

III. Medizinische Klinik und Poliklinik
und Biochemisches Institut
Justus-Liebig-Universität Gießen

**Vasoobliteration und Neovaskularisation
bei diabetischer Retinopathie**

Pathogenetische und therapeutische Untersuchungen *in vitro* und *in vivo*

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades im Fachbereich
"Agrarwissenschaften, Ökötrophologie und Umweltmanagement"
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von
Dipl. oec. troph. Jennifer Hoffmann
aus Recklinghausen

Gießen 2004

Mitglieder der Prüfungskommission:

Vorsitzende:	Prof. Dr. I. Hoffmann
1. Gutachter:	Prof. Dr. med. H.-P. Hammes
2. Gutachter:	Prof. Dr. C. Kunz
3. Gutachter und	
Prüfer:	Prof. Dr. K.T. Preissner
Prüferin:	Prof. Dr. K. Becker-Brandenburg

Tag der mündlichen Prüfung: 7.7.2005

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
TABELLENVERZEICHNIS	VII
ABKÜRZUNGEN	IX
1 EINLEITUNG	1
1.1 Die diabetische Retinopathie	1
1.2 Molekulare Mechanismen des Diabetes	5
1.2.1 Physiologische Glukoseregulation	5
1.2.2 Konsequenzen eines akuten Insulinmangels	6
1.2.3 Auswirkungen der Hyperglykämie auf die Gefäße der Retina	6
1.2.3.1 Generierung von oxidativem Stress infolge der Hyperglykämie	11
1.2.3.2 Polyol-Weg	12
1.2.3.3 Proteinkinase C-Aktivierung	13
1.2.3.4 AGE-Bildung	14
1.2.4 Ursachen des retinalen Perizytenverlusts	18
1.3 Therapie der diabetischen Retinopathie	21
1.3.1 Konventionelle Therapie	21
1.3.2 Neue Forschungsansätze	21
1.4 Fragestellung	25
1.4.1 Tenilsetam	28
1.4.2 Perizyten	29
1.4.2.1 Morphologie	29
1.4.2.2 Funktion	30
1.5 Zielsetzung	34

2	MATERIAL UND METHODEN	35
2.1	Material	35
2.1.1	Geräte und Software	35
2.1.2	Verbrauchsmaterial	35
2.1.3	Chemikalien und Lösungen	36
2.1.4	Chemokine und Wachstumsfaktoren	38
2.1.5	Enzyme	38
2.1.6	Antikörper	38
2.1.7	Kits	39
2.2	Methoden	40
2.2.1	Grundlagen der Zellkultur	40
2.2.1.1	Kryokonservierung von Zellen	40
2.2.1.2	Auftauen der Zellen	41
2.2.1.3	Passagieren von Zellen	41
2.2.1.4	Einsatz von Tenilsetam	41
2.2.2	Funktionelle Tests	42
2.2.2.1	Proliferation	42
2.2.2.2	DNA-Synthese	42
2.2.2.3	Apoptose	43
2.2.2.4	Adhäsion	44
2.2.2.5	Migration	45
2.2.2.6	ELISA zur Bestimmung der Adhäsionsproteine	46
2.2.2.7	Sprouting	47
2.2.3	Versuche mit XlacZ- und C57BL/6-Mäusen	49
2.2.3.1	Haltung der Tiere	49
2.2.3.2	Bestimmung der retinalen Perizytdichte bei der XlacZ-Maus	49
2.2.3.3	Darstellung des Gefäßnetzes nach erfolgter X-gal Färbung	51
2.2.3.4	ROP-Modell mit C57BL/6-Mäusen	52
2.2.4	Western Blot-Analyse von Retinalysaten	55
2.2.4.1	Probenaufbereitung	55
2.2.4.2	Proteinbestimmung	56
2.2.4.3	Herstellung der Polyacrylamidgele	57
2.2.4.4	Elektrophorese	57

2.2.4.5	Tank-Blotting	58
2.2.4.6	Protein-Nachweis	59
2.2.5	Statistik	60
3	ERGEBNISSE	62
3.1	Projekt I: Beeinflussung der Endothelzellfunktion durch Tenilsetam	62
3.1.1	Tenilsetam verändert die Morphologie von HUVECs und hemmt deren Proliferation	62
3.1.2	Tenilsetam induziert weder Apoptose noch Nekrose von HUVECs	69
3.1.3	Hohe Tenilsetam-Konzentrationen nehmen Einfluss auf das Adhäsionsverhalten von HUVECs	72
3.1.4	Hohe Tenilsetam-Konzentrationen fördern die Migration von HUVECs	76
3.1.5	Tenilsetam beeinflusst die Expression von ICAM-1, aber nicht die von VCAM-1 und E-Selektin bei HUVECs	79
3.1.6	Tenilsetam fördert das Aussprossen von BRECs	82
3.2	Projekt II: Rolle der retinalen Perizyten in der physiologischen Angiogenese	85
3.2.1	Rekrutierung von Perizyten und vaskulären Glattmuskelzellen entlang der retinalen Gefäße	85
3.2.2	Das tiefe Kapillarnetz der Maus entsteht 8 Tage nach der Geburt	87
3.2.3	Die Morphologie der Perizyten verändert sich während der Gefäßreifung	89
3.2.4	Die Zahl der Perizyten steigt von p7 auf p8 sprunghaft an	90
3.2.5	Die Hyperoxie-induzierte Gefäßregression in der Retina ist nur bis zum 7. Tag nach der Geburt möglich	92
3.2.6	Immundetektion von Wachstumsfaktoren und Rezeptoren, die an der Angiogenese beteiligt sind	96
3.2.6.1	VEGF-A und flk-1	96
3.2.6.2	PDGF-B und PDGF-R β	98
3.2.6.3	Angiopietin-1/-2 und Tie2	99
3.2.6.4	Ephrin B1 und B2	101
4	DISKUSSION	104
4.1	Effekt von Tenilsetam auf Endothelzellen	104
4.1.1	Einfluss von Tenilsetam auf die Zellproliferation von HUVECs	104

4.1.2	Einfluss von Tenilsetam auf das Adhäsions- und Migrationsverhalten von HUVECs	105
4.1.3	Einfluss von Tenilsetam auf die IL-1 β -induzierte Expression von Adhäsionsmolekülen bei HUVECs	108
4.1.4	Einfluss von Tenilsetam auf das Sprouten mikrovaskulärer BRECs	109
4.1.5	Grundsätzliche Überlegungen zum Einsatz und Wirkmechanismus von Tenilsetam	111
4.1.6	Ist der Einsatz von Tenilsetam zu Therapie Zwecken vorstellbar?	112
4.2	Die Bedeutung perivaskulärer Zellen für retinale Kapillaren	114
4.2.1	Rekrutierung von Perizyten und vSMC während der physiologischen Angiogenese	114
4.2.2	Perizyten und die Entwicklung des tiefen Kapillargeflechts	116
4.2.3	Gefäßreifung und die Hyperoxie-induzierte Gefäßregression	118
4.2.4	Beteiligung von Wachstumsfaktoren während der Angiogenese prozesse	120
4.2.4.1	VEGF-A	121
4.2.4.2	PDGF-B	124
4.2.4.3	Angiopoietin-1 und -2	127
4.2.4.4	Ephrin Bs	131
4.2.4.5	Einfluss weiterer Wachstumsfaktoren	132
4.2.4.6	Beteiligung von Wachstumsfaktoren: Zusammenfassung	134
4.2.5	Die Bedeutung retinaler Perizyten für die Kapillarstabilität: Schlussbetrachtung	135
5	ZUSAMMENFASSUNG	138
6	SUMMARY	142
7	ANHANG	146
7.1	Tabellarische Zusammenfassung der Daten von Projekt I	146
7.2	Tabellarische Zusammenfassung der Daten von Projekt II	153
8	LITERATURVERZEICHNIS	155

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1:	Stadieneinteilung der proliferativen Retinopathie	3
Abb. 2:	Querschnitt durch die Netzhaut und die angrenzenden Schichten nach (Lütjen-Drecoll und Rohen, 1997).	7
Abb. 3:	Pathobiochemie des diabetischen Endothelschadens	10
Abb. 4:	Mechanismus der AGE-Bildung in der "Maillard-Reaktion"	15
Abb. 5:	Ergebnis der quantitativen Retinamorphometrie Streptozotocin-diabetischer Wistar-Ratten nach 9-monatiger Behandlung mit Tenilsetam	26
Abb. 6:	Strukturformel des AGE-Inhibitors Tenilsetam	28
Abb. 7:	Schematischer Querschnitt durch eine Kapillare	30
Abb. 8:	Schematische Darstellung von Angiogeneseprozessen in der Retina	31
Abb. 9:	Schematische Darstellung von Angiogeneseprozessen in der Retina	33
Abb. 10:	Zeitverlauf des ROP-Modells (A) und des modifizierten ROP-Modells (B)	53
Abb. 11:	Änderung der Morphologie von HUVECs durch Tenilsetam	62
Abb. 12:	Zellzahl von HUVECs nach 24-stündiger Behandlung mit Tenilsetam	63
Abb. 13:	Morphologie von HUVECs nach 4-tägiger Behandlung mit Tenilsetam	64
Abb. 14:	Zellzahlbestimmung bei HUVECs	65
Abb. 15:	Hemmung der Zellproliferation durch Tenilsetam	66
Abb. 16:	Hemmung der DNA-Synthese von HUVECs durch 24-stündige Behandlung mit Tenilsetam.	68
Abb. 17:	Apoptoserate von HUVECs unter Tenilsetam-Einfluss mit und ohne Apoptose-Induktion durch Staurosporin oder BSA-Beschichtung	69
Abb. 18:	Prozentsatz nekrotischer Zelltrümmer in An- und Abwesenheit von Tenilsetam sowie mit und ohne Apoptose-Induktion durch Staurosporin oder BSA-Beschichtung	71
Abb. 19:	Apoptose- und Nekroserate von HUVECs unter dem Einfluss von Tenilsetam, bzw. Staurosporin sowie nach Kultivierung auf BSA-beschichteten Wells	72
Abb. 20:	Adhäsion von HUVECs auf BSA-, FCS- bzw. Gelatine-beschichteten Wells in Anwesenheit von Tenilsetam	73
Abb. 21:	Adhäsion von HUVECs auf BSA- bzw. FCS-beschichteten Wells nach 24-stündiger Vorbehandlung mit Tenilsetam	75
Abb. 22:	Migrationsverhalten von HUVECs in Anwesenheit von Tenilsetam	76
Abb. 23:	Migrationsverhalten von HUVECs nach 24-stündiger Vorbehandlung mit Tenilsetam	77
Abb. 24:	Migrationsverhalten von HUVECs nach 24-stündiger Vorbehandlung mit Tenilsetam	78

