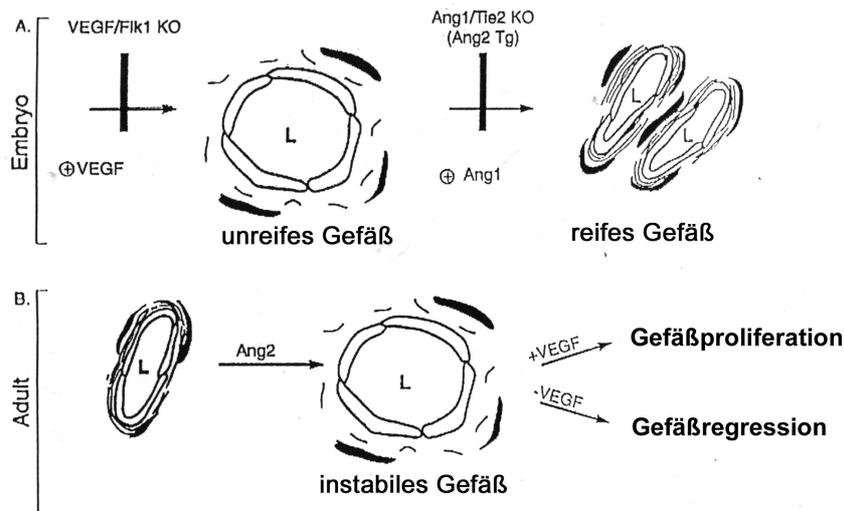
In Blutgefäßen bewirken ausschließlich Angiopoietin-1 und Angiopoietin-4 über die Bindung an Tie-2 eine Phosphorylierung des Rezeptors. Nach Bindung von Angiopoietin-2 kommt es dagegen zu keiner Aktivierung. Angiopoietin-2 vermag dies nur *in vitro* nach 24h Inkubation von HUVECs oder in mit Tie-2 DNA transfizierten Fibroblasten [Teichert-Kuliszewska et al. 2000, Maisonpierre et al. 1997]. Vielmehr reduziert Angiopoietin-2 die durch Angiopoietin-1 induzierte Phosphorylierung von Tie-2 und könnte so antagonistisch auf die Ang1 vermittelte Gefäßstabilisierung wirken [Maisonpierre et al. 1997]. Im Lymphsystem spielt Angiopoietin-2 ebenfalls eine wichtige Rolle [Veikkola et al. 2002] und scheint dort als Angiopoietin-1 Agonist zu wirken [Gale et al. 2002]. Expression von Tie-2 in Lymphendothelzellen konnte bisher allerdings noch nicht gezeigt werden. Das weitere Schicksal der Gefäße mit hoher Ang2 Expression hängt davon ab, ob VEGF ebenfalls hoch reguliert ist. So führt VEGF-Expression in den zuvor durch Ang2 destabilisierten Gefäßen zu Angiogenese und Expression von Matrixmetalloproteasen, die Proteine der Basalmembran abbauen [Etho et al. 2001]. Abwesenheit von VEGF resultiert jedoch in Gefäßregression [Asahara et al. 1998, Maisonpierre et al. 1997, Lobov et al. 2002, Holash et al. 1999]. Auch Angiopoietin-2 erhöht die Expressionsrate der Matrixmetalloprotease MMP-2 [Hu et al. 2003], die Voraussetzung für eine funktionelle Angiogenese ist. Es wird vermutet, daß Angiopoietin-2 auf diese Weise zu einer Destabilisierung der Bindung zwischen perivaskulären Zellen und dem Endothel führt, so daß der mitogene Effekt von VEGF auf das nun instabile Gefäßsystem ein Ausprossen von Kapillarästen bewirkt.

Während der Vaskularisation der Retina via Angiogenese ist Angiopoietin-2 besonders zur Zeit der Ausbildung des tiefen Kapillarbetts ab Tag P8 hochreguliert. Folglich kommt es in Angiopoietin-2 *knock out* Mäusen zu keiner Ausbildung der mittleren und tiefen Kapillarbetten der Netzhaut. Die Etablierung eines oberflächlichen primären Gefäßnetzes findet in den *knock out* Mäusen, wenn auch inkomplett und verzögert, statt. Auch ist die Regression der Hyaloidgefäße nur unvollständig [Hackett et al. 2000, 2002]. Das Lymphgefäßsystem der Angiopoietin-2 *knock out* Mäusen scheint insuffizient, die Tiere entwickeln einen chylösen Aszites. Experimentell konnte in adulten Ratten durch Einsatz von Angiopoietin-2 bindender RNA (Aptamere) die Neovaskularisation im „cornea micropocket assay“ inhibiert werden [White et al. 2003]. Die Expression von Angiopoietin-2 wird, im Gegensatz zu Angiopoietin-1, unter hypoxischen Bedingungen [Hackett et al. 2000, Yuan et

al. 2000, Krikun et al. 2000] sowie unter Einfluß von VEGF [Oh et al. 1999, Park et al. 2003] gesteigert. Auch wird Angiopoietin-2 nach längerer Hyperglykämie in Müllerzellen (persönliche Mitteilung H. P. Hammes), während der Vaskularisierung der Netzhaut in Horizontalzellen [Hackett et al. 2000] und nach TNF- $\alpha$  Stimulation [Kim et al. 2000] verstärkt exprimiert. In Gewebe von Patienten, die unter ischämischen Netzhauterkrankungen leiden, konnte ebenfalls eine verstärkte Expression von Angiopoietin-2 festgestellt werden [Takagi et al. 2003].

Angiopoietin-1 besitzt selbst keinen proliferativen Effekt auf Endothelzellen, hat aber *tubeformation* und *sprouting* (Ausbildung von „Gefäßsprossen“) [Hayes et al. 1999, Koblizek et al. 1998] sowie verstärkte Gefäßbildung nach Überexpression zur Folge. Auch zeigen Tiere, die Angiopoietin-1 überexprimierende Tumoren tragen, einen erhöhten Perizytenbesatz auf den Tumorgefäßen [Stoeltzing et al. 2003]. In anderen Studien hingegen führt Angiopoietin-1 zu einer Stabilisierung neu geformter Gefäße, indem es deren Permeabilität vermindert [Thurston et al. 1999, 2000, Jousen et al. 2002], in Gegenwart von VEGF Perizyten rekrutiert [Asahara et al. 1998] und einen antiapoptotischen Effekt auf Endothelzellen ausübt, der durch gleichzeitige Gabe von VEGF verstärkt wird [Kwak et al. 1999]. Durch Injektion eines Antikörpers gegen PDGF-Rezeptor- $\beta$  und folgendem Perizytenverlust konnte die Ausbildung von Gefäßanomalien induziert werden. Angiopoietin-1 Gabe antagonisiert diesen Effekt und bewahrt die Integrität der Netzhautkapillaren [Uemura et al. 2002].

Die verschiedenen, z.T. gewebsspezifischen Wirkungen der Angiopoietine (s. **Abb. 10**) zeigen, daß das Tie-2/Angiopoietin-System sehr komplex reguliert wird und die Aussage nicht immer gilt, daß Angiopoietin-2 der Antagonist von Angiopoietin-1 ist. So werden außerdem durch alternatives *splicing* mehrere verschiedene Angiopoietin-2 mRNAs zu verschiedenen Isoformen des Proteins translatiert [Kim et al. 2000]. Bekannt ist die Existenz von biologisch unterschiedlich aktiven Isoformen eines Proteins mit Einfluss auf das Gefäßsystem bereits für VEGF [Stalmans et al. 2002]. Für Angiopoietin-2 Isoformen im Huhn konnte gezeigt werden, dass deren C-Terminus (zur Bindung an Tie-2) identisch ist, der N-Terminus (zur Multimerisierung) sich hingegen unterscheidet [Mezquita et al. 2000]. Eine weitere Möglichkeit zur Modifizierung der Angiopoietin-Wirkungen ist die Variation des Rezeptorkomplexes (Tie-1/Tie-2 Heterodimerbildung, proteolytische Abspaltung der Extrazellulärdomäne). Daneben hat die Koexpression von anderen Faktoren, wie z.B. VEGF, einen großen Einfluß auf den resultierenden Effekt einer Angiopoietin-Tie-Interaktion.



**Abb. 10 Zusammenspiel ausgewählter Rezeptoren und Liganden bei der Gefäßbildung im embryonalen und adulten System**

**A)** Das Ausschalten bestimmter Faktoren (senkrechte schwarze Balken) führt während der Embryogenese zu unterschiedlichen Gefäßphänotypen. So unterbleibt im VEGF-R2 K.O. die Ausbildung eines primären Gefäßplexus. Nach Ausschalten von Angiopoietin-1 bzw. Tie-2 ist keine Reifung der Gefäße zu beobachten, das Gefäßnetz ist insuffizient, die Tiere sterben postnatal.

**B)** Im adulten Tier führt Angiopoietin-2 zu einer Auflockerung und Instabilisierung der Gefäße, was diese anfällig für proliferative Stimuli macht oder zur Gefäßregression führt. (L = Lumen) (nach Hanahan, D., 1997)

## 1.5 Die Maus als molekularbiologisches Modell

Um wissenschaftliche Fragestellungen zu beantworten, kann man die Untersuchungen in verschiedenen Bezugssystemen durchführen. So besteht die Möglichkeit, außerhalb eines Organismus mit dessen Zellen oder Geweben *in vitro*-Studien durchzuführen. Diese zeichnen sich durch leichtere Handhabung und meist einfacheren Aufbau der Versuchssituation aus. Nachteil ist, daß einzelne „Funktionseinheiten“ eines Gesamtorganismus aus diesem herausgenommen und vom Kontext isoliert betrachtet werden. So ist nicht sicher, ob Effekte, die sich *in vitro* zeigen, *in vivo* tatsächlich existent sind. Um Studien durchzuführen, die alle Regulationsmechanismen und mögliche Einflüsse eines gesamten Organismus berücksichtigen, wählt man *in vivo*-Experimente. Die in diesen Studien nachgewiesenen Effekte kommen unter Einbeziehung aller zellulären und subzellulären Komponenten eines Gewebes oder Organsystems zustande und sind somit sehr aussagekräftig.

Daher wurde in dieser Arbeit als *in vivo*-Modell die Maus und die Ratte gewählt. Als Angehörige der „echten Mäuse“ (Familie *Muridae*) zeichnen sie sich durch hohe Nachkommenszahl, frühe Fertilität, geringen Platzbedarf und Möglichkeit der Haltung in

Gruppen aus. Somit sind „echte Mäuse“ ein optimales Säugetier-Modell. Die murinen Gewebsstrukturen gleichen zum größten Teil den humanen, so daß sich die gewonnenen Erkenntnisse in einem gewissen Rahmen auch auf den Mensch übertragen lassen, was besonders für die Entwicklung therapeutischer Ansätze Voraussetzung ist. Die durchgeführten Experimente beschränkten sich auf das Auge der Versuchstiere. Dieses Organ entwickelt sich während der Embryogenese aus Teilen des Zwischenhirns und stellt einen Ort verminderter Immunkompetenz da. Daher ist die Expression bzw. intravitreale Injektion von humanem Protein in das Nagetierauge möglich, ohne eine starke immunologische Reaktionen zu provozieren.

Neben den verwendeten Wildtyp-Ratten wurden in dieser Arbeit auch transgene Mäuse verwendet. Zur Schaffung transgener Tiere wird die zu integrierende DNA-Sequenz in linearisierter Form in einen Pronukleus einer befruchteten Maus-Oocyte injiziert. Die Eizelle wird anschließend in den Eileiter einer durch Verpaarung mit einem sterilen Männchen erzeugten pseudoschwangeren Maus retransferiert. Nach der Integration der DNA an einer zufälligen Stelle des Mausgenoms kann sich ein transgenes Tier entwickeln. Sind die Keimzellen dieses Tieres für das Konstrukt transgen, so lassen sich stabile transgene Linien erzeugen.

### 1.6 Ziel dieser Arbeit

Ein sehr frühes Ereignis im Krankheitsbild der Proliferativen Diabetischen Retinopathie ist der Abfall von Perizyten vom Kapillarnetz der Retina. Diesem Vorgang folgen weitere vaskuläre Veränderungen, die letztlich zum klinischen Bild einer diabetischen Mikroangiopathie mit Erblindung des Patienten führen. Ein Vertreter von Rezeptortyrosinkinasen, der bei der Umstrukturierung von Gefäßen eine entscheidende Rolle spielt, ist die endothelzellspezifische Tie-2-Rezeptortyrosinkinase mit ihren Liganden Angiopoietin-1 und Angiopoietin-2. Über Angiopoietin-1 kommt es zu einer Rekrutierung von Perizyten und Stabilisierung von Gefäßen, Angiopoietin-2 bewirkt hingegen eine Instabilisierung und Regression von Gefäßen. Im Tiermodell konnte nachgewiesen werden, daß Angiopoietin-2 zu einer Vergrößerung des Durchmessers von Kapillaren führen kann [Lobov et al. 2002]. Den gleichen Effekt sieht man in PDGF-B *knock out* Mäusen, die Defekte im Perizytenbesatz vieler Gefäße besitzen. Weiterhin zeigen künstlich diabetisch gemachte Ratten sehr früh verstärkte Angiopoietin-2 Expression und zu einem späteren Zeitpunkt

Perizytenabfall von ihren Netzhautkapillaren. Auch ist in diabetischen Mäusen im Vergleich zu nicht-diabetischen Tieren eine Zunahme der Aktivität des Angiopoietin-2 Promoters zu beobachten (Hammes et al. 2004). Zusätzlich konnte im Gewebe von Patienten mit ischämischen Netzhauterkrankungen verstärkte Angiopoietin-2 Expression nachgewiesen werden. All diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß die vermehrte Angiopoietin-2 Expression und der folgende Perizytenabfall in kausalem Zusammenhang stehen könnten. Es ist daher u. a. Ziel dieser Arbeit nachzuweisen, daß Angiopoietin-2 zum Perizytenabfall von den Netzhaut-Kapillaren führt. Hierzu stehen unterschiedliche Versuchsanordnungen zur Verfügung. So werden zum einen intravitreale Injektionen von rekombinantem Angiopoietin-2 in verschiedene Tiermodelle vorgenommen und anschließend die Auswirkungen auf den Perizytenbesatz untersucht. Durch Koinjektion von Angiopoietin-2 und seinem Rezeptor Tie-2 sollen Angiopoietin-2 vermittelte Effekte kompetitiv gehemmt werden. Desweiteren wird ein transgenes Maus-Modell geschaffen, mit dem man ohne direkte Manipulation am Auge den Effekt einer Überexpression von humanem Angiopoietin-2 in der Retina auf den Perizytenbesatz der Netzhautgefäße und die Gefäßmorphologie durch enzymatische Digestionen zeigen kann. Diese Mäuse exprimieren unter Kontrolle des Opsin-Promoters humanes Angiopoietin-2 in der Rezeptorzellschicht der Retina. Durch Einkreuzen dieser Mäuse in eine weitere Mauslinie, deren Perizyten speziell markiert sind, ließe sich der erwartete Effekt ebenfalls elegant darstellen. Zusätzlich soll das Gefäßsystem der Netzhaut durch Fluoreszenzmikroskopie dreidimensional dargestellt und die Frage geklärt werden, ob die Überexpression von Angiopoietin-2 in der Netzhaut zu einer Instabilisierung der Gefäße führt.

Um jedoch die Wirkung von Angiopoietin-2 auf das Gefäßsystem der Netzhaut umfassend beschreiben zu können, muß neben den Effekten eines Überangebotes an Angiopoietin-2 auch die Folgen eines Mangels analysiert werden. Hierzu soll die Morphologie der Netzhautkapillaren in Angiopoietin-2 *knock out* Mäusen dargestellt und durch enzymatische Digestionen genauer beschrieben werden. Zusätzlich werden Untersuchungen zur Aktivität des Angiopoietin-2 Promoters während der postpartalen Vaskularisierung durchgeführt. Die Kombination von Studien zum Angiopoietin-2 Überangebot und Mangel haben zum Ziel, ein besseres Verständnis des Tie-2/Angiopoietin-2 Systems in Bezug auf die Gefäße der Netzhaut zu erlangen. Würde sich die gestellte Hypothese eines Angiopoietin-2 vermittelten Perizytenabfalls bestätigen, wäre das therapeutische Ausschalten dieses Effekts ein idealer Ansatzpunkt, der Diabetischen Retinopathie in einem frühen Stadium entgegen zu treten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte und Chemikalien

#### 2.1.1 Verwendete Geräte

Blot-Transfer-Zelle Semi-Dry Trans-Blot SD (Fa. BioRad)  
Brutschrank für Zellkultur IR-Autoflow, CO<sub>2</sub>-begast (Fa. Nuair)  
Dissektionsmikroskop Stemi SV6 + Kameraaufsatz MC80 (Fa. Zeiss)  
Eisenerzeuger AF-10 (Fa. Scotsman)  
Flachbettgelkammer MGU 500T (Fa. C.B.S. Scientific)  
Flachbettgelkammer SGE-030-02 (Fa. C.B.S. Scientific)  
Fluoreszenzmikroskop Axioskop 2 (Fa. Zeiss)  
Gelkammer Mini-Protean II (Fa. BioRad)  
Heizrührer IkaMag RCT (Janke & Kunkel)  
Kaltlichtlampe KL1500 electronic (Fa. Zeiss)  
Kryotom HM 500 OM (Fa. Microm)  
Kühlzentrifuge 4K10 (Fa. Sigma)  
Kühlzentrifuge Biofuge fresco (Fa. Heraeus)  
Laborwaage MC1 Laboratory LC4800P (Fa. Sartorius)  
Mikroskop Axiovert 135 (Fa. Zeiss)  
Mikroskop Wiloverts (Fa. Will / Hund)  
Mikrotom HM 350 (Fa. Microm)  
Netzgerät Modelle E455, E743 und E702 (Fa. Consort)  
PCR-Gerät Robocycler Gradient 96 (Fa. Stratagene)  
Pipette Pipetman (Fa. Gilson)  
Pipette (Fa. Eppendorf)  
Reaktionsgefäßschüttler VF2 (Fa. Janke & Kunkel)  
Röntgenfilmentwickler M35 X-OMAT Processor (Fa. Kodak)  
Sterilarbeitsplatz A/B3 (Fa. Nuair)  
Stickstofftank Chronos Biosafe (Fa. Messer Griesheim)  
Thermomixer 5436 (Fa. Eppendorf)  
Tiefkühlschrank HFU 86 (Fa. Heraeus)  
Tischzentrifuge Centrifuge 5415C (Fa. Eppendorf)

UV-Lichttisch 312 nm + 254 nm (Fa. Bachofer)

Wasserbad Modelle SW, SW-20C und FC 200 (Fa. Julabo Labortechnik)

Wasserbad LKB Multitemp II (Fa. Pharmacia)

Wippschüttler Rocky (Fa. Uniequip Laborgerätebedarf)

Für die verwendete Kühlzentrifuge „Biofuge Fresco“ errechnet sich die relative Zentrifugalbeschleunigung nach der Formel:  $RZB = 11.18 \times (n/1000)^2 \times r$  ; wobei n = Umdrehungen/Minute und r = Radius (= 7.3 cm)

### **2.1.2 Verwendete Verbrauchsmaterialien**

Reaktionsgefäße, 0.2 – 2.0 ml (Fa. Eppendorf)

Röhrchen 15 ml und 50 ml (Fa. Falcon bzw. Becton-Dickinson)

Film, Kunstlicht 64 ASA EPYT (Fa. Kodak)

Gewebekulturgefäße (Fa. Costar, Greiner, Nunc)

Sterilfilter 0.2 µm (Fa. Schleicher & Schuell)

Zentrifugationsgefäße 14 ml (Fa. Greiner)

Pipettenspitzen (Fa. Greiner)

Hyperfilm ECL (Fa. Amersham Life Science)

Nitrozellulose Transfer Membran Protran BA83 (Fa. Schleicher & Schuell)

Einmalspritzen (Fa. Henke-Saas, Wolf)

Einmal-Injektionskanülen (Fa. Braun)

Einmalhandschuhe

### **2.1.3 Puffer, Lösungen, Chemikalien und Enzyme**

#### Chemikalien

Die eingesetzten Chemikalien wurden im Reinheitsgrad (p. A.) von folgenden Firmen bezogen: Difco, Gibco BRL, J.T. Baker, Merck, Riedel-de Haen, Roth, Serva, Sigma. dNTPs von der Fa. Eurogentech, Oligodesoxynukleotide von der Fa. Clontech, Heidelberg. Antikörper wurden von den Firmen Santa Cruz Biotechnology, R&D Biosystems, Chemicon International und Dako bezogen. Hormone (PMS, hCG) wurden von der Fa. Sigma, Deisenheim bezogen.

### Enzyme

Proteinase K	Fa. Boehringer-Mannheim
Reverse Transkriptase	Fa. Invitrogen
Trypsin	Fa. Difco und Fa. Merck
Pepsin	Fa. Merck
<i>Taq</i> -DNS-Polymerase	Fa. Promega
DNaseI, RNase-frei	Fa. Boehringer-Mannheim

### Größenmarker

DNA-Größenmarker: 1 kB DNA-Leiter (Fa. Gibco BRL)

Protein-Größenmarker: Prestained SDS-PAGE Standard, „High Range“ (Fa. BioRad)

### Lösungen

Die unten aufgeführten Lösungen für die Molekularbiologie und Proteinbiochemie wurden mit deionisiertem ultrafiltriertem und autoklaviertem Wasser angesetzt.

<u>5 x TBE</u>	54 g Tris-Base	<u>5 x Ladepuffer</u>	50 % Glycerin
	27.5 g H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>		0.2 % Bromphenolblau
	20 ml 0.5 M EDTA pH 8.0		0.2 % Xylencyanol
	<i>ad</i> 1Liter H <sub>2</sub> O		

<u>PBS</u>	137 mM NaCl	<u>10 x TBST</u>	200 mM Tris
	2,7 mM KCl		1.5 M NaCl
	4,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		0.5 % TWEEN 20; pH 7.5
	1,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		

<u>Stripping-Puffer</u>	62.5 mM Tris, pH 6.8	<u>Semi-Dry-Puffer</u>	48 mM Tris
	2 % SDS		39 mM Glycin
	100 mM $\beta$ -Mercaptoethanol		0.037 % SDS (v/v)
			20 % Methanol

<u>TE (T0.1E)</u>	10 mM Tris, pH 7.5
	1 mM EDTA (0.1 mM EDTA)

6 x Auftragspuffer nach Lämml

200 mM Tris pH 6.8  
6 % SDS (w/v)  
27 % Glycerin  
0,1 % Bromphenolblau  
15 %  $\beta$ -Mercaptoethanol

10 x Laufpuffer nach Lämml

250 mM Tris, pH 8.3  
1.92 M Glycin  
1 % SDS (w/v)

### 2.1.4 Verwendete Primer und Antikörper

Folgende Primer und Antikörper wurden in dieser Arbeit verwendet:

**Tab. 1 In dieser Arbeit eingesetzte Antikörper, Fluorophore und Primer**

Antikörper bzw. Fluorophor	Firma / Nr.	Tier	Spezifität	[ ]	Emission
$\alpha$ -Angiopoietin-2 PK n-T.	R&D 623	Ziege	h	1-10 $\mu$ g/ml	---
$\alpha$ -Angiopoietin-2 PK c-T.	St.Cruz 7015	Ziege	h, r, m	1-10 $\mu$ g/ml	---
$\alpha$ -Angiopoietin-2 PK n-T.	St.Cruz 7016	Ziege	h	1-10 $\mu$ g/ml	---
$\alpha$ -Angiopoietin-2 PK n-T.	Chemicon 3122	Ziege	h	1-10 $\mu$ g/ml	---
$\alpha$ -Ziege-IgG PK	Dako 038 (101)	Kaninchen	Ziege-IgFc	1:2000	---
$\alpha$ -Ziege Biotin-gekoppelt	Vector Lab.	Kaninchen	Ziege-IgFc	1:150	---
$\alpha$ -Ziege-Cy3	Chemicon 21020711	Esel	Ziege-IgFc	10 $\mu$ g/ml	570 nm
Streptavidin-Cy3	Jackson 39441	---	Biotin	4 $\mu$ g/ml	570 nm
$\alpha$ -NG-2 Chondroitin Sulfate Proteoglycan PK	Chemicon AB 5320	Kaninchen	h, r, m	5 $\mu$ g/ml	---
$\alpha$ -Ziege-IgG-Alexa-Fluor 488	Molec. Probes A-11034	Ziege	Kaninchen-IgFc	4 $\mu$ g/ml	520 nm
Isolectin-TRITC	Sigma 5264	<i>Bandeiraea</i>	$\alpha$ -D-Galactosyl	10 $\mu$ g/ml	570 nm
4,4 kDa Dextran-TRITC	Sigma T-1037	<i>Leuconostoc</i>	unspezifisch	20 $\mu$ g/ml	570 nm
500 kDa Dextran-FITC	Molec. Probes D-7136	<i>Leuconostoc</i>	unspezifisch	5 $\mu$ g/ml	522 nm

PK=Polyklonal; n-T.=N-Terminus; c-T.=C-Terminus; h=human; r=Ratte; m=Maus; [ ]=Konzentration

Primer	Basensequenz (5'-3')
LacZ-FW	ATCCTCTGCATGGTCAGGTC
lacZ-Rev	CGTGGCCTGATTCATTCC
hAng2RTF2	GGAAGAGCATGGACAGCATAGGA
hAng2RTRev2	GCCATTTGTGGTGTGTCCTGATT
mGAPDH Fw	ACCACAGTCCATGCCATCAC
mGAPDH Rev	TCCACCACCCTGTTGCTGTA

Die fettgedruckten Basen sind humanspezifisch (ungleich der Mausequenz)

**Tab. 2 In dieser Arbeit durchgeführte PCR**

PCR	Denaturierung	Zyklus:	Denaturierung	Annealing	Elongation	Elongation
LacZ	4Min. 94°C	30x:	30s 94°C	45s 60°C	45s 72°C	4Min. 72°C
hAng2	5Min. 94°C	30x:	45s 94°C	45s 63°C	60s 72°C	8Min. 72°C
GAPDH	5Min. 94°C	25x:	30s 94°C	45s 65°C	45s 72°C	6Min. 72°C

## 2.2 Präparation der Versuchstiere

Zum Nachweis eines bestimmten Effektes können *in vitro* oder *in vivo* Analysen durchgeführt werden. Der entscheidende Vorteil von *in vivo* Analysen ist die realitätsnahe Versuchssituation, die die eher künstliche Versuchsbedingung des *in vitro* Experiments übertrifft. Hierbei sind alle Faktoren, die Einfluss auf die untersuchten Elemente haben, in das Experiment eingeschlossen. Somit sind *in vivo* Effekte von starker Aussagekraft. Das in diesen Studien eingesetzte *in vivo* Modell ist eine für ein bestimmtes Konstrukt transgene Maus.

### 2.2.1 Transgene Mäuse

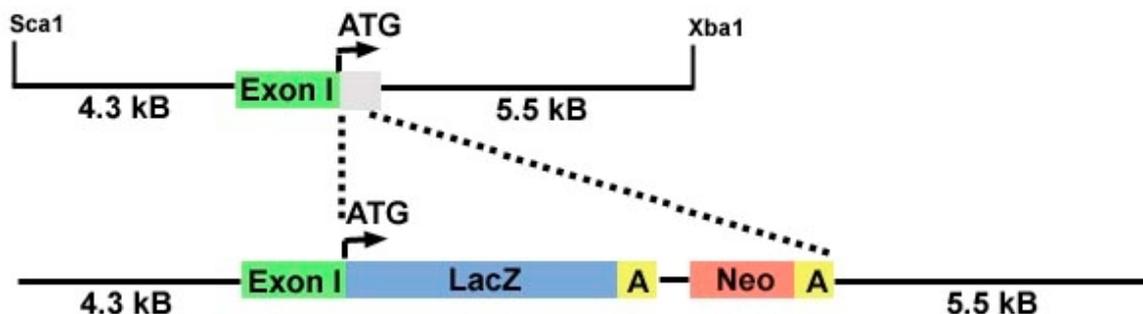
Zur „Herstellung“ transgener Mäuse wird ein Teil einer entsprechenden Plasmid DNA in linearisierter Form durch DNS-Mikroinjektion in einen Pronukleus einer befruchteten Maus-Oocyte injiziert. Die Eizelle wird anschließend in den Eileiter einer durch Verpaarung mit einem sterilen Männchen erzeugten pseudoschwangeren Maus retransferiert. Die DNA integriert zufällig an einer beliebigen Stelle des Mausgenoms. Tragen die Keimzellen des sich aus der Oocyte entwickelnden Tieres das Transgen, so lassen sich durch spätere Verpaarung dieser Maus stabile transgene Linien erzeugen.

Zur Gewinnung von befruchteten Oozyten wurden Tiere der F1-Generation des Hybridstammes C57BL/6 x C3H/He herangezogen und als pseudoschwangere Weibchen eingesetzt. Pseudoträchtige Weibchen wurden aus Verpaarungen mit vasktomierten NMRI-Albino Männchen gewonnen. Die Tiere wurden entweder von der Fa. Charles River, Sulzfeld, bezogen oder stammten aus eigener Zucht. Zur Hälterung der Tiere wurde ein separater Tierstall genutzt, der eine Raumtemperatur von 22 °C und eine Luftfeuchtigkeit von 55 % aufwies. Der Tag-Nacht Zyklus hatte eine Hellphase von 12 h. Zur Gewinnung einer ausreichenden Anzahl befruchteter Mausoozyten wurden 21-28 Tage alte C57BL/6 x C3H/He-Weibchen zur Superovulation stimuliert. Die Stimulation erfolgte durch Injektion von PMS (FSH-Stimulation) und hCG (LH-Stimulation). Anschließend wurden jeweils 2 Weibchen mit einem Männchen verpaart. Die Männchen und die pseudoträchtigen Weibchen hatten ein Alter von mindestens 8 Wochen, die superovulierten Weibchen waren jünger. Nach der Verpaarung der superovulierten Weibchen mussten die befruchteten Oozyten zur Mikroinjektion aus dem Eileiter isoliert werden. Nachdem die Oozyten gereinigt worden waren, wurden sie durch leichten Unterdruck unter mikroskopischer Kontrolle fixiert und so fokussiert, dass die Vorkerne sichtbar waren. Die DNS-Lösung wurde dann mit Hilfe einer

Injektionskapillare und Mikromanipulatoren (Fa. Leitz, Wetzlar) unter leichtem Druck in einen Vorkern injiziert. Nach erfolgreicher Mikroinjektion wurden die befruchteten Oozyten in das Infundibulum des Eileiters retransferiert. Das beschriebene Verfahren zur Herstellung transgener Mäuse erfolgte als Serviceleistung des Instituts.

### 2.2.1.1 Angiopoietin-2 *knock out* Mäuse

Zur Analyse der Kapillarmorphologie von Netzhäuten aus Angiopoietin-2 defizienten Mäusen wurden  $\beta$ -Galaktosidase-Färbungen, Netzhaut-Digestionen und Fluoreszenzfärbungen von Netzhautgefäßen heterozygoter Angiopoietin-2/LacZ *knock in* Mäuse (Angiopoietin-2<sup>+/-</sup>) bzw. homozygoter Angiopoietin-2 *knock out* Mäuse (Angiopoietin-2<sup>-/-</sup>) angefertigt. Diese Mäuse tragen im ersten Exon ihres Angiopoietin-2-Gens eine LacZ-Kassette (s. **Abb. 11**), Fa. Regeneron, N.Y. [Gale et al. 2002, Valenzuela et al. 2003]. Je nachdem, ob nur ein Allel oder beide Angiopoietin-2 Allele ausgeschaltet sind, handelt es sich entweder um heterozygote Angiopoietin-2 LacZ-*knock in* Mäuse oder homozygote Angiopoietin-2 *knock out* Mäuse. Letztere können kein Angiopoietin-2 mehr synthetisieren.



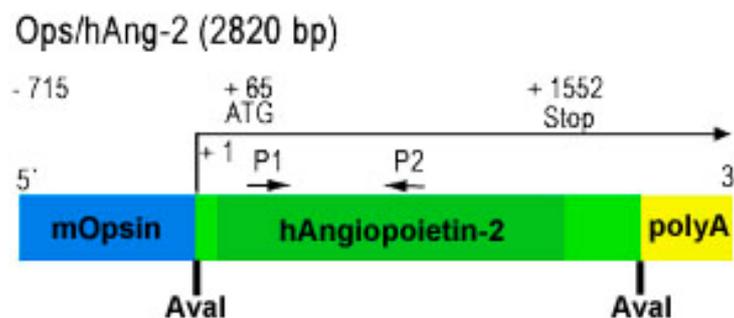
**Abb. 11** Der genetische Hintergrund der transgenen Angiopoietin-2 *knock out* Maus

Durch Insertion einer LacZ-Kassette in das erste Exon des Angiopoietin-2 Gens wird dieses funktionslos. In Geweben, in denen der Angiopoietin-2 Promoter aktiviert ist, wird statt Angiopoietin-2 die transgene  $\beta$ -Galaktosidase exprimiert.

### 2.2.1.2 „Ops/hAng-2-Mäuse“

Die eigentlichen Studien zur Auswirkung eines Überangebotes an Angiopoietin-2 auf die Gefäße wurden u. a. an einer transgenen Mauslinie („Ops/hAng2-Mäuse“) vorgenommen, die humanes Angiopoietin-2 unter Kontrolle des ausschließlich in der Retina-Rezeptorzellschicht aktiven Opsin-Promoters exprimiert. Dieser Promoter des in den Stäbchen synthetisierten Sehfärbstoffs (Opsin als Bestandteil des Rhodopsins) wird normalerweise zwischen dem 3.

und 5. postnatalen Tag zur Opsin-Biosynthese aktiviert. Nach Klonierung des Transgens (s. **Abb. 12**) wurden Tiere auf die im Abschnitt 2.2.1 beschriebene Weise erzeugt (mit freundlicher Unterstützung von Frau Silvia Hennig und Herrn Dr. Felix Müller-Holtkamp) und verschiedene Linien, die auf unterschiedliche *founder* zurückzuführen sind, vermehrt. Zur Charakterisierung der Tiere wird mittels PCR bestimmt, ob sie das Transgen stabil in ihr Genom aufgenommen haben (Genotypisierung). Weitere Experimente weisen die Transkription (RT-PCR) bzw. die Translation des Transgens nach.



**Abb. 12 Die Struktur des Ops/hAng2-Transgens**

Die Basensequenz des 2.8 kB großen Ops/hAng-2 Transgens besteht aus dem murinen Opsin-Promoter (blau), der Angiopoietin-2 Sequenz (grün) und dem polyA Abschnitt des simian virus 40 (gelb). Die Angiopoietin-2 Sequenz wurde mittels AvalI-Restriktionsendonukleasen hinter den Opsin-Promoter inkloniert.

### 2.2.1.3 „P-LacZ-Mäuse“

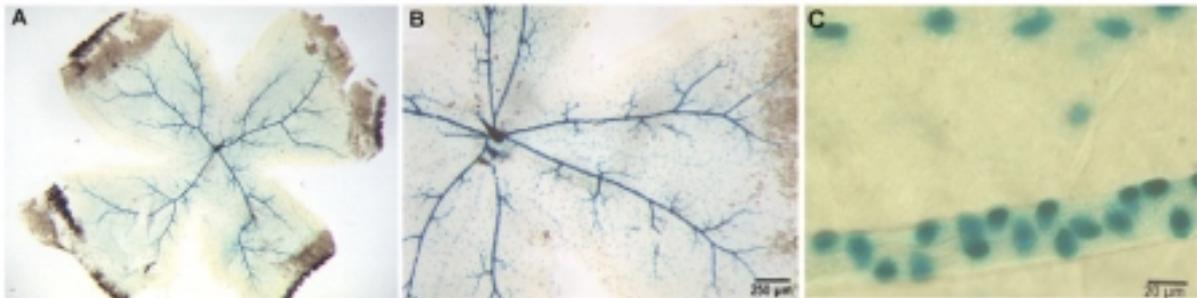
Desweiteren wurde eine Mauslinie verwendet, die als Transgen den 5'-flankierenden Bereich des aP2-Gens in Verbindung mit einem LacZ-Reportergen trägt [s. **Abb. 13**, Tidhar et al. 2001]. Das Transgen wurde zufällig an einer Stelle des Maus-Genoms inseriert.



**Abb. 13 Der genetische Hintergrund der P-LacZ-Maus**

Die integrierte DNA-Sequenz der P-LacZ-Mäuse besteht aus upstream-Sequenzen des aP2-Gens (adipose specific gene) und einer LacZ-Expressionskassette. Begrenzt ist das Transgen von einer PstI- bzw. einer NotI-Restriktionsendonukleasen-Bindesequenz. Die grauen Boxen entsprechen Exons des Mausgenoms, der dicke Balken zeigt das Transgen.

Diese Insertions-Mutante trägt unvollständige 5'-Sequenzen des adipose specific gene (aP2) [Graves et al. 1991], gekoppelt an ein LacZ-Reportergen mit einem SV40 Kernlokalisierungssignal (nls) [Fire et al. 1990]. Der Phänotyp dieser Tiere zeigt  $\beta$ -Galaktosidase-Expression in perivaskulären Zellen und somit auch in den Perizyten der Netzhaut (s. **Abb. 14**). Zur Vereinfachung werden diese Tiere im folgenden als „P-LacZ-Mäuse“ bezeichnet. Nicht alle Perizyten der Netzhaut einer P-LacZ-Maus exprimieren das Transgen. Auch wird die  $\beta$ -Galaktosidase in aktiv proliferierenden Zellen vermindert exprimiert. Ein Teil der Versuche verwendet doppelt-transgene Tiere, die aus der Verpaarung von Ops/hAng2- und P-LacZ-Mäusen hervorgegangen sind. Der Nachweis der LacZ-Expression erfolgt mittels  $\beta$ -Galaktosidase-Färbung.



**Abb. 14  $\beta$ -Galaktosidase-Gesamtfärbung der Netzhaut einer P-LacZ-Maus**

Zu erkennen sind die aufgrund der LacZ-Färbung blau gefärbten Perizyten, die indirekt die Gefäße markieren. Jedoch exprimieren nicht alle vorhandenen Perizyten das LacZ-Transgen. **A)** Gesamtübersicht über eine Netzhaut. Zu erkennen sind die Gefäßverläufe der vier großen Arterien und deren Austritt aus der Zentralarterie. Die Netzhaut ist zur besseren Präparation kleeblattförmig eingeschnitten. **B)** In dieser Vergrößerung erkennt man deutlich die Perizyten der größeren Gefäße und die dazwischen liegenden einzelnen Perizyten der tieferen Kapillarbetten. **C)** Diese Aufnahme zeigt detailliert den Perizytenbesatz auch der kleineren Gefäße.

### 2.2.2 Intravitreale Protein-Injektion

Um einen Effekt von Angiopoietin-2 auf den Perizytenbesatz der Netzhaut nachzuweisen, kann das Protein selbst in das Auge injiziert werden. Als Tiermodell wurden zum einen 5 Wochen alte männliche Wistar-Ratten gewählt; die Analyse erfolgte durch Retina-Digestion (s.u.). Desweiteren kam das P-LacZ-Maus-Modell zum Einsatz; die Auswertung erfolgte durch  $\beta$ -Galaktosidase Färbung der Netzhaut.