Abb. 25:	Einfluss von Tenilsetam auf die Expression von ICAM-1 nach Il-1 β -Stimulation bei HUVECs	79
Abb. 26:	Einfluss von Tenilsetam auf die Expression von VCAM-1 nach Il-1 β -Stimulation bei HUVECs	80
Abb. 27:	Einfluss von Tenilsetam auf die Expression von E-Selektin nach Il-1 β -Stimulation bei HUVECs	81
Abb. 28:	Einfluss von Tenilsetam auf das Aussprossen von BRECs mit und ohne Stimulation durch bFGF	83
Abb. 29:	Rekrutierung und Migration von vSMC und Perizyten entlang der GefäÙe in der retinalen Ganglienzellschicht bei XlacZ-Mäusen	86
Abb. 30:	Lokalisation der Perizyten an den Kapillaren	87
Abb. 31:	Darstellung der retinalen GefäÙe der Ganglienzellschicht und der Inneren Körnerschicht bei 7-, 8-, bzw. 26-Tage alten XlacZ-Mäusen	88
Abb. 32:	Morphologie von Perizyten während der Entwicklung des retinalen GefäÙsystems von Tag p7 bis p12 bei der XlacZ-Maus	89
Abb. 33:	Vergleichende Darstellung retinaler Perizyten der XlacZ-Maus in der X-gal-Färbung und der kombinierten X-gal- und Lectin-Färbung	90
Abb. 34:	Quantifizierung des Perizytenbesatzes in Retinakapillaren von XlacZ-Mäusen von p7 bis p12 und an p26	91
Abb. 35:	Qualitative Darstellung von GefäÙregression und Neovaskularisation nach ROP-Modell an Tag 17	92
Abb. 36:	Vergleichende qualitative Darstellung von GefäÙregression und Neovaskularisation nach ROP-Modell bei unterschiedlich alten C57BL/6-Mäusen (p17, p18, p21 und p22); zentrale Ansicht, Region um den <i>Nervus opticus</i>	93
Abb. 37:	Histologischer Schnitt durch die Retinae von C57BL/6-Mäusen nach ROP-Modell	94
Abb. 38:	Quantifizierung der retinalen Neovaskularisationen nach ROP-Modell bei C57BL/6-Mäusen	95
Abb. 39:	Expression von VEGF-A in Retinae von 7, 8 und 26 Tage alten XlacZ-Mäusen	97
Abb. 40:	Expression von flk-1 in Retinae von C57BL/6-Mäusen	98
Abb. 41:	Expression von PDGF-B und PDGF-R β in Retinae von 7, 8 und 26 Tage alten XlacZ-Mäusen	99
Abb. 42:	Expression von Ang-1 und Ang-2 in Retinae von C57BL/6-Mäusen	100
Abb. 43:	Expression von Tie-2 in Retinae von C57BL/6-Mäusen	101
Abb. 44:	Expression von Ephrin B1 in Retinae von C57BL/6-Mäusen	102
Abb. 45:	Expression von Ephrin B2 in Retinae von C57BL/6-Mäusen	103

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1:	Stadieneinteilung bei diabetischer Retinopathie	2
Tab. 2:	Color Markers von Sigma	58
Tab. 3:	Paarweise Vergleiche (LSD-Test) zu Abb. 12	63
Tab. 4:	Paarweise Vergleiche (LSD-Test) zu Abb. 15	66
Tab. 5:	Paarweise Vergleiche (LSD-Test) zu Abb. 16	68
Tab. 6:	Paarweise Vergleiche (LSD-Test) der Adhäsion auf BSA-Beschichtung zu Abb. 21	75
Tab. 7:	Paarweise Vergleiche (LSD-Test) zu Abb. 23	77
Tab. 8:	Paarweise Vergleiche (nach Sidak) zu Abb. 28	83
Tab. 9:	Paarweise Vergleiche (Tukey-HSD) zu Abb. 34	91
Tab. 10:	Paarweise Vergleiche (Tukey-HSD) zu Abb. 38	95
Tab. 11:	Zellzahlbestimmung bei HUVECs nach 24-stündiger Tenilsetam-Behandlung, Angaben in Prozent zur unbehandelten Kontrolle	146
Tab. 12:	Zellzahlbestimmung bei HUVECs nach 48-stündiger Tenilsetam-Behandlung, Angaben in Prozent zur unbehandelten Kontrolle	146
Tab. 13:	Zellzahlbestimmung bei HUVECs nach 4-tägiger Tenilsetam-Behandlung, Angaben in Prozent zur unbehandelten Kontrolle	146
Tab. 14:	Zellzahlbestimmung bei HUVECs nach 6-tägiger Tenilsetam-Behandlung, Angaben in Prozent zur unbehandelten Kontrolle	147
Tab. 15:	Proliferationsversuch mit HUVECs über einen Zeitraum von 48 Stunden unter Einfluss von (a) 0.2 %, bzw. (b) 10 % FCS und Tenilsetam, Angaben in Prozent zur unbehandelten Kontrolle	147
Tab. 16:	DNA-Synthese bei HUVECs unter Einfluss von Tenilsetam in (b) An-, bzw. (a) Abwesenheit von 20 ng/ml VEGF, Angaben in Prozent zur unbehandelten Kontrolle	147
Tab. 17:	Prozentsatz (a) apoptotischer und (b) nekrotischer HUVECs in An- und Abwesenheit von Tenilsetam	148
Tab. 18:	Adhäsion von HUVECs auf (a) BSA-, (b) FCS- und (c) Gelatine-beschichteten Wells in An- und Abwesenheit von Tenilsetam (ohne Präinkubation), Angaben in Prozent zur unbehandelten Kontrolle	148
Tab. 19:	Adhäsion von HUVECs auf (a) BSA- und (b) FCS-beschichteten Wells in An- und Abwesenheit von Tenilsetam (nach 4-stündiger Präinkubation), Angaben in Prozent zur unbehandelten Kontrolle	149
Tab. 20:	Adhäsion von HUVECs auf (a) BSA-, (b) FCS- und (c) Gelatine-beschichteten Wells in An- und Abwesenheit von Tenilsetam (nach 24-stündiger Präinkubation), Angaben in Prozent zur unbehandelten Kontrolle	149

Tab. 21:	Migration von HUVECs in An- und Abwesenheit von Tenilsetam (ohne Präinkubation), mit oder ohne Stimulation durch VEGF und bFGF [20 ng/ml], Angaben in Prozent zur unbehandelten Kontrolle	150
Tab. 22:	Migration von HUVECs nach 24-stündiger Präinkubation mit Tenilsetam, mit oder ohne Stimulation durch VEGF [20 ng/ml], Angaben in Prozent zur unbehandelten Kontrolle	150
Tab. 23:	Migration von HUVECs nach 24-stündiger Präinkubation mit Tenilsetam, mit oder ohne Stimulation durch VEGF und bFGF [20 ng/ml], Angaben in Prozent zur unbehandelten Kontrolle	150
Tab. 24:	ICAM-1-Expression von HUVECs unter Einfluss von Tenilsetam	151
Tab. 25:	VCAM-1-Expression von HUVECs unter Einfluss von Tenilsetam	151
Tab. 26:	E-Selectin-Expression von HUVECs unter Einfluss von Tenilsetam	152
Tab. 27:	Sprouten von BRECs in An- und Abwesenheit von Tenilsetam, basal (ohne Stimulus) oder über bFGF [2 ng/ml] induziert, Angaben in Prozent zur bFGF-behandelten Kontrolle	152
Tab. 28:	Perizytdichte bei XlacZ-Mäusen (zu Abb. 35)	153
Tab. 29:	Quantifizierung der reaktiven Neovaskularisation nach ROP-Modell bei C57BL/6-Mäusen (zu Abb. 38)	153
Tab. 30:	Densitometrische Auswertung von Western Blot-Analysen gegen VEGF und flk-1 (zu Abb. 39 und 40)	153
Tab. 31:	Densitometrische Auswertung von Western Blot-Analysen gegen PDGF-B und PDGF-R β (zu Abb. 41)	154
Tab. 32:	Densitometrische Auswertung von Western Blot-Analysen gegen Angiopoietin-1 und -2, sowie gegen Tie-2 (zu Abb. 42 und 43)	154
Tab. 33:	Densitometrische Auswertung von Western Blot-Analysen gegen Ephrin B1 und B2 (zu Abb. 44 und 45)	154

ABKÜRZUNGEN

ABTS	<i>2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazolinesulfonate(6)] diammonium salt</i>
ADAM	<i>A Disintegrin And Metalloprotease</i> (Desintegrin-Metalloprotease)
AGE	<i>Advanced Glycation Endproduct</i> (Glykierungsendprodukte)
Ang	Angiopoietin
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AZK	Azelluläre Kapillaren
bFGF	<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Rinderserumalbumin)
BRB	<i>Blood-Retinal Barrier</i> (Blut-Retina-Schranke)
BREC	<i>Bovine Retinal Endothelial Cells</i> (bovine Retinaendothelzellen)
BrdU	5-Bromo-2'-deoxyuridin
d	Tage
Da	Dalton
DCCT	<i>Diabetes Control and Complication Trial</i>
ddH ₂ O	doppelt-deionisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
EBE	Essigsäurebutylester
ECGS	<i>Endothelial Cell Growth Supplement</i> (Wachstumszusatz für Endothelzellen)
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> (fötales Kälberserum)
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
flk-1	<i>fetal liver kinase-1</i>
flt-1	<i>fms-like tyrosine kinase-1</i>
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung (9.81 m/s ²)
GSH	Glutathion

h	Stunde(n)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i> (Peroxidase aus Meerrettich)
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i> (Humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen)
ICAM	<i>Intercellular Adhesion Molecule</i>
IgG	Immunglobulin G
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IL-1	Interleukin-1
kDa	Kilo-Dalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LSD	<i>Least Square Difference</i>
M	Konzentration [mol/l]
mA	Milli-Ampère
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MC	<i>Microcarrier</i>
min	Minute(n)
ml	Milliliter
MMP	Matrixmetalloprotease
NF- κ B	<i>Nuclear Factor-κB</i>
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
OD ₄₀₅	Optische Dichte bei 405 nm
p7	postnatal (Tag 7 nach der Geburt)
PAS	<i>Periodic Acid Schiff</i> (Perjodsäure = Schiff'sches Reagenz)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PEDF	<i>Pigment Epithelium Derived Factor</i>
PI-3-K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PIGF	<i>Placental Growth Factor</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur

RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i>
RAGE	<i>Receptor for Advanced Glycation Endproducts</i>
sec	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TEMED	N, N, N',N'-Tetramethylethyldiamin
TF	<i>Tissue Factor</i>
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
Tie	<i>Tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	t-Octylphenoxypolyethoxyethanol
U	Unit, Einheit der Enzymaktivität (μmol Umsatz/min)
UKPDS	<i>United Kingdom Prospective Diabetes Study</i>
V	Volt
v/v	Volumen zu Volumen
VCAM	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
vSMC	<i>vascular Smooth Muscle Cell</i> (vaskuläre Glattmuskelzelle)
w/v	Gewicht zu Volumen
w/w	Gewicht zu Gewicht
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-beta-D-galactopyranosid

1 Einleitung

1.1 Die diabetische Retinopathie

Die Retinopathie ist die häufigste mikrovaskuläre Komplikation des Diabetes. Obwohl sie zum diabetischen Spätsyndrom zählt, zeigen sich meist schon früh während der Erkrankung Veränderungen im Augenhintergrund, die zunächst symptomlos bleiben, aber mit der Zeit kontinuierlich zunehmen. Studien zeigen, dass nach 5-jähriger Diabetesdauer 67 % aller Patienten mit Typ 1-Diabetes (Malone, 2001) und ca. 36 % der Patienten mit Typ 2-Diabetes eine Retinopathie haben (UKPDS, 1998a). Nach 15-20 Jahren kommt sie bei ca. 95 % aller Typ 1-Diabetiker und 50-80 % der Typ 2-Diabetiker vor (Klein, 1984b, a).

Die diabetische Retinopathie ist gekennzeichnet durch fortschreitende Veränderungen kleinster Gefäße innerhalb der Netzhaut. Unterschieden werden zwei Stadien: das frühe, nicht-proliferative und das späte, proliferative Stadium.

Die erste klinische Veränderung des nicht-proliferativen Stadiums ist die Ausbildung von kapillären Mikroaneurysmen (Kohner, 1982). Im Schnitt erscheinen diese 4-7 Jahre nach der Diagnose des Typ 1-Diabetes, bei der Diagnose des Typ 2-Diabetes sind sie bei einem Drittel der Patienten bereits vorhanden (Klein, 1984b, a). Auf histologischer Ebene geht der Entstehung von Mikroaneurysmen ein Verlust an den Zellen voraus, die den Endothelzellen der Kapillaren von außen aufliegen: den Perizyten. Dieser initiale Perizytenverlust ist ein charakteristisches Merkmal der diabetischen Retinopathie (Cogan, 1961). Die Ausprägung der Erkrankung wird zu diesem Zeitpunkt noch als "mild" beschrieben. Die weitere Zunahme an Mikroaneurysmen und die Präsenz perlschnurartiger Venen sowie einzelner intraretinaler Blutungen kennzeichnen den Übergang in das "mäßige" Stadium. Der in diesem Stadium beobachtete Anstieg der vaskulären Permeabilität und die damit verbundene Leckage von Plasmabestandteilen in den Extrazellularraum ist mit verantwortlich für die Ausbildung von Ödemen und die Verdickung der Basalmembran.

Die nicht-proliferative Retinopathie wird als "schwer" klassifiziert, sobald zahlreiche Mikroaneurysmen und Hämorrhagien in allen vier Quadranten der Retina,

"perlschnurartige Venen" in zwei Quadranten oder intraretinale, mikrovaskuläre Anomalien (IRMA) in einem Quadranten zu finden sind (Tab. 1). Auch die Anwesenheit von weichen, hell erscheinenden Exsudaten (Infarkte der Nervenschicht) und harten, gelblich aussehenden Exsudaten (Ablagerung von Lipiden in der äußeren Retinaschicht) weist auf eine Verschlechterung des Zustandes hin (Klein, 1984b, a).

Die Summe dieser Veränderungen führt letztlich zum Kapillarverschluss, woraufhin ganze Netzhautareale minderdurchblutet werden. In histologischen Präparaten beobachtet man eine vermehrte Anwesenheit von "azellulären Kapillaren", womit Basalmembranlayer gemeint sind, die weder Perizyten noch Endothelzellen beherbergen. Sie sind nicht länger perfundiert, wodurch das umgebene Gewebe nicht ausreichend mit Sauerstoff versorgt wird (Bresnick, 1976). Die dort vorherrschende Hypoxie ist die treibende Kraft für die Neubildung von Gefäßen (Patz, 1982; Manschot und Lee, 1985), was das Stadium der proliferativen Retinopathie kennzeichnet. Zunächst findet diese Neubildung von Gefäßen innerhalb der Netzhaut statt, später jedoch durchbrechen die Gefäße auch die innere Grenzmembran und breiten sich präretinal aus.

Tab. 1: Stadieneinteilung bei diabetischer Retinopathie

Stadium	Klinisches Bild
Nicht-proliferativ*	
Mild	Mikroaneurysmen
Mäßig	Mikroaneurysmen einzelne intraretinale Blutungen perlschnurartige Venen
Schwer	„4-2-1“-Regel: Zahlreiche Mikroaneurysmen und intraretinale Blutungen in 4 Quadranten oder perlschnurartige Venen in 2 Quadranten oder intraretinale mikrovaskuläre Anomalien (IRMA) in 1 Quadranten
Proliferativ**	
A	Papillenproliferation und papillenferne Proliferation mit/ohne präretinalen Blutungen
B	Umschriebene traktive Netzhautablösungen
C	Traktionsbedingte Netzhautablösung bei der die Makula mit einbezogen ist
*	Einteilung nach den Leitlinien der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG) (Hammes, 2000)
**	Stadienbeschreibung nach Prof. Dr. P. Kroll (Kroll, 1987)

Da die Glaskörpergrenzschicht normalerweise dicht an der Retina anliegt, wächst ein Teil der neugebildeten Gefäße auch in den Glaskörper hinein. Aus noch ungeklärter Ursache kann es zu einer Schrumpfung des Glaskörpers kommen. Die eingewachsenen Gefäße üben so einen Zug auf die Retina aus, wodurch diese an einigen Stellen abgehoben wird. Teilweise reißen die labilen Gefäße und es kommt zu Blutungen in den Glaskörper. Einsprossende Bindegewebszellen können durch Matrixsynthese Membranen bilden, die durch Traktion ebenfalls zur Netzhautablösung beitragen. Diese Vorgänge erklären, warum das Risiko einer Erblindung bei Diabetikern im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung fünfmal höher liegt (Standl und Maurer, 1997; Trautner, 1997).

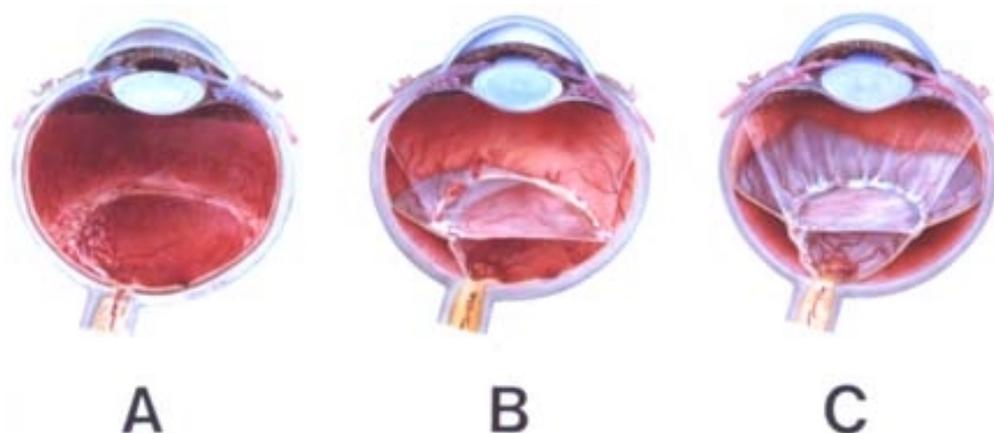


Abb. 1: Stadieneinteilung der proliferativen Retinopathie

A) Neovaskularisationen an der Papille oder in papillenfernen Regionen, B) umschriebene traktive Netzhautablösung, C) schwere traktive Netzhautablösung. Abbildung entnommen aus: (Hesse, 2002)

Die pathogenetischen Mechanismen, die zu Gefäßverschluss und Gefäßneubildung in der Retina führen, sind nicht in allen Einzelheiten bekannt. Da die der Erkrankung zugrunde liegende biochemische Störung die chronische Hyperglykämie ist, ist es naheliegend, die veränderte Stoffwechselsituation beim Diabetes genauer zu untersuchen, um den Ursachen der Gefäßschädigung auf den Grund zu gehen. Dass ein Zusammenhang zwischen Hyperglykämie und der Entstehung von mikrovaskulären Komplikationen besteht, wurde inzwischen in Studien bestätigt (DCCT, 1993; UKPDS, 1998a).