Im Rattenmodell ist rekombinantes humanes Angiopoietin-2 (Fa. R&D Biosystems Nr. 623-AN, 66 kD) in verschiedenen Konzentrationen in einem Volumen von 10  $\mu$ l mit Hilfe einer Hamiltonspritze intravitreal appliziert worden. Als Kontrolle wurde die entsprechende Menge Hitze-inaktiviertes Protein bzw. PBS in das verbleibende Auge der Ratte gespritzt.

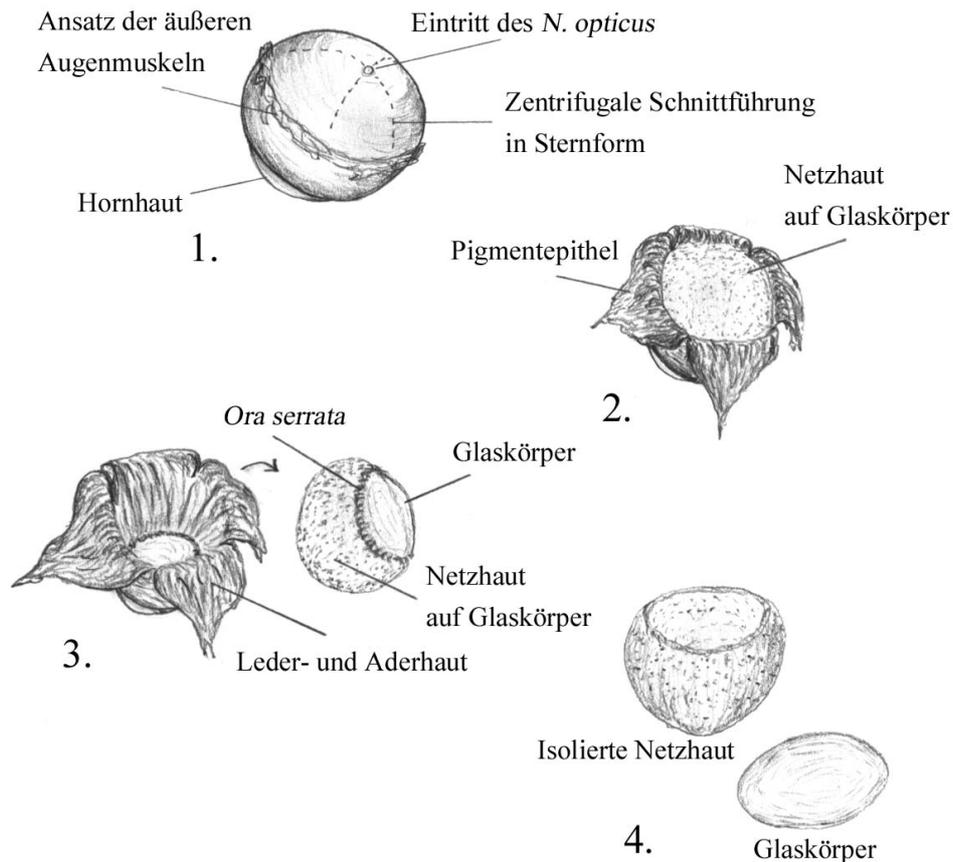
In die P-LacZ-Mäuse wurde 400 ng rekombinantes humanes Angiopoietin-2 in einem Volumen von 4 µl injiziert. Zur Kontrolle wurden 300 ng Protein bei 95 °C für 25 Minuten inaktiviert und in das verbleibende, unmanipulierte Auge der Maus gespritzt. Zum Zeitpunkt der Injektion waren die Tiere 13 Tage alt und wurden 8 Tage später zur Analyse getötet. Der Zugang zum Bulbus erfolgte in beiden Modellen mit leichtem Abstand zur Cornea durch die Sklera, die Anästhesie der Tiere per Inhalationsnarkose mit Isofluran durchgeführt worden.

Um zu überprüfen, ob der Angiopoietin-2 Effekt auf die Perizyten durch Koapplikation von löslichem Tie-2 Rezeptor (extrazelluläre Angiopoietin-2 Bindedomäne) kompetitiv gehemmt werden kann, wurden 330 ng Angiopoietin-2 zusammen mit einem 12-fachen Überschuss an Tie2-IgG-Chimäre in ein Auge injiziert, in das andere Auge ausschließlich Tie2-IgG-Chimäre. Dieses Molekül besteht aus der ligandenbindenden extrazellulären Tie2-Domäne sowie einem IgG-Fc-Anteil. Der größte Teil des Angiopoietin-2 sollte an seinen im molaren Überschuss koinjizierten, löslichen Rezeptor binden und somit inaktiviert werden.

### 2.2.3 Entnahme und Präparation der Netzhaut

Zur Entnahme der Augen wurden die Tiere getötet, die Bulbi nach Durchtrennung der äußeren Augenmuskulatur und des *Nervus opticus* entnommen und zur besseren Fixation mit Hilfe einer Kanüle seitlich ein Löchlein gestochen. Die so manipulierten Augen ruhten für 48 h in einer 2 % Para-Formaldehyd Lösung. Die Freipräparation der Retina erfolgte unter Zuhilfenahme einer Stereolupe in PBS-Lösung. Am Eintritt des *N. optici* wurde in den *Bulbus oculi* ein zentrifugal verlaufender Sternschnitt gesetzt, der auf Höhe des Pigmentepithels die Abtrennung der Retina von der Choroidea erlaubte. So erhielt man nach Abziehen der Ader- und Lederhaut die dem Glaskörper bzw. der Linse anhaftende Netzhaut. Durch geschicktes Scheren der Strukturen ließ sich letztlich die Retina isolieren (s. **Abb. 15**).

Alternativ kann durch Incision und anschließender Circumcision in Höhe der *ora serrata* Hornhaut, Linse und Glaskörper von der Netz- Ader- und Lederhaut getrennt werden. Mittels einer stumpfen Flachsonde wird die Retina anschließend von der äußeren Augenwand in Höhe des Pigmentepithels isoliert und entnommen. Vorteil dieser Methode ist eine geringere Spannung innerhalb der Retina. Bei kleinen Bulbusdurchmessern ist dies bei der Digestion von Vorteil, da sich die Netzhaut auf dem Objektträger besser spreiten lässt. Allerdings geht bei dieser Art von Präparation ein Teil der Kapillarfläche verloren, da die Retina ja nicht *in toto* entnommen wird.



### Abb. 15 Methode zur Entnahme der Netzhaut aus dem fixierten Auge

Zeichnerisch dargestellt ist die chronologische Abfolge der Freipräparation einer fixierten Netzhaut. **1.** Ausgangssituation vor Eröffnung der Leder- und Aderhaut. **2.** Darstellung der dem Glaskörper aufliegenden Netzhaut durch zentrifugale Schnittführung, ausgehend vom Eintritt des *N. opticus*. **3.** Entnahme der Netzhaut mit dem Glaskörper durch stumpfes Präparieren. **4.** Befreiung der Netzhaut vom Glaskörper entlang der *ora serrata*.

#### 2.2.4 $\beta$ -Galaktosidase Färbung der Netzhaut

Die isolierte Retina wird über Nacht in einer Färbelösung (1 Teil 2 % X-Gal-Stocklösung in DMF und 19 Teile LacZ-Färbelösung) bei 30 °C inkubiert. Durch mehrmaliges peripheres Einschneiden ist es anschließend möglich, die halbkugelförmige Netzhaut in eine annähernd plane Form zu bringen. So lässt sich die Retina nach Waschen in  $H_2O_{dd}$  problemlos auf einen Objektträger überführen und mit Aquatex wässrig eindeckeln. Der Gefäßverlauf der Äste der *Arteria centralis retinae* und die aufgelagerten Perizyten sind durch die Blaufärbung sehr gut zu erkennen (s. **Abb. 14**).

Zur Bestimmung des Perizytenbesatzes einer Netzhaut werden pro Retina bei 400 facher Vergrößerung in mindestens 10 Gesichtsfeldern die Anzahl der Perizyten des tiefen Kapillarbettts ausgezählt und gemittelt.

B-Galaktosidase- (LacZ-)Färbelösung:

5 mM Kaliumhexacyanoferrat

5 mM Kaliumhexacyanoferrit

2 mM Magnesiumchlorid (Hexahydrat)

20 µl P40 10 %

0,01g Natriumdeoxycholat

frisch hinzu: 1/20 Volumen X-Gal (2 %) in DMF

### 2.2.5 Enzymatische Netzhaut-Digestion

Zur Darstellung der Gefäß- und Kapillarbetten einer Retina wird das um die Gefäße liegende Gewebe enzymatisch entfernt. Hierzu wird die fixierte Netzhaut in PBS gewaschen und anschließend für 30 Minuten in  $H_2O_{dd}$  bei 37 °C inkubiert. Es folgt die Abtrennung eventueller Glaskörperreste mit einer Pinzette. Nach Überführung der Retina in eine 2,5 % Pepsin-Lösung (Fa. Merck, 37 °C, pH=1,27) wird nach 5-minütiger Inkubation begonnen, die sich bereits lösende Photorezeptorzellschicht durch leichtes Bestreichen mit einer Sonde zu entfernen. Länger als 10 Minuten sollte die Netzhaut nicht in der Pepsin-Lösung verbringen. Anschließend folgt eine Behandlung der Retina mit einer 5 % Trypsin-Lösung (Fa. Difco, 37 °C, pH=7,6) für 15 Minuten oder 10 % Trypsin-Lösung (Fa. Merck, 37 °C, pH=7,6) für 11 Minuten. Es trennen sich nun die restlichen Gewebsschichten von den Gefäßen. Die Netzhaut wird vorsichtig auf einen Objektträger überführt. Durch peripheres Betropfen der Retina mit destilliertem Wasser werden mechanisch noch verbleibende Zellreste abgetrennt. Der sich bildende Suspensionssee wird mit Abstand zum Objekt vorsichtig abgesaugt. Eventuell muß noch mehrmals mit Trypsin-Lösung inkubiert werden, um die Kapillarbetten einigermaßen frei von Zellresten darstellen zu können. Das Gefäßnetz des Auges wird auf dem Objektträger mit Hilfe des beschriebenen Tropfens und Saugens ausgespreitet und luftgetrocknet. Nach mind. 3 h Trocknen führt man eine PAS-Färbung durch.

Die Konzentrationen der Trypsin- und Pepsin-Lösungen sowie die Inkubationszeiten müssen für jede Enzym-Charge neu ermittelt werden.

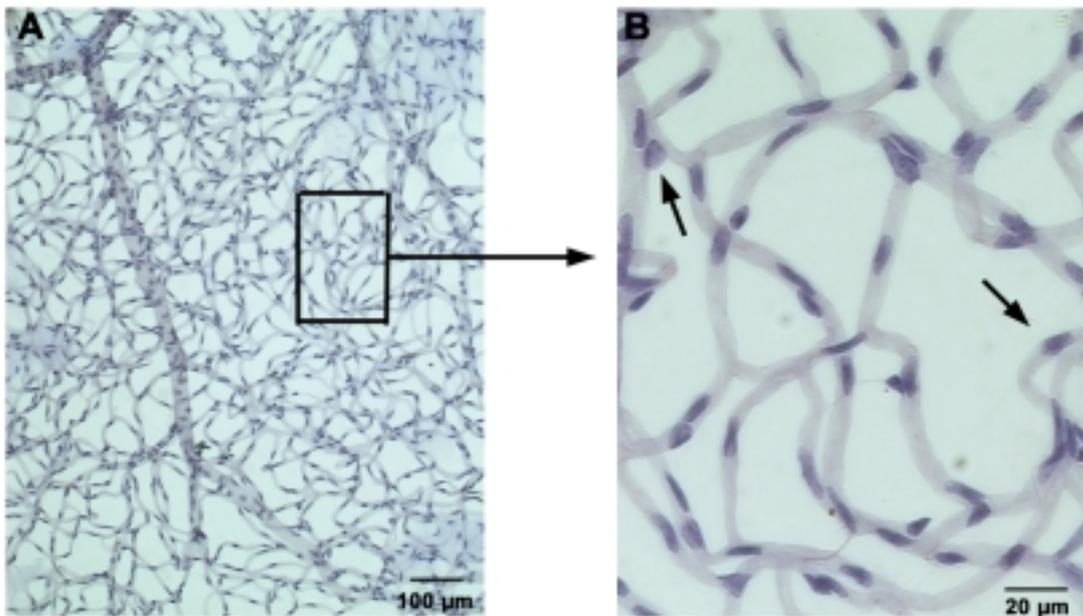
### 2.2.6 PAS-Färbung (Perjodsäure-Schiff-Reaktion)

Um das Verhältnis Perizyten zu Kapillarfläche bzw. Endothelzellzahl für die Netzhautkapillaren bestimmen zu können, muß die zuvor enzymatisch digestierte Retina gefärbt werden. Hierzu eignet sich besonders die Perjodsäure-Schiff-Färbung (s. **Tab. 3**).

**Tab. 3 Vorgehensweise zur Durchführung einer PAS-Färbung**

Medium	Verweildauer (Min)
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	1
Perjodsäure 1 %	5
Leitungswasser	7
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	2
Schiffsches Reagenz	20
Leitungswasser	15
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	0,2
Mayers Hämalaun	7
Leitungswasser	10
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	2
EtOH 60 % 70 %, 80 % 90 % 95 % 100 %	Je 2
Roticlear (Xylolersatz)	2 x 4
Eindeckeln mit Entellan	

Zur Auswertung der PAS-gefärbten Netzhaut-Digestionen wird je Netzhaut in mindestens 8 Gesichtsfeldern (Vergrößerung 600 fach) die Anzahl der Perizyten pro Kapillarfläche bestimmt und gemittelt. Die Auswertung erfolgt „blind“. Die Unterscheidung zwischen Perizyten und Endothelzellen wird aufgrund morphologischer Merkmale, dem Färbeverhalten in der PAS-Färbung und der Lage der Zellen vorgenommen. So sitzen die Perizyten auf den Endothelzellen auf und sind bevorzugt an Gabelungen des Kapillarnetzes zu finden (s. **Abb. 16**). Weiterhin sind die Kerne der Endothelzellen schmaler und länger als die Perizyten und treten niemals als „Doppelkern“ auf.



**Abb. 16 Enzymatische Netzhaut-Digestion mit anschließender PAS-Färbung**

Die Abbildung zeigt das zweidimensionale Netzwerk der Netzhautgefäße. **A)** Überblick über die Gefäßstrukturen der Retina einer Maus. Die Kapillarnetze sind in ihrer Dichte homogen; die Gefäße zeigen deutlich hierarchischen Aufbau. **B)** Vergrößerung aus **A**: Die Pfeile markieren Perizyten.

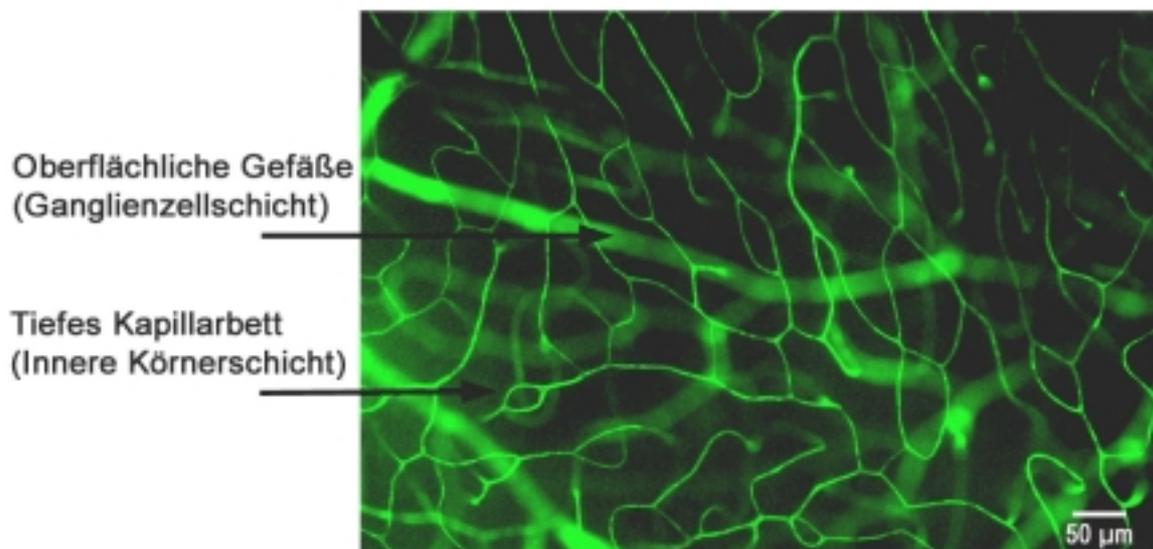
**2.2.7 Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Netzhautgefäße**

Es ist bekannt, dass Perizyten auf das Gefäßsystem stabilisierend wirken. Da wir vermuten, dass Angiopoietin-2 zu einer Verminderung des Perizytenbesatzes auf den Netzhautgefäßen führt, soll geklärt werden, ob sich hierdurch die Permeabilität der Netzhautkapillaren verändert. Auch die dreidimensionale Struktur des Kapillarnetzes der Retina soll dargestellt werden. Hierzu werden die Kapillaren durch Injektion eines hochmolekularen Fluorophors luminal gefärbt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop lassen sich die gefärbten Gefäße dreidimensional darstellen und beurteilen. Mit dieser Methode soll zusätzlich die Gefäßmorphologie von homozygoten Angiopoietin-2 *knock out* Mäusen analysiert werden. Durch Injektion eines weiteren, niedermolekularen Fluorophors und anschließendem Nachweis des Moleküls im Extravasalraum kann eine erhöhte Gefäßpermeabilität nachgewiesen werden.

Es existieren mehrere Möglichkeiten zur Färbung der Gefäße. Zum einen können die Kapillaren der extrahierten und fixierten Netzhaut durch Immersion gefärbt werden. Es ist außerdem möglich, durch intravenöse Injektion des Fluorophors die Gefäße von der Lumenseite her zu färben und anschließend die Retina zu fixieren. Zur Immersionsfärbung

wird das Auge entnommen, für mindestens 3 h in 4 % PFA fixiert und anschließend die Netzhaut freipräpariert. Nach Waschen in PBS wird die Retina durch zweistündige Inkubation bei RT in PBS/ Tween 0,5 % permeabilisiert. Es wird erneut mit PBS/ Tween 0,5 % gewaschen und daraufhin die Netzhaut mit Isolectin-TRITC (s. **Tab.1**) in PBS/ Tween 0,5 % ÜN bei 4 °C immersionsgefärbt. Am nächsten Tag wird 3 x 1 h mit PBS/ Tween 0,5 % gewaschen und die Netzhaut in 2 % Glycerin auf einem Objektträger ausgespreitet.

Zur Bestimmung der Gefäßpermeabilität wird ein hochmolekulares (500 kDa) und ein niedermolekulares Dextran (4,4 kDa, s. **Tab.1**) in einem Volumen von 100 µl in die Schwanzvene der entsprechenden Maus injiziert. Zur besseren Darstellung der Vene werden die Tiere zuvor mit einer Rotlichtlampe wärmebehandelt. Nach 15 Minuten erfolgt die Tötung der Tiere und die Entnahme der Augen. Diese werden für mind. 3 h in 4 % PFA fixiert. Es folgt die Freipräparation der Netzhäute, Waschen in PBS und Ausspreiten der Netzhäute auf einem Objektträger in 2 % Glycerin. Zur flachen Montage der Netzhaut auf dem Objektträger muß die Retina 2-3 x peripher eingeschnitten werden. Es folgt die Analyse unter dem Fluoreszenzmikroskop. Während des gesamten Experiments ist zu bedenken, dass die Fluorophore lichtempfindlich sind und die Gefahr des Ausbleichens besteht.



**Abb. 17** Dreidimensionale Darstellung des Gefäßsystems der Netzhaut nach Injektion eines Fluorophors

Deutlich zu erkennen ist das grazile Kapillarnetz der tiefen Schicht (scharf gestellt). Die größeren Gefäße der oberflächlichen Schicht erscheinen aufgrund der Dreidimensionalität unscharf und liegen in einer anderen Ebene. Das Fluorophor (500 kDa FITC-Dextran) markiert das Gefäßlumen homogen und vollständig.

## 2.3 Bearbeitung von Nukleinsäuren

### 2.3.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) [Saiki et al. 1988] dient der exponentiellen Amplifizierung und somit dem Nachweis eines bestimmten DNA-Abschnittes. Ist ein bestimmtes Transgen die Zielsequenz, kann folglich mittels der PCR die Transgenität eines Tieres nachgewiesen werden. Auch ist die Identifizierung einer bestimmten mRNA möglich, nachdem diese mit Hilfe der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben worden ist (RT-PCR, s.u.). Die zu amplifizierende DNA-Sequenz wird durch den Einsatz von speziellen synthetischen Oligonukleotid-Primern definiert, die den zu vervielfältigenden DNA-Bereich flankieren. In mehreren Reaktionszyklen unterschiedlicher Temperatur wird die doppelsträngige DNA denaturiert, die Primer an die Nukleinsäure hybridisiert und durch die thermostabile *Taq*-Polymerase (aus *Thermus aquaticus*, Fa. Promega) elongiert. Nach exponentieller Vervielfältigung der Zielsequenz lässt sich die akkumulierte DNA mit Hilfe einer Gelelektrophorese nachweisen.

#### 2.3.1.1 Genotypisierung mittels PCR

Im Rahmen der Studien mit den P-LacZ-/ bzw. Ops/hAng2-Mäusen ist es notwendig zu überprüfen, ob die zu untersuchenden Tiere transgen sind. Zum Nachweis der integrierten Fremd-DNA wird eine PCR durchgeführt, in der spezifische Primer (s. **Tab. 1**) eingesetzt werden, die ausschließlich die Sequenz des jeweiligen Transgens erkennen. Im positiven Falle resultiert eine spezifische Bande, die jenen Bereich repräsentiert, der durch die Primer „eingeschlossen“ wird.

Die zu analysierende genomische Maus-DNA wird durch Lyse der Schwanzspitze mit Proteinase K in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß gewonnen. Das Gewebe wird hierzu in 500 µl PCR-Ready-Lysis-Puffer (s.u.) und 4 µl Proteinase K (20 µg/ µl) für 6 h bei 55 °C unter Schütteln lysiert.

#### PCR-Ready-Lysis-Puffer:

50 mM KCl

1.5 mM MgCl<sub>2</sub>

10 mM Tris-HCl pH 8.3

0.45 % NP-40

0.45 % Tween 20

Nach Inaktivierung der Proteinase bei 95 °C für 15 Minuten wird kurz zentrifugiert. Zu 19 µl Reaktionsmix (s. **Tab. 4**) wird 1 µl Überstand gegeben, der die genomische DNA enthält.

**Tab. 4 PCR-Reaktionsansatz**

Reagenz	Molarität / Konzentration	Volumen
PCR-Puffer	10 x	2.00 µl
MgCl <sub>2</sub>	25mM	1.20 µl
dNTPs	5 mM	0.80 µl
lacZ-Primer <i>forward</i>	100 pmol	0.13 µl
lacZ-Primer <i>reverse</i>	100 pmol	0.13 µl
<i>Taq</i> -Polymerase	5U/µl	0.20 µl
DNA-Probe	Bis zu 10 <sup>-7</sup> g	1.00 µl
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	---	<u>14.54 µl</u>
Gesamtvolumen	---	20.00 µl

In einem 200 µl PCR-Reaktionsgefäß kann die Reaktion in der PCR-Maschine gestartet werden. Die PCR erfolgt nach dem in **Tab. 2** angegebenen Schema. Über eine analytische Agarose-Gelelektrophorese kann im positiven Falle das PCR-Produkt nachgewiesen werden.

### **2.3.1.2 PCR zur Charakterisierung der Transkriptionsaktivität eines Gewebes im Rahmen einer RT-PCR**

Nachdem die gesamte mRNA eines Gewebes isoliert und in cDNA umgeschrieben worden ist, können bestimmte Exon-Sequenzen durch Wahl der entsprechenden Primer amplifiziert und somit nachgewiesen werden.

Von den insgesamt 6 Linien der Ops/hAng-2-Mäuse sollen diejenigen bestimmt werden, die Transkription des Transgens zeigen. Hierzu wurden die Netzhäute transgener Tiere gewonnen (s. **2.2.3**) und hieraus die mRNA isoliert. Nach Transkription in cDNA (s. **2.3.3**) wird eine PCR durchgeführt, die das humane Angiopoietin-2 spezifisch nachweist. Die Sequenz der eingesetzten Primer-Paare ist **Tab. 1** zu entnehmen. Der Reaktionsansatz und die Reaktionsbedingungen gleichen den in **Tab. 4** bzw. **Tab. 2** beschriebenen. Nach erfolgter Amplifikation eines Teils der Angiopoietin-2 Sequenz lässt sich die angereicherte DNA mit

Hilfe einer Gelelektrophorese nachweisen. Ist der Nachweis positiv, ist nachgewiesen, dass das Transgen transkribiert worden ist.

### **2.3.2 Gelelektrophoretische Größenfraktionierung von DNA-Fragmenten**

Das Prinzip der Gelelektrophorese basiert auf der unterschiedlich schnellen Wanderung verschieden großer DNA-Moleküle in einem elektrischen Feld durch eine Gelmatrix. Die negativ geladene DNA wandert dabei zur Anode. Die Größe der aufzutrennenden DNA-Moleküle entscheidet über die Konzentration der Gelmatrix. Gemische kleinerer Moleküle lassen sich mit höherprozentigen Gelen besser fraktionieren. Bei gleichzeitigem Auftrennen eines Markers können die ungefähren Größen der resultierenden Fragmente bestimmt werden. Die in einer PCR amplifizierten DNA-Sequenzen können so unter Verwendung eines Agarosegels aufgetrennt und sichtbar gemacht werden.

Je nach verwendeter Gelkammer werden in 100 ml bis 400 ml 0.5 x TBE 1 % Agarose durch mehrfaches Aufkochen gelöst. Nach Abkühlen auf etwa 50 °C wird 5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) pro 100 ml Gellösung hinzugegeben und durch Schwenken gemischt. Nach dem Gießen in eine Flachbettgelkammer wird ein Kamm gesteckt. Nach dem Aushärten wird das Gel mit 0.5 x TBE Laufpuffer überschichtet und die DNA mit Ladepuffer in die Taschen pipettiert, wobei eine Menge von 5 µg/cm Taschenbreite nicht überschritten wird. Die angelegte Spannung richtet sich nach der Fragment- und Gelgröße und liegt zwischen 30 V und 200 V. Das DNA-Bandenmuster lässt sich durch kurzzeitige Auflage des Gels auf eine UV-Quelle (314 nm) darstellen, da das Ethidiumbromid in die DNA interkaliert und durch die UV-Strahlung zur Fluoreszenz angeregt wird. Eine Größenzuordnung und Mengenabschätzung ist durch Einsatz einer 1 kB-Leiter (Fa. Gibco) mit der Konzentration von 100 ng/µl möglich, wobei die 1,6 kB-Bande 1/10 der Gesamtmenge ausmacht.

### **2.3.3 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)**

Zur Erfassung aller in einer Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt transkribierten Gensequenzen (mRNAs) können diese nach Isolierung aus dem Zytosol mit Hilfe der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden. Der Nachweis eines spezifischen Transkripts erfolgt anschließend mittels PCR (s.o.). Zeitgleich zur RNA-Isolierung erfolgt die enzymatische Degradation der genomischen DNA mittels DNase. Mit dieser Methode lässt sich u.a. nachweisen, ob ein Transgen transkribiert wird und somit aktiv ist.

Im Kontext der Untersuchungen wurde überprüft, ob das unter der Kontrolle des Opsin Promoters stehende humane Angiopoietin-2 in der Maus-Retina überhaupt exprimiert wird.

### 2.3.3.1 Isolierung und Aufreinigung von RNA

Da die Expression des Transgens in der Rezeptorzellschicht der Retina erfolgt, wurden beide Netzhäute einer Maus aus dem Auge entnommen und „gepoolt“ (s. 2.2.3). Anschließend erfolgte die Lyse der Zellen unter Verwendung des „RNeasy Mini Kit“ der Fa. Qiagen in  $\beta$ -Mercaptoethanol. Unter Hochsalzbedingungen binden die Nukleinsäuren an eine Silica-Gelmatrix. Hierauf wird in geeignetem Puffer DNase I gegeben, welche zur Degradation der genomischen DNA führt. Die Elution der aufgereinigten RNA erfolgt mit einem Niedrigsalzpuffer ( $H_2O_{dd}$ ). Es ist darauf zu achten, daß sämtliche Reagenzien und Materialien Rnase-frei sind.

### 2.3.3.2 Reverse Transkription

Um aus dem aufgereinigten mRNA-Pool der Netzhäute die entsprechende cDNA zu erzeugen, wurde die „Superscript II Rnase H-Reverse Transcriptase“ der Fa. Invitrogen verwendet. Im einzelnen werden in einem Gesamtvolumen von 24  $\mu$ l für 5 Minuten bei 65°C inkubiert: 2  $\mu$ g RNA, 1  $\mu$ g Oligo(dT)<sub>18</sub>, 2  $\mu$ l dNTP Mix (10 mM), ad 24  $\mu$ l mit  $H_2O_{dd}$  Rnase-frei. Anschließend wird das Reaktionsgemisch auf Eis abgeschreckt. 12  $\mu$ l des Ansatzes werden mit 4  $\mu$ l 5x RT-Puffer, 2  $\mu$ l DTT 0.1 M und 1  $\mu$ l Rnasin (40 Einheiten Ribonuclease Inhibitor) versetzt und bei 42°C für 2 Minuten inkubiert. Nach Addition von 1  $\mu$ l Superscript II Reverse Transkriptase (200 Einheiten) wird das Gemisch für weitere 50 Minuten auf 42 °C erhitzt und letztlich die Reaktion bei 70 °C für 15 Minuten inaktiviert. Von der erhaltenen cDNA werden 2  $\mu$ l als Matrize in die sich anschließende PCR eingesetzt.

Zum Ausschluß einer Kontamination der RNA-Extrakte mit genomischer DNA (inkomplette Degeneration durch Dnase I) wird in der PCR neben der eigentlichen cDNA-Probe als Matrize 2  $\mu$ l nicht revers transkribiertes RNA-Isolat eingesetzt. Bei DNA-Kontamination des Isolats tritt hier ebenfalls ein Amplifikat auf. Um sicherzustellen, daß annähernd die gleichen Mengen RNA aus den Netzhäuten der verschiedenen Mauslinien isoliert wurden, erfolgte zusätzlich eine PCR zur Amplifikation der GAPDH-cDNA (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase), einem ubiquitär exprimierten Enzym der Glykolyse.

### 2.3.3.3 Quantifizierung von Ribonukleinsäuren

Zur Bestimmung von RNA-Konzentrationen wird die Absorbtion der jeweiligen Probe bei 260 nm mit Hilfe eines Photometers gemessen. Als Bezugslösung dient der Puffer, in dem die RNA aufgenommen wurde. Die Konzentration (C) errechnet sich nach der Formel:

$C = OD_{260\text{ nm}} \cdot Y \cdot Z$ , wobei  $Y = 40\ \mu\text{g/ml}$  und  $Z = \text{Verdünnungsfaktor}$ .

## 2.4 Immunologische Methoden

### 2.4.1 Immunhistochemie

Proteine lassen sich mit Hilfe von Antikörpern auf histologischen Schnitten *in situ* nachweisen. Hierzu muß das zu untersuchende Gewebe präpariert und eventuell fixiert werden. Anschließend erfolgt der immunologische Nachweis.

#### 2.4.1.1 Gewebepräparation

Zur Gewinnung von Gefrierschnitten werden die frisch entnommenen Netzhäute kurz in PBS gewaschen und danach sofort in „Tissue-Tek“-Gel eingebettet. Mit Hilfe von Trockeneis, das mit 2-Methyl-Butan überschichtet wird, wird das Gewebe eingefroren und anschließend für mindestens 24 h bei  $-80\ ^\circ\text{C}$  gelagert. Zur Anfertigung von Paraffinschnitten müssen die Netzhäute in flüssiges Paraffin eingebettet werden. Zuvor wird das Gewebe jedoch über Nacht mit 1% Para-Formaldehyd oder nach Carnoy (60 % EtOH, 30 %  $\text{CHCl}_3$ , 10 % Eisessig, bei  $4\ ^\circ\text{C}$ ) fixiert. Es schließt sich eine Dehydration des Gewebes an. Dies geschieht mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 80 %, 90 % EtOH für je 30 Minuten, 2 x 95 % EtOH je 30 Minuten, 2 x 100 % EtOH je 45 Minuten, 2 x Xylolersatz Roticlear je 30 Minuten). Aus dem Xylolersatzbad wird das Gewebe für 45 Minuten in ein Paraffinbad bei  $60\ ^\circ\text{C}$  überführt und anschließend über Nacht in einem zweiten Paraffinbad aufbewahrt. Am Folgetag wird das Gewebe in die dafür vorgesehenen Formgefäße überführt und paraffinbedeckt nochmals für 30 Minuten auf  $60\ ^\circ\text{C}$  erhitzt. Das Gewebe innerhalb des Formgefäßes kann nun auf Eis abgeschreckt und nach dem Aushärten aus der Form entnommen werden. Die Lagerung erfolgt bei Raumtemperatur.

#### 2.4.1.2 Anfertigung von histologischen Schnitten

Bevor die Objektträger zur Aufnahme der Schnitte verwendet werden, müssen sie mit 3-Aminopropyl-trimethoxysilan („TESPA“) beschichtet werden. Hierzu werden sie in 70 % EtOH gewaschen und anschließend für 5 Minuten in einer 2 % TESPA-Lösung (in Aceton) beschichtet. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 5 Minuten in Aceton kann man die Objektträger trocknen.

Es folgt die Herstellung der Schnitte. Zur Produktion von Gefrierschnitte wird der Tissue-Tek-Gewebeblock in ein Kryotom eingespannt und es werden 5-8 µm dicke Serienschnitten angefertigt. Nach mehrstündigem Trocknen bei RT werden die Schnitte bei -20 °C gelagert oder sofort weiterverarbeitet (Immunfärbung, s.u.).

Sollen Paraffinschnitte angefertigt werden, werden von dem Paraffinblock mit Hilfe eines Mikrotoms Serienschnitte angefertigt. Der einzelne Schnitt wird auf ein erhitztes Wasserbad (40 °C) überführt, wo er aufgrund der Oberflächenspannung spreitet. Durch Untertauchen auf einem Objektträger wird der Schnitt auf demselben fixiert und anschließend für 2h bei 48 °C getrocknet. Zur Färbung wird das Objekt deparaffiniert. Hierzu kommt der Objektträger 2 x für 10 Minuten in Roticlear (Xylolersatz) und anschließend in eine absteigende Alkoholreihe, um das Gewebe zu rehydrieren (2x 100 %EtOH für 5 Minuten, 95 %, 90 %, 80 %, 70 % EtOH je 3 Minuten anschließend H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>). Es folgt die Immunfärbung.

Paraffinschnitte zeigen einen besseren Morphologieerhalt des Gewebes, jedoch können durch die Prozedur der Herstellung Epitope maskiert oder zerstört werden. Zur „Demaskierung“ der Epitope werden die Schnitte einige Minuten bei 37 °C mit Trypsin behandelt (0,1 % Trypsin, 0,1 % CaCl<sub>2</sub> in 0,05 M Tris-Puffer) oder in der Mikrowelle 3-5 x für je 5 Minuten in 4 °C kaltem Citratpuffer (10 mM tri-Natriumcitrat-Dihydrat; pH 7,4) erhitzt. Die Qualität der Gefrierschnitte bezüglich des Gewebeerhalts erreicht nicht die Qualität der Paraffinschnitte, jedoch ist auf ihnen ein immunologischer Proteinnachweis eher möglich.

### **2.4.1.3 Immunologischer Nachweis von Proteinen *in situ***

Mit dieser Methode lässt sich die Expression von Proteinen *in situ* auf Gewebeschnitten darstellen. Das nachzuweisende Protein wird von einem spezifischen Erstantikörper gebunden. An diesen bindet wiederum ein zweiter, biotinylierter Antikörper. An das Biotin bindet Avidin. Dieses ermöglicht einem weiteren Biotin-Molekül, an das eine Peroxidase gekoppelt ist, die Anlagerung. Die Peroxidase setzt letztlich in der Nachweisreaktion ein Substrat (AEC) in einen Farbstoff um. Es kommt das Vectastain-Kit der Fa. Vector Laboratories zum Einsatz. In der Praxis werden die zuvor erzeugten Gewebeschnitte aufgetaut und für 10 Minuten bei -20 °C in Aceton fixiert. Handelt es sich um Paraffinschnitte, werden die Objekte rehydriert (s. o.). Nach 30 minütigem Trocknen wird das Gewebe mit einem Fettstift umrandet und in einer feuchten Kammer für 5 Minuten mit 5 ml PBS bedeckt. Das PBS wird abgeschlagen und anschließend pro Schnitt mit 80 µl 10 % Kaninchenserum für 15 Minuten unspezifische Proteine blockiert. Nach Entfernen des Serums

werden 80 µl des Erstantikörpers (s. **Tab. 1**, 10µg/ml in PBS) für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf die Schnitte gegeben. Es folgt das Waschen der Schnitte mit PBS für 1 Minute, Abschlagen des PBS und nochmaliges Waschen mit PBS/ 0.1 % TWEEN20 für 5 Minuten. Nach Entfernung der PBS-Lösung kann optional eine Inaktivierung der endogenen Peroxidase vorgenommen werden, indem das Objekt für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 3,3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in MetOH inkubiert wird. Ansonsten wird nach Abschlagen der PBS-Waschlösung 1 Tropfen des Zweitantikörpers (biotinylierter anti-Ziege-Antikörper, Vectastain-Kit, Dosierung nach Herstellerangaben) versetzt mit je 2%<sub>vol.</sub> Kaninchen-/ bzw. Mausserum auf die Schnitte gegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es wird mit PBS für 1 Minute und anschließend für 5 Minuten mit PBS/ 0.1 % TWEEN20 gewaschen. Es folgt die Inkubation mit Avidin und Biotin-gekoppelter Peroxidase für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nach wiederholtem Waschen mit PBS und PBS/ TWEEN20 wird mit jeweils 80 µl AEC-Lösung (Dosierung und Zusammensetzung nach Herstellerangaben, Fa. Sigma) für 20 Minuten entwickelt (mikroskopische Kontrolle der sich entwickelnden Farbintensität). Die Objektträger werden nun ohne Waschen direkt mit Leitungswasser bedeckt und abschließend mit einem Tuch unter Aussparen des Objekts abgetupft. Es schließt sich die Hematoxylin-Gegenfärbung an. Hierzu werden die Objektträger für eine Minute in ein Hematoxylin-Färbebad getaucht und anschließend dreimal in H<sub>2</sub>O gewaschen. Abschließend werden die Gefrierschnitte mit Aquatex wässrig eingedeckelt und die Paraffinschnitte nach Dehydrierung (s. Gewebepräparation) mit Entellan eingedeckelt.