Um relevante Therapieansätze zu finden, ist jedoch eine genaue Aufschlüsselung der Abfolge und der jeweiligen Konsequenzen dieser biochemischen und zellbiologischen Störungen von Nöten. In diesem Sinne gibt die vorliegende Arbeit zunächst einen kurzen

Überblick über die allgemeine Stoffwechselsituation beim Diabetes, um dann konkret auf die Bedeutung dieser Situation für die mikrovaskulären Blutgefäße der Retina einzugehen. Es wird vorgestellt, welche Mechanismen ursächlich an der Schädigung der vaskulären Zellen beteiligt sein können, wie die diabetische Retinopathie zur Zeit behandelt wird, wo neue Ansatzpunkte liegen und in welchen Bereichen diese Arbeit einen Beitrag dazu leistet.

1.2 Molekulare Mechanismen des Diabetes

Ein absoluter oder relativer Mangel des Hormons Insulin ist der Grund für die Stoffwechselerkrankung Diabetes mellitus. Die Ursachen des Insulinmangels sind beim Typ 1- und Typ 2-Diabetes verschieden: Ersterer wird auch IDDM (*Insulin-Dependent Diabetes Mellitus*) genannt, da aufgrund einer Autoimmunreaktion oder Virusinfektion die β -Zellen des Pankreas zerstört werden und diese nicht mehr in der Lage sind, Insulin zu produzieren. Da der Typ 2-Diabetiker lange kein Insulin benötigt, wurde diese Form des Diabetes auch als NIDDM (*Non Insulin-Dependent Diabetes Mellitus*) bezeichnet. Im Gegensatz zum Typ 1-Diabetes geht dieser, auch als Altersdiabetes bezeichnete Typ, auf eine gestörte Insulinsekretion und/oder eine Insulinresistenz in Folge eines Rezeptor- oder Postrezeptor-Defekts zurück (Löffler, 1997).

1.2.1 Physiologische Glukoseregulation

Insulin ist in hohem Maße an der Aufrechterhaltung der Glukosehomöostase beteiligt. Vor allem das Gehirn und die Retina sind auf eine gesicherte Glukosezufuhr angewiesen, da sie als neuronales Gewebe nur geringe Vorräte an Glykogen und Fett aufweisen (Lund_Andersen, 1979; Takata, 1997). Damit der kontinuierliche Energiebedarf des Gehirns gewährleistet ist, muss die Blutglukosekonzentration zwischen 50 und 140 mg/dl gehalten werden. Zu niedrige Glukosekonzentrationen beeinträchtigen die Funktionen des zentralen Nervensystems, zu hohe Konzentrationen im Blut schädigen vor allem die Gefäße (siehe Kapitel 1.2.4).

Die Normoglykämie wird hauptsächlich dadurch gewährleistet, dass die Glukose nach einer Mahlzeit insulinabhängig in Muskulatur und Fettgewebe befördert wird und die Leber zudem große Mengen an Glukose aus dem Blut aufnimmt und in Form von Glykogen speichert. In der Postresorptionsphase kann die Leber das Glykogen wieder aufspalten und Glukose freisetzen. Zudem hat sie die Fähigkeit zur Glukoneogenese, was vor allem während einer länger andauernden Nahrungskarenz von großer Bedeutung ist. Dank dieser Mechanismen gelingt es dem Körper meist seinen Blutglukosespiegel innerhalb der verträglichen Grenzen zu halten (DeFronzo, 1988).

Die Sekretion von Insulin wird normalerweise durch Veränderungen des Blutglukosespiegels reguliert: Die β -Zelle des Pankreas nimmt Glukose über den Glut 2-

Transporter auf, schleust sie in die Glykolyse ein und produziert auf diese Weise ATP. Der Anstieg an ATP signalisiert der Zelle, dass eine Nahrungsaufnahme stattgefunden hat und der Bedarf an Insulin groß ist. Daraufhin wird das Hormon freigesetzt und bindet in Muskulatur und Fettgewebe an den Insulinrezeptor (Cook und Hales, 1984; Ashcroft und Ashcroft, 1990). Diese Bindung bewirkt die Translokation des intrazellulär gespeicherten Glut 4-Transporters in die Plasmamembran, was die Glukoseaufnahme um das 10- bis 30-fache beschleunigt (Rösen, 1999). Auch die Glykogensynthese in Muskel und Leber wird durch Insulin beschleunigt, da Insulin das geschwindigkeitsbestimmende Enzym – die Glykogensynthase – aktiviert. Im Fettgewebe wird zudem die Pyruvatdehydrogenase und die Acetyl-CoA-Carboxylase aktiviert, wodurch die Synthese von Fettsäuren aus Glukose stimuliert wird.

1.2.2 Konsequenzen eines akuten Insulinmangels

Ein akuter Insulinmangel beim Typ 1-Diabetes mellitus führt zu massiven Störungen im Energiehaushalt: In der Muskulatur ist die Glukoseaufnahme und -Oxidation verlangsamt, wodurch die Zellen anfangen den Glykogenspeicher abzubauen, um ihren Energiebedarf zu decken. Zudem wird die Proteolyse in Gang gesetzt, um die Leber mit glukogenen Aminosäuren zu versorgen.

Auch im Fettgewebe sind Glukoseaufnahme und -Oxidation vermindert, was zu einer deutlichen Hemmung der Lipogenese und Erhöhung der Lipolyse durch insulinantagonistische Hormone (Katecholamine und Glukagon) führt. Große Mengen an Fettsäuren und Glycerin werden dadurch freigesetzt und an das Blut abgegeben. In der Leber werden die anflutenden Fettsäuren zum einen in die β -Oxidation geschleust, zum anderen erneut für die Biosynthese von Triglyceriden, Phosphoglyceriden und Cholesterinestern herangezogen. Das in der β -Oxidation entstandene Acetyl-CoA wird dann entweder über den Citratcyclus weiter oxidiert oder in Ketonkörper umgewandelt. Die Glukose, welche die Leber aus dem Abbau der eigenen Glykogenspeicher und der Glukoneogenese aus Aminosäuren und Glycerin gewinnt, gibt sie an das Blut ab, was den Blutglukosespiegel weiter erhöht (Löffler, 1997).

1.2.3 Auswirkungen der Hyperglykämie auf die Gefäße der Retina

Während Muskel- und Fettzellen im diabetischen Organismus nicht ausreichend mit Glukose versorgt sind, da sie sich die Glukose insulinabhängig über den Glut 4-

Transporter in die Zellen holen, leiden die Endothelzellen der retinalen Kapillaren unter einem ganz anderen Problem: Sie besitzen den Glukosetransporter Glut 1, der Glukose insulin- und natriumunabhängig durch erleichterte Diffusion aufnimmt (Bell, 1990; Mueckler, 1994). Neben seiner charakteristischen Expression in Blut-Gewebe-Schranken, wie der Blut-Hirn- und der Blut-Retina-Schranke, wird er auch in Erythrozyten stark exprimiert (Harik, 1990; Takata, 1990).

Im Gegensatz zum Gehirn hat die Retina zwei Schranken: die innere und äußere Blut-Retina-Schranke (BRB, *blood-retinal barrier*). Die innere BRB wird durch die Endothelzellen der Kapillaren gebildet und ist in ihrer Struktur der Blut-Hirn-Schranke sehr ähnlich. Die retinalen Pigmentepithelzellen, die sich zwischen den Photorezeptoren und der Choroidea (Aderhaut) befinden, bilden die äußere BRB (Cunha_Vaz, 1976). Eine Übersicht über die Gefäße und Schichten der Retina gibt Abb. 2.

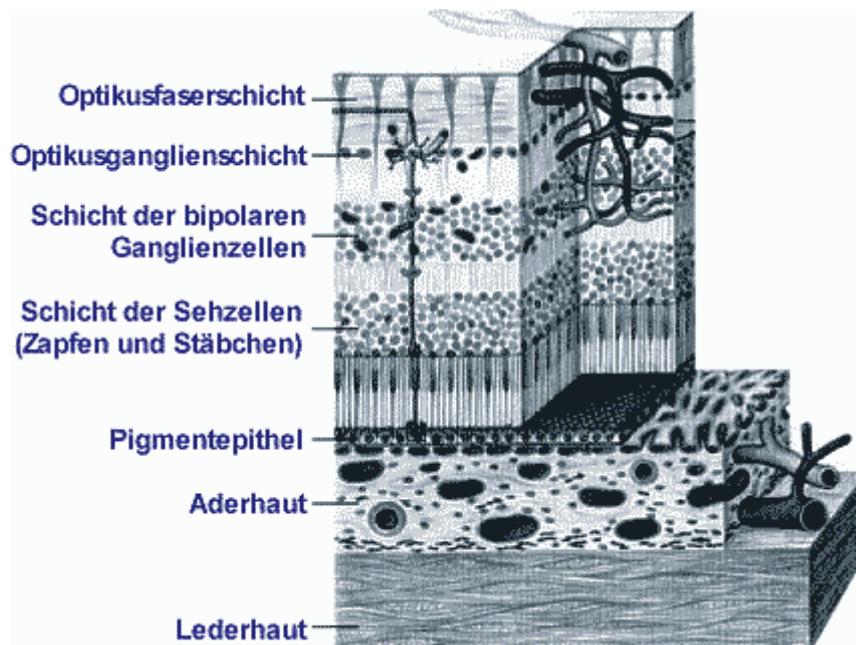


Abb. 2: Querschnitt durch die Netzhaut und die angrenzenden Schichten nach (Lütjen-Drecoll und Rohen, 1997).