### **2.4.2 Immunoblot („Western Blot“)**

Der immunologische Nachweis von Proteinen erfolgt durch Einsatz von Antikörpern, die das nachzuweisende Protein erkennen, und deren spezifische Bindung durch eine Enzymreaktion nachgewiesen werden kann. Hierzu wird das Proteingemisch zuerst mittels einer denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Proteine anschließend mittels Elektro-Blotting auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Fixiert auf dieser Membran können die Proteine wie beschrieben nachgewiesen werden.

#### **2.4.2.1 Gewinnung von Proteinextrakten**

Um die Expression des humanen Angiopoietin-2 in der Maus-Retina nachzuweisen, werden die Netzhäute freipräpariert und sofort einer Lyse unterworfen. Hierzu werden die beiden Netzhäute der Maus in einen Lysepuffer (s.u.) aufgenommen und mit Hilfe einer sterilen

Kanüle durch mehrmaliges aufziehen mechanisch grob zerkleinert. Der Zelldetritus wird kurz abzentrifugiert und anschließend eine vollständige Homogenisation des Gewebes durch Ultraschall-Behandlung erreicht. Hierzu spannt man die in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß befindlichen Netzhäute in einen „*Sonifier*“ ein und lässt die Schallwellen für ca. 2 Minuten einwirken, bis die Flüssigkeit aufklart. Das Gewebe darf dabei nicht zu stark erhitzen und sollte auf Eis gekühlt werden. Die im Lysat enthaltenen Proteine können nun mittels einer SDS-PAGE aufgetrennt werden. Da aus einer Netzhaut nur sehr geringe Mengen Zellysat gewonnen werden, wird auf eine Proteinmengenbestimmung verzichtet.

### Lysepuffer (Proteinextraktion):

150 mM NaCl,  
0,2 % Triton,  
1 mM EDTA,  
30 mM Tris pH 7.5,  
Proteaseinhibitorencocktail Fa. Boehringer

### **2.4.2.2 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen (SDS-PAGE)**

Die diskontinuierliche denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wird u.a. zur Auftrennung eines Proteingemisches verwendet. Durch die Denaturierung der Proteine wird eine Auffaltung der Tertiärstrukturen erreicht, die die Beladung der Proteine mit SDS ermöglicht. Hierdurch werden alle Proteine mit einer negativen Ladung versehen, so daß die gesamten Proteine unabhängig von ihrer Ausgangsladung je nach Molekulargewicht unterschiedlich schnell zur Anode wandern. Für eine optimale Fraktionierung von Proteinen mit einem Molekulargewicht zwischen 60 kDa und 200 kDa sind 5 % Gele, für Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 16 kDa und 70 kDa 10 % Gele geeignet. Das System besteht aus einem großporigen, 3 % Sammelgel, das etwa 1/3 der gesamten Laufstrecke ausmacht. Die eigentliche Auftrennung erfolgt aufgrund der Masse der aufzutrennenden Proteine über ein engporiges, 10 % Trenngel. Im Sammel- und Trenngel befinden sich Chloridionen, im Laufpuffer Glycin. Die Chloridionen wandern nach Anlegen der Spannung schnell zur Anode, während das Glycin nur langsam in das Sammelgel eindringt und sich nur langsam bewegt, da es bei pH 6.8 überwiegend als Zwitterion vorliegt. Zwischen Glycin und Chloridionen entsteht somit ein „ionenarmer“ Bereich, so daß die Proteine hier den Ladungstransport übernehmen. Je nach ihrem Molekulargewicht, das ihre elektrophoretische Mobilität bestimmt, ordnen sich die Proteine an und werden zugleich an der Grenze zwischen

Sammel- und Trenngel konzentriert. Im Trenngel werden die Proteine von den Glycinionen überholt, da Glycin bei pH 8.8 negativ geladen ist. Es folgt die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht.

Praktisch wird nach dem Einspannen der zuvor gereinigten Glasplatten in die Gelgießapparatur mini-Protean II (Fa. BioRad) die Trenngellösung zwischen die Platten ( 73 mm x 100 mm) gegossen. Diese besteht aus 7,5 % Acrylamid, 0.1 % SDS (Natriumdodecylsulfat) und 1M Tris pH 8.8 in H<sub>2</sub>O. Zum Aushärten werden 100 µl einer frischen 10 % Ammoniumpersulfat-Lösung (APS) und 10 µl TEMED auf 10 ml Gelvolumen zugesetzt. Damit sich während des Aushärtens eine ebene Oberfläche bilden kann, wird die Gellösung sofort mit wässrigem Butanol oder H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> überschichtet. Nach erfolgtem Aushärten wird das Butanol bzw. das Wasser abgezogen und das Sammelgel pipettiert. Dies besteht aus 3 % Acrylamid, 1M Tris pH 6.8 und 0.1 % SDS. Nach Zusatz entsprechender Mengen TEMED und APS wird das Sammelgel gegossen und der Kamm gesteckt. Nach dem Aushärten wird das fertige Gel in die Elektrophoresekammer eingespannt, der Kamm gezogen, mit Laufpuffer nach Lämmli überschichtet und die Taschen gespült. Zu 20 µl Probe wird 1/6 Volumen 6 x Auftragspuffer nach Lämmli hinzugegeben und zur Denaturierung für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt. Gleiches gilt für den Marker. Dieser besteht aus Molekülen bestimmter Größe, die nach der Auftrennung eine Größenordnung der aufzutrennenden Proteine zulassen. Alternativ kann zu dem Lämmli-Auftragspuffer 8M Harnstoff hinzu gegeben. Weiterhin besteht die Möglichkeit, einen DTT-haltigen SDS-Auftragspuffer zu verwenden. Es folgt das Auftragen der Proben und die Elektrophorese mit 100 V für 10 Minuten und anschließend mit 160 V bis zur vollständigen Auftrennung.

### Reduzierender SDS-Probenpuffer (DTT-haltig):

Tris pH6,8	200 mM
SDS	200 mM
Glycerin	30 %
DTT (frisch)	32 mM
Bromphenolblau	0,001 %

### **2.4.2.3 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen**

Die über eine denaturierende SDS-PAGE aufgetrennten Proteine lassen sich mittels Elektro-Blotting leicht auf eine Nitrozellulosemembran überführen. Hier können einzelne Proteine

über die Bindung spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Der erste Antikörper erkennt spezifisch das Protein (s. **Tab.1**). An ihn bindet in diesem Fall der mit einer Peroxidase gekoppelte zweite Antikörper. Die Peroxidase setzt ein bestimmtes Substrat unter Lichtemission um. Die Lichtemission schwärzt einen Röntgenfilm.

Das PAA-Gel wird nach Ausbau aus der Elektrophorese-Apparatur für 5 Minuten in *semi-dry*-Puffer gelegt. Daraufhin positioniert man eine Nitrozellulosemembran auf drei mit *semi-dry*-Puffer befeuchtete Whatman-Papiere in Größe des Geles. Auf die Membran kommt nun das Gel und auf dieses wiederum drei Lagen feuchtes Whatman-Papier. Luftblasen werden durch Abrollen entfernt. Der Papier-Gel-Membran-Papier-Stapel wird in eine Semi-Dry-Transfer-Zelle überführt und bei 100 mA/Gel ( $2\text{mA}/\text{cm}^2$ ) für 1 h einer elektrischen Spannung ausgesetzt. Es ist darauf zu achten, daß der Stapel so zwischen die flächigen Elektroden positioniert wird, daß die negativ geladenen, SDS-beladenen Proteine auf ihrem Weg zur Anode auf die Membran treffen. Im Idealfall binden die Proteine fest an der Nitrozellulosemembran und können nun mittels spezieller Antikörper immunologisch nachgewiesen werden.

#### **2.4.2.4 Immunologischer Proteinnachweis**

Nachdem die Proteine in der SDS-PAGE aufgetrennt und auf die Nitrozellulosemembran übertragen worden sind, lassen sie sich jetzt durch Inkubation mit spezifischen Antikörpern nachweisen. Die Membran wird hierzu ÜN bei 4 °C oder alternativ für 3 h bei Raumtemperatur in eine Blockierungslösung (5 % Milchpulver [Fa. Rapilait] in TBST) gelegt. In dieser Lösung kann die Nitrozellulose auch bei 4 °C aufbewahrt werden, wenn 0.05 % Natriumacid hinzugefügt wird. Vor Zugabe des ersten Antikörpers wird die Membran für 1 Minute in TBST geschwenkt. Die Inkubation des ersten Antikörpers erfolgt ebenfalls bei 4 °C ÜN in einem geeigneten Gefäß. Hierzu wird der Erstantikörper in der jeweils optimalen Verdünnung (1:1000 bis 1:10.000 entspricht einer Endkonzentration von 0.1 µg/ml bis 1,0 µg/ml) in 5 ml TBST / 1 % Milchpulver eingesetzt. Am nächsten Tag wird zweimal für 30 sec und zweimal für 30 Minuten durch Schwenken in TBST gewaschen. Die antikörperhaltige Lösung kann aufgefangen und nach Versetzen mit 0.1 % Natriumacid bei 4 °C gelagert werden. Der zweite Antikörper (Kaninchen-anti-Ziege-Antikörper, gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase, Fa. Dako) wird in einer Verdünnung von 1:2000 in TBST hinzugegeben und für 45 – 60 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wird zweimal für 30 sec und einmal für 30 Minuten bei RT in TBST geschwenkt. Abschließend wird die Membran für 10 Minuten in

TBS gewaschen. Zur Entwicklung wird die Membran in 5 ml eines 1:1 Gemisches aus Entwickler / Verstärker (ECL-Kit, Fa. Amersham) übertragen und für 1 Minute bei RT inkubiert. Anschließend wird die Membran zwischen zwei Overhead-Folien gelegt und Luftblasen durch Herausrollen entfernt. Hiernach wird ein Röntgenfilm (ECL-Hyperfilm) für 0.5 bis 2 Minuten aufgelegt, entwickelt und abschließend der Marker auf den Film übertragen. Soll die selbe Membran für den Nachweis eines weiteren Proteins verwendet werden, können die Antikörper-Komplexe mittels „*stripping*“ entfernt werden. Hierzu wird die Membran für 30 Minuten bei 56 °C in Stripping-Lösung gelegt und anschließend 3 x für 10 Minuten unter Schütteln mit TBST gewaschen. Die Aufbewahrung erfolgt in TBST/ 5 % Milchpulver.

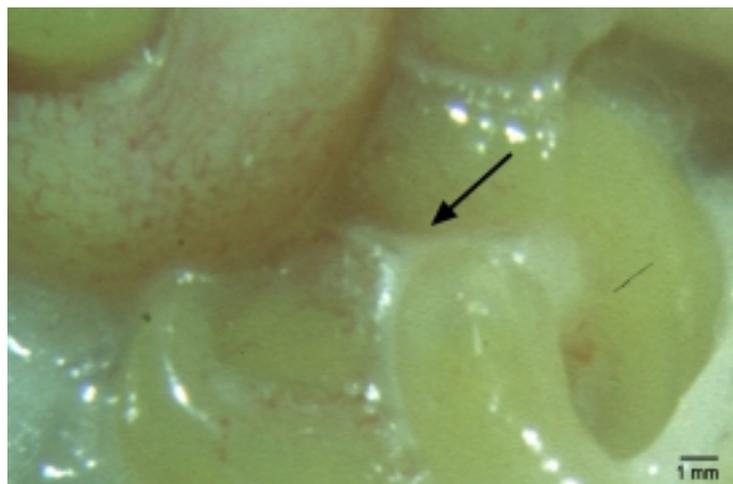
### **2.4.3 Immunologische Perizytendarstellung**

Zur dreidimensionalen Darstellung des Perizytenbesatzes der Netzhautgefäße werden die Mäuse getötet, die Augen entnommen und für 2 h in 2 % PFA fixiert. Anschließend wird die Retina freipräpariert (s. **2.2.3**), in PBS gewaschen und für 1,5 h bei RT in PBS/ 0.1 % TWEEN 20 + 1 % BSA permeabilisiert. Es folgt die Inkubation mit dem 1. Antikörper und dem Fluorophor gekoppelten Isolektin zur Kofärbung der Kapillaren in PBS/ 0.1 % TWEEN 20 übernacht bei 4 °C unter Lichtschutz. Am nächsten Tag werden die Netzhäute 3 x kurz mit PBS / 0.1 % TWEEN 20 gewaschen und anschließend mit dem 2. Antikörper für 2h bei RT in PBS/ 0.1 % TWEEN 20 im Dunkeln inkubiert. Nach erneutem Waschen können die jeweiligen Netzhäute auf einem Objektträger ausgebreitet werden und die Strukturen unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert werden. Da die benutzten Fluorophore lichtempfindlich sind, ist bei der Versuchsdurchführung auf geringen Lichteinfall zu achten.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Angiopoietin-2: Beteiligung an der Vaskularisierung der reifenden Netzhaut

Angiopoietin-2 ist nicht nur an Umbauvorgängen im reifen Gefäßsystem beteiligt, sondern wird auch während der postpartalen Vaskularisierung der Netzhaut im Bereich der Kapillarbetten verstärkt exprimiert. Um die Effekte eines Überangebotes an Angiopoietin-2 auf die Gefäße der Netzhaut besser in einen Gesamtkontext bringen zu können, ist zuvor die Frage zu beantworten, in wieweit sich ein Angiopoietin-2 Mangel auf die Ausbildung der Gefäßstrukturen auswirkt. Hierzu wurden Tiere analysiert, deren jeweiligen Angiopoietin-2 Allele durch Insertion einer LacZ-Kassette ( $\beta$ -Galaktosidase) in das erste Exon des Angiopoietin-2 Gens ausgeschaltet und so entweder homozygote „Angiopoietin-2 *knock out* Mäuse“ (Angiopoietin-2<sup>-/-</sup>-Mäuse) oder heterozygote „Angiopoietin-2/LacZ *knock in* Mäuse“ (Angiopoietin-2<sup>+/-</sup>-Mäuse) erzeugt wurden [Gale et al. 2002, Valenzuela et al. 2003]. Auf den ersten Blick war bei der Propagierung der homozygoten Mäuse auffällig, dass die Tiere ein gestörtes Lymphsystem ausbilden (s. **Abb. 18**). In der Bauchhöhle der homozygoten Tiere findet sich ein chylöser Aszites („Bauchwassersucht“) und die meisten Mäuse überleben die ersten Wochen nicht. Allerdings erreichen sie das Alter, in dem die Untersuchungen der Netzhautgefäße geplant sind.



**Abb. 18 Eröffneter Bauchraum von Angiopoietin-2 knock out Mäusen**

In der Bauchhöhle von gesäugten Angiopoietin-2 knock out Mäusen ist zwischen den Darmschlingen ein ausgeprägter chylöser Aszites (Pfeil) zu erkennen.

Der beobachtete Lymphgefäß-Phänotyp weisen darauf hin, dass Angiopoietin-2 auch bei der Ausbildung eines intakten Lymphsystems beteiligt ist.

Mit Hilfe der heterozygoten LacZ *knock in* Tiere, deren Gefäßphänotyp dem der Wildtypiere entspricht, sollte untersucht werden, ob und in welchen Strukturen der Netzhaut der Angiopoietin-2 Promoter während der Vaskularisierungsphase der Retina aktiviert wird. Die Angiopoietin-2 *knock out* Tiere hingegen stellen ein einmaliges Modell dar, mit dessen Hilfe die Notwendigkeit der Angiopoietin-2-Expression in der entscheidenden Phase der Netzhaut-Reifung untersucht werden kann. Zur dreidimensionalen Darstellung des gesamten Gefäßsystems einer Netzhaut wurden entweder die Endothelien mit Fluorophoren markiert oder die Gefäße durch die unter Kontrolle des Angiopoietin-2 Promoters stehende LacZ-Expression nachgewiesen.

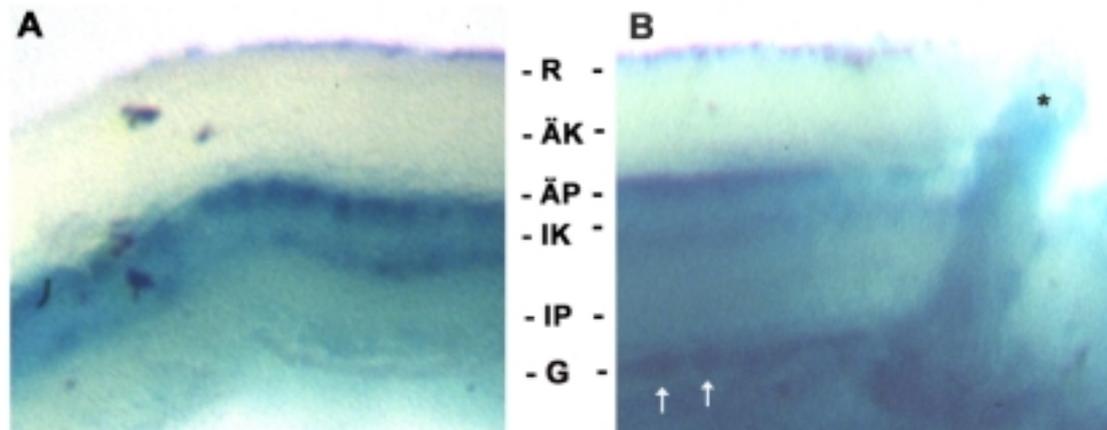
Die Morphologie der Kapillaren in Angiopoietin-2<sup>-/-</sup> Tieren sollte mit der von Angiopoietin-2 exprimierenden Mäusen verglichen werden. Hierzu wurden enzymatische Netzhaut-Digestionen (s. 2.2.5) durchgeführt. Die ebenfalls geplante quantitative Analyse des Perizytenbesatzes der Gefäße war jedoch nicht möglich, da die Kapillarnetze aufgrund der in Abschnitt 3.1.2 beschriebenen Missbildungen mit Hilfe dieser Methode für aussagekräftige quantitative Analysen nicht vollständig zu präparieren waren (s.a. 4.1.1).

### **3.1.1 Analyse der Aktivität des Angiopoietin-2 Promoters in der reifenden Netzhaut in Angiopoietin-2 LacZ-Knock in Mäusen**

Die Frage, ob und in welchen Strukturen der Angiopoietin-2 Promoter während der Vaskularisierung der Netzhaut aktiv ist, lässt sich mit Hilfe der Angiopoietin-2 LacZ *knock in* Mäuse durch  $\beta$ -Galaktosidase Färbung elegant beantworten. Es wurden die Netzhäute 12 Tage alter Tiere untersucht, da zu diesem Zeitpunkt die Front aussprossender neuer Gefäße den Bereich des tiefen Kapillarbett (äußere plexiforme Schicht) erreicht.

Die LacZ-Färbung zeigt Promoteraktivität in zwei Schichten der Retina (s. **Abb. 19**). Am stärksten ist die Färbung im Bereich des Übergangs äußere plexiformer Schicht zu innerer Körnerschicht, in der das tiefe Kapillarbett gelegen ist (s. **Abb. 4**). Weiterhin ist  $\beta$ -Galaktosidase Expression in der inneren plexiformen Schicht nachweisbar, in der das mittlere Kapillarnetz liegt. Im Bereich der oberflächlichen Gefäße in der Ganglienzellschicht ist jedoch keinerlei Färbung zu erkennen. Der leichte Blauschimmer der äußeren Begrenzung in Höhe des Pigmentepithels ist als brechungsbedingter Artefakt zu werten. Somit konnte

gezeigt werden, dass der Angiopoietin-2 Promoter während der Vaskularisierung der Netzhaut an P12 im Bereich der tiefen Kapillarbetten aktiviert wird.



**Abb. 19 Querschnitt der Netzhaut einer Angiopoietin-2 knock out Maus**

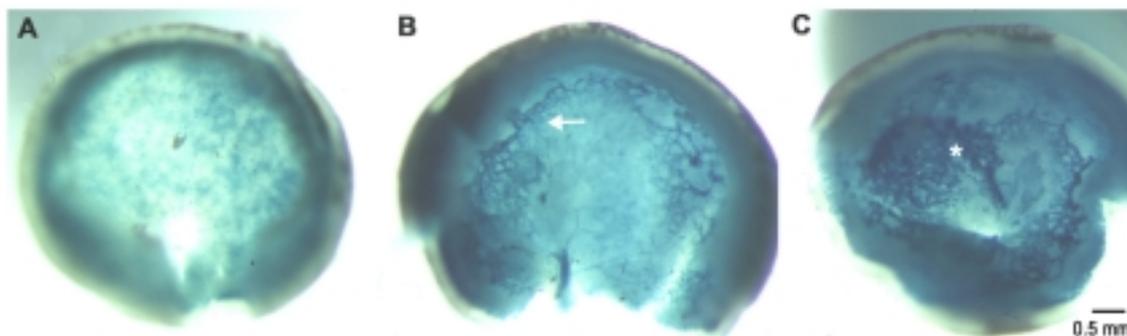
Transversale Anschnitte von  $\beta$ -Galaktosidase gefärbten Netzhäuten an Tag P12. **A)** Netzhaut einer heterozygoten Angiopoietin-2/*LacZ* knock in Maus: die stärkste  $\beta$ -Galaktosidase Expression ist im Übergang von innerer Körnerschicht zu äußerer plexiformen Schicht zu erkennen. Weitere Expression findet sich im inneren Bereich der inneren Körnerschicht. In beiden *LacZ*-positiven Schichten verlaufen im adulten Tier die Kapillarbetten der Netzhaut. **B)** Netzhaut einer homozygoten Angiopoietin-2 knock out Maus im Bereich des Eintritts des *N. opticus* (\*). Das Färbemuster entspricht dem des heterozygoten Tieres, jedoch findet sich an der Oberfläche der Retina zusätzliche  $\beta$ -Galaktosidase Expression (Pfeile). Dieser Bereich entspricht dem der Netzhaut aufliegenden malformierten Gefäßnetz.

### 3.1.2 Analyse der Gefäßstrukturen homozygoter Angiopoietin-2 knock out Mäuse

Bevor wir die Effekte eines Überangebotes von Angiopoietin-2 auf die Gefäße eines adulten Organismus untersuchten, interessierte uns, welche Auswirkungen ein Fehlen von Angiopoietin-2 während den ersten Tagen *post partum* auf die Ausbildung eines funktionellen Gefäßsystems in der Retina und auf den Perizytenbesatz der Netzhautkapillaren hat. Hierzu wurden Angiopoietin-2 knock out Mäuse (Angiopoietin-2<sup>-/-</sup>) erzeugt (s.o.). Die dreidimensionale Darstellung der tiefen Kapillarnetze wurde mit Hilfe von fluoreszenzmikroskopischen Analysen vorgenommen. Zur Beschreibung der Morphologie der Gefäße wurde ebenfalls die gefäßassoziierte Expression der *LacZ*-Kassette in den Angiopoietin-2 knock out Mäusen [Hackett et al. 2002] genutzt. Nach  $\beta$ -Galaktosidase Färbung sind die Gefäßbäume gut zu bewerten. Eine zweidimensionale Präparation der Gefäße mit Hilfe von Netzhaut-Digestionen zur Analyse des Perizytenbesatzes war möglich. Allerdings konnten nur qualitative Aussagen bezüglich Morphologie und keine quantitativen Aussagen bezüglich Perizytenzahl gemacht werden.

### 3.1.2.1 Darstellung des Gefäßnetzes von Angiopoietin-2 *knock out* Mäusen mittels LacZ Färbung der Netzhaut

Hackett et al. konnte eine gefäßassoziierte LacZ-Expression in den Angiopoietin-2<sup>-/-</sup> Tieren nachweisen [Hackett et al. 2002, Gale et al. 2002]. Durch LacZ-Färbung war es uns daher möglich, in den Angiopoietin-2 defizienten Tieren ein der Netzhaut aufliegendes Gefäßnetz darzustellen (s. **Abb. 20 B, C** und auch **Abb. 19 B**). Im Vergleich hierzu fand sich in den heterozygoten Angiopoietin-2 *knock in* Mäusen keine Färbung auf der Netzhautoberfläche. (s. **Abb. 20 A** und **19 A**). Das beschriebene Gefäßsystem in den Angiopoietin-2 *knock out* Mäusen ist wahrscheinlich auf das persistierende Hyaloid-Gefäßsystem zurückzuführen. Dieses zur Versorgung der Linse angelegte, embryonale Relikt zeigt deutliche Malformationen. Auffällig ist die inhomogene Verknüpfung des Kapillarnetzes. Die randbildenden Gefäße erscheinen großlumiger und enger vernetzt als die zentral gelegenen (s. **Abb. 20 B, C**). Das Färbemuster entspricht dem malformierten Gefäßphänotyp, der auch mittels enzymatischer Digestionen nachzuweisen war (s.u.).



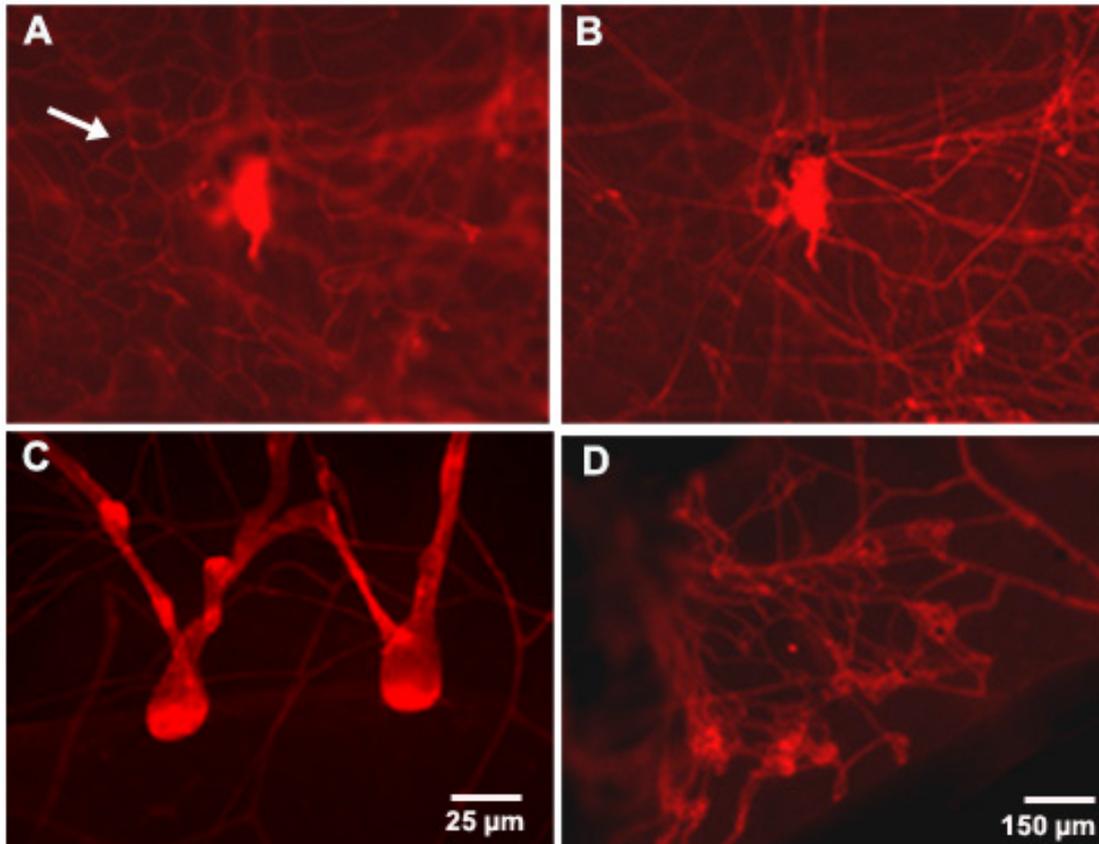
#### **Abb. 20 Übersicht über die Netzhäute von Angiopoietin-2 *knock out* Mäusen**

Netzhäute von heterozygoten Angiopoietin-2/LacZ *knock in* Mäusen (**A**) und von homozygoten Angiopoietin-2/LacZ *knock out* Mäusen (**B + C**). Deutlich zu erkennen ist die  $\beta$ -Galaktosidase Expression in den der Retina aufliegenden Gefäßen von Angiopoietin-2 *knock out* Mäusen (**Pfeil**). In den heterozygoten Tieren zeigt diese Schicht keine Färbung. In **C** erkennt man die leichte Ablösbarkeit des Gefäßnetzes von der Netzhaut (\*) und seinen Ursprung in der Zentralarterie.

### 3.1.2.2 Dreidimensionale Analyse der Kapillarmorphologie von Angiopoietin-2 *knock out* Mäusen mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie

Die in der Netzhaut liegenden Kapillarbetten von 19 Wochen alten Tieren wurden mittels Bindung von Fluorophoren an die Gefäße dargestellt. Auffällig sind zwei unterschiedliche Gefäßnetze, die in den Netzhäuten der Angiopoietin-2 *knock out* Mäuse in verschiedenen Ebenen zu finden waren (s. **Abb. 21 A, B**). Das auf der Netzhaut liegende Gefäßsystem

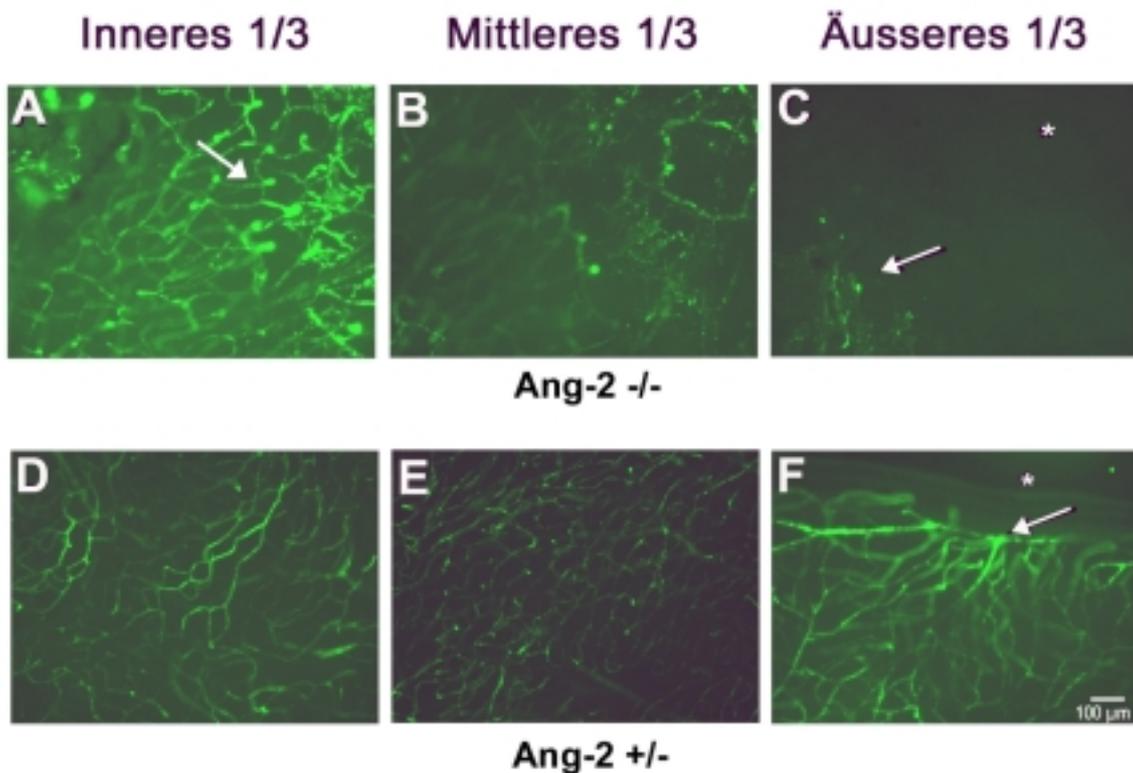
entspringt der Zentralarterie (s. **Abb. 21 B**), wirkt stark malformiert und zeigt deutlich dilatierte Gefäßabschnitte (s. **Abb. 21 D**). Es entspricht in seiner Morphologie den Gefäßstrukturen, die bereits in der LacZ-Färbung zu beobachten waren (s. **Abb. 20 B, C**). Wahrscheinlich handelt es sich dabei um das persistierende Hyaloidgefäßsystem.



**Abb. 21 Darstellung der Gefäßnetze in Angiopoietin-2 knock out Mäusen mittels Isolectin-TRITC Immersionsfärbung**

Fluoreszenzmikroskopischen Detailaufnahme des selben Bildausschnitts (A+B) in unterschiedlichen Ebenen **A**: Schärfenebene innerhalb der Retina; Gefäße mit homogenerer Struktur (Pfeil) **B**: Schärfenebene vor der Retina; malformiertes, der Netzhaut aufliegendes Gefäßnetz mit Ursprung in der Zentralarterie (zentral sichtbar). **C**: Gleiche Schärfenebene wie in **A**, peripherer Bereich mit randbildenden trommelschlägelförmigen Gefäßausstülpungen **D**: Gleiche Schärfenebene wie in **B**, peripherer Bereich mit deutlichen Malformationen und Gefäßdilataationen.

Das innerhalb der Netzhaut gelegene Gefäßnetz hingegen erscheint im zentralen Bereich eher homogen (s. **Abb. 21 A**), erreicht jedoch die Peripherie der Retina nicht (s. **Abb. 22 C**) und wird von blind endenden Gefäßausstülpungen begrenzt (s. **Abb. 21 C, 22 A, 24 B**). Diese trommelschlägelartigen Gefäßmalformationen sind physiologischer Weise nicht zu finden (s. **Abb. 22 D, E**). Die zur Angiopoietin-2 Expression fähigen Mäuse zeigen ein unauffälliges Gefäßnetz, das bis in die Peripherie der Netzhaut reicht (s. **Abb. 22 F**).



**Abb. 22 Dreidimensionale Darstellung des Gefäßnetzes der Netzhäute von Angiotensin-2 knock out Mäusen nach FITC-Dextran Perfusionsfärbung**

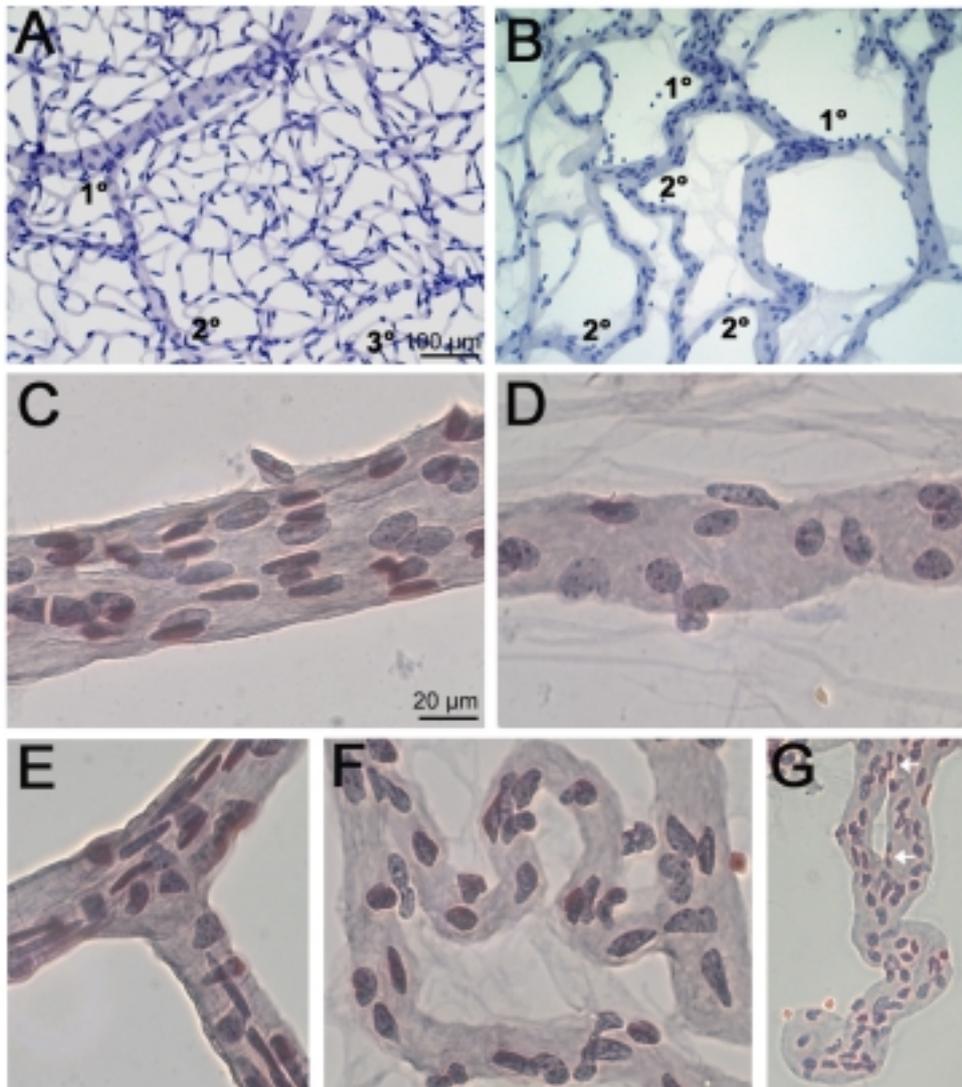
Die in der Netzhaut gelegenen Gefäße der Angiotensin-2 *knock out* Mäuse (*Ang-2* <sup>-/-</sup>) zeigen am Übergang vom inneren zum äußeren Drittel der Netzhaut eine Abnahme der Kapillardichte sowie eine Zunahme von blind endenden, aufgetriebenen Gefäßstümpfen (A + B). Das äußere Drittel ist nicht vaskularisiert (C). Die heterozygoten *LacZ knock in* Tiere (*Ang-2* <sup>+/-</sup>) zeigen diesen Phänotyp nicht (D – E). (\* = Rand der Netzhaut, → = äußere Begrenzung der Retinagefäße).

### 3.1.2.3 Kapillarbäume von Angiotensin-2 knock out Mäusen in Retina-Digestionen.

Zur genaueren Analyse der in den vorhergehenden Experimenten beschriebenen Gefäßmalformationen sollen die einzelnen Strukturen detailliert dargestellt werden. Hierzu wurden die Gefäßnetze durch enzymatische Digestion vom übrigen Gewebe befreit, um die Histologie der Kapillaren mittels PAS-Färbung beurteilen zu können. Um diese Ergebnisse mit den Resultaten der Fluoreszenzanalysen vergleichen zu können, wurden in beiden Experimenten Mäuse gleichen Alters untersucht.

Zum einen wurden die zellulären Strukturen derjenigen Gefäße dargestellt, die der Retina aufliegen und eindrucksvolle Malformationen zeigen (s. o.). Die zweidimensionalen Präparate zeigen deutlich das unphysiologische Gefäßgeflecht mit den gefärbten Endothelzellkerne und den Perizyten. Im Vergleich zum Wildtyp sind diese Strukturen deutlich pathologisch verändert. So ist die Hierarchie der Gefäßbäume eher untypisch (s. **Abb. 23 B**). Aus größeren

Arteriolen 1. Ordnung gehen nicht wie gewöhnlich kleinere Gefäße hervor, sondern die großkalibrigen Gefäße bilden ein eigenes weitmaschiges Netzwerk. Auch zeigen sie nicht die übliche langgestreckte Form, sondern erscheinen eher gewunden (s. **Abb. 23 B, F**).

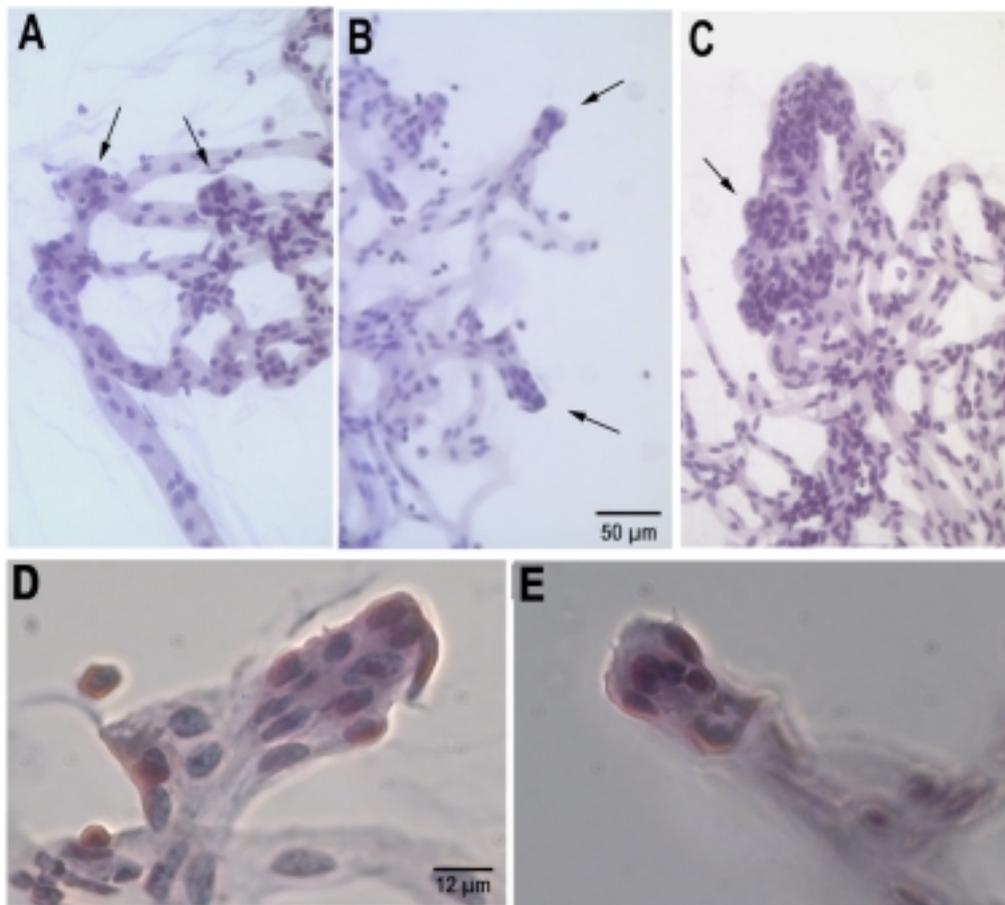


**Abb. 23** Netzhaut-Digestion von Angiotensin-2 knock out Mäusen im Überblick

Deutlich sichtbar ist der Unterschied zwischen den Gefäßverknüpfungen im *knock out Tier* (**B**) und im Wildtyp (**A**). Die physiologische Gefäßhierarchie ist im Wildtyp erhalten. Größere Arteriolen gehen in kleinere Gefäße über, die wiederum in die Kapillarbetten münden. Aufzweigungen 1° Grades, 2° Grades und 3° Grades folgen regelmäßig aufeinander (**A**). In der *knock out* Maus ist dieser Gefäßbaum nicht so stark ausgeprägt, der Gefäßdurchmesser verringert sich nach Aufzweigungen nicht zwangsläufig; auch größere Gefäße erscheinen unphysiologisch geschlängelt (**B, F**). Weiterhin sind die Gefäße im *knock out* Tier nicht gerade ausgerichtet und auch nicht von regelmäßig angeordneten Endothelzellen besetzt, wie es in den heterozygoten *Ang-2<sup>+/-</sup>* Mäuse der Fall ist (**C, E**). In den Angiotensin-2 defizienten Tieren ist die Zahl der Endothelzellkerne verringert; die Perizyten erscheinen unverändert, jedoch regellos auf den Gefäßen verteilt (**D, F**). Weiterhin ist eine haarnadelförmige Gefäßstruktur auffällig, die über einen kurzen Bereich in zwei von einander isolierte Gefäße aufgespalten ist (**G**, weiße Pfeile).

In dem Verbund der größeren Gefäße existieren auch keine Aufzweigungen 2. und 3. Grades, so dass der „Gefäßzwischenraum“ frei bleibt und nicht kapillarisiert ist (s. **Abb. 23 B**). Auffällig ist auch, dass die Zahl der Endothelzellkerne in den  $Ang-2^{-/-}$  Mäusen im Vergleich zum Wildtyp im Bereich des Gefäßnetzes reduziert ist. Die Perizyten scheinen zufällig auf den Kapillaren verteilt. Bemerkenswert ist weiterhin eine vaskuläre Struktur, die wie eine Haarnadel geformt ist und über eine kurze Strecke in zwei separate Gefäße aufgetrennt ist (s. **Abb. 23 G**).

Betrachtet man zum anderen die Digestionen des innerhalb der Retina gelegenen Gefäßnetzes, so zeigen sich blind endende, trommelschlägelartigen Malformationen (s. **Abb. 24 B**). An den Spitzen dieser Konglomerate ist eine deutliche Akkumulation von Zellen zu erkennen (s. **Abb. 24 D, E**).



**Abb. 24 Detailansicht der Netzhaut-Digestionen von Angiopoietin-2 knock out Mäusen**

Deutlich erkennbar sind die bereits in der Fluoreszenzmikroskopie aufgefallenen Malformationen. Diese imponieren als endständig gelegene, aufgetriebene Gefäßkonglomerate (**A-C**, Pfeile) und scheinen aus einer Vielzahl an Zellen aufgebaut zu sein (erhöhte Zahl an Zellkernen in diesem Bereich, **D + E**).

## 3.2 Intravitreale Proteininjektionen

Zum Nachweis eines Effekts von Angiopoietin-2 auf den Perizytenbesatz der Netzhautkapillaren wurden intravitreale Injektionen von rekombinantem Angiopoietin-2-Protein in die Augen von Versuchstieren vorgenommen (s. 2.2.2). Auf diese Weise ist es möglich, hohe Protein-Konzentrationen direkt in die Nähe der Kapillarbetten zu applizieren. Das verwendete humane Angiopoietin-2 ist auf Bioaktivität in Bezug auf Nagerzellen positiv getestet. Als Versuchstiere wurden zum einen Wistar-Ratten verwendet. Die Auswertung erfolgte durch enzymatische Netzhaut-Digestion und PAS-Färbung der Gefäße (s. 2.2.5 und 2.2.6). Desweiteren wurde rekombinantes Angiopoietin-2 in transgene P-LacZ-Mäuse injiziert, die  $\beta$ -Galaktosidase in ihren Perizyten exprimieren. Die Auswertung erfolgte durch  $\beta$ -Galaktosidase-Färbung der gesamten Netzhaut und anschließender Bestimmung der Anzahl blauer Perizyten pro Kapillarfläche.

Nach Ablauf einer Inkubationszeit von einer Woche nach Injektion der jeweiligen Lösungen liessen sich die Kapillarnetze der entsprechenden Versuchsgruppen (s. **Tab. 5**) ohne Unterschied gut präparieren. Auch zeigten die Augen der Tiere keine entzündlichen Veränderungen, so dass eine aussagekräftige Analyse des Perizytenbesatzes der Netzhautkapillaren möglich war. Der Injektionskanal war, wenn überhaupt, lediglich als kleine umschriebene Trübung sichtbar. Die Tiere zeigten direkt nach der Injektion sowie zu späteren Zeitpunkten keinerlei Verhaltensauffälligkeiten, auch schienen sie kein Fremdkörpergefühl im Auge zu haben. Ein negativer Einfluß der Injektionen auf den Visus der Tiere konnte nicht beobachtet werden.

### 3.2.1 Netzhautdigestion nach Injektion von Angiopoietin-2 in die Ratte

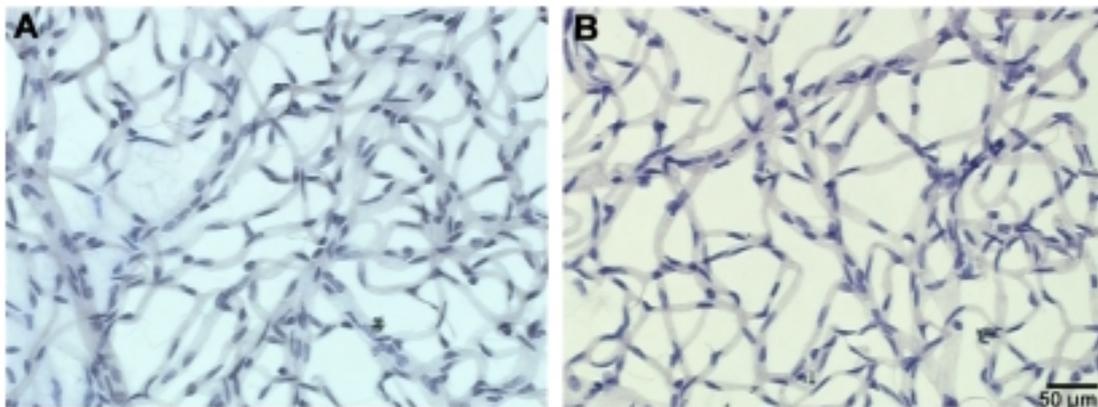
Als Versuchstiere kamen 5 Wochen alte männliche Wistar-Ratten zum Einsatz. Eine Versuchseinheit bestand aus 4 Tieren. Es wurden Angiopoietin-2-Injektionen verschiedener Proteinkonzentrationen in die Augen vorgenommen. Als Kontrolle ist denaturiertes Protein bzw. PBS in das jeweilige andere Auge des selben Tieres injiziert worden oder es erfolgte keine Manipulation des Auges. Neben den reinen Proteininjektionen (Versuchseinheiten I-III) wurden auch Koinjektion von Angiopoietin-2 und löslichem Tie-2 Rezeptor durchgeführt (Versuchseinheit IV). Hierdurch sollte überprüft werden, ob ein Angiopoietin-2 vermittelter Effekt kompetitiv gehemmt werden kann. In jeweils ein Auge wurde ein Volumen von 10  $\mu$ l gespritzt. Die Einzelheiten des Versuchsaufbaus sind **Tab. 5** zu entnehmen. Die Auswertung

erfolgte nach 8 Tagen durch Anfertigung von enzymatischen Netzhaut-Digestionen mit anschließender PAS-Färbung (s. 2.2.5).

**Tab. 5 Schema der Angiopoietin-2 Injektionen in Wistar-Ratten**

Versuchseinheit	Injizierte Substanz	Kontrolle	Anzahl Tiere
I	100 ng rAng-2	PBS	4
II	330 ng rAng-2	PBS	4
III	1000 ng rAng-2	1000 ng rAng-2°C	4
IV	330 ng rAng-2 + 6000 ng Tie2Ig	6000 ng Tie2Ig-Chimäre	4

rAng-2 = rekombinantes Angiopoietin-2; Tie-2-Ig = Tie-2-Ig-Chimäre, 12 x mol. Überschuß



**Abb. 25 Netzhaut-Digestionen der Ratte nach intravitrealer Injektion von rekombinantem Angiopoietin-2**

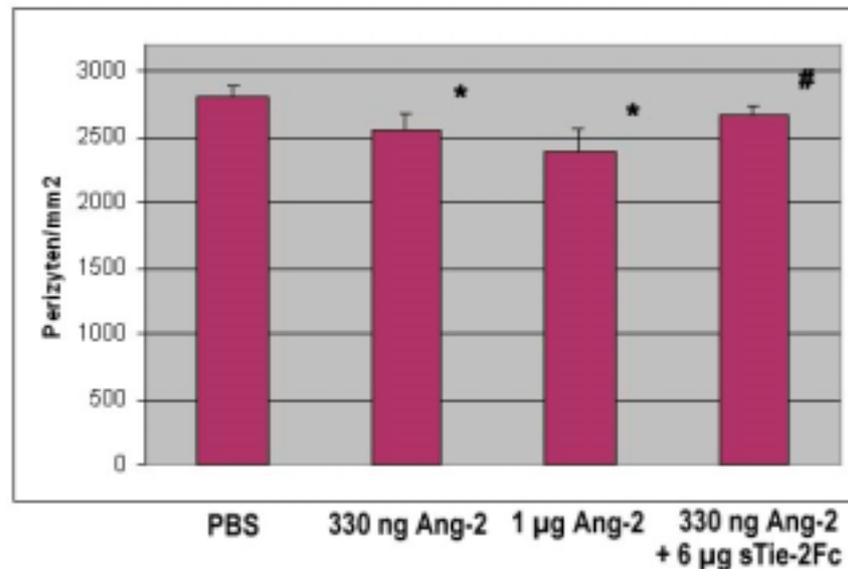
Die Darstellung des Gefäßgeflechts im Überblick zeigt weder im Fall der Angiopoietin-2 Applikation (A) noch der Kontroll-Injektion (B) einen auffälligen Befund.

### 3.2.1.1 Dosisabhängiger Perizytenabfall nach Injektion von Angiopoietin-2

Nach Injektionen von Angiopoietin-2 zeigen die Gefäße in den PAS-gefärbten Netzhaut-Digestionen makroskopisch keine Veränderungen bezüglich Gefäßdurchmesser oder Struktur der Kapillarverknüpfungen (s. **Abb. 25**). Die statistische Auswertung offenbart hingegen eine signifikante Abnahme der Perizytenzahl pro Kapillarfläche im Vergleich zu den Kontrollinjektionen (s. **Abb. 26**).

Dieser Effekt ist klar dosisabhängig und zeigt seine stärkste Ausprägung nach Injektion der höchstkonzentrierten Angiopoietin-2 Lösung (1000ng/Inj.). Da ausschließlich die Perizyten

der Kapillarregion ausgezählt und der Perizytenbesatz größerer Arteriolen vernachlässigt wurde, findet der beschriebene Perizytenabfall in den tiefen Kapillarbettungen der Netzhaut statt.



**Abb. 26 Graphische Darstellung des Perizytenabfalls nach Angiotensin-2 Injektion**

Die Graphik zeigt die dosisabhängige Abnahme des Perizytenbesatzes der Kapillaren nach Injektion von rekombinantem humanen Angiotensin-2. Nach einmaliger Injektion von 330 ng Angiotensin-2 vermindert sich der Perizytenbesatz um ca. 10 %. Injektion von 1000 ng führt sogar zu einem Perizytenverlust von ca. 17 %. Der beschriebene Effekt ist durch Koinjektion von Angiotensin-2 und löslichem Tie-2 Rezeptor antagonisierbar. n = 4, \* = vs PBS: p < 0.05 # = vs PBS: p > 0.05

### 3.2.1.2 Hemmung der Angiotensin-2 Wirkung durch Tie-2/Ig-Chimäre

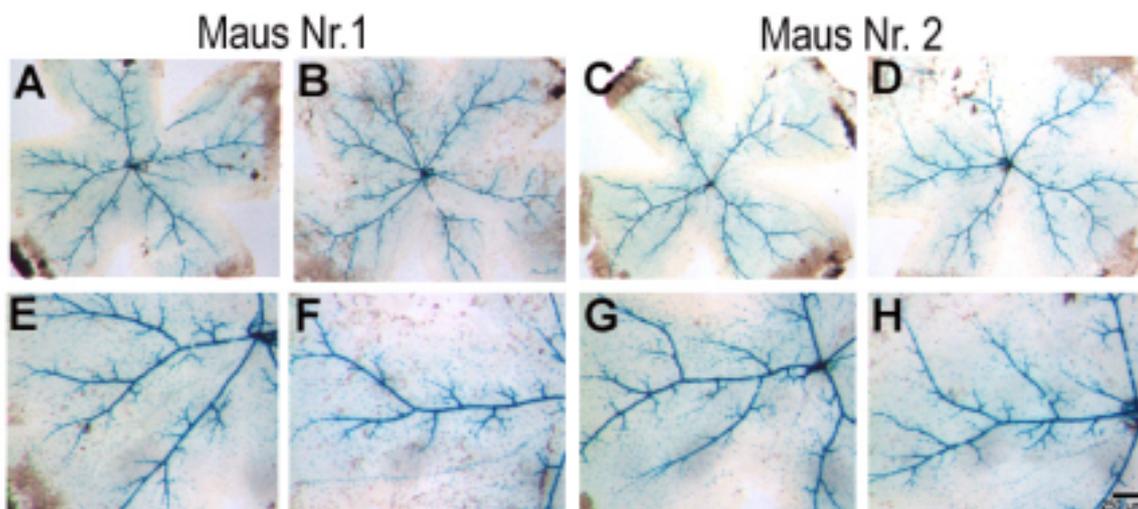
Die nach Angiotensin-2 Applikation beobachtete Abnahme der Perizytenzahl sollte durch zusätzliche Gabe von löslichem Tie-2 Rezeptor vermindert werden können. Die im zwölffachen molaren Überschuss vorliegende Extrazellulärdomäne des Rezeptors bindet theoretisch die parallel injizierten Angiotensin-2 Moleküle, so dass diese im Gewebe der Maus nicht mehr biologisch aktiv sind. Dieser Versuchsansatz schließt in Kombination mit den Kontrollinjektionen aus, dass der beobachtete Effekt (Perizytenabfall) nach Manipulation am Auge auf mechanische, entzündliche oder unspezifisch chemische Reize zurückzuführen ist. Somit sind die signifikanten Ergebnisse eindeutig auf die Wirkung von Angiotensin-2 zurückzuführen. Die beschriebenen Experimente zeigen erwartungsgemäß, dass sich durch Tie-2-Ig Koinjektion der Angiotensin-2 vermittelte Perizytenabfall aufheben lässt (s. **Abb. 26**).

### 3.2.2 LacZ-Färbung der Retina nach Injektion von rekombinanten Angiotensin-2

Weiterhin wurde rekombinantes Angiotensin-2 in 5 Wochen alte P-LacZ-Mäuse injiziert. Diese transgene Mauslinie exprimiert in perivaskulären Zellen  $\beta$ -Galaktosidase, so dass die

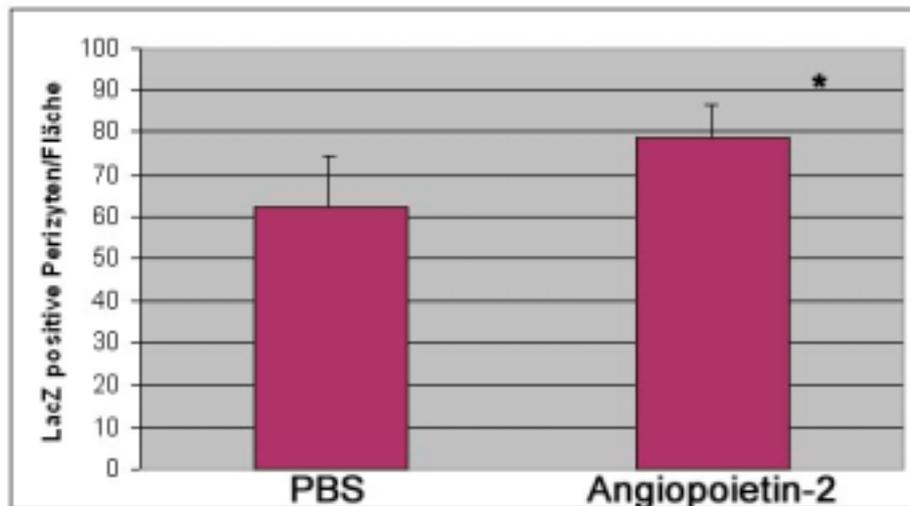
Perizyten der Netzhaut nach Färbung blau erscheinen (s. 2.2.1). Dies erleichterte die Auswertung, da hierzu nach LacZ-Färbung die Anzahl der blauen Perizyten pro Kapillarfläche ermittelt und in Verhältnis zu den Kontrollinjektionen gesetzt werden konnte. Es wurden 400 ng Angiopoietin-2 in einem Volumen von 4  $\mu$ l in das eine Auge und als Kontrolle hitzedenaturiertes Angiopoietin-2 in das andere Auge der P-LacZ-Maus injiziert. Nach 8 Tagen erfolgte die Tötung der Tiere und die Entnahme der Augen. Die freipräparierten Netzhäute wurden einer  $\beta$ -Galaktosidase-Färbung unterzogen.

Vergleicht man die  $\beta$ -Galaktosidase-gefärbten Netzhäute nach Proteininjektion mit denen nach Kontroll-Injektion, so zeigten sich auf den ersten Blick keine abnormen Veränderungen der Gefäßmorphologie (s. **Abb. 27**). Die Netzhaut-Arteriolen der oberflächlichen Gefäßschicht zeigten keine Änderung ihres Durchmessers und die Aufzweigungen dieser Gefäße sind in beiden Ansätzen regelrecht. Betrachtet man allerdings die Kapillarbetten unter dem Aspekt des Perizytenbesatzes, so zeigen sich nach quantitativer Auswertung der Perizytenzahlen deutliche Unterschiede (s. **Abb. 28**).



**Abb. 27  $\beta$ -Galaktosidase Färbung der Netzhäute von P-LacZ-Mäusen nach intravitrealer Injektion von rekombinantem Angiopoietin-2**

Abgebildet sind stellvertretend für alle Tiere ( $n = 6$ ) die Netzhäute von zwei Mäusen (Maus Nr.1: **A, B, E, F**; Maus Nr.2: **C, D, G, H**). Die obere Reihe zeigt den Überblick, die untere Reihe einen vergrößerten Ausschnitt. Nach Injektion von Angiopoietin-2 zeigt sich makroskopisch keine Änderung der Gefäßmorphologie (**A, C + E, G**). Auch die Gefäßhierarchie zeigt keine Besonderheiten und gleicht dem Kontroll-Auge (**B, D + F, H**). Auffällig hingegen ist jedoch die signifikante Zunahme an LacZ-positiven Zellen nach Angiopoietin-2 Applikation (**A, C + E, G**).



### Abb. 28 Relative Zunahme LacZ-positiver Perizyten nach Angiotensin-2 Injektion

Die Graphik zeigt die vermehrte Zahl  $\beta$ -Galaktosidase positiver Perizyten nach Injektion von Angiotensin-2. n = 6, \* = vs PBS: p < 0.05

In den Netzhäuten der Angiotensin-2 behandelten Augen ist eine bis zu 27% höhere Perizytenzahl auf den Kapillaren des tiefen Kapillarbett festzustellen. Die Netzhäute der mit denaturiertem Protein behandelten Tiere zeigen eine signifikant geringere Perizytenzahl pro Kapillarfläche. Diese vermeintlich widersprüchlichen Ergebnisse zu den vorherigen Untersuchungen sind wahrscheinlich auf unterschiedliche Aktivierung des LacZ-Transgens in den Perizyten der untersuchten Tiere zurückzuführen und werden in Abschnitt 4 diskutiert.

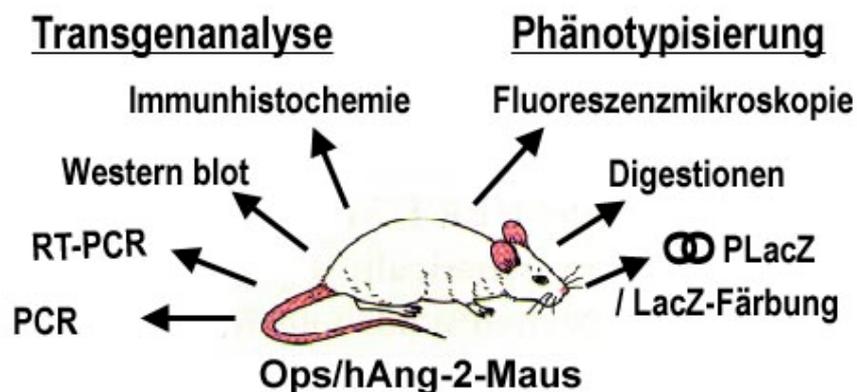
### 3.3 Transgene Mäuse

Die unter 3.1 beschriebenen Studien zur Untersuchung der Wirkung von Angiotensin-2 auf den Perizytenbesatz der Netzhaut wurden durch direkte Injektion von rekombinanten Angiotensin-2-Protein in das Auge der Versuchstiere durchgeführt. Dies bedeutet, dass nur eine einmalige Applikation von Angiotensin-2 möglich war und das Protein daraufhin abgebaut wurde. Um stete Angiotensin-2-Titer in der Netzhaut zu erhalten, sollte daher ein transgenes Maus-Modell geschaffen werden, das in der Retina unter der Kontrolle des Opsin-Promoters humanes Angiotensin-2 kontinuierlich exprimiert. Durch Einkreuzen dieser Tiere in eine weitere transgene Maus-Linie (P-LacZ-Mäuse, s.o.), die nach  $\beta$ -Galaktosidase-Färbung blaue Perizyten zeigt, wäre ein Modell geschaffen, das auf elegante Weise den Einfluß von kontinuierlich überexprimiertem Angiotensin-2 auf den Perizytenbesatz der Netzhautgefäße

zeigen könnte. Die Auswirkungen der Angiotensin-2 Applikation bzw. Überexpression in den einzelnen Modellen sind im Folgenden aufgeführt.

### 3.3.1 Erzeugung und Analyse transgener Ops/hAng2 Mäuse

Um den Einfluß einer Überexpression von Angiotensin-2 in der Netzhaut auf den Perizytenbesatz der Netzhautkapillaren zu analysieren, wurden transgene Mäuse verwendet, die unter Kontrolle des murinen Opsin-Promoters humanes Angiotensin-2 in der Rezeptorzellschicht exprimieren (Ops/hAng-2 Mäuse; s. 2.2.1.1). Es konnten insgesamt 6 Linien dieser Tiere erzeugt werden, die jeweils auf ein Ursprungstier (*founder*) zurückgehen. Die verschiedenen Ops/hAng-2 Linien wurden bezüglich der Aktivität und Expression des Transgens untersucht. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Charakterisierung dargestellt.

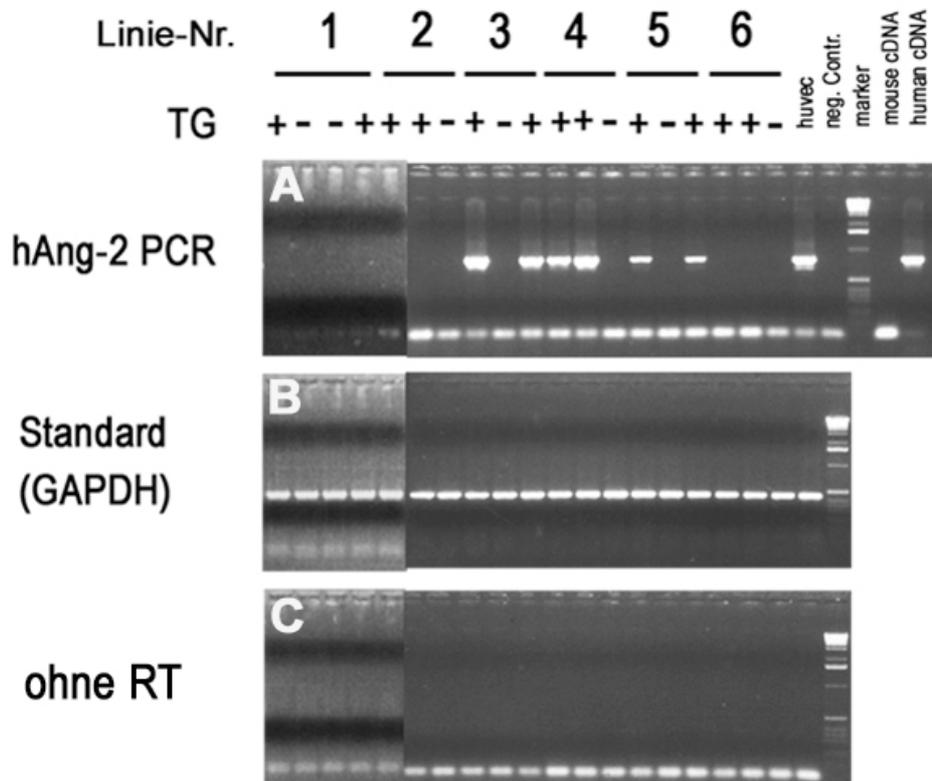


#### Abb. 29 Charakterisierung verschiedener Linien der Ops/hAng-2 Mäuse

Vereinfacht dargestellt sind die unterschiedlichen Methoden, mit denen sowohl der Genotyp als auch der Phänotyp der transgenen Tiere analysiert wurde.

#### 3.3.1.1 RT-PCR zum Nachweis der Transgenexpression auf RNA-Ebene

Der erste Schritt zur Beurteilung der Aktivität eines Transgens ist der Nachweis erfolgreicher Transkription. Hierzu wird das transgene Protein auf RNA Ebene in Form von mRNA durch RT-PCR nachgewiesen (s. 2.3.3). Von den 6 zur Verfügung stehenden Ops/hAng-2 Mauslinien zeigten 3 Linien Transkription des Transgens, in 3 Linien ließ sich keine Angiotensin-2 mRNA nachweisen (s. Abb. 30).



**Abb. 30 RT-PCR zum Nachweis der mRNA von transgenem Angiopoietin-2**

**A)** Pro Linie wurden mindestens 3 Mäuse analysiert. Von sechs Linien zeigen drei Angiopoietin-2 Transkription. Pro Ansatz wurde das Lysat einer Maus aufgetragen. Als Kontrolle dienten Extrakte aus HUVECs (*human umbilical vein endothelial cells*). Zum Nachweis der Humanspezifität wurden cDNAs der Maus und des Menschen als Proben eingesetzt. **B)** Um sicher zu stellen, dass die gleichen Mengen cDNA als Proben eingesetzt wurden, ist zusätzlich eine PCR zur Detektion der Glycerinaldehyd-3-Phosphatase (GAPDH) als interner Standard durchgeführt worden. Diese zeigte keine Unterschiede in den eingesetzten cDNA-Mengen. **C)** PCR zum Ausschluß einer Probenkontamination mit genomischer DNA (s. Text).

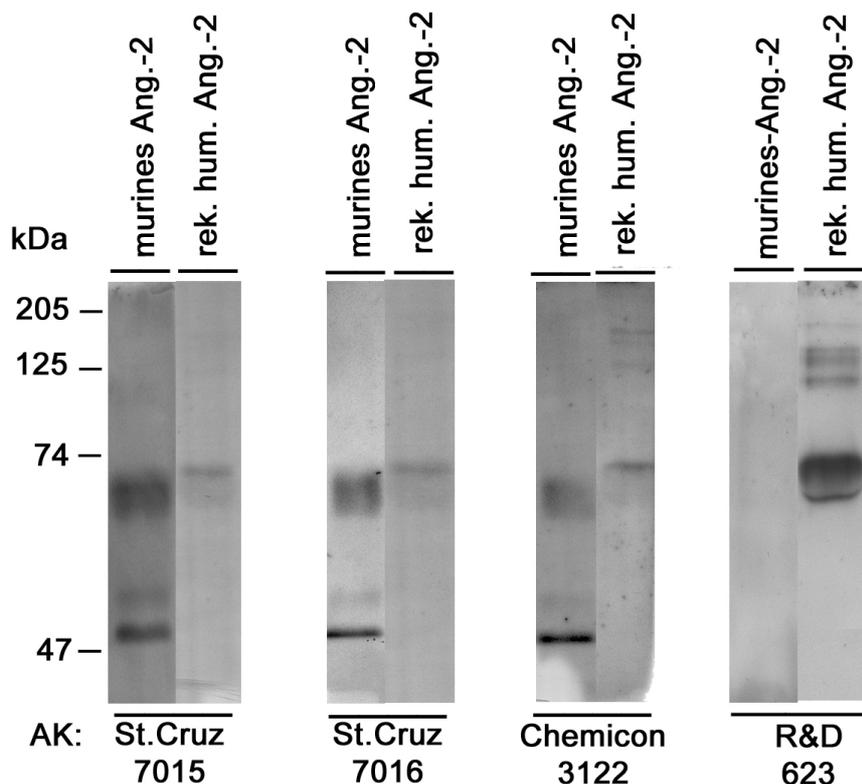
Durch Einsatz von Maus und Mensch cDNA als Probe wurde sichergestellt, dass die verwendeten Primer humanspezifisch sind. Eine PCR zum Nachweis der Glycerinaldehyd-3-Phosphatase (GAPDH) diente als interner Standard (Zykluszahl in der PCR < 26). Da alle Banden gleichstark waren, konnte davon ausgegangen werden, dass pro Ansatz gleiche Mengen cDNA als Probe eingesetzt und somit auch gleiche Mengen mRNA pro Tier isoliert worden sind. Die unterschiedlichen Intensitäten der verschiedenen Banden spiegeln so die unterschiedlichen mRNA-Konzentrationen in den verschiedenen Linien wider.

Um sicher zu gehen, dass als Matrize cDNA und keine genomische DNA verwendet wurde, wurde die PCR mit Proben durchgeführt, der keine Reverse Transkriptase zugesetzt war. Da diese PCR negativ ist, kann eine Kontamination mit genomischer DNA ausgeschlossen werden. Der nächste Schritt in der Charakterisierung der Ops/hAng-2 Mäuse war der

Nachweis des Transgens auf Proteinebene. Desweiteren wurde in der Retina-„cDNA-Bank“ transgener Ops/hAng-2 Mäuse die Expression von murinem Angiopoietin-2 nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Unabhängig davon, ob die Tiere transgen oder nicht-transgen waren, war in allen Netzhäuten etwa die gleiche Menge mRNA indirekt nachweisbar. Somit wurde murines Angiopoietin-2 zum Zeitpunkt der Präparation in den Netzhäuten sämtlicher Mäuse exprimiert.

### 3.3.1.2 Identifikation eines humanspezifischen Angiopoietin-2 Antikörpers

Zum Nachweis des in der Rezeptorzellschicht der Netzhaut transgener Mäuse exprimierten humanen Angiopoietin-2 ist die Verwendung eines spezifischen Antikörpers notwendig, der ausschließlich das humane Protein erkennt. Es wurden daher verschiedene Antikörper bezüglich ihrer Spezifität getestet.



**Abb. 31 Western blot zur Identifizierung eines humanspezifischen Angiopoietin-2 Antikörpers**

Abgebildet sind verschiedene Antikörper, die jeweils zur Detektion von humanem bzw. murinem Angiopoietin-2 eingesetzt wurden. Nur ein Antikörper (Fa. R&D) ist humanspezifisch und zeigt die erwartete Bande bei 74 kDa.

Die Analysen zeigen, dass ein Antikörper ausschließlich humanes Angiopoietin-2 erkennt (s. **Abb. 31**). Alle weiteren Antikörper zeigten (z.T. im Gegensatz zu den Herstellerangaben, s.

**Tab. 6)** Kreuzreaktivität mit murinem Angiopoietin-2. Zum Nachweis von humanem Angiopoietin-2 im Western blot ist daher ausschließlich der Antikörper „R&D 623“ geeignet.

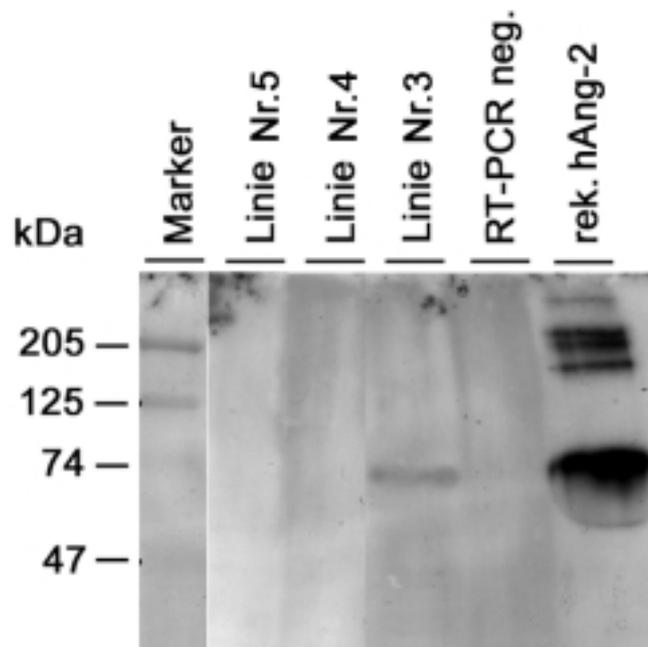
**Tab. 6:** Spezifität verschiedener Angiopoietin-2 Antikörper im Western blot

Antikörper	Firma / Nr.	Ursprung	Spezif. lt. Hersteller	Spezifität getestet
$\alpha$ -Angiopoietin-2 PK n-T.	R&D 623	Ziege	H	H
$\alpha$ -Angiopoietin-2 PK c-T.	St.Cruz 7015	Ziege	H, R, M	H, M
$\alpha$ -Angiopoietin-2 PK n-T.	St.Cruz 7016	Ziege	H	H, M
$\alpha$ -Angiopoietin-2 PK n-T.	Chemicon 3122	Ziege	H	H, M

PK=Polyklonal; n-T.=N-Terminus; c-T.=C-Terminus; H=human; R=Ratte; M=Maus

### 3.3.1.3 Western blot zum Nachweis von humanen Angiopoietin-2 in der Retina

Um die beobachteten Effekte auf die Expression eines bestimmten Transgens zurückführen zu können, ist der Nachweis des Transgens auf Proteinebene unumgänglich. Daher wurden aus den Ops/hAng-2 Mauslinien, in denen mRNA des humanen Angiopoietin-2 nachweisbar war (RT-PCR positiv, s.o.), Proteinextrakte gewonnen und ein Immunoblot (Western blot) durchgeführt (s. 2.4.2). Als Kontrolle dienten Proteinextrakte, die aus Netzhäuten von RT-PCR negativen Ops/hAng-2 Mäusen gewonnen wurden.



**Abb. 32** Western blot zum Nachweis der Expression von transgenem Angiopoietin-2 in der Retina transgener Ops/hAng-2 Mäuse

Der Western blot zum Nachweis von transgenem Protein zeigte in einer Linie eine Proteinbande der erwarteten Größe (74 kDa, vergleiche auch **Abb. 31**) in Höhe des rekombinanten Angiopoietin-2. Zum Nachweis wurde der humanspezifische Antikörper der Fa. R&D eingesetzt.

Überraschender Weise war der Nachweis von transgenem Angiopoietin-2 trotz unterschiedlicher Protein-Extraktionsmethoden (s. 2.4.2.1) und wiederholten Analysen nur in einer Linie möglich (s. Abb. 32). In den Extrakten der anderen Ops/hAng-2 Mäuse war kein Protein nachzuweisen. Die RT-PCR negativen Linien zeigten erwartungsgemäß keine Expression von humanem Angiopoietin-2 (s. Abb. 32). Somit konnte zweifelsfrei nachgewiesen werden, dass eine Ops/hAng-2 Mauslinie transgenes humanes Angiopoietin-2 exprimiert. Diese Linie wurde in allen weiteren Experimenten verwendet.