In der humanen Retina und der Rattenretina wurde gezeigt, dass Glut 1 in den Endothelzellen der inneren BRB sowohl auf der luminalen wie auch auf der abluminalen Plasmamembran exprimiert ist, was eine wichtige Voraussetzung für den transzellulären Glukosetransport zur Versorgung des neuronalen Gewebes darstellt (Takata, 1992; Kumagai, 1996).

Wie die Endothelzellen des Gehirns nehmen die retinalen Endothelzellen mehr Glukose auf als sie verbrauchen, so dass ein großer intrazellulärer Pool an freier Glukose vorliegt (Betz und Goldstein, 1980). Berkowitz et al. zeigten mit Hilfe der NMR-Spektroskopie, dass die Glukoseaufnahme in der Retina von Kaninchen um das 16-fache höher lag als ihr Glukoseverbrauch (Berkowitz, 1995).

Bezüglich der Situation in der diabetischen Stoffwechsellage gibt es jedoch unterschiedliche Auffassungen: Je nach Arbeit zeigen die Ergebnisse, dass retinale Endothelzellen den Glut 1-Transporter unverändert stark, eher vermehrt oder sogar vermindert exprimieren:

So gibt es beispielsweise etliche *in vitro* Studien die zeigen, dass Endothelzellen den Glut 1-Transporter in Antwort auf bestimmte externe Stimuli deutlich stärker exprimieren: Zu diesen Stimuli zählen vor allem die Hypoxie (Takagi, 1998) und die vermehrte Expression von Wachstumsfaktoren wie VEGF (*vascular endothelial growth factor*) (Kumagai, 1996; Sone, 2000). Da viele Arbeiten zeigen, dass Hypoxie und VEGF-Expression nicht erst während des späten proliferativen Stadiums der diabetischen Retinopathie eine Rolle spielen (Pe'er, 1995; Luttj, 1996; Amin, 1997; Sone, 1997), könnten sie auf diesem Weg zur vermehrten Glukoseaufnahme in die diabetische, retinale Endothelzelle beitragen. Kumagai et al. fanden heraus, dass sich in der humanen, diabetischen Retina bis zu 20-mal mehr Glut 1 an der Plasmamembran befindet, als in nicht-diabetischen Patienten. Diese Hochregulation des Transporters in der inneren BRB war jedoch nicht gleichmäßig, sondern fokal über die Retina verteilt (Kumagai, 1996), eine Situation, die an die ebenfalls nicht gleichmäßig verteilten pathologischen Prozesse bei der diabetischen Retinopathie erinnert (Ferris, 1993; Vinos, 1993; Kern und Engerman, 1995).

Im Gegensatz dazu zeigten Versuche an diabetischen Ratten, dass die Glut 1-Expression in den Kapillaren der inneren BRB bereits nach zwei Wochen um ca. 50 % reduziert wurde, wohingegen die Expression in Kapillaren der äußeren BRB unverändert blieb (Badr, 2000). Die gleiche Arbeitsgruppe berichtete jedoch auch, dass die Konzentration an intrazellulärer Glukose – trotz der verminderten Glut 1-Expression – um das 3-fache stieg, so dass die reduzierte Glut 1-Expression dem Endothel offensichtlich keinen ausreichenden Schutz vor der Glukose-Akkumulation verschaffte (Tang, 2000). Auch die jüngste

Publikation dieser Arbeitsgruppe bestätigte die verminderte Glut 1-Expression in retinalen Kapillaren diabetischer Ratten, wobei sie – ebenfalls im Gegensatz zu Kumagai et al. – keinen Unterschied bezüglich der Verteilung des Glut 1 innerhalb der vier Quadranten der Retina fanden (Tang, 2003).

Die Ergebnisse dieser jüngeren Studien legen den Schluss nahe, dass der Glukosetransporter in Reaktion auf die diabetische Stoffwechsellage zwar vermindert exprimiert wird, in Folge der chronischen Hyperglykämie jedoch – relativ gesehen – mehr Glukose als unter Normoglykämie in die Endothelzelle gelangt, da dieser Prozess insulin-unabhängig abläuft.

Pathologisch gesehen treten die für die diabetische Retinopathie charakteristischen Schäden (Perizytenverlust, Mikroaneurysmen, Leckage von Plasmaproteinen, Gefäßverschluss und Gefäßneubildung) in den Kapillaren der inneren BRB auf (Ferris, 1993). Diese Schäden sind direkt mit der Hyperglykämie assoziiert: Zum einen ist das Ausmaß der Retinopathie direkt mit einer schlechten Blutzuckereinstellung korreliert (Klein, 1995), zum anderen zeigt sich, dass umgekehrt eine normnahe Blutzuckereinstellung das Fortschreiten der Erkrankung bei Typ 1-Diabetikern verlangsamen kann (DCCT, 1993).

Die genauen biochemischen und molekularen Mechanismen, die eine chronische Hyperglykämie in definierte, pathologische Schäden umwandeln, sind bislang noch nicht völlig entschlüsselt. Zur Zeit wird das Augenmerk vor allem auf die mögliche Rolle einiger Stoffwechselwege gelenkt, die bei Hyperglykämie vermehrt in der Endothelzelle ablaufen und hauptsächlich an der Gefäßschädigung beteiligt sein sollen (King und Brownlee, 1996; Nishikawa, 2000b; Brownlee, 2001; Hammes, 2003):

- Der Polyolweg (Gabbay, 1975; Lee und Chung, 1999)
- Die Aktivierung der Protein-Kinase C (PKC) über die Neusynthese von Diacylglycerol (DAG) (Koya und King, 1998)
- Die Bildung von Glykierungs-Endprodukten, so genannten AGEs (*advanced glycation endproducts*) (Brownlee, 1986; Hammes, 1991)

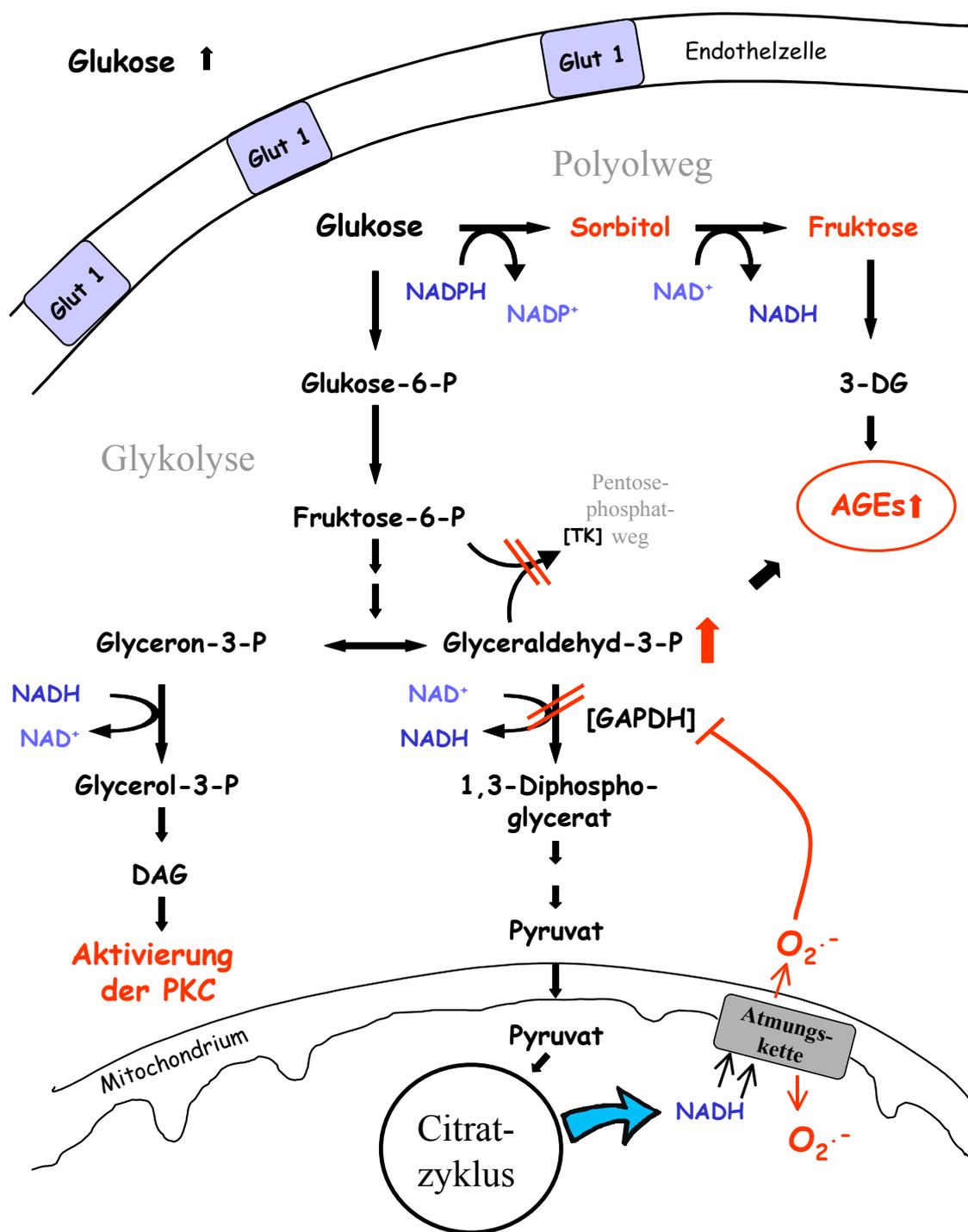


Abb. 3: Pathobiochemie des diabetischen Endothelschadens

Erhöhte Glukosespiegel führen intrazellulär zu oxidativem Stress, zur Aktivierung des Polyolwegs, zur Neusynthese von Diacylglycerol (DAG) und Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) sowie zu verstärkter AGE-Bildung (3-DG = 3-Deoxyglucoson). TK = Transketolase.