**Tabelle 7: Expression des Transgens in verschiedenen Ops/hAng-2 Mauslinien**

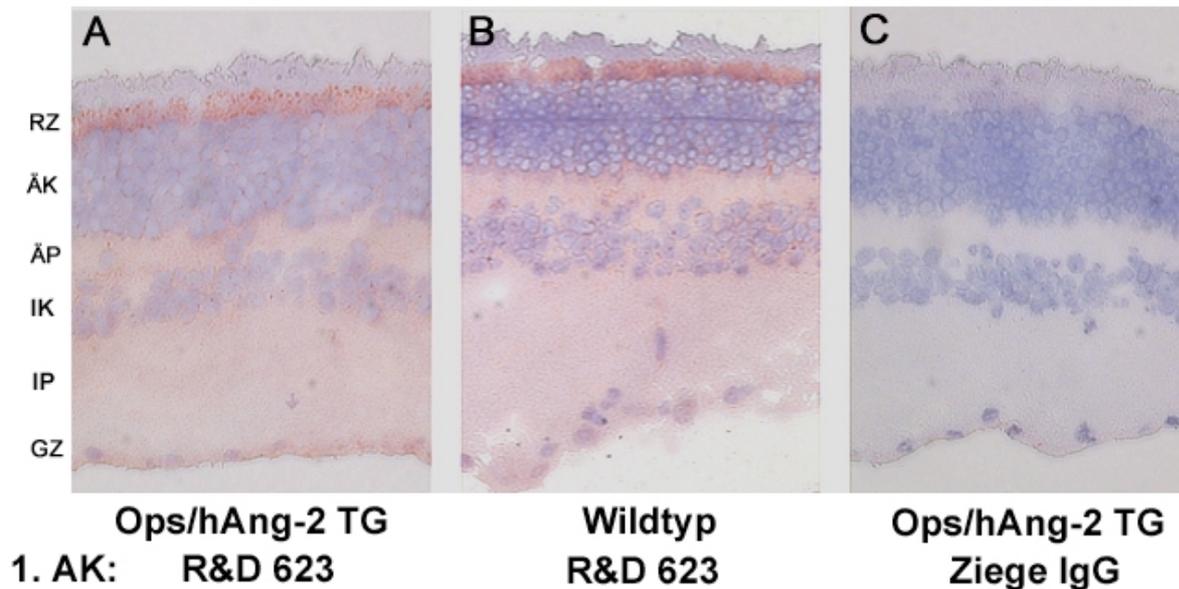
Linie Nr.	RT-PCR	Immunoblot
1	⊖	⊖
2	⊖	⊖
3	⊕	⊕
4	⊕	⊖
5	⊕	⊖
6	⊖	⊖

### 3.3.1.4 Immunohistologie zur Lokalisierung der Transgenexpression

Wie oben beschrieben wurde, konnte eine Ops/hAng-2 Mauslinie etabliert werden, die nachweislich humanes Angiopoietin-2 unter Kontrolle des Opsin-Promoters exprimiert. Zum Nachweis der Lokalisation der Expression wurden immunhistologische Untersuchungen durchgeführt. Hierzu sollte unter Verwendung verschiedener Antikörper humanes Angiopoietin-2 im Gewebe nachgewiesen werden.

Es zeigte sich jedoch, dass keiner der verwendeten Antikörper das Potential hatte, in der Immunhistologie humanes Angiopoietin-2 spezifisch nachzuweisen. Obwohl neben fixierten Paraffinschnitten auch unfixierte Gefrierschnitte angefertigt wurden und das Gewebe zur Demaskierung der Epitope verschiedenartig behandelt wurde (s. 2.4.1.2), konnte humanes Angiopoietin-2 *in situ* nicht nachgewiesen werden. So ist in der Rezeptorzellschicht der Netzhaut zwar eine Färbung zu erkennen (s. Abb. 33), da diese jedoch ebenfalls in der Rezeptorzellschicht nicht-transgener Mäuse auftritt, ist die Bindung des 1. Antikörpers unspezifisch und beweist somit nicht das humane Angiopoietin-2. Die Färbung der Netzhaut-Schnitte weiterer Ops/hAng-2 Linien zeigte stets das gleiche Bild (Daten nicht gezeigt).

Allerdings muß die Färbung durch Bindung des 1. Antikörpers vermittelt werden, da nach Ersetzen des 1. Antikörpers durch unspezifisches IgG das Signal nicht mehr nachweisbar ist.



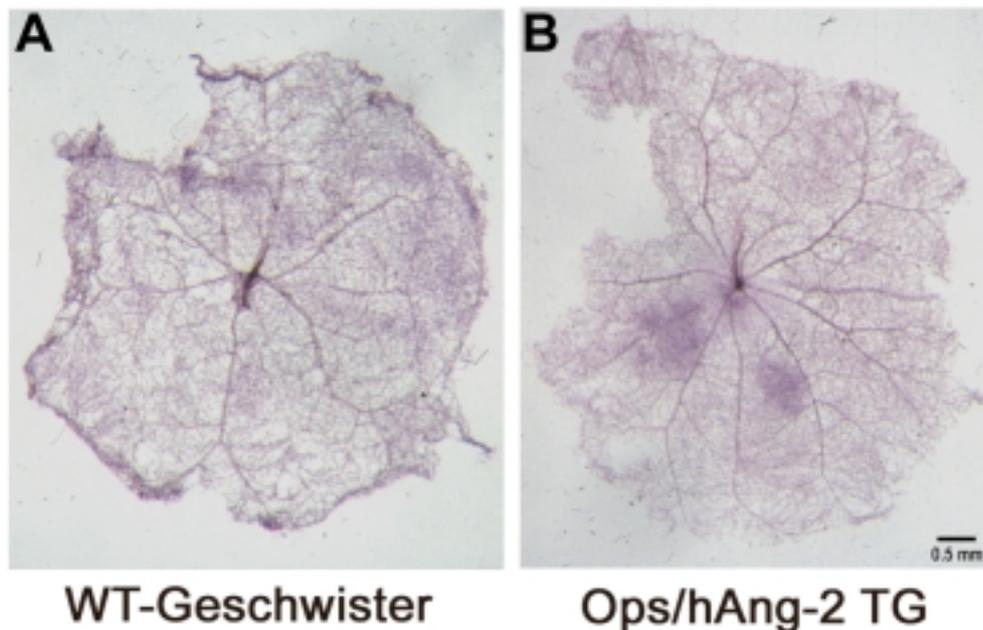
**Abb. 33 Immunhistologie zur Lokalisation der Transgenexpression**

Die histologischen Gefrierschnitte zeigen die Netzhäute einer transgenen Maus (A, C) und ihrem Wildtyp-Geschwister (B). A) Der im Western blot humanspezifische Antikörper bindet in der Rezeptorzellschicht ein Epitop. B) Derselbe Antikörper erkennt im Wildtyp ebenfalls ein Antigen in der Rezeptorzellschicht. Somit ist er in der Histologie nicht spezifisch. C) In der Negativkontrolle wurde statt dem Erstantikörper unspezifisches IgG eingesetzt. Es zeigt sich kein Signal. (GZ = Ganglienzellschicht, IP = innere plexiforme Schicht, IK = innere Körnerschicht, ÄP = äußere plexiforme Schicht, ÄK = äußere Körnerschicht, RZ= Rezeptorzellschicht).

### 3.3.1.5 Perizytenabfall von den Netzhautkapillaren transgener Mäuse

Nachdem im Western blot gezeigt werden konnte, dass eine Linie der Ops/hAng-2 Mäuse humanes Angiopoietin-2 in der Retina exprimiert, soll nun überprüft werden, ob das transgene Angiopoietin-2 zum Perizytenabfall von den Netzhautkapillaren führt. Hierzu wurden die Netzhäute 5 Wochen alter Tiere präpariert (s. 2.2.3) und nach Fixierung einer enzymatischen Digestionen unterworfen (s 2.2.5). Neben 8 transgenen Mäusen wurden als Kontrolle die Augen von 8 nicht-transgenen Geschwistertieren (Wildtyp) analysiert. Pro Netzhaut wurden mindestens 8 Gesichtsfelder „blind“ ausgezählt.

Auf den ersten Blick lässt sich eine Änderung der Morphologie der *Arteria centralis retinae* und deren Arteriolenflecht mittels der Digestion nicht nachweisen (s. Abb. 34).



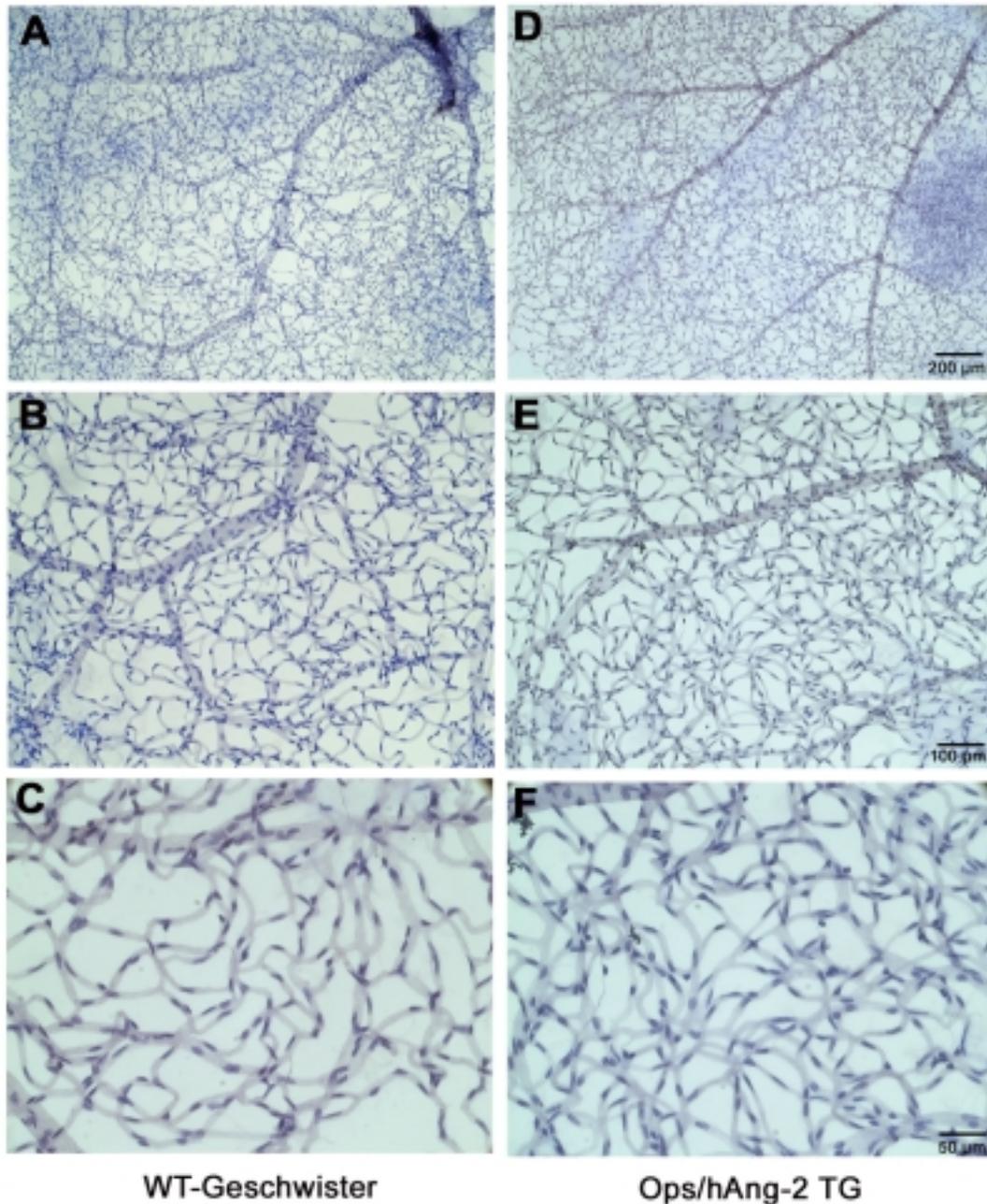
**Abb. 34 Netzhaut-Digestionen transgenerer Ops/hAng-2 Mäuse**

**A)** Gezeigt ist das Gefäßnetz einer Wildtyp-Maus im Überblick. **B)** Gefäßnetz einer Ops/hAng-2 Maus. Im Vergleich zum Wildtyp (**A**) sind makroskopisch keine Unterschiede zu erkennen. Deutlich zu sehen ist der im Zentrum gelegene Eintritt der *Arteria centralis retinae*.

Stellvertretend für alle entnommenen und digestierten Netzhäute sind die in **Abb. 34** gezeigten Gefäßbäume dargestellt. Die nicht abgebildeten Netzhautdigestionen entsprechen in Bau und Erscheinungsbild den oben aufgeführten.

Die Peripherie der zweidimensional ausgebreiteten Netzhäute erscheint unterschiedlich. Dies ist allerdings auf die Präparationsmethode zurückzuführen und nicht auf die Expression von Angiopoietin-2. Die abgebildete Netzhaut der transgeneren Ops/hAng-2 Maus zeigt in der unteren Hälfte zwei dunklere Flecken. Diese Bereiche entsprechen Resten von Körnerschicht und plexiformen Schicht, die durch die enzymatische Digestion nicht entfernt werden konnten. Daher ist der Befund ebenfalls als Artefakt zu werten.

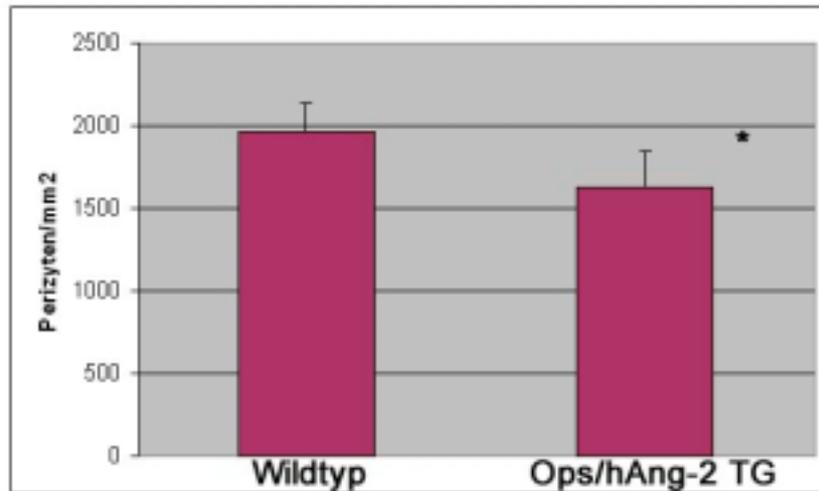
Die Kapillarnetze der transgeneren Tiere als auch die der Wildtyp-Mäuse zeigen makroskopisch keine pathologischen Veränderungen, wie z.B. Mikroaneurysmen (s. **Abb. 35**). Deutlich sind die *Arteria centralis retinae* (**Abb. 35, A**) und die von ihr ausgehenden Arteriolen zu erkennen. Der hierarchische Aufbau der Gefäße ist sowohl in den Wildtyp-Tieren als auch in den Ops/hAng-2 Mäusen regelhaft und unauffällig.



**Abb. 35** Netzhaut-Digestionen zum Vergleich der Gefäßmorphologie transgener Ops/hAng-2 Mäuse und nicht-transgener Geschwister

Zu sehen sind die Kapillarnetze der Ops/hAng-2 Mäuse (D, E, F) bzw. der Gefäße ihrer Wildtyp-Geschwister (A, B, C) in zunehmender Vergrößerung. Eventuelle Gefäßdilataationen oder grobe Malformationen sind nicht nachweisbar.

Nach quantitativer Auswertung des Perizytenbesatzes in den Ops/hAng-2 Mäusen zeigte sich allerdings eine signifikante Verminderung der Perizytenzahl pro Kapillarfläche (s. **Abb. 36**). Diese Beobachtung konnte durch wiederholte Untersuchungen an den Mäusen eines weiteren Wurfes der entsprechenden Linie bestätigt werden.

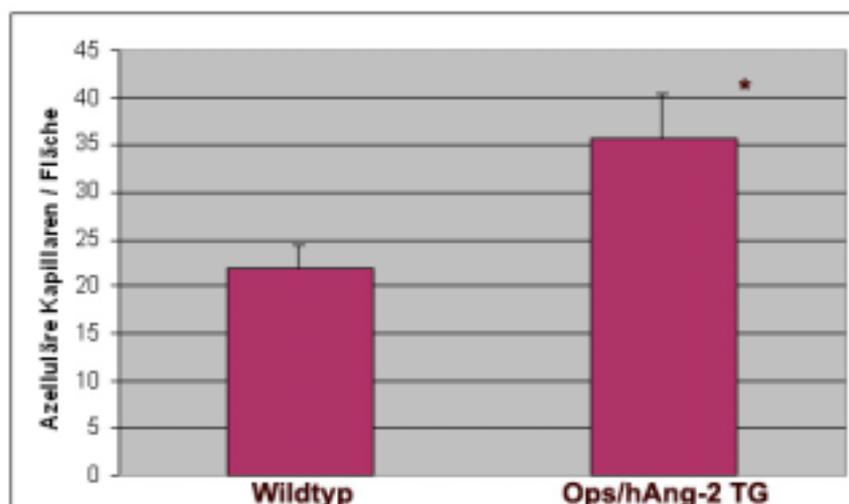


**Abb. 36 Netzhaut-Digestion: Graphische Darstellung der relativen Perizytenzahlen in Ops/hAng2-Mäusen und deren Wildtyp-Geschwistern**

Die Graphik zeigt das Ausmaß des Perizytenabfalls im transgenen Tier. n = 8, \* = vs WT: p < 0.01

### 3.3.1.6 Zunahme azellulärer Kapillaren in Ops/hAng-2 Mäusen

Neben der Perizytenzahl wurde auch die Anzahl azellulärer Kapillaren pro Fläche bestimmt und die Daten von jeweils 5 transgenen mit denen nicht-transgener Geschwister-Tiere verglichen. Die Digestionen zeigten im Kapillarnetz der Ops/hAng-2 Mäuse eine signifikante Zunahme der azellulären Kapillaren (s. **Abb. 37**).

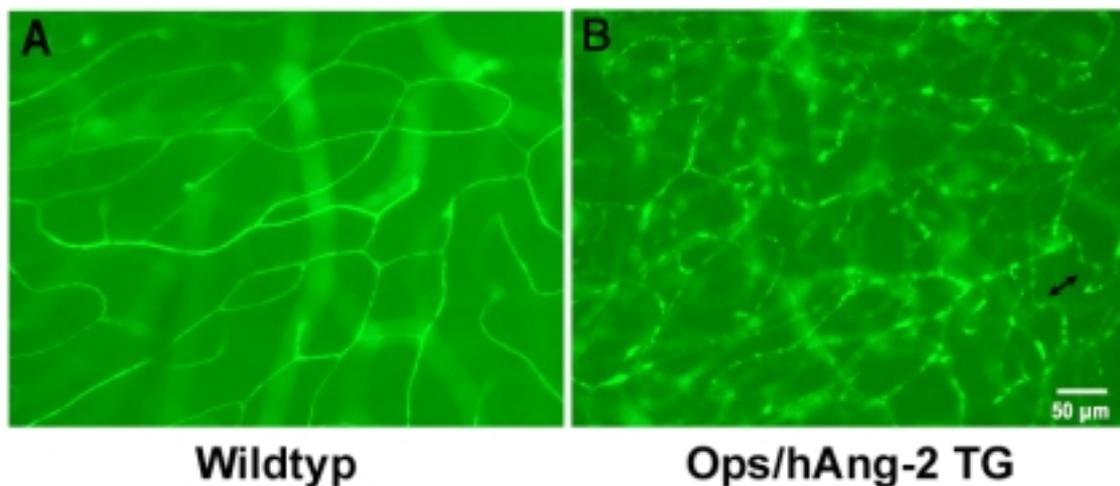


**Abb. 37 Anzahl azellulärer Kapillaren in Ops/hAng-2 Mäusen im Vergleich zu deren nicht transgenen Geschwistern**

Deutlich ist die Zunahme an azellulären Kapillaren in den Kapillarbettten der transgenen Tiere zu erkennen. n = 5, \* = vs WT: p < 0.01

### 3.3.1.7 Dreidimensionale Darstellung der Netzhautgefäße von Ops/hAng-2 Mäusen mittels Fluoreszenzmikroskopie.

Im Gegensatz zu den enzymatischen Digestionen der Netzhäute, die eine zweidimensionale Darstellung der Gefäße erlauben, läßt sich mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie das dreidimensionale Netzwerk der Kapillarbetten in der Retina vorzüglich analysieren (s. **Abb. 17**). Auch wird durch die intra-venöse (i.v.) Injektion eines hochmolekularen Fluorophors (500 kDa Dextran-FITC, s. **Tab.1**) die innere Schicht der Gefäße, das Endothel, „angefärbt“. Unterschiedliches Fluoreszenzverhalten kann somit Rückschlüsse auf eventuelle Änderungen der Gefäßintegrität und der Stabilität des Endothelzellrasens zulassen.



**Abb. 38** Fluoreszenzmikroskopische Analysen der Gefäßmorphologie von Netzhaut-Kapillaren transgener Ops/hAng-2 Mäuse

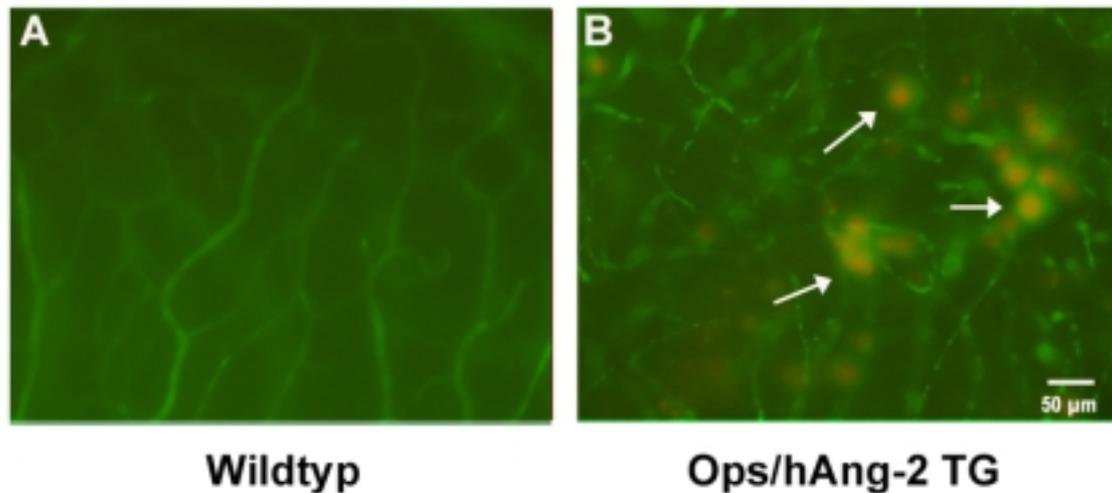
**A)** Das Gefäßsystem des Wildtyps zeigt homogene Fluorophoranreicherung im Gefäßsystem, die Kapillaren sind gestreckt und gleichmäßig verknüpft. **B)** Im transgenen Tier sind die Fluorophore punktuell angereichert, die Verknüpfung der Kapillaren wirkt ungerichtet. Auffällig ist das Auftreten von korkenzieherförmig gewundenen Gefäßen (**Doppelpfeil**).

Durch i.v. Injektion eines hochmolekularen Fluorophors in die nicht-transgenen Tiere ließ sich das dreidimensionale Kapillarnetz der Retina als homogen fluoreszierendes Gefäßgeflecht darstellen (s. **Abb. 38**). In den transgenen Tieren zeigt sich im Gegensatz zu den Wild-Typ-Geschwistern ein mehr heterologes Färbemuster. Die Gefäße bieten eine uneinheitliche Fluoreszenz, Teile scheinen vom Fluorophor ausgespart (s. **Abb. 38**).

### 3.3.1.8 Fokale Akkumulation von niedermolekularen Fluorophoren in der Retina von Ops/hAng-2 Mäusen.

Neben den Injektionen hochmolekularer Fluorophore, die das Gefäßsystem aufgrund ihrer Größe nicht verlassen können, wurden auch Parallelinjektionen von niedermolekularen

Fluorophoren (4,4 kDa TRITC-Dextran, s. **Tab. 1**) durchgeführt. Diese haben aufgrund ihrer Größe die Fähigkeit, sich in kleineren Ausbuchtungen oder Zellzwischenräumen anzureichern oder durch „undichte“ Gefäße in den perivaskulären Raum auszutreten. Da die niedermolekulare Fluorophore mit einer Wellenlänge emittieren, die unterschiedlich zu dem Emissionsmaximum der hochmolekulare Fluorophore ist, lassen sich beide Fluoreszenzmuster parallel analysieren und Strukturen zuordnen.



**Abb. 39 Fokale Akkumulation von niedermolekularen Fluorophoren in der Netzhaut Angiopoietin-2 überexprimierender Mäuse**

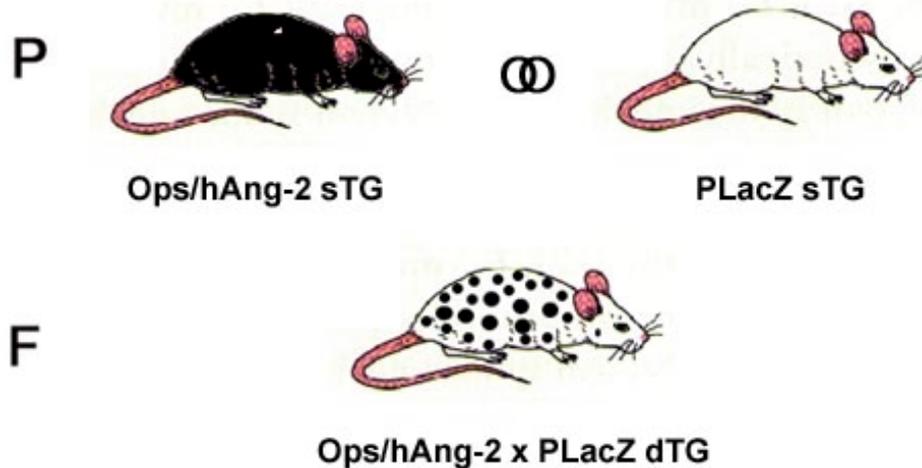
Die Abbildung zeigt die Gefäße der Netzhaut einer Wildtyp-Maus (A) und einer Ops/hAng-2 Maus (B) nach Koinjektion von FITC-Dextran (500 kDa) und TRITC-Dextran (4,4 kDa). Die Gefäße des Wildtyps erscheinen regelhaft und zeigen keine Fluoreszenz im Emissions-Wellenlängenbereich des niedermolekularen Fluorophors (A). Im Wildtyp hingegen sind punktuelle Anreicherungen des 4,4 kDa TRITC-Dextrans zu erkennen (B, Pfeile).

In den Gefäßen der nicht-transgenen Tiere ist kein niedermolekulares Fluorophor nachweisbar. Im Gegensatz hierzu zeigen die Gefäße der transgenen Ops/hAng-2 Mäuse punktuelle Anreicherung des Fluorophors in der Netzhaut (s. **Abb. 39**). Diese fokale Akkumulation ist nicht über die ganze Netzhaut verteilt und scheint in den betreffenden Gebieten den Gefäßen zu folgen. Dies spricht gegen das Vorliegen eines Artefakts.

### 3.3.2 Erzeugung und Analyse doppeltransgener Ops/hAng2 x P-LacZ-Mauslinie

Die Analyse der Ops/hAng-2 Mäuse mit Hilfe von enzymatischer Digestionen zeigte, dass der Perizytenbesatz der Netzhautkapillaren in transgenen Tieren im Gegensatz zu Wildtyp-Tieren deutlich vermindert ist. Die Identifizierung und quantitative Bestimmung der Perizyten war nur möglich, da die Perizyten aufgrund ihrer Lage, dem Färbverhalten in der PAS-Färbung und ihrer Morphologie eindeutig von den Endothelzellen abgrenzbar sind.

Eleganter und einfacher wäre die Auszählung jedoch, wenn allein die perivaskulären Zellen Färbung zeigten. Dadurch würde die Identifizierung mittels morphologischer Kriterien wegfallen und der Perizytenbesatz wäre problemlos visuell darstellbar. Um dies zu erreichen, wurden Tiere der Ops/hAng-2-Linie mit P-LacZ-Mäusen (s. 2.2.1.2) verpaart (s. **Abb. 40**).



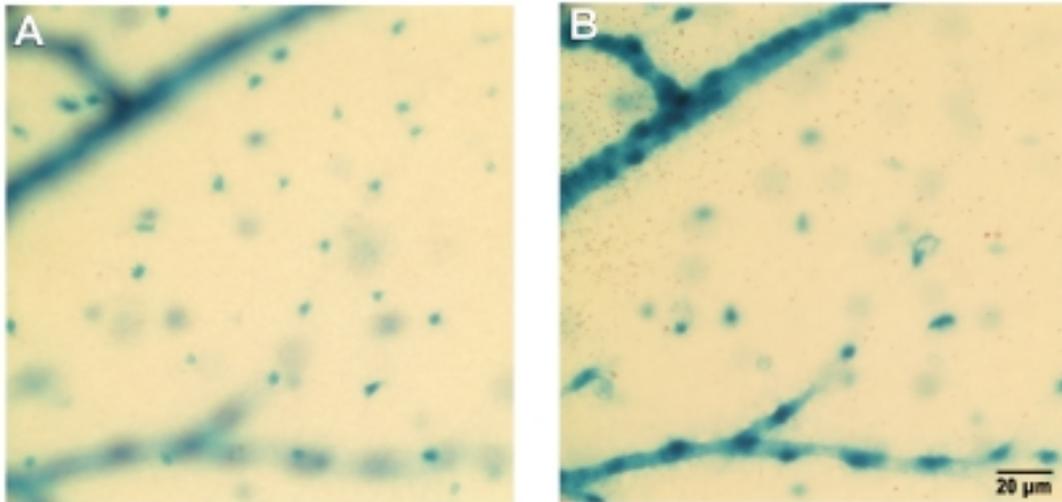
**Abb. 40 Schema der Einkreuzung von Ops/hAng-2 Mäusen in die P-LacZ-Linie**

Gezeigt ist das Einkreuzen von Ops/hAng-2 Mäusen in die P-LacZ-Linie (parental-Generation, P) und die aus dieser Verpaarung hervorgehenden doppeltransgenen Nachkommen (filial-Generation, F).

Die so erzeugten doppeltransgenen Tiere exprimieren in der Rezeptorzellschicht der Netzhaut humanes Angiopoietin-2 und zeigen  $\beta$ -Galaktosidase-Expression in den perivaskulären Zellen und somit auch in ihren Perizyten. Durch LacZ-Färbung der gesamten Netzhaut und quantitativer Erfassung der blaugefärbten Zellen (Perizyten) kann somit ein eventueller Effekt von Angiopoietin-2 auf den Perizytenbesatz elegant dargestellt werden.

**3.3.2.1 LacZ-Färbung der Retina von Ops/hAng2 x P-LacZ-Mäusen**

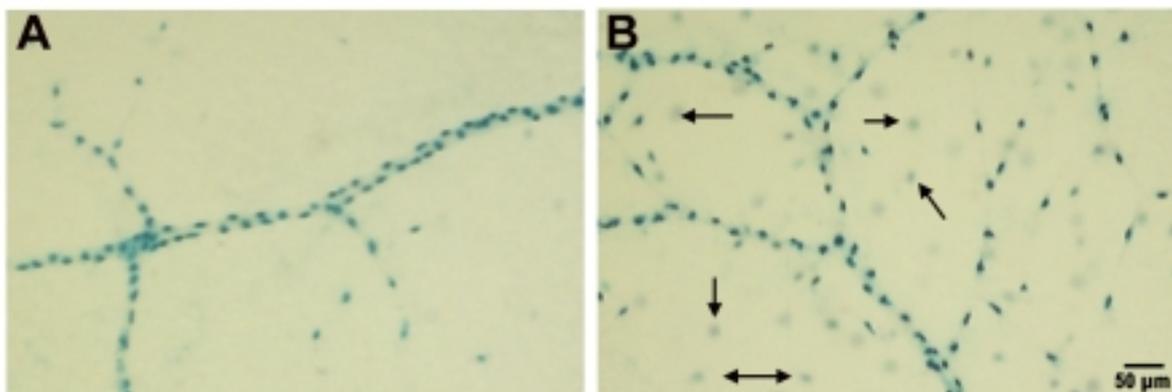
Das tiefe Kapillarnetz der Retina (Übergang innere Körnerschicht zu äußerer plexiformen Schicht) liegt dem Expressionsort von transgenem Angiopoietin-2 am nächsten. Auch erfolgt der Besatz des tiefen Kapillarnetzes mit Perizyten während der Embryogenese erst relativ spät. Aus diesen Gründen ist für unsere Fragestellung besonders die Perizytenzahl der tiefen Netzhautschichten (s. **Abb. 41**) interessant.



**Abb. 41  $\beta$ -Galaktosidase-Färbung der Netzhaut einer P-LacZ-Maus**

Die Perizyten sind durch Expression von  $\beta$ -Galaktosidase nach der Färbung als blaue Punkte auszumachen. Es sind deutlich die verschiedenen Ebenen der Gefäßbetten zu erkennen. Die Perizyten der tiefen Schicht (A) erscheinen einzeln sitzend, wohingegen in der oberflächlichen Schicht eine deutliche Gefäßassoziation zu erkennen ist (B).

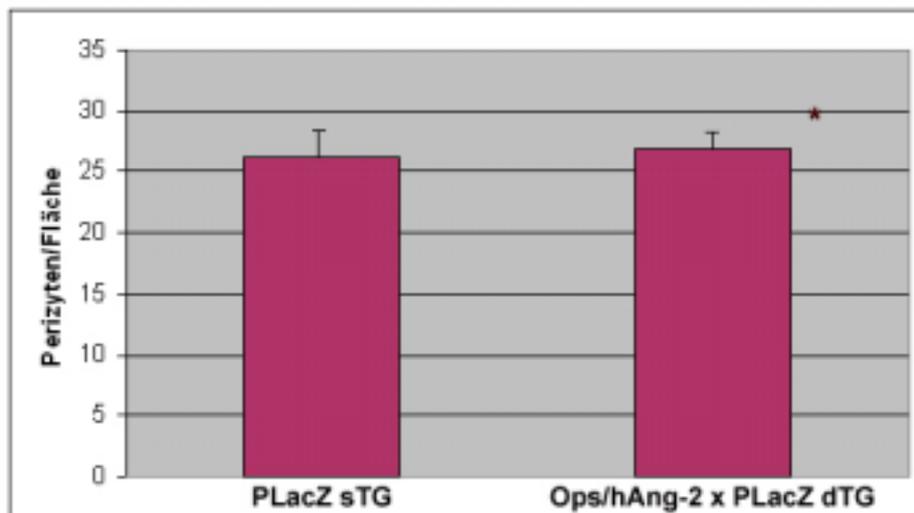
Die Analysen des Färbemusters der Perizyten zeigte innerhalb von Geschwistern eines Wurfes eine z.T. sehr unterschiedliche Anzahl LacZ-positiver Perizyten, so dass eventuelle Angiopoietin-2 vermittelte Effekte durch die hohe Varianz des Phänotyps überlagert wurden. Dies ist wahrscheinlich auf den heterogenen genetischen Hintergrund der verwendeten Linien zurückzuführen (Inzuchtstamm aus C3H/He- und C57BL/6-Mäusen).



**Abb. 42  $\beta$ -Galaktosidase-Färbung der Netzhaut rückgekreuzter Ops/hAng-2 x P-LacZ dTG-Mäuse im Vergleich zu der einer ursprünglichen P-LacZ-Maus**

Die Netzhaut der bis F5 rückgekreuzten Mäuse zeigt LacZ-Expression ausschließlich in den Perizyten der größeren Gefäße (A). Es ist keine LacZ-Aktivität in den isoliert sitzenden Perizyten der tiefen Kapillarnetzen nachzuweisen. Hingegen exprimieren in der ursprünglichen P-LacZ-Maus sowohl die Perizyten des oberflächlichen (größere Arteriolen) als auch des tiefen Gefäßsystems  $\beta$ -Galaktosidase (B).

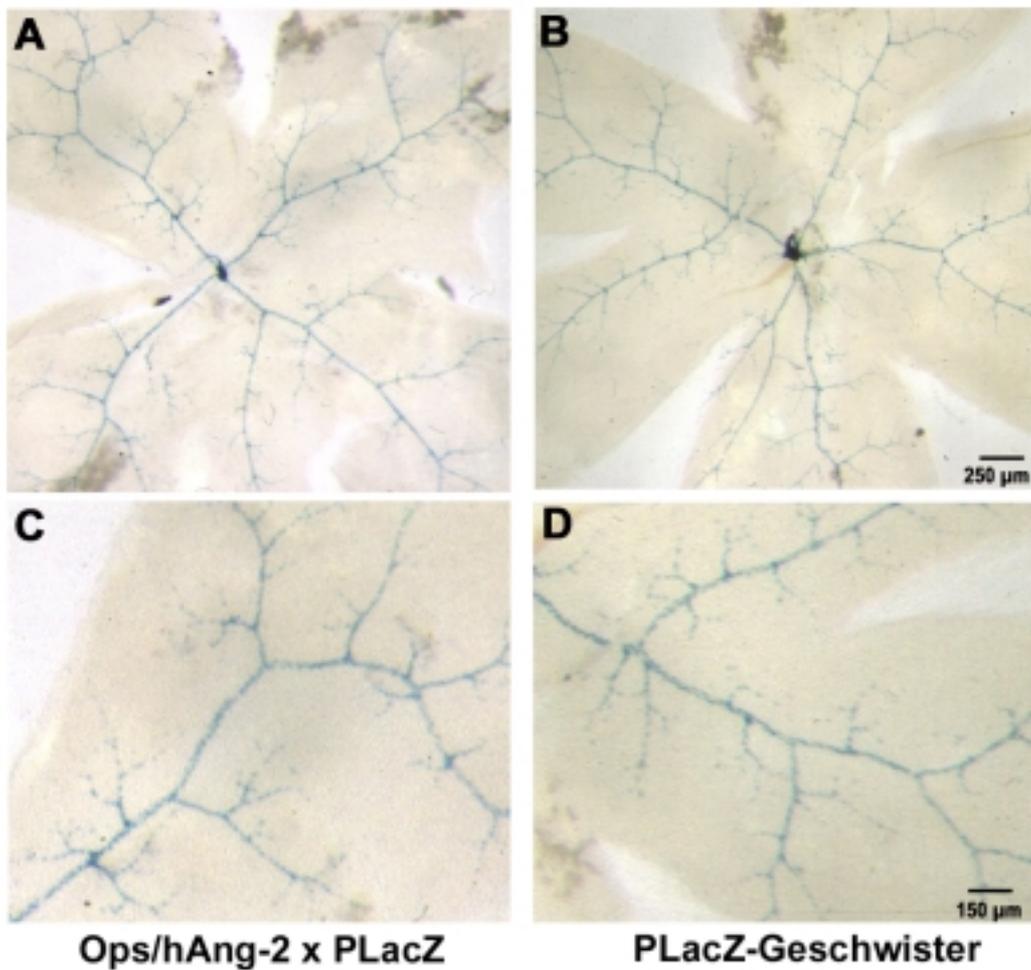
Die deswegen durchgeführten Rückkreuzungen dieser Linie in C57BL/6-Mäuse bis in Generation F5 führten zu einem homogeneren  $\beta$ -Galaktosidase Expressionsmuster. Jedoch zeigten daraufhin die doppeltransgenen Ops/hAng-2 x P-LacZ-Mäuse nur LacZ-Expression in den Perizyten der großen Arteriolen. Die Perizyten des tiefen Kapillarbetts zeigten keine  $\beta$ -Galaktosidase Expression (s. **Abb. 42 A**). Die Auswertung der Experimente beschränkt sich daher auf den LacZ-positiven Perizytenbesatz der größeren Arteriolen.



**Abb. 43 Graphische Darstellung des Perizytenbesatzes doppeltransgener Ops/hAng-2 x P-LacZ-Mäuse im Vergleich zu einzeltransgenen P-LacZ-Geschwistern**

Es zeigt sich kein Unterschied in der Perizytdichte der Netzhautgefäße von Ops/hAng-2 x P-LacZ-Mäusen im Vergleich zu P-LacZ-Tieren (n = 6, \* = vs P-LacZ: p > 0.05).

Die Anzahl gefärbter ( $\beta$ -Galaktosidase-positiver) Perizyten pro Gefäßfläche im Ops/hAng2xP-LacZ-Tier unterscheidet sich nicht von der Anzahl LacZ-positiver Perizyten in der P-LacZ-Maus (s. **Abb. 43**). Auch ist im  $\beta$ -Galaktosidase-Expressionsmuster der Perizyten kein Unterschied zwischen doppeltransgenen und einzeltransgenen Mäusen festzustellen (s. **Abb. 44**). Die Gefäße Angiopoietin-2 exprimierender Tiere zeigen keinerlei morphologische Auffälligkeiten. Die Anzahl der Perizyten auf den großen Gefäßen, die aus der *Arteria centralis retinae* entspringen, ist in den einzeltransgenen Tieren nahezu identisch mit der Anzahl in ihren doppeltransgenen Geschwistern. Verfolgt man die Gefäßbäume der jeweiligen Tiere, so wird deutlich, dass bis zur Aufzweigung 5°  $\beta$ -Galaktosidase in den dort sitzenden Perizyten in gleichem Ausmaße exprimiert wird (s. **Abb. 44 C+D**). So ist auch in den verschiedenen Perizyten-Untergruppen kein Unterschied im Besatz zu erkennen.



**Abb. 44 LacZ-Expressionsmuster rückgekreuzter doppeltransgener Ops/hAng-2 x P-LacZ-Mäuse im Vergleich zu dem einzeltransgener P-LacZ-Geschwister**

Das LacZ-Färbemuster der Perizyten zeigt  $\beta$ -Galaktosidase-Expression ausschließlich in den perivaskulären Zellen der größeren Arteriolen (A - D). Es besteht kein Unterschied zwischen dem LacZ-Expressionsmuster in einzel- (B, D) und doppeltransgenen Tieren (A, C).

Die in der stärkeren Vergrößerung sichtbaren perizytenfreien Gefäßstrecken sind Präparationsartefakte und stellen einen Bruch des Gefäßnetzes dar.

## 4 Diskussion

Das in den Gefäßen eines Organismus zirkulierende Blut kann aufgrund seiner unterschiedlichen Eigenschaften und Funktionen als eigenständiges Organ aufgefasst werden, ohne das ein Überleben nicht möglich wäre. Daher ist die Entwicklung eines stabilen und funktionellen Gefäßsystems Grundvoraussetzung für die Aufrechterhaltung der Lebensfunktionen eines Organismus. In bestimmten Situationen ist es allerdings physiologisch vorteilhaft, einen stabilen Gefäßverband aufzubrechen, um einen Abbau oder eine Neubildung von Gefäßen zu ermöglichen. Diese Umbauprozesse („*remodelling*“) sind physiologischer Weise u.a. während des weiblichen Zyklus innerhalb des Endometriums zu beobachten. Auf der anderen Seite kann eine überschüssige Gefäßbildung auch als krankhafter Prozess auftreten und den Körper schädigen. So z.B. als arterielle Aneurysmen in den Gefäßen des ZNS oder als Gefäßwucherungen in der diabetischen Retinopathie.

Das Verständnis der molekularbiologischen Hintergründe der beschriebenen Vorgänge ist Voraussetzung, um das Gefäßwachstum gezielt beeinflussen zu können und so eventuell therapeutisch Einfluss auf bestimmte Erkrankungen nehmen zu können. So existieren ausführliche Studien zu dem Wachstumsfaktor VEGF (*vascular endothelial growth factor*), der schon während der frühen embryonalen Entwicklung eines primitiven Gefäßplexus via Vaskulogenese eine wichtige Rolle spielt. Aus diesem primären Netz sprossen neue Gefäße durch Angiogenese in die Tiefe des Gewebes und bilden so das eigentliche reife Kapillarnetz, welches anschließend durch Besiedelung mit perivaskulären Zellen (Perizyten) stabilisiert wird und erst dann als reifes Gefäß angesehen werden kann. Zum Verständnis von Umbauvorgänge im adulten Organismus dürfen somit nicht nur die Kapillaren betrachtet werden; das System Endothelzelle mit aufsitzenden Perizyten ist vielmehr als Einheit zu sehen. Umbauvorgänge mit Neovaskularisierung am adulten, ausgereiften Gefäßnetz erfolgen ebenfalls via Angiogenese, ein Prozess, an dem die Angiopoietine und die Rezeptoren Tie1 und Tie2 maßgeblich beteiligt sind.

### 4.1 Rolle von Angiopoietin-2 während der postpartalen Vaskularisierung der Netzhaut

Der innere Teil der Netzhaut wird durch die *Arteria centralis retinae* versorgt, die das oberflächliche Gefäßnetz der Ganglienzellschicht bildet und letztlich in die tiefen Kapillarbetten der Retina übergeht. Die Ausbildung eines funktionellen Gefäßsystems in der

Netzhaut erfolgt zwischen den postpartalen Tagen P1 und P18 via Angiogenese, wobei die Vaskularisierung der oberflächlichen Ganglienzellschicht um den Tag P10 und die der tiefen Schichten um Tag P18 abgeschlossen ist. Es ist bekannt, dass Angiopoietin-2 bei der Neovaskularisierung der Retina beteiligt ist [Hackett et al. 2000, Gale et al. 2002], die durch Angiogenese vermittelt wird. Auch findet sich in anderen Geweben, in denen Angiogenese stattfindet, Angiopoietin-2 Expression. So z.B. im Endometrium [Goede et al. 1998] oder in vaskularisierten Tumoren [Stratmann et al. 1998]. Vor diesem Hintergrund überprüften wir die Angiopoietin-2 Promoteraktivität in der Retina am postnatalen Tag P12 zu Zeiten verstärkter physiologischer Angiogenese. Es war eine erhöhte Aktivität des Angiopoietin-2 Promoters in mehreren Ebenen der Netzhaut zu beobachten. Am stärksten war die Expression des unter der Kontrolle des Angiopoietin-2 Promoters stehenden Reportergens ( $\beta$ -Galaktosidase) in der äußeren plexiformen Schicht (Bereich des tiefen Kapillarnetzes). Zum Zeitpunkt der Präparation hat die Gefäßfront die äußere plexiforme Schicht erreicht, so dass die LacZ-positiven Zellen Endothelzellen darstellen könnten. Frühere Studien konnten zeigen, dass in homozygoten Angiopoietin-2 *knock out* Mäusen die LacZ-Expression gefäßassoziiert ist [Hackett et al. 2002]. Somit kann durch  $\beta$ -Galaktosidase-Färbung von Netzhäuten homozygoter Tiere indirekt auf das Gefäßmuster geschlossen werden. Dies gilt jedoch nicht für die heterozygoten Tiere; hier ist die LacZ-Expression nach Hackett an Horizontalzellen gebunden.

Weiterhin war bisher nicht bekannt, dass der Angiopoietin Rezeptor Tie-2 nicht nur in Endothelzellen, sondern während embryonaler Vaskularisierung auch in perivaskulären Vorläuferzellen („*mural precursor cells*“, MPCs) exprimiert wird [Iurlaro et al. 2003]. Angiopoietine stimulieren diese Zellen über Bindung an Tie-2, was sich u.a. in einer chemotaktischen Reaktion der MPCs zeigt. Auch erhöht Angiopoietin-2 die Expression der Matrix-Metalloprotease-2 in den MPCs [Iurlaro et al. 2003] und in Tumorgewebe [Hu et al. 2003]. Allerdings stammen die in diesen Studien verwendeten MPCs aus großen Arterien (Aorta) und nicht aus kleinen Gefäßen, wie z.B. Kapillaren. Matrixmetalloproteasen (MMPs) können Proteine der Basalmembran und des Bindegewebes abbauen. Die Angiopoietin-2 vermittelte Expression der Matrixmetalloprotease-2 ist für die Invasivität von Endothelzellen während der Angiogenese von entscheidender Bedeutung [Sato et al. 1997, Itoh et al. 1998] und könnte die von uns dokumentierte Aktivierung des Angiopoietin-2 Promoters während der Vaskularisierung der Netzhaut erklären. Diese Beobachtung ist ein erstes wichtiges Detail im Verständnis der Wirkung von Angiopoietin-2 auf das Gefäßsystem der Netzhaut.

#### 4.1.1 Die Gefäßstruktur der Retina in der Angiotensinogenase-2 *knock out* Maus

Um die Ergebnisse der Studien zu einem Angiotensinogenase-2 Überangebot besser einordnen zu können, ist es wichtig, zuvor die Auswirkung eines Mangels an Angiotensinogenase-2 auf die Gefäße zu analysieren. Hierzu wurde der Gefäßphänotyp von Angiotensinogenase-2 *knock out* Mäusen untersucht. Bei der Präparation der knapp 5 Monate alten Tiere fiel regelmäßig ein chylöser Aszites auf, der auf einen Defekt in der Entwicklung eines funktionellen Lymphsystems hinweist und einen Großteil der Mäuse sterben lässt. Da jedoch in bestimmten Inzuchtstämmen ein höheres Alter erreicht wurde, hängt das Überleben dieser Tiere offensichtlich von ihrem jeweiligen genetischen Hintergrund ab. Die Auswirkungen eines Angiotensinogenase-2-Mangels auf das Lymphgefäßsystems ist in diesem Kontext aber von untergeordneter Bedeutung, da neuronale Gewebe wie die Retina keine Lymphgefäße enthalten. Die von uns durchgeführten fluoreszenzmikroskopischen Analysen der Netzhautkapillaren bestätigten die von Hackett et al. 2002 beschriebenen Malformationen dieser Gefäße. So bilden die Angiotensinogenase-2 defizienten Tiere keine funktionellen Kapillarbetten in der Tiefe der Netzhaut aus. Weiterhin ist die Peripherie der Retina nicht vollständig vaskularisiert und das Hyaloidgefäßsystem zur Versorgung der embryonalen Linse hat sich im *knock out* Tier nicht, wie physiologisch normal, zurückgebildet, sondern findet sich als der Netzhaut aufliegendes malformiertes Gefäßgeflecht. Eine histologische Analyse der unphysiologischen Netzhautgefäße von Angiotensinogenase-2 *knock out* Mäusen wurde bisher jedoch noch nie durchgeführt. Die von uns angefertigten enzymatischen Netzhautdigestionen zeigen nach PAS-Färbung eindrucksvoll den erheblichen Unterschied zwischen der Gefäßmorphologie der adulten Angiotensinogenase-2 *knock out* Maus und der des Wildtyps.

In den fluoreszenzmikroskopischen Analysen der Netzhäute von Angiotensinogenase-2<sup>-/-</sup> Mäusen sind zwei unterschiedliche Gefäßbetten nachweisbar, die beide aus der Zentralarterie entspringen und über periphere Anastomosen miteinander verbunden sind. Das eine System liegt in der Ganglienzellschicht der Retina, erstreckt sich nur über die inneren zwei Drittel der Netzhautfläche und ist nach außen durch blind endende Malformationen begrenzt. Diese Gefäße entsprechen höchstwahrscheinlich den primären Netzhautgefäßen. Das andere Gefäßnetz liegt zwischen Glaskörper und Retina. Es ist wahrscheinlich aus dem primär zur Versorgung der Linse angelegten embryonalen Hyaloidgefäßsystem hervorgegangen, das sich nicht zurückgebildet hat und nun als sekundäres Gefäßgeflecht der Netzhaut aufliegt. Die während der Embryogenese zur Versorgung der Linse angelegten Hyaloidgefäße (*Arteria hyaloidea*, *Vasa hyaloidea propria*, *Tunica vasculosa lentis*) werden normalerweise beim

Menschen vor der Geburt, beim Nager kurz danach rückgebildet [Jack 1972, Ito 1999], um den Strahlengang im Auge nicht zu behindern. In den Angiopoietin-2 *knock out* Mäusen wird diese Rückbildung nicht beobachtet, das hyaloide Gefäßsystem persistiert.

Unsere Analysen zeigen eine verminderte hierarchischen Ordnung in dem der Netzhaut aufliegenden Gefäßgeflecht. Die größeren Arteriolen sind dilatiert und bilden ein eigenes „Netzwerk“, in dem keine Kapillaren angelegt sind. Vielmehr entspricht die Organisation der Arteriolen sogar der von Kapillaren. Wie die Maschen eines Netzes sind sie miteinander verbunden und gleichen arterio-venösen Anastomosen. Im physiologischen Zustand entsprechen größere Arteriolen eher langen, geraden Strukturen. Diese Röhren haben die Funktion der Zuleitung von Blut zu den Kapillarbetten. In den Angiopoietin-2 *knock out* Mäusen hingegen wirken diese Gefäße geschlängelt, Gefäße geringerer Ordnung zweigen nicht ab; ein laminarer Blutstrom kann so nicht länger gewährleistet sein. Dies spricht für einen Funktionsverlust der größeren Arteriolen und muss zwangsläufig in einer Minderversorgung des Gewebes resultieren. Es scheint, als hätten sich aus einem primären Gefäßplexus keine kleineren Kapillaren herausbilden können. Eventuell ist dies auf eine verminderte Fähigkeit zur Angiogenese zurückzuführen (s.u.).

Der beschriebene Phänotyp gleicht in seinem Erscheinungsbild dem von Krankheiten wie dem „Persistierenden Hyperplastischen Primären Vitreous“, PHPV [Reese 1949, 1955]. Goldberger hat diese Krankheitserscheinungen als „Persistierende Fetale Gefäße“ (PFV) zusammengefasst [Goldberger 1997]. Auch in der Erkrankung „*retinopathy of prematurity*“ (ROP) werden persistierende Hyaloidgefäße beobachtet. Diese Parallelen zum Angiopoietin-2 *knock out* sind auffällig, da es sowohl bei Angiopoietin-2 Mangel als auch bei den beschriebenen Erkrankungen zu fehlerhafter Vaskularisierung der Netzhaut mit avaskulären Bezirken kommen kann [Penn et al. 1993]. Es ist daher möglich, dass das persistierende Hyaloidsystem sekundär zur Versorgung von hypoxischen Bereiche der Netzhaut „reaktiviert“ wird und Anastomosen mit den primären Gefäßen der Netzhaut ausbildet, wie es für die ROP und die PFV beschrieben ist [Eller et al. 1987, Stefani et al. 1976].

Eine quantitative Erfassung des Perizytenbesatzes dieser Gefäße war nicht möglich. Die kleineren malformierten Gefäßnetze der Angiopoietin-2 defizienten Tiere konnten aufgrund ihrer innergeweblichen Spannung mittels Digestion nicht zur Gänze dargestellt werden. Somit sind ausschließlich qualitative Aussagen zur Gefäßmorphologie möglich. So war auffällig, dass in den Gefäßen der homozygoten Tiere fast keine Endothelzellkerne zu finden waren, das Perizytenverteilungsmuster jedoch nicht gestört war. Da Angiopoietin-2 zur Migration und

Proliferation von Endothelzellen in Kombination mit weiteren Faktoren beiträgt [Lobov et al. 2002], könnte ein Angiopoietin-2 Mangel zu der beobachteten Reduktion der Endothelzellzahl führen. Gestützt wird diese Hypothese durch die Beobachtung, dass nach Blockierung von Angiopoietin-2 durch einen spezifischen Antikörper Proliferation und Migration von Endothelzellen ebenfalls verhindert werden kann [Cai et al. 2003]. Da diese Daten jedoch aus *in vitro*-Studien stammen, ist ihre Übertragbarkeit auf die *in vivo* Situation nur eingeschränkt möglich. Auch ist bekannt, dass Angiopoietin-2 alleine keinen proliferativen Effekt auf Endothelzellen besitzt. In Kombination mit Wachstumsfaktoren wie VEGF begünstigt Angiopoietin-2 allerdings eine beachtliche Proliferation von Gefäßen [Asahara et al. 1998, Holash et al. 1999, Lobov et al. 2002].

Neben den beschriebenen Veränderungen war außerdem eine haarnadelförmige Struktur im *knock out* Tier auffällig, die über einen kurzen Bereich in zwei separate Gefäße aufgeteilt ist. Diese Malformation ähnelt einer Situation, in der aus einem primären Gefäß via Intussuszeption (eine Form der Angiogenese [Burri et al. 1990, Patan et al. 1996]) zwei neue Gefäße entstehen, dieser Vorgang aber möglicherweise aufgrund von Angiopoietin-2 Mangel blockiert oder unterbrochen wurde. Eine Erklärung hierfür wäre die Beobachtung, dass Angiopoietin-2 zur Expression von Matrixmetalloproteasen (MMP-2) führt [Etho et al. 2001, Hu et al. 2003]. Diese Enzyme spielen bei der Angiogenese eine wichtige Rolle, da sie zum Abbau von perivaskulärem Bindegewebe benötigt werden. Auch ist zur Gefäßneubildung bzw. zum Gefäßumbau eine Lockerung der Verbindung zwischen Endothelzellen und Perizyten notwendig, was ebenfalls durch Angiopoietin-2 bewirkt werden kann [Hammes et al. 2004]. Eine fehlende Expression von MMP-2 bzw. eine ausgebliebene Auflockerung des Perizyten-Endothelzellverbandes aufgrund Angiopoietin-2 Mangels könnte somit zu den beschriebenen Malformationen führen.

Ein weiteres Gefäßnetz liegt innerhalb der Netzhäute Angiopoietin-2 defizienter Mäuse. Dieses Gefäßsystem ist durch trommelschlägelförmige Gefäßmißbildungen charakterisiert, die ausschließlich an der äußeren Grenze des Gefäßgeflechts zu finden sind. Sie ragen senkrecht aus den horizontal angeordneten Gefäßen heraus und sprossen in Richtung der tiefen Schichten der Netzhaut. Die blind endenden Gefäßstrukturen zeigen an ihrem Ende eine Erweiterung des Gefäßlumens und eine Anhäufung von Zellen. Da die beschriebenen Strukturen ausschließlich am Rand der vaskularisierten Netzhaut vorkommen, wäre es durchaus möglich, dass sich aufgrund der Minderdurchblutung dieser avaskulären Bereiche eine lokale Hypoxie ausbildet, die wiederum VEGF hochreguliert [Shweiki et al. 1992, Alon

et al. 1995, Stone et al. 1995]. Dieser Wachstumsfaktor wirkt positiv auf die Proliferation von Endothelzellen [Ferrara et al. 1999]. Eine reibungslose Angiogenese kann allerdings nur dann stattfinden, wenn z.B. Matrixmetalloprotease-2 (MMP-2) das umliegende Gewebe „auflockert“ und so eine Instabilisierung bereits vorhandener Gefäße bewirkt (s. o.). Im *knock out* Tier könnten die dilatierten, von Zellhaufen besetzten Spitzen der trommelschlägeförmigen Malformationen daher Orte beginnender Angiogenese repräsentieren, in denen zwar lokale Zellproliferation stattfindet, jedoch kein Aussprossen von neuen Gefäßen aufgrund persistierender Gefäßstabilität stattfinden kann.

Ein Mangel an Angiopoietin-2 scheint zu verhindern, dass proliferative Reize in den Gefäßnetzen der postpartalen Netzhaut Proliferation induzieren und somit Gefäßaussprossung unterbleibt. Folge ist die beschriebene Mindervaskularisierung der Netzhautperipherie im Angiopoietin-2 *knock out* Tier [Gale et al. 2002, Hackett et al. 2002] oder die von uns beobachteten Malformationen (s. o.). Diese These wird von Studien gestützt, die nachweisen, dass in der adulten Ratte („*cornea micropocket assay*“) durch Einsatz von Angiopoietin-2 bindender RNA bzw. eines Angiopoietin-2 bindenden Antikörpers Neovaskularisation verhindert werden kann [White et al. 2003, Cai et al. 2003].

Die beschriebenen Beobachtungen belegen unsere Vermutung, dass Angiopoietin-2 während der Vaskularisierung entscheidenden Einfluß auf die primitiven Gefäße der frühen Retina in Form einer Sensibilisierung für proliferative Reize durch Instabilisierung der Gefäßstrukturen nimmt. Welches morphologische Korrelat jedoch die „Sensibilisierung“ der Gefäße durch Angiopoietin-2 hat, sollen die Versuche zeigen, in denen die Gefäße einem Angiopoietin-2-Überangebot ausgesetzt werden.

#### **4.2 Das transgene Opsin-hAng-2 Maus-Modell**

Um die Effekte eines Überangebotes von Angiopoietin-2 studieren zu können, muss im Auge eine Erhöhung der Angiopoietin-2-Konzentration herbeigeführt werden. Zum einen ist dies auf direkte Weise durch intravitreale Injektionen zu erreichen. Diese Methode liefert zuverlässige Ergebnisse, hat jedoch den Nachteil, dass durch die Manipulation Gewebe verletzt wird und hieraus eventuell eine artifizielle Reizung des Auges resultiert. Durch Aufnahme einer Kontrollgruppe in den Versuchsplan kann dieser systematische Fehler allerdings erkannt und berücksichtigt werden. Auch stellt das Auge als Teil des Zwischenhirns ein Organ dar, das ähnlich den Gelenken eine gewisse Immuninkompetenz aufweist. So kann davon ausgegangen werden, dass das injizierte Angiopoietin-2 im Auge der Immunantwort

entgeht und ausgedehnte Entzündungsreaktionen erst nach starker Keimkontamination auftreten.

Ein weiterer negativer Aspekt der direkten Proteininjektion ist die Tatsache, dass die Applikation von Angiopoietin-2 nur ein einziges Mal erfolgen kann und die Wirkung auf das Gefäßsystem zum einen von der Halbwertszeit des Proteins und zum anderen von der Immunantwort des Versuchstiers abhängt. Effekte, die erst nach einer längeren Einwirkzeit auftreten, werden auf diese Weise nicht erfasst. Aus den beschriebenen Aspekten geht hervor, dass eine endogene Überexpression von transgenem Angiopoietin-2 im Auge mehrere entscheidende Vorteile hätte. So könnte es über einen langen Zeitraum stetig auf die Gefäße einwirken und würde in der Nähe der Kapillarbetten exprimiert. Weiterhin bedürfte es keiner invasiven Manipulation am Auge. Daher wurden neben den Proteininjektionen auch transgene Mäuse erzeugt, die unter Kontrolle des murinen Opsin-Promoters [Flannery et al. 1997] Angiopoietin-2 in der Rezeptorzellschicht exprimieren („Ops/hAng-2 Mäuse“).

### **4.2.1 Eignung des Modells zur Beantwortung der Fragestellung**

Frühere Studien haben gezeigt, dass es erfolgreich möglich war, transgenes VEGF unter Kontrolle des bovinen Opsin-Promoters in der Rezeptorzellschicht der Netzhaut zu exprimieren [Okamoto et al. 1997, Ohno-Matsui et al. 2002]. Die Expression eines Wachstumsfaktors (hier VEGF) innerhalb der Rezeptorzellschicht hatte deutlichen Einfluß auf die Gefäße des tiefen Kapillarbetts der Retina. Aufgrund des unterschiedlichen Bildungs- und Wirkungsort kann somit auf ein Transport des transgenen Proteins durch die Netzhaut geschlossen werden. Die Aktivität des in unseren Studien verwendeten murinen Opsin-Promoters innerhalb der Netzhaut wurde in verschiedenen Veröffentlichungen bewiesen [Kido et al, 1996, Flannery et al. 1997]. Diese Studien konnten zeigen, dass nach retroviralem Gentransfer unter Kontrolle des murinen Opsin-Promoters in der Rezeptorzellschicht GFP-Expression induzierbar war. Folglich lassen sich mit diesem Versuchs-Design bestimmte Proteine unter Kontrolle des Opsin-Promoters innerhalb der Rezeptorzellschicht in ausreichender Konzentration synthetisieren. Durch passiven Transport erreichen die transgenen Proteine Gewebe fern ihrer Bildungsstätte und können auf die dortigen Gefäße einwirken. Die Induktion von Gefäßmalformationen im Kapillarsystem der Maus-Retina sowie deren Analyse durch enzymatische Digestionen wurde bereits erfolgreich durchgeführt [Midena et al. 1989]. Für unsere Fragestellung erscheint die Expression eines Wachstumsfaktors in der Netzhaut unter Kontrolle eines rezeptorzellspezifischen Promoters

als Versuchskonstellation optimal. So wurde als Transgen der murine Opsin-Promoter vor die Sequenz des humanen Angiopoietin-2 gesetzt und im 3'-Bereich die SV40 polyA Sequenz angefügt. Die Bioaktivität des humanen Angiopoietin-2 in Gewebe von Nagetieren wurde überprüft und bestätigt (persönliche Mitteilung H. Gerhardt).

### 4.2.2 Nachweis der Transgen-Expression

Durch die Injektion der linearisierten transgenen DNA-Sequenz in die Pronuclei von Mauszygoten wurden mehrere Maus-Linien erzeugt, die auf je einen *Founder* zurückgehen. Mittels PCR konnte in Schwanzlysaten von sechs verschiedenen Linien die Sequenz des humanen Angiopoietin-2 nachgewiesen werden, so dass die Integration des Ops/hAng-2-Transgens in das Genom dieser Mäuse erwiesen ist. Als nächstes wurde mit Hilfe einer RT-PCR untersucht, ob der Opsin-Promoter in den sechs transgenen Linien aktiviert und vom humanen Angiopoietin-2 cDNA-Insert eine mRNA transkribiert wird. Allerdings war eine Transkription des Transgens nur in drei Linien zu belegen. Die fehlende Aktivität des Opsin-Promoters in den anderen Tieren kann darauf zurückzuführen sein, dass die exogenen Sequenzen zufällig in Bereiche des Maus-Genoms integriert wurden, die transkriptionell nicht aktiv sind oder unter dem Einfluss von *silencern* stehen. Letztlich konnte die Translation bzw. Protein-Expression des Transgens in der Netzhaut mittels Western-blotting durch Einsatz eines humanspezifischen anti-Angiopoietin-2 Antikörpers in einer der drei RT-PCR positiven Linien gezeigt werden. Somit war die Expression von humanem Angiopoietin-2 innerhalb der Netzhaut auf Proteinebene eindeutig bewiesen. Dieser Nachweis war allerdings nur durch Einsatz eines humanspezifischen anti-Angiopoietin-2 Antikörpers der Firma R&D möglich. Wie sich herausstellte, waren alle anderen kommerziell zu beziehenden Antikörper trotz z.T. anderslautender Herstellerangaben nicht humanspezifisch. Diese Problematik zeigte sich auch bei der Charakterisierung des genauen Expressionsortes des Transgens innerhalb der Retina. Hier offenbarte sich, dass der im Western-Blot eingesetzte Antikörper in der Immunhistologie das humane Angiopoietin-2 nicht mehr spezifisch erkennt. Trotz Fixation der Schnitte mit unterschiedlichen PFA-Konzentrationen, Herstellung von unfixierten Gefrierschnitten und versuchter Demaskierung des Epitops mit Trypsin und Mikrowellenbehandlung war ein spezifischer Nachweis des Expressionsortes nicht möglich. Es wurde auch versucht, den Ort der Expression mit Hilfe von Fluoreszenzanalysen nachzuweisen. Zur Detektion des Erstantikörpers kam ein anti-Ziege-Cy3 Antikörper zum Einsatz. Daneben wurde als Zweitantikörper ein anti-Ziege-Biotin gekoppelter Antikörper und zur Detektion Streptavidin-

Cy3 eingesetzt. Beide Ansätze zeigten nicht das gewünschte Ergebnis, so dass auch mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie keine Bestimmung der Lokalisation der Angiopoietin-2 Expression möglich war. Da die Bestimmung des Ortes der Transgenexpression für unsere Fragestellung nicht unbedingt notwendig war und der Beweis der Expression an sich ausreichend ist, wurde auf das Anfertigen von *in situ*-Hybridisierungen verzichtet. Aufgrund vorausgegangener Studien kann davon ausgegangen werden, dass das in der Rezeptorzellschicht gebildete Angiopoietin-2 die Retina mittels Diffusion durchwandert [Okamoto et al. 1997].

### 4.3 Darstellung der Angiopoietin-2-Effekte in Netzhautdigestionen

Nachdem in einer transgenen Ops/hAng-2 Linie die Expression von humanem Angiopoietin-2 zweifelsfrei nachweisbar war, wurden die Netzhäute von Nachkommen dieser Linie zur gefäßmorphologischen Analyse entnommen und präpariert. Mit Hilfe von enzymatischen Netzhautdigestionen konnten die Gefäßnetze vom restlichen Gewebe isoliert dargestellt und die verschiedenen Zelltypen *in situ* durch PAS-Färbung beurteilt werden. Zur Beschreibung eventueller Effekte eines Angiopoietin-2 Überangebotes wurden neben den transgenen Tieren auch Ratten präpariert, in die intravitreal rekombinantes humanes Angiopoietin-2 injiziert wurde. (Die Bioaktivität des injizierten humanen Angiopoietin-2 bezüglich Nagerzellen wurde zuvor erfolgreich überprüft, Mitteilung H. Gerhardt). Auch diese Netzhäute wurden enzymatisch digestiert und so das Gefäßsystem als zweidimensionales Netzwerk dargestellt.

#### 4.3.1 Angiopoietin-2 verursacht Perizytenabfall

Der Abfall von Perizyten von Kapillaren der reifen Netzhaut ist ein pathologisches Ereignis, das u.a. im Rahmen der diabetischen Retinopathie auftritt und die frühen Auswirkungen einer chronischen Hyperglykämie widerspiegelt (s. u.). So konnte *in vitro* gezeigt werden, dass erhöhte Glukosespiegel zu einer Expression von NF- $\kappa$ B in Perizyten führt, die daraufhin durch Apoptose untergehen [Romeo et al. 2002, Li et al. 1997]. In einem Maus-Tumor-Modell war neben einer erhöhten Angiopoietin-2 Expression Perizytenabfall beobachtet worden [Holash et al. 1999, Zhang et al. 2003]. Weiterhin konnte in früheren Studien beobachtet werden, dass die Gefäße der Netzhaut reduzierten Perizytenbesatz zeigen, wenn der Wachstumsfaktor PDGF-B (*platelet-derived growth factor*) bzw. dessen Rezeptor PDGFR- $\beta$  (*platelet-derived growth factor receptor-beta*) ausgeschaltet wurden [Lindhahl et al. 1997, Hellström et al. 2001, Hammes et al. 2003]. PDGF-B wird von Endothelzellen gebildet und

führt über die Rekrutierung und Proliferation von Perizyten zu einer Gefäßstabilisierung. Die Gefäße der PDGF-B<sup>-/-</sup> Embryonen neigen zur Ausbildung von Gefäßmalformationen (z.B. Mikroaneurysmen) oder haben größere Durchmesser als üblich. Da auch Angiopoietin-2 zu einer Gefäßinstabilisierung führt, liegt der Verdacht nahe, dass die Angiopoietin-2 vermittelte Instabilität ebenfalls durch einen verminderten Perizytenbesatz verursacht wird. Daher wurden unterschiedliche Experimente zum Einfluß von Angiopoietin-2 auf die Perizytenbesiedelung der Kapillaren in der Netzhaut durchgeführt (s.o.). Die statistischen Auswertungen dieser Versuche ergaben sowohl in den transgenen Tieren als auch nach direkter Injektion von Angiopoietin-2 eine signifikante Abnahme der Perizytenzahl pro Kapillarfläche. Das Ausmaß dieses Effektes ist abhängig von der Angiopoietin-2 Konzentration im Auge. So bewirkt die Injektion einer dreifachen Angiopoietin-2 Menge eine Zunahme des Perizytenverlustes um ca. 66 %. Die Standardabweichung der Ergebnisse nach Angiopoietin-2 Injektion ist höher als die der Wildtyp-Werte. Dies ist wahrscheinlich durch die injektionsbedingte inhomogene Verteilung des injizierten Angiopoietin-2 vor der Netzhaut zu erklären. Je nach applizierter Angiopoietin Konzentration grenzen Bereiche mit hohem Perizytenabfall an Areale mit geringerem Perizytenverlust. Dies spiegelt sich in der Auswertung als erhöhte Streuung der Werte wider. Koinjektion von Angiopoietin-2 und löslichem Angiopoietin Rezeptor (sTie-2-Fc) in 12 fachem Überschuss hebt den beobachteten Perizytenabfall wieder auf und schließt gleichzeitig aus, dass der beobachtete Effekt auf eine Kontamination des rekombinanten Angiopoietin-2 mit Endotoxin verursacht sein könnte. Diese Beobachtung und die Tatsache, daß in den PBS-Kontrollinjektionen kein Perizytenverlust feststellbar war, beweisen die Beteiligung von Angiopoietin-2 an der Vermittlung dieses Effektes auf die Perizyten. Ein reaktiver Perizytenverlust aufgrund von mechanischer Manipulation oder unspezifischer chemischer Reize ist daher auszuschließen. Da löslicher Tie-2 Rezeptor auch physiologischer Weise im Plasma nachweisbar und in bestimmten Krankheitsbildern erhöht ist [Chung et al. 2003], liegt die Vermutung nahe, dass die Wirkung der Angiopoietine in bestimmten Situationen auch durch kompetitive Hemmung begrenzt wird.

Unsere Untersuchungen stehen mit der Beobachtung im Einklang, dass in diabetischen Ratten vor Eintreten des Perizytenabfalls von den Netzhautgefäßen Angiopoietin-2 hochreguliert wird. Auch sind unsere Ergebnisse konform mit der dokumentierten Aktivierung des Angiopoietin-2 Promoters transgener Angiopoietin-2/LacZ-Mäuse nach medikamentöser Ausschaltung der  $\beta$ -Zellen des Pankreas [Hammes et al. 2004]. Die Injektionsexperimente zeigen weiterhin, wie zeitnah der Perizytenabfall nach einer Erhöhung des Angiopoietin-2

Spiegels auftritt. So konnte der Perizytenverlust bereits eine Woche nach Injektion beobachtet werden. Der Abfall von Perizyten tritt im Zuge der Ausbildung einer diabetischen Retinopathie ebenfalls eher früh auf. Gefäßanomalien wie z.B. azelluläre Kapillaren sind erst später im Verlauf der Erkrankung zu beobachten. In den transgenen Mäusen konnte im Alter von 5 Wochen ebenfalls Perizytenabfall nachgewiesen werden. In diesem Modell reichte die kontinuierliche Überexpression von transgenem Angiopoietin-2 aus, um sowohl das Gefäßsystem zu instabilisieren als auch die Zahl azellulärer Kapillaren zu erhöhen.

Im transgenen Modell erfolgte die Expression des humanen Angiopoietin-2 in der Rezeptorzellschicht. Dies gewährleistet eine stets hohe Konzentration des transgenen Proteins im Bereich der tiefen Kapillaren. In den Digestionen wurde ausschließlich der Perizytenbesatz der tiefen Kapillaren (mittlere und tiefe Schicht der Netzhaut) erfasst. Somit liegen Expressions- und analysierter Wirkungsort von Angiopoietin-2 im transgenen Tier nahe beisammen. Im Gegensatz hierzu wurde bei Angiopoietin-2 Injektionen ein Protein-Depot zwischen Glaskörper und Netzhaut angelegt. In dieser Konstellation trifft Angiopoietin-2 erst auf die größeren Gefäße der Ganglienzellschicht, bevor es die Kapillarbetten erreicht. Daher ist in diesem Modell die Diffusionsstrecke größer, was sich auch in der Größenordnung des Perizytenverlustes widerspiegelt. So ist der beobachtete Effekt im transgenen Tier um fast ein Fünftel stärker als in der injizierten Ratte, was sich auch im Signifikanzniveau ausdrückt.

### **4.3.2 Angiopoietin-2 erhöht die Anzahl azellulärer Kapillaren**

Azelluläre Kapillaren treten im fortgeschrittenen Stadium der diabetischen Retinopathie bzw. als Folge chronischer Hyperglykämie auf [Midena et al. 1989, Kern et al. 1996, Hammes et al. 1998]. Durch die unterbrochene Perfusion in azellulären Kapillaren kommt es in diesen Bereichen der Netzhaut zu einer relativen Unterversorgung und Hypoxie des Gewebes. Es resultiert eine Neovaskularisation der Retina, die zur Visusverschlechterung des Patienten führen kann. Die Ausbildung von azellulären Kapillaren erfolgt jedoch erst nach einer Reduzierung des Perizytenbesatzes der Gefäße und ist das Resultat einer gestörten Wechselwirkung zwischen Endothelzellen und perivaskulären Zellen. In den Netzhautdigestionen 5 Wochen alter transgener Ops/hAng-2-Mäuse wurde im Vergleich zu den Wildtyp-Geschwistern eine erhöhte Zahl azellulärer Kapillaren gefunden. Die Angiopoietin-2 überexprimierenden Tiere zeigten neben den beschriebenen Auffälligkeiten keine weiteren Malformationen. Schwerwiegende pathologische Veränderungen der Gefäße treten bei diabetischen Patienten erst später auf und sind für ein fortgeschrittenes Stadium der

Diabetischen Retinopathie charakteristisch [Engerman et al. 1984]. Dementsprechend waren in unseren Studien auch keine Mikroaneurysmen zu finden, die ansonsten zeitlich versetzt in der Nähe von azellulären Kapillaren gehäuft auftreten (persönliche Mitteilung H. P. Hammes, Kern et al. 1996). Mikroaneurysmen stellen Orte begrenzter Gefäßinstabilität dar, die aufgrund eines Stimulus (z.B. Hypoxie) lokale Proliferation zeigen oder wegen umschriebener Druckintoleranz Aussackungen der Gefäßwand darstellen. In den Netzhäuten der von uns untersuchten Mäuse sind zwar azelluläre Kapillaren nachweisbar, es scheint jedoch aufgrund des Fehlens von Mikroaneurysmen noch keine Hypoxie oder gravierende Gefäßwandschwäche vorzuliegen. Allerdings ist zu erwarten, dass sich zu einem späteren Zeitpunkt die Zahl azellulärer Kapillaren weiter erhöht und auch Mikroaneurysmen nachweisbar werden. Dieser Frage nachzugehen war allerdings nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Wir konnten zeigen, dass Überexpression von Angiopoietin-2 in der Netzhaut zur Ausbildung von azellulären Kapillaren führt, was höchstwahrscheinlich direkte Folge des gleichzeitig beobachteten Perizytenabfalls ist. Frühere Studien haben als Folge einer Angiopoietin-2 Applikation Endothelzellproliferation und Dilatation von Gefäßen beschrieben [Lobov et al. 2002]. Unsere Experimente konnten diese Beobachtung nicht stützen. Die Gefäße der transgenen Tiere erscheinen nicht dilatiert oder erweitert, auch ist die Anzahl von Endothelzellen nicht vermehrt. Wahrscheinlich ist der von Lobov beschriebene Effekt auf die Eigenheiten des von ihm verwendeten *in vivo* Modells zurückzuführen. Dieses „*pupillary membrane model*“ nutzt ein temporäres Gefäßgeflecht auf der Linse zu deren Versorgung während der Embryogenese. Die Gefäße dieses Modells sind aufgrund ihrer speziellen Funktion nicht mit der Situation in der reifen Netzhaut vergleichbar. Auch sind auf der Linse nur die äußeren, dickeren Gefäße mit Perizyten besetzt. Die Gefäße des Zentrums tragen physiologischerweise keine Perizyten. Die beschriebene Gefäßdilatation findet jedoch gerade in diesem Bereich statt. Daher ist der beobachtete Effekt wohl Folge einer direkten Angiopoietin-2 Wirkung auf die Endothelzellen.