Einen Überblick über die Zusammenhänge gibt Abb. 3. Gemeinsamer Auslöser für die Aktivierung der aufgezählten Stoffwechselwege scheint die vermehrte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*) – insbesondere des Superoxidradikalanions ($O_2^{\bullet-}$) – zu sein, da dessen Inhibierung eine Aktivierung dieser

Stoffwechselwege verhindern kann (Baynes und Thorpe, 1999; Nishikawa, 2000b; Brownlee, 2001):

1.2.3.1 Generierung von oxidativem Stress infolge der Hyperglykämie

Als Folge der vermehrten Glukoseaufnahme läuft die Glykolyse in der Endothelzelle auf Hochtouren, wobei NADH und Pyruvat entstehen. Pyruvat wird in die Mitochondrien transportiert und in den Citratzyklus eingeschleust, in welchem neben CO₂ und H₂O weiteres NADH entsteht. Auch das zytosolische NADH kann über den Malat-Shuttle in die Mitochondrien gelangen, wo es in der Atmungskette zur ATP-Gewinnung beitragen kann. NADH wird hierfür zunächst von Komplex I (NADH:Ubiquinon-Oxidoreduktase) oxidiert. Die Protonen und Elektronen von NADH werden auf Ubiquinon übertragen und auf diesem Wege in die Elektronentransportkette befördert. Je höher das Glukoseangebot, desto stärker die NADH-Bildung und desto mehr Elektronen durchlaufen die mitochondriale Transportkette. Über Komplex IV (Cytochrom c-Oxidase) gelangen die Elektronen letztlich zum Sauerstoff, der dadurch reduziert wird, zwei Protonen bindet und in Wasser übergeht.

Während des Elektronentransports gibt es zwei Stellen, an denen das Superoxidradikalanion (O₂^{•-}) generiert wird: Zum einen an der NADH-Dehydrogenase in Komplex I (Turrens und Boveris, 1980; Wallace, 1992) und zum anderen an dem Berührungspunkt von Ubiquinon und Komplex III (Ubiquinol-Cytochrom c-Reduktase) (Turrens, 1985; Kwong und Sohal, 1998; Kowaltowski und Vercesi, 1999), wobei letzterer der zentrale Ort der O₂^{•-}-Generierung ist (Korshunov, 1997; Turrens, 1997; Nishikawa, 2000b). Je stärker der Metabolismus – und somit der Protonengradient, welcher die ATP-Synthase antreibt – desto höher ist die Produktion von O₂^{•-}, da sich bei hohem elektrochemischen Potenzial der Daseinszustand des Übergangsmoleküls Semiquinon-Anion im so genannten Q-Cyclus verlängert. Anscheinend gibt es bezüglich des elektrochemischen Potentials einen Schwellenwert, über welchem die Superoxid-Bildung deutlich erhöht ist (Korshunov, 1997).

Das Superoxidradikalanion inhibiert unter anderem das glykolytische Enzym Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH) (Knight, 1996; Du, 2000). Glyceraldehyd-3-Phosphat kann dementsprechend nicht zu 1,3-Diphosphoglycerat oxidiert werden, wodurch ein Rückstau der aufwärts gelegenen Metabolite erfolgt, die so vermehrt

in andere Stoffwechselwege "gedrückt" werden (Du, 2000; Brownlee, 2001). Diese Umlagerung an Stoffwechselwegen, führt zu einer gestörten Balance von Co-Enzymen und zur Bildung von Produkten, die negative Auswirkungen auf die Physiologie der Zelle haben.

Zu den aufwärts gelegenen Metaboliten gehört so auch die Glukose an sich, denn zum einen ist ihr "Abfluss" über die Glykolyse vermindert, zum anderen ist die intrazelluläre Glukosekonzentration durch den Diabetes erhöht. Erschwerend kommt hinzu, dass auch der "Abfluss" über den Pentosephosphat-Cyclus gestört ist, da Diabetiker in vaskulären Zellen ein Mangel an Thiamin – dem Vitamin, welches als Co-Enzym des geschwindigkeitsbestimmenden Enzyms Transketolase fungiert (Schenk, 1998) – aufweisen. Wodurch dieser Mangel hervorgerufen wird, ist noch nicht vollständig geklärt. Es wird zur Zeit vermutet, dass auch hier die verstärkte Präsenz von reaktiven Sauerstoffspezies die Ursache sein könnte, da diese in der Lage sind, das funktionstüchtige Thiamin zu dem biologisch unwirksamen Produkten Thiochrom und Oxodihydrothiochrom zu oxidieren (Hammes, 2003).

1.2.3.2 Polyol-Weg

In der Folge wird die aufgestaute Glukose vermehrt über den Polyol-Weg metabolisiert, wobei die Aldose-Reduktase den ersten Schritt – die Reduktion von Glukose zu dem Polyol Sorbitol – katalysiert. Das Enzym hat eine relativ niedrige Affinität zu Glukose, weshalb dieser Stoffwechselweg erst bei hohen intrazellulären Glukosekonzentrationen größere Bedeutung erlangt. In einem zweiten Schritt wird Sorbitol mit Hilfe der Sorbitoldehydrogenase unter Bildung von NADH zu Fruktose oxidiert (Abb. 3).

Die negativen Konsequenzen des Polyol-Wegs sind vielfältig: Zum einen akkumulieren Sorbitol und Fruktose in der Zelle, was zu osmotischem Stress führt und zur Kataraktenstehung beiträgt (Gabbay, 1975; Jedziniak, 1981; Barnett, 1986; Lee und Chung, 1999; Jiang, 2000). Zum anderen wird die verstärkte Bildung von zytosolischem NADH als zentrales Problem beschrieben, da durch den Anstieg der Reduktionsäquivalente das Redoxgleichgewicht der Zelle gestört wird ("hyperglykämische Pseudohypoxie") und NADH zudem Sauerstoffradikale generieren kann (Ellis, 1998; Obrosova, 1999; Zalba, 2000). Die Sauerstoffradikale beschleunigen die Bildung von AGEs und induzieren eine vermehrte Expression von Wachstumsfaktoren (wie z.B.

VEGF), unter anderem über die Aktivierung der PKC (Tilton, 1997; Oates und Mylari, 1999; Gupta, 2002; Mamputu und Renier, 2002; Tilton, 2002; Obrosova, 2003). NADH unterstützt zudem direkt die Bildung von DAG, da dessen Überschuss ebenfalls die Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase der Glykolyse hemmt, was einen Rückstau an Glyceraldehyd-3-Phosphat und dessen vermehrte Umwandlung zu Glyceron-3-Phosphat zur Folge hat. Weiterhin kann die gebildete Fruktose zu 3-Deoxyglucoson umgesetzt werden, ein reaktives Zwischenprodukt, welches sehr rasch Proteine glykiert und so ebenfalls zu einer vermehrten AGE-Bildung beiträgt (Hamada, 1996; Niwa, 1999). Zusätzlich führt der erhöhte Verbrauch von NADPH im ersten Schritt des Polyolwegs indirekt zu einem Anstieg von ROS, da NADPH zur Regeneration von reduziertem Glutathion (GSH) – einem biologischen Antioxidans – benötigt wird (Lee und Chung, 1999; Brownlee, 2001). Einige Autoren vermuten, dass in der Depletion von GSH der Hauptmechanismus der Polyol-Weg-induzierten Schädigungen zu sehen ist (Brownlee, 2001).

1.2.3.3 Proteinkinase C-Aktivierung

Die PKC gehört zu der Familie der Serin-Threonin-Kinasen. Es gibt von ihnen mindestens zwölf Isoformen, die teilweise gewebsspezifisch exprimiert werden. In ihrer inaktiven Form liegt sie als lösliches zytosolisches Protein vor. Die Aktivierung erfolgt in Anwesenheit von Calcium durch die Bindung an DAG, welches auf drei Wegen gebildet werden kann: entweder durch die Hydrolyse des Membranbestandteils Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphat, über die Neusynthese aus dem Glykolyse-Zwischenprodukt Dihydroxyaceton-3-Phosphat oder durch den Abbau von Phosphatidylcholin (Koya und King, 1998).

Der Mechanismus der hyperglykämieinduzierten PKC-Aktivierung ist noch nicht vollständig erforscht. Bekannt ist, dass die Hyperglykämie zu erhöhten Konzentrationen an zellulärem DAG führt, wodurch in vaskulären Zellen eine starke Aktivierung der PKC – besonders der PKC β -Isoformen – erfolgt (Lee, 1989b; Inoguchi, 1992; Xia, 1994; Koya und King, 1998). Wahrscheinlich trägt auch der oxidative Stress direkt zur PKC-Induktion bei (Taher, 1993; Bierhaus und Nawroth, 1999; Nishikawa, 2000a).

Die Folgen einer PKC-Aktivierung für das Gefäßsystem sind vielfältig, da sie u.a. Einfluss auf Zellmigration und -Wachstum, auf die Produktion extrazellulärer Matrix, die

Aktivierung der Prostaglandin-Synthese, die Modulation der vaskulären Permeabilität und die Expression verschiedener Zytokine nimmt (Lynch, 1990; King, 1996; Nagpala, 1996; Xia, 1996; Koya, 1997; Naruse und King, 2000; Park, 2000). Gerade die über die PKC bewirkte Induktion verschiedener Wachstumsfaktoren, wie z.B. VEGF oder TGF- β , kann in der Retina beträchtliche Folgen haben. VEGF wird hauptsächlich über Hypoxie induziert und ist postnatal normalerweise in nur geringen Konzentrationen in der Retina zu finden. Allerdings werden sowohl im frühen nicht-proliferativen Stadium der diabetischen Retinopathie (Lutty, 1996; Amin, 1997), wie auch im späten, proliferativen Stadium erhöhte VEGF-Konzentrationen im Auge gefunden (Adamis, 1994; Aiello, 1994), was durchaus eine Folge der Glukose-induzierten Aktivierung der PKC sein kann und eine erhöhte Gefäßpermeabilität bedingt (Ishii, 1996; Williams, 1997). Die Induktion von TGF- β hingegen führt zu einer verstärkten Produktion von Kollagen und Fibronectin und trägt so zur Verdickung der Basalmembran und dem Verschluss von Kapillaren bei (Craven, 1997; Studer, 1997; Brownlee, 2001).