#### **4.4 Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Gefäßnetze in Ops/hAng-2-Mäusen**

Nachdem durch enzymatische Netzhautdigestionen gezeigt werden konnte, dass ein Angiopoietin-2 Überangebot zu Perizytenabfall und zu einer Zunahme von azellulären Kapillaren führt, sollte nun mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie das Gefäßgeflecht der Ops/hAng-2-Mäuse analysiert werden. Im Vergleich zu den zweidimensionalen Präparaten der Digestionen kann man mit der Fluoreszenzmikroskopie die Gefäße der Netzhaut in

dreidimensionaler Weise darstellen. Dadurch lassen sich die einzelnen Gefäßebenen separat beurteilen. Die Fluophore wurden in den fluoreszenzmikroskopischen Studien intra-venös verabreicht und konnten aufgrund ihres Molekulargewichts von 500 kDa die Gefäßwand nicht passieren. So markieren sie die Innenwand der Gefäße und lassen daher aufgrund des Fluoreszenzmusters grobe Rückschlüsse auf die Integrität des Endothels zu.

Die Injektion von 500 kDa FITC-Dextran in Wildtyp-Tiere führte zu einer homogenen Verteilung des Fluorophors, so dass sich die Gefäße als ein gleichmäßig fluoreszierendes Netzwerk darstellten, ohne dass Kalibersprünge oder Fluoreszenzlücken auftraten. Im Gegensatz dazu zeigte sich in den transgenen Ops/hAng-2-Mäusen ein eher heterogenes Fluoreszenzverhalten. So sind punktuelle Anreicherungen des Fluorophors auffällig. Daneben existieren Gefäßabschnitte, die keine Fluoreszenz zeigen. Größere Malformationen sind nicht zu verzeichnen. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der Digestionen (s.o.). Allerdings sind einige korkenzieherförmige Gefäße nachweisbar. Diese Gefäßform tritt gehäuft in Kollateralgefäßen auf, die sich z.B. häufig nach Bypassoperationen am Herzen zeigen [Herzog 2002]. Allerdings sind diese Gefäße größeren Maßstabs und erst späte Folge einer Ischämie bedingten Hypoxie. Das höhere Alter der fluoreszenzmikroskopisch analysierten Tiere (19 Wochen) im Vergleich zu den digestierten Tieren (5 Wochen) könnte erklären, warum diese Gefäßmorphologie in den Digestionen nicht zu beobachten war. Eventuell ist die Netzhaut zu diesem Zeitpunkt schon in einigen Bereichen hypoxisch, so dass hierdurch bereits Proliferation induziert worden ist. Allerdings kann es auch möglich sein, dass korkenzieherförmige Gefäße nur dreidimensional darstellbar sind und daher in den Digestionen nicht auftreten. Das heterogene Fluoreszenzmuster in den Gefäßen transgener Mäuse lässt sich eventuell durch veränderte Endothelzell-Stabilität erklären, die eine Akkumulation der Fluorophore in diesen Bereichen begünstigt. Eine solche Störung der Gefäßintegrität mit anschließendem Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke konnte in diabetischen Tieren bereits beschrieben werden [Joussen et al.2002]. Auch wurde eine erhöhte Angiopoietin-2 Expression während des Zusammenbruchs der Blut-Hirn-Schranke dokumentiert [Nourhaghighi et al. 2003], so dass eine Störung der Gefäßintegrität durchaus als Erklärung für den von uns beobachteten Phänotyp in Frage kommt.

Neben den Injektionen des hochmolekularen 500 kDa FITC-Dextran wurden auch Koinjektionen mit niedermolekularen Fluorophoren (4.4 kDa TRITC-Dextran) vorgenommen. Diese Experimente hatten zum Ziel, eine erhöhte Gefäßpermeabilität bzw. gestörte Endothelzell-Adhärenz nachzuweisen. Wiederum zeigten sich ausschließlich im transgenen

Tier Abschnitte mit erhöhter Konzentration des niedermolekularen Fluorophors. Da sich in diesen Strukturen ebenfalls hochmolekulares Dextran anreicherte, ist es sehr wahrscheinlich, daß diese Orte Bereiche darstellen, in denen der Zusammenhalt des Endothels gestört ist. Das niedermolekulare Dextran scheint in diesen Abschnitten durch die Kapillaren zu treten und sich perivaskulär zu akkumulieren. Jene 4.4 kDa-Dextran-Moleküle, welche nicht in den beschriebenen Gefäßauffälligkeiten zurückgehalten worden sind, wurden in kurzer Zeit über die Nieren eliminiert.

### **4.5 Das transgene P-LacZ-Modell**

In den bisher beschriebenen Studien wurden die Effekte eines Angiopoietin-2 Überangebotes auf den Perizytenbesatz der Netzhautgefäße anhand von enzymatischen Digestionen erfasst. Die quantitative Erfassung der Perizytenzahl basiert bei dieser Methode auf indirektem Erkennen der Perizyten aufgrund von Morphologie und Färbemuster. Das Anfertigen der Digestionen ist aufwendig und zeitintensiv. Die genannten Fakten lassen erkennen, dass es von Vorteil wäre, die Perizyten direkt identifizieren zu können, ohne aufwendige Präparationen der Netzhaut durchführen zu müssen. Das transgene P-LacZ-Maus-Modell bietet all diese Vorteile [Tidhar et al. 2001]. Diese Mäuse exprimieren in ihren Perizyten  $\beta$ -Galaktosidase, so dass eine einfache und schnelle LacZ-Gesamtfärbung der Netzhaut den Perizytenbesatz eindeutig darstellt. Diese P-LacZ-Insertion war zufälliges „Produkt“ eines Experiments, in dem eine LacZ-Kassette hinter Sequenzen des  $\alpha$ P2-Gens ligiert wurde, um damit transgene Mäuse herzustellen. Eine der nach Pronukleus-Injektion entstandenen transgenen Mauslinien zeigte das beschriebene Expressionsmuster. Das P-LacZ-Maus-Modell kam bereits erfolgreich in Tumorexperimenten zum Einsatz [Abramsson et al. 2002], in denen die Perizyten aufgrund der LacZ-Expression eindeutig zu identifizieren waren (s. auch [Hammes et al. 2003]). Unser Ziel war es, mit Hilfe der P-LacZ-Mäuse den postulierten Angiopoietin-2 vermittelten Perizytenverlust auf einfache Weise erfassen zu können. Dazu wurde zum einen rekombinantes Angiopoietin-2 direkt in die Augen der P-LacZ-Mäuse injiziert, zum anderen wurden die Ops/hAng-2-Mäuse in die P-LacZ-Linie eingekreuzt. Die Auswertungen erfolgten mittels LacZ-Färbung der gesamten Netzhaut.

#### **4.5.1 Intravitreale Injektion von Angiopoietin-2 in P-LacZ-Mäuse**

Das Alter der injizierten Mäusen betrug 5 Wochen, um eine Vergleichbarkeit mit den Analysen der Ops/hAng-2-Tiere zu gewährleisten. Ausgewertet wurde der Perizytenbesatz der

tiefen Kapillarbetten, da die Kapillaren dieser Schicht im Vergleich zu den Arteriolen der oberflächlichen Schicht im Laufe der Netzhautentwicklung erst später reifen und die Bindung Perizyt-Endothelzelle daher weniger stabil ist. Dies würde eventuelle Angiotensin-2 vermittelte Effekte auf die Perizyten begünstigen. Die eigentliche Injektion erfolgte in das eine, die Kontrollinjektion in das andere Auge eines Tieres. Da von einem gleichen LacZ-Expressionsmuster in beiden Augen ausgegangen wurde, sind die beobachteten Unterschiede nicht durch ungleiche Ausgangssituationen zu erklären, sondern stellen reale Angiotensin-2 Effekte dar.

Nach quantitativer Auszählung der LacZ-positiven Perizyten in den tiefen Kapillarbetten zeigte sich eine Zunahme von blaugefärbten Zellen. Dies war nicht zu erwarten, da ja mit einem Perizytenabfall gerechnet wurde. Wenn man jedoch berücksichtigt, dass in den P-LacZ-Mäusen generell nur durchschnittlich 65% aller Perizyten  $\beta$ -Galaktosidase Expression zeigen (persönliche Mitteilung H.P. Hammes, PAS/LacZ-Doppelfärbung enzymatisch digestierter Netzhäute), wird deutlich, dass durch die Auszählung nur eine relative Zellzahl erfasst wird. Trotz Zunahme der LacZ-positiven Zellen kann dennoch die absolute Perizytenzahl (gefärbte und nicht gefärbte Perizyten) abnehmen. Dies setzt allerdings eine relative Zunahme der LacZ-positiven Perizyten im Vergleich zur Gesamtzahl voraus. Eine solche Hochregulation des P-LacZ-Transgens könnte Zeichen für einen degenerativen Prozess sein, der letztlich zur Apoptose der Perizyten führt. Der apoptotische Untergang von Perizyten in der diabetischen Netzhaut zu einem frühen Zeitpunkt wurde gezeigt [Li et al. 1997]. Die Hochregulation der  $\beta$ -Galaktosidase in den Perizyten wäre somit auf eine Angiotensin-2 vermittelte Änderungen des internen Zellstatus zurückzuführen. So scheint es, dass Angiotensin-2 einen destabilisierenden Effekt auf die lacZ-negativen Perizyten ausübt, die nach eventueller Apoptose-Induktion das LacZ-Transgen hochregulieren. Es wäre ebenfalls denkbar, dass proliferierende Perizyten das LacZ-Transgen nicht exprimieren und Angiotensin-2 hemmend auf die Proliferation wirkt. Folge wäre nach Angiotensin-2 Applikation eine erhöhte Subpopulation von Perizyten, die sich in einem inaktiven, postmitotischen Zustand befinden und das LacZ-Transgen verstärkt exprimieren.

Die relative Zunahme der LacZ-positiven Zellen widerspricht daher nicht zwangsläufig dem postulierten Angiotensin-2 vermittelten Perizytenabfall. Um obige Hypothese zu bestätigen, könnte man die Perizyten auf Proliferation bzw. Apoptose anzeigende Marker wie z.B. Phospho-Histon-3, Caspasen oder mittels TUNEL-Färbung untersuchen. Da dies aber nicht

zur Beantwortung unserer eigentlichen Fragestellung beiträgt, sind wir dem nicht weiter nachgegangen.

### **4.5.2 Einkreuzung der P-LacZ-Tiere in Ops/hAng-2-Mäuse**

Da die kontinuierliche Überexpression von Angiotensinogenase-2 im transgenen Modell einige Vorteile gegenüber den intravitrealen Proteininjektionen hat (s. 4.3.1), wurden die Ops/hAng-2 Tiere mit Mäusen der P-LacZ-Linie verpaart. Hierdurch erhält man ein Modell, in dem Angiotensinogenase-2 in der Rezeptorzellschicht der Netzhaut mit Beginn der Opsin-Promoter Aktivität exprimiert wird und somit kontinuierlich auf die benachbarten Kapillarnetze einwirken kann. Da die Perizyten in den P-LacZ transgenen Tieren aufgrund von LacZ-Expression Blaufärbung zeigen, sind sie leichter zu identifizieren als durch enzymatische Digestion. Dies vereinfacht eine quantitative Erfassung des Perizytenbesatzes enorm.

Nach Auswertung des  $\beta$ -Galaktosidase Expressionsmusters der Ops/hAng-2 x P-LacZ-Mäuse im Vergleich zu den P-LacZ-Tieren zeigte sich jedoch, dass die Anzahl LacZ-positiver Perizyten (blaue Zellen) innerhalb eines Wurfes stark variierte. Aufgrund dieser ungleichen Ausgangssituation waren Angiotensinogenase-2 vermittelte Effekte nicht darzustellen. Zu erklären ist dieses Phänomen vermutlich durch den gemischten genetischen Hintergrund der Tiere. Daher wurden die Mäuse bis in die 5. Generation in den C57BL/6-Inzuchtstamm zurückgekreuzt. Resultat war ein homogeneres LacZ-Expressionsmuster. Da die tiefen Kapillarnetze dem Expressionsort des Transgens am nächsten liegen und daher in diesem Bereich eine hohe Angiotensinogenase-2 Konzentration vorliegt, ist der Perizytenbesatz dieser Kapillaren von besonderem Interesse. In den rückgekreuzten, doppeltransgenen Tiere zeigten allerdings ausschließlich die Perizyten größerer Gefäße LacZ-Expression. In den tiefen Kapillarnetzen waren keine blauen Zellen zu entdecken. Ein eventueller Perizytenverlust in den tiefen Schichten der Netzhaut war daher mit diesem Modell nicht zu belegen. Die Auswertung des Perizytenbesatzes der größeren Arteriolen konnte keinen Unterschied der Perizytenzahl zwischen Mäusen mit Angiotensinogenase-2 Expression und den Kontrolltieren erbringen. Dies kann mehrere Ursachen haben. So liegen die untersuchten Arteriolen vom Ort der Angiotensinogenase-2 Expression weit entfernt. Folglich ist es möglich, dass das Angiotensinogenase-2 Protein diesen entfernten Bereich der Netzhaut nicht erreicht oder in zu geringen Konzentrationen vorliegt, um einen Effekt auf den Perizytenbesatz ausüben zu können. Zum anderen kann der ausgebliebene Effekt auf eine stärkere Adhäsion der Perizyten an den

größeren Gefäßen zurückzuführen sein. Es ist ebenfalls denkbar, dass sich die Perizyten der Arteriolen in einem gegenüber exogenen Stimuli resistenten Zustand befinden.

### 4.6 Die Rolle von Angiopoietin-2 in der Diabetischen Retinopathie

Angiopoietin-2 spielt bei der embryonalen Vaskularisierung der Netzhaut, während Gefäßumbauprozessen im adulten Tier und bei der Ausbildung eines funktionellen Lymphgefäßsystems eine entscheidende Rolle. Dabei bewirkt Angiopoietin-2 eine Instabilisierung der Gefäße, was in Abhängigkeit von der Präsenz anderer Wachstumsfaktoren zu Gefäßregression oder Proliferation führen kann. Der Verlust an Gefäßintegrität spiegelt sich unter anderem in einer Störung des Kontaktes zwischen Endothelzellen und Perizyten wider. Ein intakter Perizytenbesatz stabilisiert somit die Gefäße. In verschiedenen Experimenten zur Funktion der Perizyten konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion der Perizytenzahl um mehr als 50% zu pathologischen Gefäßveränderungen führt, die typisch für die diabetische Retinopathie sind [Enge et al. 2002]. Die Besiedelung des jungen Gefäßsystems mit Perizyten markiert dessen Reifung und wird durch PDGF-B vermittelt (s. 4.3.1). Interessant ist, dass der Angiopoietin Rezeptor Tie-2 neben der Expression in Endothelzellen auch in Perizyten-Vorläuferzellen gebildet wird [Iurlaro et al. 2003]. Daher ist eine direkte Beteiligung der Angiopoietine bei der initialen Rekrutierung von perivaskulären Zellen nicht auszuschließen. Die diabetische Retinopathie ist Folge chronischer Hyperglykämie und zeigt in ihrem Frühstadium einen gestörten Perizyten-Endothelzell Kontakt. In Gewebe von Patienten, die unter ischämischen Netzhauterkrankungen leiden [Takagi et al. 2003] und in den Augen von Nagern mit experimentell induziertem Diabetes mellitus konnte noch vor Auftreten von pathologischen Gefäßveränderungen eine verstärkte Angiopoietin-2 Expression nachgewiesen werden [Hammes et al., 2004]. Das folgende Ereignis in der Chronologie der diabetischen Retinopathie ist der Abfall von Perizyten („*pericyte-drop-out*“) von Gefäßen der Netzhaut [Midena et al. 1989]. Das Ausmaß des Perizytenverlustes korreliert dabei mit der Dauer der Hyperglykämie. Als Resultat dieses Vorgangs treten azelluläre Kapillaren auf, die aufgrund der Obliteration ihres Gefäßlumens funktionslos werden. Dies hat im fortgeschrittenen Stadium eine Ischämie des Netzhautgewebes zur Folge, was wiederum einen Stimulus zur Expression von Wachstumsfaktoren wie VEGF darstellt. Diese bewirken an den bereits instabilisierten Gefäßen eine Neoangiogenese und Proliferation von Endothelzellen, was sich in der Ausbildung von Mikroaneurysmen in der Nähe der azellulären Kapillaren zeigt. Das

Endstadium der Erkrankung wird durch Gefäßmalformationen gekennzeichnet, welche die klinischen Symptome im Patienten wie z.B. hämorrhagische Blutungen oder Visusverlust verursachen. Das initiale zelluläre und morphologisch erkennbare Ereignis bleibt allerdings der Perizytenabfall von den Netzhautgefäßen. Die zeitlich nahe Expression von Angiopoietin-2 konnte durch unsere Versuche in kausalen Zusammenhang mit dem Perizytenverlust gebracht werden. In mehreren Tiermodellen war zu dokumentieren, dass Angiopoietin-2 zum Perizytenabfall führt und eine Zunahme von azellulären Kapillaren bewirkt. Eine hypoxische Schädigung der perivaskulären Zellen kann als Auslöser des Perizytenabfalls ausgeschlossen werden, da eine Hypoxie erst lange nach dem Abfall eintritt. Die verstärkte Angiopoietin-2 Expression als erstes fassbares Zeichen einer diabetischen Retinopathie ist wahrscheinlich auf eine Hyperglykämie-bedingte Schädigung der Endothelzellen zurückzuführen. So könnte Angiopoietin-2 zur Ermöglichung von Reparaturvorgängen hochreguliert werden, um eine Instabilisierung der Gefäße zu erzeugen. Diese Instabilisierung ist eventuell Vorbedingung für eine reparaturbedingte Beschleunigung des Zell „turn over“. Nehmen die Endothelzellschäden im Laufe der Erkrankung zu, resultiert eine sekundäre Hypoxie, die zur Expression von Wachstumsfaktoren wie VEGF führt. Diese treffen auf die zur Reparatur instabilisierten Gefäße und bewirken die beschriebenen Gefäßmalformationen. In diesem Denkmodell ist nicht Angiopoietin-2 das eigentliche pathologische Agens, sondern es sind die sekundär einwirkenden Wachstumsfaktoren. Bemerkenswert ist, dass der Angiopoietin-2 Antagonist Angiopoietin-1 die Entwicklung einer diabetische Retinopathie in diabetischen Ratten unterdrückt. Dies spricht ebenfalls für die entscheidende Rolle von Angiopoietin-2 in der Pathogenese dieser Erkrankung. Hieraus ergibt sich die therapeutische Möglichkeit, den Perizytenabfall und somit das Initialstadium der diabetischen Retinopathie zu bekämpfen, in dem die Wirkung von Angiopoietin-2 durch kompetitive Hemmung mit Angiopoietin-1 oder löslicher Tie-2 Chimäre unterbunden wird. Alternativ wäre es möglich, durch Gentransfer ein Angiopoietin-2 bindender Antikörper [Cai et al.2003] oder Angiopoietin-2 bindende RNA [White et al. 2003] in den Patienten einzuschleusen. Weitere Studien zu diesem Thema sind erfolgversprechend und können auf die Ergebnisse dieser Arbeit aufbauen.

## 5 Zusammenfassung

Die Ergebnisse mehrerer Studien legten die Vermutung nahe, dass eine Hochregulation von Angiopoietin-2 im Auge diabetischer Tiere und der Abfall von Perizyten von Netzhautgefäßen in Zusammenhang stehen könnten. Ziel dieser Arbeit war daher, die Auswirkungen von Angiopoietin-2 auf die Gefäße im Allgemeinen und auf den Perizytenbesatz als Garant eines stabilen und gesunden Gefäßsystems im Speziellen zu untersuchen. Die Bestätigung unserer Hypothese, Angiopoietin-2 führe zur Verminderung der Perizytenzahl auf den Netzhautapillaren, würde neue Wege in der Therapie der diabetischen Retinopathie ermöglichen. Da der Verlust von Perizyten zu Beginn dieser Erkrankung immer zu beobachten ist, hätte die gezielte Blockade von Angiopoietin-2 potentiell einen erheblichen therapeutischen Wert.

Zur Beantwortung unserer Fragestellung wählten wir die Maus und die Ratte als *in vivo* Modelle. Hierdurch war es möglich, die Auswirkungen eines Überangebotes bzw. eines Mangels an Angiopoietin-2 im Zusammenspiel aller weiteren einflussnehmenden Faktoren zu beschreiben. Um die Rolle von Angiopoietin-2 während der postpartalen Vaskularisierung der Netzhaut aufzuklären, wurden die Gefäßphänotypen von homo- und heterozygoten Angiopoietin-2 *knock out* Mäusen analysiert. Im heterozygoten Tier zeigte sich an Tag P12 eine Aktivierung des Angiopoietin-2 Promoters in der Netzhaut; das Gefäßnetz dieser Tiere war dabei unauffällig. Hingegen waren die homozygoten, Angiopoietin-2 defizienten *knock out* Tiere unfähig, ein funktionelles Gefäßsystem in der Retina zu entwickeln. Die morphologischen Analysen der z. T. malformierten Gefäße zeigten zahlreiche blind endende Gefäßaussackungen in der Peripherie eines insuffizienten, primitiven Gefäßgeflechts. Somit ist Angiopoietin-2 entscheidend bei der postnatalen Ausprägung eines funktionellen Gefäßnetzes beteiligt. Auf der anderen Seite führt ein Überangebot an Angiopoietin-2 zu einem dosisabhängigen Perizytenabfall von den Netzhautkapillaren, der durch ko-appliziertes lösliches Tie-2 aufgehoben werden kann. Zusätzlich treten vermehrt azelluläre Kapillaren auf und die Integrität der Gefäße scheint bei Angiopoietin-2 Überangebot gestört. Die beschriebenen Effekte eines Angiopoietin-2 Überangebotes wurden zum einen nach direkter intravitrealer Injektion von rekombinantem Angiopoietin-2 beobachtet. Zum anderen konnte die Angiopoietin-2 Wirkung durch Etablierung einer neuen transgenen Mauslinie dargestellt werden, die unter Kontrolle des Opsin-Promoters nachweislich humanes Angiopoietin-2 in der Retina exprimiert.

Alles in allem ergeben die bereits bekannten Fakten mit den durch diese Arbeit neu gewonnenen Erkenntnissen ein schlüssigeres Bild der Angiopoietin-2 vermittelten Auswirkungen auf das Gefäßsystem. So kann die Angiopoietin-2 bedingte Instabilisierung der Kapillaren durch Verlust von stabilisierenden Perizyten physiologisch sein, um Gefäßumbau und Neoangiogenese zu ermöglichen. Dies ist der Fall in der reifenden Netzhaut oder während des weiblichen Zyklus im Endometrium. Treffen jedoch zusätzlich proliferative Stimuli unkontrolliert auf die instabilen Gefäße, resultieren krankhafte Zustände, wie sie in der diabetischen Retinopathie beobachtet werden.

## 6. Literaturverzeichnis

Abramsson, A., Berlin, Ö., Papayan, H., Paulin, D., Shani, M., Betsholtz, C. (2002): Analysis of Mural Cell Recruitment to Tumor Vessels. *Circulation* **105** 112-117.

Aiello, P.L., Pierce, E.A., Foley, E.D., Takagi, H., Chen, H., Riddle, L., Ferrara, N., King, G.L., Smith, L.E.H. (1995): Suppression of retinal neovascularisation in vivo by inhibiting of vascular endothelium growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92** 10457-10461.

Alon, T., Hemo, I., Itin, A., Pe'er, J., Stone, J., and Keshet, E. (1995). Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat. Med.* **1**, 1024–1028.

Asahara, T., Chen, D.H., Takahashi, T., Fujikawa, K., Kearney, M., Magner, M., Yancopoulos, G.D. und Isner, J.M. (1998): *Tie-2* receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2, modulate VEGF-induced postnatal neovascularization. *Circulation Research* **83**, 233-40.

Assero, G., Lupo, G., Anfuso, C.D., Ragusa, N., Alberghina, M. (2001): High glucose and advanced glycation end products induce phospholipid hydrolysis and phospholipid enzyme inhibition in bovine retinal pericytes. *Biochem Biophys Acta* **1533** 128-140.

Benjamin, L.E., Hemo, I., Keshet, E. (1998): A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development* **125** 1591-1598.

Berse, B., Brown, L.F., Van de Water, L., Dovrak, H.F., Senger, D.R. (1992): *Mol. Biol. Cell* **3** 211-220.

Brownlee, M. (2001): Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* **414** 813-820.

Burri, P.H., Tarek, M.R. (1990): A novel mechanism of capillary growth in the rat pulmonary microcirculation. *Anatomical recordings* **228** 35-45.

Cai, M., Zhang, H., Hui, R. (2003) :Single chain Fv antibody against angiopoietin-2 inhibits VEGF-induced endothelial cell proliferation and migration *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun.* **309** (4) 946-951.

Carmeliet, P. und Collen, , D. (1999): Role of vascularendothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptors in vascular development. *Vascular Growth Factors and Angiogenesis.* 133-158

Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gerstenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoek, A., Harpal, K., Eberhardt, C., Declercq, C., Pawling, J., Moons, L., Collen, D., Risau, W. und Nagy, A. (1996): Abnormal Blood Vessel Development And Lethality In Embryos Lacking A Single VEGF Allele. *Nature* **380**, 435-39.

Chen, Y.Q. et al. (1998): Sp 1 sites mediate activation of the plasminogen activator inhibitor-1 promoter by glucose in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **273** 8225-8231.

Chung NA, Makin AJ, Lip GY. (2003): Measurement of the soluble angiopoietin receptor tie-2 in patients with coronary artery disease: development and application of an immunoassay. *Eur J Clin Invest.* **33** (7) 529-35.

Collins, T., Ginsburg, D., Boss, J.M., Orkin, S.H., Pober, J.S. (1985): Cultured human endothelial cells express platelet-derived growth factor B chain: cDNA cloning and structural analysis. *Nature* **316** 748-750.

Cogan, D.G., Toussaint, D., Kuwabara, T. (1961): Retinal vascular patterns. IV. Diabetic retinopathy. *Arch. Ophthalmol.* **66** 366-378.

Conolly, D.T., Olander, J.V., Heuveland, D., Nelson, R., Monsell, R., Siegel, N., Haymore, B.L., Leimgruber, R., Feder, J. (1992): *Mol. Biol. Cell* **2** 211-220.

Cooke, J.P., Rossitch, E., Jr., Andon, N.A., Loscalzo, J. und Dzau, V.J. (1991): Flow activates an endothelium potassium channel to release an endogenous nitrovasodilator. *Journal of Clinical investigation* **88**, 1663-71.

Davis, S., Gale, N.W., Aldrich, T.H., Maisonpierre, P.C., Lhotak, V., Pawson, T., Goldfarb, M. und Yancopoulos, G.D. (1994): Ligands for Eph-related receptor tyrosine kinases that require membrane attachment or clustering for activity. *Science* **266**, 816-19.

Davis, S., Aldrich, T.H., Jones, P.F., Acheson, A., Compton, D.L., Jain, V., Ryan, T.E., Bruno, J., Radziejewski, C., Maisonpierre, P.C. und Yancopoulos, G.D. (1996): Isolation of a angiopoietin-1, a ligand for the *Tie-2* receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* **87**, 1161-9.

De Vries, C., Escobedo, J.A., Ueno, H., Houck, K., Ferrara, N. und Williams, L.T. (1992): The *fms*-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelium growth factor. *Science* **255**, 989-91.

Degenhardt, T.P., Thorpe, S.R., Baynes, J.W. (1998): Chemical modification of proteins by methylglyoxal. *Cell Mol. Biol.* **44** 1139-1145.

Dodge, A.B., D'Amore, P.D. (1992): Cell-cell interactions in diabetic retinopathy. *Diabetics Care* **15** 1168-1180.

Dorrell, M.I., Aguilar, E., Friedlander, M. (2002): Retinal vascular development is mediated by endothelial filopodia, a preexisting astrocytic template and specific R-cadherin adhesion. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **43** (11) 3500-10.

Du, X. L. et al. (2000): Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp 1 glycosylation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **97** 12222-12226.

- Dumont, D.J., Yamaguchi, T.P., Conlon, R.A., Rossant, J. und Breitman, M.L. (1992): tek, a novel tyrosine kinase gene located on mouse chromosome 4, is expressed in endothelial cells and their presumptive precursors. *Oncogene* **7**, 1471-80.
- Dumont, D.J., Gradwohl, G., Fong, G.H., Puri, M.C., Gertsenstein, M., Auerbach, A., und Breitman, M.L. (1994): Dominant-negative and targeted null mutations in the endothelial receptor tyrosin kinase, tek, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo. *Genes & Development* **8**, 1897-909.
- Eller, A.W., Jabbour, N.M., Hirose, T., Schepens, C.L. (1987): Retinopathy of prematurity. The association of a persistent hyaloid artery. *Ophthalmology* **94** (4) 444-8.
- Enge, M., Bjarnegard, M., Gerhardt, H., Gustafsson, E., Kalen, M., Asker, N., Hammes, H.P., Shani, M., Fässler, R., Betsholtz, C. (2002): Endothelium-specific platelet-derived growth factor-B ablation mimics diabetic retinopathy. *EMBO-Journal* **21**/16 4307-4316.
- Engerman RL, Kern TS. (1984): Experimental galactosemia produces diabetic-like retinopathy. *Diabetes* **33** (1) 97-100.
- Engerman, R.L. (1989): Pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetes* **38** 1203-1206.
- Esmon, C.T. (1993): Cell mediated events that control blood coagulation and vascular injury. *Annual Review of Cell Biology* **9**, 1-26.
- Esmon, C.T. und Owen, W.G. (1981): Identification of an endothelial cell cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**, 2249-52.
- Etho, T., Inoue, H., Tanaka, S., Barnard, G.F., Kitano, S., Mori, M. (2001): Angiopoietin-2 Is Related to Tumor Angiogenesis in Gastric Carcinoma: Possible *in Vivo* Regulation via Induction of Proteases. *Cancer Research* **61** 2145-2153.
- Ferrara, N., Houck, K.A., Jakeman, L.B., Leung, D.W. (1992): *Endocr. Rev.* **13** 18-32.
- Ferrara, N., Cavermoore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., Oshea, K.S., Powellbraxton, L., Hillan, K.J. und Moore, M.W. (1996): Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF. *Nature* **380**, 439-442.
- Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor (1999): molecular and biological aspects. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **237** 1-30.
- Fiedler, U., Scharpfenecker, M., Koidl, S., Hegen, A., Grunow, V., Schmidt, J.M., Kritz, W., Thurston, G., Augustin, H.G. (2004): The Tie-2 ligand Angiopoietin-2 is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell Weibel-Palade bodies. *Blood* Feb 19
- Fire, A., Harrison, S.W., Dixon, D.A. (1990): Modular set of lacZ fusion vectors for studying gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* **93** 189-198.

- Flannery, J.G., Zolotukhin, S., Vaquero, M.I., La Vail, M.M., Muzyczka, N. und Hauswirth, W.W. (1997): Efficient photoreceptor-targeted gene expression *in vivo* by recombinant adeno-associated virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 6916-6921.
- Fruttiger, M. (2002): Development of the mouse retinal vasculature: angiogenesis versus vasculogenesis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **43** (2) 522-7.
- Gale, N.W., Holland, S.J., Valenzuela, D.M., Flenniken, A., Pan, L., Ryan, T.E., Henkemeyer, M., Strebhardt, K., Hirai, H., Wilkinson, D.G., Pawson, T., Davis, S. und Yancopoulos, G.D. (1996): Eph receptors and ligands comprise two major specificity subclasses and are reciprocally compartmentalized during Embryogenesis. *Neuron* **17**, 9-19.
- Gale, N.W. und Yancopoulos, G.D. (1999): Growth factor acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes & Development* **13**, 1055-66.
- Gale, N.W., Thurston, G., Hackett, S.F., Renard, R., Wang, Q., McClain, J., Martin, C., Witte, C., Witte, M.H., Jackson, D., Suri, C., Campochiaro, P.A., Wiegand, S.J., Yancopoulos, G.D. (2002): Angiopoietin-2 is required for Postnatal Angiogenesis and Lymphatic Patterning, and Only the Latter Role Is Rescued by Angiopoietin-1. *Developmental Cell* **3** 411-423.
- Gariano, R.F. (2003): Cellular mechanisms in retinal vascular development. *Prog. Ret. Eye Res.* (**22**) 3 295-306.
- Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., Abramsson, A., Jeltsch, M., Mitchell, C., Alitalo, K., Shima, D., Betsholtz, C. (2003): VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J. Cell Biol.* **161** (6) 1163-74.
- Gerhardt, H., Betsholtz, C. (2003): Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res.* **314** 15-23.
- Ginsberg, H.N. (2000): Insulin resistance and cardiovascular disease. *J. Clin. Invest.* **106** 453-458.
- Goede, V., Schmidt, T., Kimmina, S. und Augustin, H.G. (1998): Analysis of blood vessel maturation processes during cyclic ovarian angiogenesis. *Laboratory Investigation* **78**, 1385-94.
- Goldberger, M.F. (1997): Persistent fetal Vasculature (PFV): An integrated interpretation of signs and symptoms associated with persistent hyperplastic primary vitreous (PHPV). LIV Edward Jackson Memorial Lecture. *Am. J. Ophthalmol.* **124** 587-626.
- Graves, R.A., Tontonoz, P., Ross, S.R., Spiegelman, B.M. (1991): Identification of adipocyte-specific enhancer-involvement of NF-1 like factor. *Genes & Development* **5** 428-437.
- Hackett, S.F., Ozaki, H., Strauss, R.W., Wahlin, K., Suri, C., Maisonpierre, P., Yancopoulos, G., Campochiaro, P.A. (2000): Angiopoietin-2 expression in the retina: Upregulation during physiologic and pathologic neovascularisation. *Journal of Cellular Physiology* **184** 275-284.

- Hackett, S.F., Wiegand, S.J., Yancopoulos, G., Campochiaro, P.A. (2002): Angiopoietin-2 plays an important role in retinal angiogenesis. *Journal of Cellular Physiology* **192** 182-187.
- Haitoglou, C.S., Tsilibary, E.C., Brownlee, M., Charonis, A.S. (1992): Altered cellular interactions between endothelial cells and nonenzymatically glucosylated laminin/type IV collagen. *J. Biol. Chem.* **267** 12404-12407.
- Hammes, H.P., Martin, S., Federlin, K., Geisen, K., Brownlee, M. (1991): Aminoguanidine treatment inhibits the development of experimental diabetic retinopathy. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **88** 11555-11559.
- Hammes HP, Lin J, Bretzel RG, Brownlee M, Breier G. (1998): Upregulation of the vascular endothelial growth factor/vascular endothelial growth factor receptor system in experimental background diabetic retinopathy of the rat. *Diabetes* **47** (3) 401-406.
- Hammes, H.P., Jihong, L., Renner, O., Shani, M., Lundqvist, A., Betsholtz, C., Brownlee, M., Deutsch, U. (2002): Pericytes and the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy. *Diabetes* **51** 3107-3112.
- Hammes, H.P. (2003): Pathophysiological mechanisms of diabetic angiopathy. *J. Diabetes Complications.* **17** 16-19.
- Hammes, H.P., Du, X., Edelstein, D., Taguchi, T., Matsumura, T., Ju, Q.L.J., Bierhaus, A., Nawroth, P., Hannak, D., Neumaier, M., Bergfeld, R., Giardino, I., Brownlee, M. (2003) : Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycaemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy. *Nature med.* **9** 294-299.
- Hammes, H.P., Lin, J., Wagner, P., Feng, Y., vom Hagen, F., Krzizok, T., Renner, O., Breier, G., Brownlee, M., Deutsch, U. (2004): Angiopoietin-2 causes pericyte dropout in the normal retina: evidence for involvement in diabetic retinopathy. *Diabetes* **53** (4)1104-1110.
- Hanahan, D. (1997) : Signaling Vascular Morphogenesis and Maintenance. *Science* **277** 48-50.
- Hayes, A.J., Huang, W.Q., Mallah, J., Yang, D.J., Lippman, M.E., Li, Y. (1999): Angiopoietin-1 and its receptor Tie-2 participate in the regulation of capillary-like tubule formation and survival of endothelial cells. *Microvascular Research* **58** 224-237.
- Heldin, C.H. (1992): Structural and functional studies on platelet-derived growth factor *EMBO Journal* **11** 4251- 4259.
- Hellström, M., Gerhardt, H., Kalen, M., Li, X., Eriksson, U., Wolburg, H., Betsholtz, C. (2001): Lack of Pericytes leads to Endothelial Hyperplasia and Abnormal Vascular Morphogenesis. *Journal of Cell Biology* **153** 543-553.
- Hellström, M., Kalén, M., Lindahl, P., Abramsson, A., Betsholtz, C. (1999): Role of PDGF-B and PDGFR-b in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development* **126** 3047-3055.