1.2.3.4 AGE-Bildung

Ein weiterer Mechanismus, über den die Hyperglykämie Veränderungen von Struktur und Funktion des Gefäßsystems herbeiführen kann, ist die vermehrte Bildung von AGEs (Brownlee, 1988; Brownlee, 1994). AGEs werden historisch auch als "Maillard-Verbindungen" bezeichnet, da ihre Entstehung im Körper im Wesentlichen die gleichen Reaktionsschritte wie die Bräunung beim Brotbacken oder Kaffeerösten beinhaltet: Bereits 1912 beschrieb Louis Camille Maillard die nicht-enzymatische Bildung von braungefärbten, aromatisch riechenden Produkten aus einem Gemisch von Aminosäuren und Zuckern, die für einige Stunden auf 100°C erhitzt wurden (Maillard, 1912). Bei Körpertemperatur läuft die Bildung der Maillard-Produkte weitaus langsamer ab. Die Akkumulation von AGE-Proteinen ist Teil des normalen Alterungsprozesses (Araki, 1992; Horiuchi und Araki, 1994; Münch, 1997c; Brinkmann-Frye, 1998), wird aber durch die diabetische Stoffwechsellage stark beschleunigt (Makita, 1991).

Im ersten, reversiblen Schritt der nicht-enzymatischen Glykierung erfolgt die Bildung einer Schiff-Base durch die Addition einer reaktiven Carbonylgruppe an eine primäre Aminogruppe. Die Schiff-Base lagert sich in einem zweiten Schritt zu dem etwas stabileren Ketoamin, dem sog. Amadori-Produkt um. In den nächsten Schritten entsteht durch Dehydratation, Kondensation und Oxidation ein heterogenes Gemisch aus

proteingebundenen, irreversibel verknüpften Strukturen (Abb. 4), die Protease-resistent sind und unter dem Begriff AGEs zusammengefasst werden (Horiuchi, 1988; Fu, 1994; Shipanova, 1997). Diese Reaktion ist für alle Zucker mit freier Carbonylgruppe beschrieben und kann sowohl extra- als auch intrazellulär ablaufen.

Da die meisten intrazellulär vorkommenden Zucker sehr viel reaktiver als Glukose sind (Giardino, 1994), erfolgt die AGE-Bildung in der Zelle wesentlich schneller als außerhalb der Zelle. Gerade die Metabolite des Polyolstoffwechsels wie Fructose und Fructose-3-Phosphat (Hamada, 1996) oder Zuckerfragmentierungsprodukte wie Glyceron-3-Phosphat, Glyceraldehyd-3-Phosphat, 3-Deoxyglucoson, Glyoxal und Methylglyoxal (Hipkiss, 1995; Shipanova, 1997; Thornalley, 1999) reagieren sehr schnell mit primären Aminen von Proteinen, Phospholipiden und Nukleinsäuren (Bucala, 1984; Bucala, 1994; Baynes, 2002). Die geringe Reaktivität von Glukose mag der Grund sein, warum sie von der Evolution als universeller Energieträger ausgewählt wurde (Bunn und Higgins, 1981).

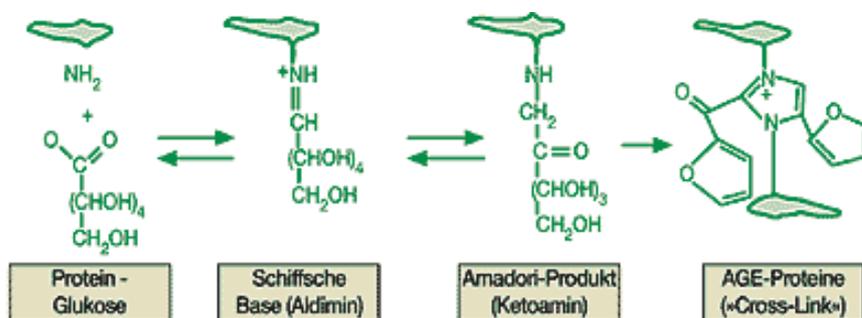


Abb. 4: Mechanismus der AGE-Bildung in der "Maillard-Reaktion"

Durch Kondensationsreaktionen von Glukose und anderen reduzierenden Zuckern mit Aminogruppen von Makromolekülen bilden sich zunächst Schiffsbasen, die zu Amadori-Produkten und letztendlich zu irreversibel quervernetzten AGE-Strukturen umgelagert werden. Abbildung entnommen aus: (Nawroth, 1999).

Die Auswirkungen der AGE-Bildung auf den Stoffwechsel sind vielfältig, da letztlich jede Glykierung eines Moleküls, wie z.B. eines Enzyms oder Zytokins dessen Funktion einschränken oder aufheben kann. Erst kürzlich wurde entdeckt, dass auch Insulin zu den verstärkt glykierten Proteinen bei Typ 2-Diabetikern zählt (Lindsay, 2003). In der Literatur gibt es zahllose Anhaltspunkte dafür, dass die Bildung von AGEs in der Pathogenese der diabetischen Mikroangiopathie einen hohen Stellenwert einnimmt (Brownlee, 1994, 2001).

Die Konsequenzen der AGE-Bildung können generell in drei Kategorien eingeteilt werden:

1. Schädigung des Gefäßsystems durch Glykierung extrazellulärer Proteine und Phospholipide
2. Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden durch Bindung extrazellulärer AGEs an RAGE (*Receptor for AGEs*)
3. Zellschädigung durch die direkte Glykierung intrazellulärer Proteine und Nukleinsäuren

Die extrazelluläre Glykierung von Membranbestandteilen führt unter anderem zum Verlust der Elastizität, zur Verdickung der Gefäßwand und zur Verengung des Gefäßlumens (Monnier, 1984; Brownlee, 1988), alles Merkmale, die in diabetischen Gefäßen häufig beobachtet werden. Zu den extrazellulär glykierten Blutbestandteilen zählt auch die Hämoglobinvariante HbA_{1c} (Koenig, 1977). Die Höhe des so genannten "HbA_{1c}-Wertes" korreliert gut mit der Höhe des Blutglukosespiegels, wodurch dessen Bestimmung bei Diabetikern einen Anhaltspunkt über die Blutzuckereinstellung der letzten Wochen gibt (Koenig, 1976).

Über die Bindung an spezifische Rezeptoren können extrazelluläre AGEs intrazelluläre Signalkaskaden in Gang setzen und die Zielzelle auf diesem Wege direkt aktivieren. Der diesbezüglich am besten untersuchte Rezeptor ist RAGE. Er wird von Endothelzellen, Monozyten/Makrophagen, T-Lymphozyten, Perizyten, glatten Muskelzellen, Mesangialzellen und Neuronen exprimiert (Brett, 1993; Schmidt, 1994). Eine Bindung von AGEs an RAGE führt intrazellulär zu oxidativem Stress (Bierhaus, 1997a), zur Aktivierung und Neusynthese des redoxsensitiven Transkriptionsfaktors NFκB (*nuclear factor κB*) und weiterhin zur vermehrten Expression NFκB-regulierter Zielgene. Zu Letzteren zählt neben dem prokoagulativen TF (*tissue factor*), ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) und VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) auch RAGE selbst, wodurch eine Amplifikation des Signals stattfindet (Schmidt, 1995; Vlassara, 1995; Bierhaus, 1997b; Basta, 2002; Boulanger, 2002).

AGEs induzieren jedoch nicht nur über die Bindung an RAGE oxidativen Stress: Bereits bei ihrer Entstehung können durch die Oxidation von Glukose zu Dicarbonylintermediaten Superoxidradikale entstehen, welche weiterhin zu Wasserstoffperoxid dismutieren können.

In Anwesenheit von Übergangsmetallen wie Eisen oder Kupfer, kann Wasserstoffperoxid das extrem reaktive Hydroxylradikal (OH[•]) bilden (Hunt, 1988). Da oxidativer Stress die weitere Bildung von AGEs sowie die vermehrte Verstoffwechslung von Glukose über den Polyolweg begünstigt – wodurch wiederum vermehrt AGE-Präkursoren (Fructose-3-Phosphat und Sorbitol-3-Phosphat) gebildet werden – verschlechtert sich die Situation in der Zelle kontinuierlich (Hamada, 1996).

Neben ihrer Bedeutung in der Pathologie des Diabetes mellitus wird die Akkumulation von AGEs aber auch in anderen Erkrankungen, wie z.B. der Alzheimer-Demenz (Colaco, 1996; Yan, 1996; Münch, 1997c; Gasic_Milenkovic, 2001), der Arteriosklerose (Sakata, 1995; Vlassara, 1996a; Yamagishi, 1999a) und der terminalen Niereninsuffizienz (Urämie) (Sell und Monnier, 1990; Vlassara, 1996b) beobachtet.