- Hempel, A. et al. (1997): High glucose concentrations increase endothelial cell permeability via activation of protein kinase C alpha. *Circ. Res.* **81** 363-371.
- Hertig, A.T. (1935): Angiogenesis in the early human chorion and in the primary placenta of the macaque monkey. *Contrib. Embryol. Carnegie Inst. Washington* **25**, 37-81.
- Herzog, S., Sager, H., Khmelevski, E., Deylig, A., Ito, W.D. (2002): Collateral arteries grow from preexisting anastomoses in the hindlimb. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **283** 2012-2020.
- Holash, J., Wiegand, S.J. und Yancopoulos, G.D. (1999): New model of tumor-angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene* **18**, 5356-62.
- Holland, S.J., Gale, N.W., Mbamalu, G., Yancopoulos, G.D., Henkemeyer, M., Pawson, T. (1996): Bidirectional signaling through the EPH-family receptor Nuk and its transmembrane ligands. *Nature* **383** 722-725.
- Hu B, Guo P, Fang Q, Tao HQ, Wang D, Nagane M, Huang HJ, Gunji Y, Nishikawa R, Alitalo K, Cavenee WK, Cheng SY. (2003): Angiopoietin-2 induces human glioma invasion through the activation of matrix metalloprotease-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100** (15) 8904-8909.
- Huijberts, M.S.P. et al. (1993): Aminoguanidine treatment increases elasticity and decreases fluid filtration of large arteries from diabetic rats. *J. Clin. Invest.* **92** 1407-1411.
- Jeffers, M., Taylor, G.A., Weidner, K.M., Omura, S., Vande Woude, G.F. (1997): Degradation of Met tyrosine kinase receptor by the ubiquitin-proteasome pathway. *Mol. Cell. Biol.* **17** 799-808.
- Ishii, H. et al. (1996): Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC beta inhibitor. *Science* **272** 728-731.
- Itoh, T., Tanioka, M., Yoshida, H., Yoshioka, T., Nishimoto, H., Itohara, S. (1998): Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer Research* **58** (5) 1048-1051.
- Ito, M., Yoshioka, M. (1999): Regression of the hyaloid vessels and pupillary membrane of the mouse. *Anat. Embryol.* **200** 403-411.
- Iurlaro M, Scatena M, Zhu WH, Fogel E, Wieting SL, Nicosia RF. (2003): Rat aorta-derived mural precursor cells express the Tie2 receptor and respond directly to stimulation by angiopoietins. *J Cell Sci.* **116** (17) 3635-3643.
- Jack, R.L. (1972): Regression of the hyaloid vascular system. An ultrastructural analysis. *Am. J. Ophthalmol.* **74** 261-272.
- Joukov, V., Pajusola, K., Kaipainen, A., Chilov, D., Lahtinen, I., Kukk, E., Saksela, O., Kalkkinen, N. und Alitalo, K. (1996): A novel vascular endothelium growth factor, VEGF-C,

is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO Journal* **15**, 290-98.

Joussen, A.M., Poulaki, V., Tsujikawa, A., Qin, W., Qaum, T., Xu, Q., Moromizato, Y., Bursell, S.E., Wiegand, S.J., Rudge, J., Loffe, E., Yancopoulos, G.D., Adamis, A.P. (2002): Suppression of Diabetic Retinopathy with Angiopoietin-1. *American Journal of Pathology* **160** 1683-1693.

Kadonaga, J.T., Courey, A.J., Ladika, J., Tjian, R. (1988): Distinct regions of Sp 1 modulate DNA binding and transcriptional activation. *Science* **242** 1566-1570.

Kador PF, Akagi Y, Terubayashi H, Wyman M, Kinoshita JH. (1988): Prevention of pericyte ghost formation in retinal capillaries of galactose-fed dogs by aldose reductase inhibitors. *Arch Ophthalmol.* **106** (8) 1099-1102.

Kern TS, Engerman RL. (1996): A mouse model of diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol.* **114** (8) 986-890.

Kido, M., Rich, K.A., Yang, G., Barron, E., Kohn, D.B., al-Ubaidi, M.R., Blanks, J.C. and Lang, G. (1996): Use of a retroviral Vector with an internal opsin promoter to direct gene expression to retinal photoreceptor cells. *Curr. Eye Research* **15** (8) 833-844.

Kim I, Kim JH, Ryu YS, Liu M, Koh GY. (2000): Tumor necrosis factor-alpha upregulates angiopoietin-2 in human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **16** 269 (2) 361-5.

Kim, I., Kim, J.H., Ryu, Y.S., Jung, S.H., Nah, J.J., Koh, G.Y. (2000): Characterization and Expression of a Novel Alternatively Spliced Human Angiopoietin-2. *The Journal of Biological Chemistry* **275** (24) 18550-18556.

Klein, R., Klein, B.E., Moss, S.E., Davis, M.D., DeMets, D.L. (1984): The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. *Arch. Ophthalmol.* **102** 520-532.

Koblizek, T.I., Weiss, C., Yancopoulos, G.D., Deutsch, U. und Risau, W. (1998): Angiopoietin-1 induces sprouting angiogenesis *in vitro*. *Current Biology* **8**, 529-32.

Kolm-Litty, V., Sauer, U., Nerlich, A., Lehmann, R., Schleicher, E.D. (1998): High glucose induced transforming growth factor beta 1 production is mediated by the hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. *J. Clin. Invest.* **101** 160-169.

Kowluru RA, Tang J, Kern TS. (2001): Abnormalities of retinal metabolism in diabetes and experimental galactosemia. VII. Effect of long-term administration of antioxidants on the development of retinopathy. *Diabetes* **50** (8) 1938-1942.

Koya, D., King, G.L. (1998): Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes* **47** 859-866.

Krikun, G., Schatz, F., Finlay, T., Kadener, S., Mesia, A., Gerrets, R., Lockwood, C.J. (2000): Expression of Angiopoietin-2 by Human Endometrial Endothelial Cells: Regulation by

Hypoxia and Inflammation. *Biochemical and Biophysical Research Communication* **275** 159-163.

Kukk, E., Lymboussaki, A., Taira, S., Kaipainen, A., Jeltsch, M., Joukov, V., Alitalo, K. (1996): VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development* **122** 3829-3837.

Kwak, H.J., So, J.N., Lee, S.J., Kim, I., Koh, G.Y. (1999): Angiopoietin-1 is an apoptosis survival factor for endothelial cells. *FEBS Letters* **448** 249-253.

Li W, Yanoff M, Liu X, Ye X. (1997): Retinal capillary pericyte apoptosis in early human diabetic retinopathy. *Chin Med J (Engl)* **110** (9) 659-663.

Lindahl, P., Johansson, B.R., Leveen, P., Betsholtz, C. (1997): Pericyte Loss and Microaneurysm Formation in PDGF-B-Deficient Mice. *Science* **277** 242-245.

Lobov, I.B., Brooks, P.C., Lang, R.A. (2002): Angiopoietin-2 displays VEGF-dependent modulation of capillary structure and endothelial cell survival in vivo. *PNAS* **99** 11205-11210.

Lu, M. et al. (1998): Advanced glycation end products increase retinal vascular endothelium growth factor expression. *J. Clinical Investigation* **101** 1219-1224.

Maisonpierre, P.C., Suri, C., Jones, P.F., Bartunkova, S., Wiegand, S.J., Radziejewski, C., Compton, D., McClain, J. Aldrich, T.H., Papadopoulos, N., Daly, T.J., Davis, S., Sato, T.N. und Yancopoulos, G.D. (1997): Angiopoietin-2, a natural antagonist for *Tie-2* that disrupts *in vivo* angiogenesis. *Science* **277**, 55-60.

Marron, M.B., Hughes, D.P., Edge, M.D., Forder, C.L., Brindle, N.P.J. (2000): Evidence for Heterotypic Interaction between the Receptor Tyrosine Kinases TIE-1 and TIE-2. *Journal of Biological Chemistry* **275** 39741-39746.

Master, Z., Jones, N., Tran, J., Jones, J., Kerbel, R.S., Dumont, D.J. (2001): Dok-R plays a pivotal role in angiopoietin-1-dependent cell migration through recruitment and activation of Pak. *EMBO Journal* **20** 5919-5928.

Mezquita J, Mezquita P, Montserrat P, Mezquita B, Francone V, Vilagrasa X, Mezquita C (2000): Genomic structure and alternative splicing of chicken angiopoietin-2. *Biochem Biophys Res Commun.* **275** (2) 643-651.

Midena E, Segato T, Radin S, di Giorgio G, Meneghini F, Piermarocchi S, Belloni AS. (1989): Studies on the retina of the diabetic db/db mouse. I. Endothelial cell-pericyte ratio. *Ophthalmic Res.* **21** (2) 106-111.

Miyazato, M., Fukuda, M., Iwamasa, T. (1991): Growth characteristics of retinal capillary endothelial cells compared with pulmonary vein endothelial cells in culture. *Acta Pathologica Japonica* **41** 133-142.

Millauer, B., Wizigmann-Voos, S., Schnürch, H., Martinez, R., MØller, N.P.H., Risau, W. und Ullrich, A. (1993): High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* **72**, 835-846.

- Moss, S.E., Klein, R., Klein, B.E. (1988): The incidence of vision loss in adiabetic population. *Ophthalmology* **95** 1340-1348.
- Mudhar, H.S., Pollok, R.A., Wang, C., Stiles, C.D., Richardson, W.D. (1993): PDGF and ist receptors in the developing rodent retina and optic nerve. *Development* **118** 539-552.
- Nehls, V., Denzer, K., Drenckhahn, D. (1992): Pericyte involvement in capillary sprouting during angiogenesis in situ. *Cell Tissue Res.* **270** 469-474.
- Nehls, V., Drenckhahn, D. (1991): Heterogeneity of microvascular pericytes for smooth muscle type alpha-actin. *Journal of Cell Biology* **113** 147-154.
- Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S. und Poltorak, Z. (1999): Vascular endothelial growth factor (VEGF) and ist receptors. *FASEB Journal* **13**, 9-22.
- Nikosia, R.F., Villaschi, S. (1995): Rat aortic smooth muscle cells become pericytes during angiogenesis in vitro. *Lab. Invest.* **73** 658-666.
- Nishikawa, T. et al. (2000): Normalising mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* **404** 787-790.
- Nourhaghighi N, Teichert-Kuliszewska K, Davis J, Stewart DJ, Nag S. (2003): Altered expression of angiopoietins during blood-brain barrier breakdown and angiogenesis. *Lab Invest.* **83** (8) 1211-1222.
- O'Leary, D.D. und Wilkinson, D.G. (1999): Eph receptors and ephrins in neural development. *Current Opinion in Neurobiology* **9** 65-73.
- Oh, H., Takagi, H., Suzuma, K., Otani, A., Matsumuta, M., Honda, Y. (1999): Hypoxia and vascular endothelial growth factor selectively upregulate angiopoietin-2 in bovine microvascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **274** 15732-15739.
- Ohno-Matsui, K., Hirose, A., Yamamoto, S., Saikia, J., Okamoto, Gehlbach, P., Duh, E.J., Hackett, S., Chang, M., Bok, D., Zack, D.J., Campochiaro, P.A. (2002): Inducible Expression of Vascular Endothelial Growth Faktor in Adult Mice Causes Severe Proliferative Retinopathy and Retinal Detachment. *American Journal of Pathology* **160** 711-719.
- Okamoto, N., Tobe, T., Hackett, S.F., Ozaki, H., Viores, M.A., LaRochelle, W., Zack, D.J., Campochiaro, P.A. (1997): Transgenic mice with increased expression of vascular endothelium growth factor in the retina: a new model of intraretinal and subretinal neovascularisation *Am. J. Pathology* **151** 281-291.
- Okamoto T, Yamagishi S, Inagaki Y, Amano S, Koga K, Abe R, Takeuchi M, Ohno S, Yoshimura A, Makita Z. (2002): Angiogenesis induced by advanced glycation end products and its prevention by cerivastatin. *FASEB J.* **16** (14) 1928-30.
- Orlidge, A. Dámore, P.A. (1987): Inhibition of capillary endothelial cell growth by pericytes and smooth muscle cells. *Journal of Cell Biology* **105** 1455-1462.

- Ozerdem, U., Monosov, E., Stallcup, W.B. (2002): NG2 Proteoglycan Expression by Pericytes in Pathological Microvasculature. *Microvascular Research* **63** 129-134.
- Park, Y.S., Kim, N.H., Jo, I. (2003): Hypoxia and vascular endothelial growth factor acutely up-regulate angiopoietin-1 and Tie-2 mRNA in bovine retinal pericytes. *Microvasc. Res.* **65** 125-31.
- Patan, S., Munn, L.L. und Jain, R.K. (1996): Intussusceptive microvascular growth in a human colon adenocarcinoma Xenograft-a novel mechanism of tumor-angiogenesis. *Microvascular Research* **51**, 260-72.
- Patan, S. (1998): TIE1 and TIE2 receptor tyrosin kinase inversely regulate embryonic angiogenesis by the mechanism of intussusceptive microvascular growth. *Microvascular Research* **56** 1-21
- Penn, J.S., Johnson, B.D. (1993): Fluorescein angiography as a means of assessing retinal vascular pathology in oxygen-exposed newborn rats. *Curr. Eye Res.* **12** (6) 561-70.
- Peters, K.G., Coogan, A., Berry, D., Marks, J., Iglehart, J.D., Kontos, C.D., Rao, P., Sankar, S. und Trogan, E. (1998): Expression Of *Tie-2*/TEK In Breast Tumor Vasculature Provides A New Marker For Evaluation Of Tumor Angiogenesis. *British Journal of Cancer* **77**, 51-56.
- Pierce, E.A., Avery, R.L., Foley, E.D., Aiello, L.P., Smith, L.E.H. (1995): Vascular endothelium growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularisation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92** 905-909.
- Portilla, D. et al. (2000): Etomoxir-induced PPAR alpha modulated enzymes protect during acute renal failure. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **278** F667-F675.
- Procopio, W.N., Pelavin, P.I., Lee, W.M.F., Yeilding, N.M. (1999): angiopoietin-1 and -2 Coiled Coil Domains Mediate Distinct Homo-oligomerization Patterns, but Fibrinogen-like Domains Mediate Ligand Activity. *J. Biological Chemistry* **274** 30196-30201.
- Puri, M.C., Rossant, J., Alitalo, K., Bernstein, A., Partanen, J. (1995): The receptor tyrosine kinase TIE is required for integrity and survival of vascular endothelial cells. *EMBO Journal* **14** 5884.
- Reese, A.B. (1949): Persistence and hyperplasia of primary vitreous, retrolental fibroplasia: two entities. *Arch. Ophthalmol.* **41** 527-552.
- Reese, A.B. (1955): Persistent hyperplastic primary vitreous. *Am- J. Ophthalmol.* **40** 317-331.
- Reusch, P., Barleon, B., Weindel, K., Martiny-Baron, G., Gödde, A., Siemeister, G., Marme, D. (2001): Identification of a soluble form of the angiopoietin receptor TIE-2 released from endothelial cells and present in human blood. *Angiogenesis* **4** 123-131.
- Risau, W. und Flamme, I. (1991): Vasculogenesis. *Annual Review of Cell & Developmental Biology* **11**, 73-91.
- Risau, W. (1997): Mechanisms of angiogenesis. *Nature* **386**, 671.

Romeo G, Liu WH, Asnaghi V, Kern TS, Lorenzi M. (2002): Activation of nuclear factor-kappaB induced by diabetes and high glucose regulates a proapoptotic program in retinal pericytes. *Diabetes* **51** (7) 2241-2248.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. und Erlich, H.A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-91.

Sato, Y., Rifkin, D.B. (1989): Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells: activation of a latent transforming growth faktor- $\beta$ 1-like moleküle by plasmin during co-culture. *Journal of Cell Biology* **109** 309-315.

Sato, T.N., Qin, Y., Kozak, C.A., Audus, K.L. (1993): Tie-1 and Tie-2 define another class of putative receptor tyrosine kinase genes expressed in early embryonic vascular system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** 9355-9358.

Sato, T.N., Tozawa, Y., Deutsch, U., Wolburg, B.K., Fujiwara, Y., Gendron, M.M., Gridley, T., Wolburg, H., Risau, W. und Qin, Y. (1995): Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature* **376**, 70-4.

Sato, H., Okada, Y., Seiki, M. (1997): Membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs) in cell invasion. *Thrombosis & Haemostasis* **78** (1) 497-500.

Schläger, T.M. (1998): Identifikation und Analyse genregulatorischer Elemente des endothelzellspezifischen Tie2-Gens sowie deren Anwendung zur Etablierung konditioneller Genexpressionssysteme in transgenen Mäusen. Phillips-Universität Marburg, pp. 147.

Schlessinger, J., Ullrich, A. (1992): Growth factor signaling by receptor tyrosin kinases. *Neuron* **9** 383-391.

Schor, A.M., Schor, S.L. (1986): The isolation and culture of endothelial cells and pericytes from the bovine retinal microvasculature: a comparative study with large vessel vascular cells. *Microvascular Research* **32** 21-38.

Schnürch, H. und Risau, W. (1993): Expression of Tie-2, a member of a novel family of receptor tyrosine kinases, in the endothelial cell lineage. *Development* **119**, 957-68.

Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T.P., Gerstenstein, M., Wu, X.F., Breitman, L. und Schuh, A.C. (1995): Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1 deficient mice. *Nature* **376**, 62-66.

Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D., Keshet, E. (1992): Vascular endothelium growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* **359** 843-845.

Sims, D.E. (1986): The pericyte-A review. *Tissue Cell* **18** 153-174.

Speiser, P., Gittelsohn, A.M., Patz, A. (1968): Studies on diabetic retinopathy. III Influence of diabetes on intramural pericytes. *Arch. Ophthalmol.* **80** 332-337.

Stalmans I, Ng YS, Rohan R, Fruttiger M, Bouche A, Yuce A, Fujisawa H, Hermans B, Shani M, Jansen S, Hicklin D, Anderson DJ, Gardiner T, Hammes HP, Moons L, Dewerchin M, Collen D, Carmeliet P, D'Amore PA. (2002): Arteriolar and venular patterning in retinas of mice selectively expressing VEGF isoforms. *J Clin Invest.* **109** (3) 327-336.

Stefani, F.H., Laszczyk, W.A. (1976): Vitreoretinal reactions and persistent hyaloid vessels. *Br. J. Ophthalmol.* **60** (12) 829-34.

Stitt, A.W. et al. (1997): Advanced glycation end products (AGEs) co-localize with AGE receptors in the retinal vasculature of diabetic and of AGE-infused rats. *Am. J. Pathol.* **150** 523-528.

Stratmann, A., Risau, W., Plate, K.H. (1998): Cell type-specific expression of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 suggests a role in glioblastoma angiogenesis. *Am. J. Pathol.* **153** 1459-1466.

Stoeltzing, O., Ahmad, S.A., Liu, W., McCarty, M.F., Wey, J.S., Parikh, A.A., Fan, F., Reinmuth, N., Kawaguchi, M., Bucana, C.D., Ellis, L.M. (2003): Angiopoietin-1 inhibits vascular permeability, angiogenesis, and growth of hepatic colon cancer tumors. *Cancer Res.* **63** 3370-7.

Stone, J., Itin, A., Alon, T., Pe'er, J., Gnessin, H., Chan-Ling, T., and Keshet, E. (1995). Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) ex-pression by neuroglia. *J. Neurosci.* **15**, 4738–4747.

Sundberg C, Ljungstrom M, Lindmark G, Gerdin B, Rubin K. (1993): Microvascular pericytes express platelet-derived growth factor-beta receptors in human healing wounds and colorectal adenocarcinoma. *Am J Pathol.* **143** (5), 1377-88.

Suri, C., Jones, P.F., Patan, S., Bartunkova, S., Maisonpierre, P.C., Davis, S., Sato, T.N. und Yancopoulos, G.D. (1996): Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the *Tie-2* receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* **87**, 1171-80.

Takagi, H., Koyama, S., Seike, H., Oh, H., Matsumura, M., Honda, Y. (2003): Potential role of the angiopoietin/tie2 system in ischämia-induced retinal neovascularisation. *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.* **44** 393-402.

Takahama, M., Tsutsumi, M., Tsujiuchi, T., Nezu, K., Kushibe, K., Taniguchi, S., Kotake, Y. und Konishi, Y. (1999): Enhanced expression of *Tie-2*, its ligand angiopoietin-1, vascular endothelial growth factor, and CD31 in human non-small cell lung carcinomas. *Clinical Cancer Research* **5**, 2506-10.

Teichert-Kuliszewska, K., Maisonpierre, P.C., Jones, N., Campbell, A.I.M., Master, Z., Bendeck, M.P., Alitalo, K., Dumont, D.J., Yancopoulos, G.D., Stewart, D.J. (2000): Biological action of angiopoietin-2 in a fibrin matrix model of angiogenesis is associated with activation of Tie2. *Cardiovascular Research* **49** 659-670.

- Terman, B.I., Doughter-Vermazen, M., Carrion, M.E., Dimitrov, D., Armellino, D.C., Gospodarowicz, D. und Bohlen, P. (1992): Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **187**, 1579-86.
- Thornalley, P.J. (1990): The glyoxalase system: new developments towards functional characterisation of a metabolic pathway fundamental to biological life. *Biochem. J.* **269** 1-11.
- Thurston, G., Suri, C., Smith, K., McClain, J., Sato, T.N., Yancopoulos, G.D., McDonald, D.M. (1999): Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science* **286** 2511-2515.
- Thurston, G., Rudge, J.S., Loffe, E., Zhou, H., Ross, L., Croll, S.D., Glazer, N., Holash, J., McDonald, D.M., Yancopoulos, G.D. (2000): Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nature Medicine* **6** 460-463.
- Tidhar, A., Reichenstein, M., Cohen, D., Faerman, A., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Shani, M. (2001): A novel Transgenic Marker for Migrating Limb Muscle Precursors and for Vascular Smooth Muscle Cells. *Developmental Dynamics* **220** (60-73)
- Tsiamis, A.C., Morris, P.N., Marron, M.B., Brindle, N.P.J. (2002): Vascular Endothelial Growth Factor Modulates the TIE-2:TIE-1 Receptor Complex. *Microvascular Research* **63** 149-158.
- Uemura, A., Ogawa, M., Hirashima, M., Fujiwara, T., Koyama, S., Takagi, H., Honda, Y., Wiegand, S.J., Yancopoulos, G., Nishikawa, S.I. (2002): Recombinant Angiopoietin-1 restores high-order architecture of growing blood vessels in mice in the absence of mural cells. *Journal of Clinical Investigation* **110** 1619-1628.
- UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. (1998): Intensive blood-glucose control with sulfonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes. (UKPDS 33). *Lancet* 352 837-853.
- Valenzuela, D.M., Griffiths, J.J., Rojas, J., Aldrich, T.H., Jones, P.F., Zhou, H., McClain, J., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Huang, T., Papadopoulos, N., Maisonpierre, P.C., Davis, S., Yancopoulos, G.D. (1999): Angiopoietins 3 and 4: Diverging gene counterparts in mice and humans. *PNAS* **96** 1904-1909.
- Valenzuela DM, Murphy AJ, Friendewey D, Gale NW, Economides AN, Auerbach W, Poueymirou WT, Adams NC, Rojas J, Yasenchak J, Chernomorski R, Boucher M, Elsasser AL, Esau L, Zheng J, Griffiths J, Wang X, Su H, Xue Y, Dominguez MG, Noguera I, Torres R, Macdonald LE, Stewart AF, DeChiara TM, Yancopoulos GD. (2003): High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis. *Nature Biotechnology* **21** (6) 652-659.
- Vecchi, M., Baulida, J., Carpenter, G. (1996): Selective cleavage of the heregulin receptor ErbB-4 by protein kinase C activation. *Journal of Biological Chemistry* **271** 18989-18995.
- Veikkola, T., Alitalo, K. (2002): Dual role of Angiopoietin-2 in postnatal angiogenesis and lymphangiogenesis. *Developmental Cell* **3** (3) 302-304.

- Von Schulte, W. (1914): Early stages of vasculogenesis in the cat (*Felis domestica*) with special reference to the mesenchymal origin of endothelium. *Anatomical Record* **8**, 78-80.
- Waltenberger, J., Claesson-Welsh, L., Siegbahn, A., Shibuya, M. und Heldin, C.H. (1994): Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 26988-95.
- Wang, H.U., Chen, Z.F. und Anderson, D.J. (1998): Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell* **93**, 741-53.
- Wells-Knecht, K.J. et al. (1995): Mechanism of autooxidative glycosylation: identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose. *Biochemistry* **34** 3702-3709.
- White, R.R., Shan, S., Rusconi, C.P., Shetty, G., Dewhirst, M.W., Kontos, C.D. and Sullenger, B.A. (2003): Inhibition of rat corneal angiogenesis by a nuclease-resistant RNA aptamer specific for angiopoietin-2. *PNAS* **100** (9), 5028-5033.
- Williamson, J.R. et al. (1993): Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes* **42** 801-813.
- Wong, A.L., Haroon, Z.A., Werner, S., Dewhirst, M.W., Greenberg, C.S. und Peters, K.G. (1997): *Tie-2*, expression and phosphorylation in angiogenic and quiescent adult tissues. *Circulation Research* **81**, 567-74.
- Yabkowitz, R., Meyer, S., Black, T. et al. (1999): Inflammatory cytokines and vascular endothelium growth factor stimulate the release of soluble tie receptor from human endothelial cells via metalloprotease activation. *Blood* **93** 1969-1979.
- Yamagishi, S.S., Amano, S., Inagaki, Y., Okamoto, T., Koga, K., Sasaki, N., Yamamoto, H., Takeuchi, M., Makita, Z. (2002): Advanced glycation end products-induced apoptosis and overexpression of vascular endothelial growth factor in bovine retinal pericytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **290** 973-978.
- Yuan, H.T., Yang, S.P., Woolf, A.S. (2000): Hypoxia up-regulates angiopoietin-2, a Tie-2 ligand, in mouse mesangial cells. *Kidney International* **58** 1912-1919.
- Zhang, L., Yang, N., Park, J.W., Katsaros, D., Fracchioli, S., Cao, G., O'Brien-Jenkins, A., Rubin, S.C., Coukos, G. (2003): Tumor derived vascular endothelial growth factor up-regulates angiopoietin-2 in host endothelium and destabilizes host vasculature, supporting angiogenesis in ovarian cancer. *Cancer Res.* **63** 3403-12.

## 7. Anhang

### 7.1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AS	Aminosäuren
βME	2-Mercaptoethanol
Bp	Basenpaare
BES bzw.	N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure beziehungsweise
ca.	circa
DAG	1,2-Diacylglycerin
d.h.	das heißt
DNS / DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	Desoxy-(Adenosin-Thymosin/Guanosin/Cytidin-) triphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
E13	Embryonaler Tag 13
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
FSH	Follikel Stimulierendes Hormon
g	Gramm
h	Stunde(n)
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	Doppelt destilliertes Wasser
hCG	Human Chorionic Gonadotropin
i.v.	Intra-venös
kB	Kilobasenpaare
kDa	10 <sup>3</sup> Dalton
Lsg.	Lösung
LH	Luteinisierendes Hormon
m	Meter
MetOH	Methanol
min	Minute(n)
mRNA	Botenribonukleinsäure

OD <sub>N</sub>	Optische Dichte bei N nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAS	<i>Periodsäure-Schiff</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Para-Formaldehyd
PMS	Pregnant Mare's Serum
r	Radius
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
RT-PCR	Reverse Transkriptase- PCR
s.a.	siehe auch
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SV40	<i>simian vacuolating virus 40</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
ss	einzelsträngig
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris/Borat/EDTA-Puffer
TE	Tris/EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
TESPA	3-Aminopropyltrimethyloxysilan
TG	Transgen
TIE	<i>tyrosine kinase with immunoglobuline- and epidermal growth factor homology domains</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Umdrehungen
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolett
ÜN	über Nacht (12-16 h)
VEGF	Vasculoendothelialer Wachstumsfaktor
WT	Wildtyp
xg	-fache Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galaktosid
z.B.	zum Beispiel

## 7.2 Bildnachweis

Alle in dieser Arbeit gezeigten Abbildungen stammen, wenn nicht anders in der Bildunterschrift erwähnt, vom Autor.

## 7.3 Basenabfolge des rekombinanten „Ops/hAng-2“-Konstrukts (2820Bp)

**Fettdruck:** Sequenz des humanen Angiopoietin-2, 1810 Bp, 496 AS. Verwendete Primer zur Genotypisierung sind unterstrichen.

```

5'
GTCGACGGTA   TCGATAAGCT   TGATATCGAA   TTCCTGCAGC   CCGGGGGATC
TGTC AAGTGA   GCCATTGTCA   GGGCTTGGGG   ACTGGATAAG   TCAGGGGGGTC
TCCTGGGAAG   AGATGGGATA   GGTGAGTTCA   GGAGGAGACA   TTGTCAACTG
GAGCCATTGT   GGAGAAAGTGA   ATTTAGGGCC   CAAGGGTTCC   AGTCGCAGCC
TGAGGCCACC   AGACTGACAT   GGGGAGGAAT   TCCCAGAGGA   CTCTGGGGCA
GACAAGATGA   GACACCCTTT   CCTTCTTTA   CCTAAGGGCC   TCCACCCGAT
GTCACCTTGG   CCCCTCTGCA   AGCCAATTAG   GCCCCGGTGG   CAGCAGTGGG
ATTAGCGTTA   GTATGATATC   TCGCGGATGC   TGAATCAGCC   TCTGGCTTAG
GGAGAGAAGG   TCACTTTATA   AGGGTCTGGG   GGGGGTCAGT   GCCTGGAGTT
GCGCTGTGGG   AGCCGTCAGT   GGCTGAGCTC   GCCAAGCAGC   CTTGGTCTCT

GTCTACGAAG   AGCCCGTGGG   GCAGCCTCGA   GGAACTGAAA   AACCAGAAAG
TTAACTGGTA   AGTTTAGTCT   TTTTGTCTTT   TATTTAGGT   CCCGGATCCG
GTGGTGGTGC   AAATCAAAGA   ACTGCTCCTC   AGTGGATGTT   GCCTTACTT
CTAGGCCGTGT   ACGGAAGTGT   TACTTCTGCT   CTAAAAGCTG   CGGAATTGTA
CCC GCGGCCG   GGGGATCGGG   ACTCTGGACG   TGTGTTTGCC   CTCAAGTTG
CTAAGCTGCT   GGTTTATTAC   TGAAGAAAGA   ATGTGGCAGA   TTGTTTTCTT
TACTCTGAGC   TGTGATCTTG   TCTTGGCCGC   AGCCTATAAC   AACTTTCGGA
AGAGCATGGA   CAGCATAGGA   AAGAAGCAAT   ATCAGGTCCA   GCATGGGTCC
TGCAGCTACA   CTTTCTCCT   GCCAGAGATG   GACAAC TGCC   GCTCTTCTC
CAGCCCCTAC   GTGTCCAATG   CTGTGCAGAG   GGACGCGCCG   CTCGAATACG

ATGACTCGGT   GCAGAGGCTG   CAAGTGCTGG   AGAACATCAT   GGAAAACAAC
ACTCAGTGGC   TAATGAAGCT   TGAGAATTAT   ATCCAGGACA   ACATGAAGAA
AGAAATGGTA   GAGATACAGC   AGAATGCAGT   ACAGAACCAG   ACGGCTGTGA
TGATAGAAAT   AGGGACAAAC   CTGTTGAACC   AAACAGCTGA   GCAAACGCGG
AAGTTAACTG   ATGTGGAAGC   CCAAGTATTA   AATCAGACCA   CGAGACTTGA
ACTTCAGCTC   TTGGAACACT   CCCTCTCGAC   AAACAAATTG   GAAAAACAGA
TTTTGGACCA   GACCAGTGAA   ATAAACAAAT   TGCAAGATAA   GAACAGTTTC
CTAGAAAAGA   AGGTGCTAGC   TATGGAAGAC   AAGCACATCA   TCCAACTACA
GTCAATAAAA   GAAGAGAAAG   ATCAGCTACA   GGTGTTAGTA   TCCAAGCAAA
ATCCATCAT   TGAAGA ACTA   GAAAAAAAAA   TAGTGACTGC   CACGGTGAAT

AATTCAGTTC   TTCAAAGCA   GCAACATGAT   CTCATGGAGA   CAGTTAATAA
CTTACTGACT   ATGATGTCCA   CATCAA ACTC   AGCTAAGGAC   CCCACTGTTG
CTAAAGAAGA   ACAAATCAGC   TTCAGAGACT   GTGCTGAAGT   ATTC AAATCA
GGACACACCA   CAAATGGCAT   CTACACGTTA   ACATTCCCTA   ATTCTACAGA
AGAGATCAAG   GCCTACTGTG   ACATGGAAGC   TGGAGGAGGC   GGGTGGACAA
TTATTCAGCG   ACGTGAGGAT   GGCAGCGTTG   ATTTTCAGAG   GACTTGGAAA
GAATATAAAG   TGGGATTTGG   TAACCCTTCA   GGAGAATATT   GGCTGGGAAA
TGAGTTTGTG   TCGCAACTGA   CTAATCAGCA   ACGCTATGTG   CTTAAAATAC
ACCTTAAAGA   CTGGGAAGGG   AATGAGGCTT   ACTCATTGTA   TGAACATTTT
TATCTCTCAA   GTGAAGAACT   CAATTATAGG   ATTCACCTTA   AAGGACTTAC

AGGGACAGCC   GGCAAATAA   GCAGCATCAG   CCAACCAGGA   AATGATTTTA
GCACAAAGGA   TGGAGACAAC   GACAAATGTA   TTTGCAAATG   TTCACAAATG

```

CTAACAGGAG	GCTGGTGGTT	TGATGCATGT	GGTCCTTCCA	ACTTGAACGG
AATGTACTAT	CCACAGAGGC	AGAACACAAA	TAAGTTCAAC	GGCATTAAAT
GGTACTACTG	GAAAGGCTCA	GGCTATTCGC	TCAAGGCCAC	AACCATGATG
ATCCGACCAG	CAGATTTCTA	AACATCCCAG	TCCACCTGAG	GAACTGTCTC
GAACTATTTT	CAAAGACTTA	AGCCCAGTGC	ACTGAAAGTC	ACGGCTGCGC
ACTGTGTCCT	CTTCCACCAC	AGAGGGCGTG	TGCTCGGTGC	TGACGGGACC
CACATGCTCC	AGATTAGAGC	CTGTAAACTT	TATCACTTAA	ACTTGCATCA
CTTAACGGAC	CAAAGCAAGA	CCCTAAACAT	CCATAATTGT	GATTAGACAG
AACACCTATG	CAAAGATGAA	CCCGATCCAC	TAGTTCTAGA	GCTCTGATCA
CTGAGGGTCA	TGAAGTGCCG	CCGCTTCGGG	GAGGCCAGCT	GTGCCTTCTA
GTTGCCAGCC	ATCTGTTGTT	TGCCCTCCC	CCGTGCCTTC	CTTGACCCTG
GAAGGTGCCA	CTCCCCTGT	CCTTTCCTAA	TAAAATGAGG	AAATTGCATC
GCATTGTCTG	AGTAGGTGTC	ATTCTATTCT	GGGGGTGGG	GTGGGGCAGG
ACAGCAAGGG	GGAGGATTGG	GAAGACAATA	GCAGGCATGC	TGGGGATGCG
GTGGGCTCTA	TGGNCTCGAG	3`		

## 7.4 Lebenslauf

Von Patrick Wagner, geboren am 29.04.1974 in Friedberg/ Hessen

- 1981-1984:** Besuch der „Grundschule am Solgraben“ in Bad Nauheim
- 1984-1993:** Besuch des „Ernst-Ludwig-Gymnasiums“ in Bad Nauheim  
Abschluss: Abitur
- Juli 1993 – Juni 1994:** Grundwehrdienst in der Bundesmarine
- Oktober 1994 – März 2000:** Studium der Biologie an der Justus-Liebig-Universität-Gießen. Abschluss: Diplom-Biologe
- Seit Oktober 1998 :** Studium der Medizin an der Justus-Liebig-Universität-Gießen und an der Technischen Universität Dresden.

## 7.5 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Clauss danke ich für die Betreuung meiner Promotion für den Fachbereich Biologie. Die Arbeit wurde am Biochemischen Institut des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen in Zusammenarbeit mit dem Max-Planck-Institut Bad Nauheim und der Universität Mannheim angefertigt. Herrn Prof. Dr. Klaus Theo Preissner danke ich daher für die Betreuung meiner Dissertation für den Fachbereich Medizin. Für die freundliche Betreuung in der Abteilung für Molekulare Zellbiologie am Max-Planck-Institut Bad Nauheim danke ich Herrn Dr. Urban Deutsch. Weiterhin wäre ohne die nette Einweisung in die Methodik der enzymatischen Digestion durch Prof. Dr. Hans-Peter Hammes und Dr. Jihong Lin diese Arbeit nicht durchzuführen gewesen. Ali Jüce ist für die hilfreiche Unterstützung bei der Auswertung der Digestionen ein Dank auszusprechen. Für die freundlichen Hinweise bei den intravitrealen Injektionen danke ich Herrn PD Dr. Krzizok. Herrn Dr. Felix Müller-Holtkamp danke ich für die Injektion der DNA zur Gewinnung transgener Ops/hAng-2 Mäuse. Für das Korrekturlesen der Arbeit danke ich Regina Heidenreich und Evelyn Zerbe.

Allen weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppen in Gießen, Bad Nauheim und Mannheim sei Dank für die nette Arbeitsatmosphäre und produktive Kooperation in den letzten Jahren. Der größte Dank gilt jedoch meiner Familie, die mir diese Ausbildung erst ermöglicht hat.

## 7.6 Publikationen und Postervorträge

Auszüge aus der vorliegenden Arbeit wurden in folgendem Fachartikel veröffentlicht und im Rahmen verschiedener Symposien vorgestellt:

### Veröffentlichte Fachartikel:

Hammes, H.P., Lin, J., Wagner, P., Feng, Y., vom Hagen, F., Krzizok, T., Renner, O., Breier, G., Brownlee, M., Deutsch, U. (2004): Angiotensin-2 causes pericyte dropout in the normal retina: evidence for involvement in diabetic retinopathy. *Diabetes* **53** (4) 1104-1110.

Eine weitere Veröffentlichung ist in Vorbereitung.

### Postervorträge:

Wagner, P., Feng, Y., Rink, N., Hoffmann, S., Deutsch, U. und Hammes, H.P.: Regulation of retinal pericytes by Angiotensin-2 studies in new animal models. 2<sup>nd</sup> Int. Symposium of the German Priority Research Program SPP1069: Angiogenesis – Molecular Mechanisms and Functional Interactions. Kloster Seeon (2002).

Wagner, P., Feng, Y., Lin, J., Rink, N., Hoffmann, S., Hammes, H.P. and Deutsch, U.: Angiotensin-2 causes pericyte dropout in the retinal capillary network and leads to an increased number of acellular capillaries. 1<sup>st</sup> Young Scientist Meeting of the German Priority Research Program SPP1069, Günzburg, Germany (2003).

## 7.7 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Patrick Wagner, geboren am 29.04.1974 in Friedberg/Hessen, daß ich die Arbeit mit dem Titel „Analyse der Wirkung von Angiopoietin-2 auf das Gefäßsystem der Netzhaut in verschiedenen Tiermodellen“ unter Betreuung von Prof. Dr. Klaus Theo Preissner (Biochemisches Institut/ FB Medizin/ JLU-Gießen) in Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für physiologische und klinische Forschung in Bad Nauheim mit Unterstützung von Dr. Urban Deutsch ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Die Betreuung für den Fachbereich Biologie der Justus-Liebig-Universität Gießen ist durch Herrn Prof. Dr. Wolfgang Clauss erfolgt.

Bad Nauheim, den 01.06.2004

Patrick Wagner