1.2.4 Ursachen des retinalen Perizytenverlusts

Der retinale Perizytenverlust ist eines der frühesten Ereignisse in der Evolution der diabetischen Retinopathie. Es folgt die Bildung von azellulären Kapillaren, d.h. die Entstehung von Röhren aus Basalmembran, die weder Perizyten noch Endothelzellen beherbergen. Zwangsläufig drängt sich hier die Frage auf, warum nicht die Endothelzellen, die in direktem Kontakt zum hyperglykämischen Blut stehen, sondern die Perizyten, die an der blutabgewandten Seite sitzen, zuerst untergehen. Die Aktivierung des Polyolwegs und der Proteinkinase C sowie der Einfluss von ROS werden in der Literatur vor allem in Zusammenhang mit der endothelialen Stoffwechselsituation beschrieben. Doch wie sieht die Situation in diabetischen Perizyten aus? Bislang gibt es keine eindeutig konsistenten Erkenntnisse zu diesem Thema, einige Ergebnisse und Hypothesen werden im Folgenden dargestellt:

Wie die Endothelzellen besitzen Perizyten den Glut 1-Transporter, den sie jedoch – im Gegensatz zu den Endothelzellen – in Gegenwart hoher Glukosekonzentrationen herabregulieren (Kaiser, 1993; Mandarino, 1994). Dementsprechend müssten die intrazellulären Glukosekonzentrationen stark von denen der Endothelzellen abweichen, wodurch auch eine verringerte Aktivierung der aufgezählten Stoffwechselwege stattfinden sollte. Aber es gibt ebenso andere Untersuchungen, die zeigen, dass kultivierte bovine retinale Perizyten – im Gegensatz zu bovinen retinalen Endothelzellen – neben Glut 1 ein Natrium-abhängiges SGLT2-ähnliches Glukose-Transportsystem besitzen, welches unter hyperglykämischen Bedingungen eine gesteigerte Glukoseaufnahme vermittelt: Wakisaka et al. wiesen nach, dass der vermehrte Glukosetransport über dieses Transportsystem zu erhöhten intrazellulären Konzentrationen an Glukose, Sorbitol und Fruktose und einer verstärkten Kollagensynthese durch Perizyten führt. Im Vergleich zur normoglykämischen Kontrolle wiesen die hyperglykämischen Perizyten einen geringeren DNA-Gehalt und eine stärkere Zellschwellung auf (Wakisaka, 1997; Wakisaka, 1999).

Eine andere Arbeitsgruppe beobachtete eine verstärkte Akkumulation von Polyolen in Perizyten aus Hundeaugen, wenn diese unter hyperglykämischen Bedingungen kultiviert wurden. Dieser Anstieg wurde in Endothelzellen, die unter den gleichen Bedingungen kultiviert wurden, nicht beobachtet, was sie darauf zurückführten, dass Perizyten eine höhere Konzentration an Reduktasen (Aldose-, Glyceraldehyd- und besonders Aldehyd-Reduktasen) aufweisen (Sato, 1999).

Einige Untersuchungen zeigen, dass Perizyten der diabetischen Retina durch Apoptose zugrunde gehen (Mizutani, 1996; Li, 1997; Li, 1999; Podesta, 2000; Miwa, 2003). Als Ursachen werden häufig die AGE-Akkumulation sowie der erhöhte oxidative Stress diskutiert. Letzterer ist für Perizyten von größerer Bedeutung als für Endothelzellen, da ihre antioxidative Kapazität geringer sein soll als die der Endothelzellen (Ansari, 1998; Li, 1998; Li, 1999; Shojaee, 1999). Ein Versuch von Li et al. machte zudem deutlich, dass retinale Perizyten, zumindest *in vitro*, sehr viel schlechter mit fluktuierenden Glukosekonzentrationen zurechtkommen als retinale Endothelzellen: Während die Perizyten nach einem plötzlichen Abfall der Glukosekonzentration apoptotisch wurden, zeigten die Endothelzellen unter den gleichen Bedingungen keine auffälligen Veränderungen (Li, 1996).

Für die AGE-Akkumulation als Ursache der perizytären Apoptose sprechen ebenfalls einige Hinweise: So konnten Chibber et al. mit Hilfe eines ELISAs nachweisen, dass die Menge an frühen Glykierungsprodukten in bovinen retinalen Perizyten (BRP), die für zwölf Tage in Medium mit hohen Glukosekonzentrationen gehalten wurden, ansteigt (Chibber, 1999). Denis et al. zeigten, dass bereits die Zugabe von 3 μM AGE-BSA zum Medium die Apoptoserate in BRP nach 15 Tagen verdreifachte. Nach ihren Messungen wurde die Apoptose über eine Erhöhung an ROS, der DAG- und der Ceramid-Spiegel vermittelt (Denis, 2002). Weitere Arbeiten unterstützen diese Hypothese (Mizutani, 1996; Romeo, 2002; Yamagishi, 2002a), wobei nach wie vor unklar ist, ob allein die Akkumulation intrazellulärer AGEs oder auch deren Signaltransduktion über RAGE den programmierten Zelltod in Perizyten induziert (Yamagishi, 2002c). Erst kürzlich fanden Yonekura et al. heraus, dass Endothelzellen und Perizyten unterschiedliche Splicevarianten des AGE-Rezeptors besitzen, eine Besonderheit, die die unterschiedliche Reaktion der beiden Zelltypen hinsichtlich der chronischen Hyperglykämie erklären könnte (Yonekura, 2003).

Einen weiteren Mechanismus, über den die AGE-Bildung zum Verlust perivaskulärer Zellen führen könnte, zeigten Beltramo et al., indem sie nachwiesen, dass die Adhäsion von Perizyten an extrazelluläre Matrix vermindert war, die zuvor von Endothelzellen unter dem Einfluss hoher Glukosekonzentration gebildet wurde (Beltramo, 2002). Ein zweites Experiment bestätigte diese Theorie, so dass möglicherweise die schlechte Adhäsion von

Perizyten an eine AGE-modifizierte Matrix ein Grund für die perizytäre Apoptose darstellen könnte (Beltramo, 2003).

Aber auch ein Abfall von PEDF (*pigment epithelium-derived factor*) könnte ursächlich an dem Perizytenverlust beteiligt sein. Yamagishi et al. zeigten, dass PEDF Perizyten vor AGE-induzierten ROS, vor einem Stopp der DNA-Synthese und auf diesem Wege vor Apoptose schützen kann. Dieser Schutz wird möglicherweise über antioxidative Eigenschaften vermittelt, da N-Acetylcystein in diesen Versuchen ganz ähnliche Effekte erzielte. Da Perizyten ein Membranprotein mit hoher Bindungsaffinität für PEDF besitzen, ist es denkbar, dass PEDF als ein *survival factor* für Perizyten fungiert. Dementsprechend kann ein Absinken der PEDF-Konzentration – wie es für die diabetische Retinopathie beschrieben ist – einen Verlust dieser Schutzfunktion bewirken (Spranger, 2001; Yamagishi, 2002b).

Es ist demnach denkbar, dass der Perizytenverlust Folge komplexer Diabetes-bedingter Veränderungen ist. Zusammenfassend kommen insbesondere in Betracht:

- der erhöhte oxidative Stress und die verminderte Expression antioxidativer Enzyme und Moleküle (z.B. Glutathion)
- die intra- und extrazelluläre AGE-Akkumulation sowie eine verstärkte Aktivierung von RAGE
- eine verminderte Konzentration an "schützenden" Molekülen, wie z.B. PEDF
- eine verstärkte Polyol-Akkumulation als Folge erhöhter Reduktase-Aktivität
- eine vermehrte Glukoseaufnahme über ein zweites Transportsystem

1.3 Therapie der diabetischen Retinopathie

1.3.1 Konventionelle Therapie

Breit angelegte Studien wie die *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT) und die *United Kingdom Prospective Diabetes Study* (UKPDS) kamen zu dem Ergebnis, dass die wirksamste Prävention der diabetischen Retinopathie die normnahe Blutzuckereinstellung ist. So wurde z.B. bei Typ 1-Diabetikern gezeigt, dass das Risiko einer Retinopathie durch die Reduktion des HbA_{1c}-Spiegels von 9.1 % auf 7.1 % über einen Zeitraum von neun Jahren um 76 % gesenkt werden konnte (DCCT, 1993; UKPDS, 1998a). Aber auch eine normnahe Blutdruckeinstellung auf unter 140/80 mm Hg (Klein, 1989; Wong, 2002) sowie die Senkung von erhöhten Blutfettwerten (Chew, 1996) vermindern das Risiko einer fortschreitenden Retinopathie (UKPDS, 1998b).

Ist die diabetische Retinopathie bereits im fortgeschrittenen Stadium, kann nur eine Laserkoagulation das Fortschreiten des Visusverlustes verhindern. Eine Verbesserung des Sehvermögens ist aufgrund der destruktiven Natur dieser Therapie jedoch nicht zu erreichen (ETDRS, 1991). Indikationen für eine Lasertherapie sind u.a. periphere Neovaskularisation und Neovaskularisationen an der Papille sowie einsetzende präretinale Blutungen. Durch diese Behandlung kann bei proliferativer diabetischer Retinopathie das Risiko eines schweren Visusverlustes um ca. 50 % gesenkt werden (DRS, 1987).

Treten Glaskörperblutungen und traktive Netzhautablösung auf, so kann eine Vitrektomie durchgeführt werden, wobei Glaskörperblutungen und fibrovaskuläre Proliferationen entfernt werden, die Netzhaut wieder angelegt wird und mit einem "Endo"-Laser eine panretinale Laserkoagulation vorgenommen wird (DRVS, 1990; Helbig, 1998; Hammes, 2000).

1.3.2 Neue Forschungsansätze

Da die Möglichkeiten die diabetische Retinopathie zu verhindern oder gar zu heilen bislang sehr beschränkt sind, liegt die Hoffnung in der Entwicklung neuer Therapien. Generell gibt es hier zwei Ansatzpunkte:

- a) Verhinderung der Gefäßobliteration im frühen Stadium der Erkrankung
- b) Verhinderung der Neovaskularisation im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung

Zu a) Aufgrund der Erkenntnisse, die im Laufe der letzten Jahre hinsichtlich der biochemischen Ursachen der diabetischen Retinopathie gewonnen wurden (s. Kapitel 1.2.3), werden zur Zeit verschiedenste Substanzen präklinisch auf ihre Wirkung getestet. Darunter fallen vor allem

- antioxidative Substanzen (Ting, 1996; Cunningham, 1998; Timimi, 1998; Nishikawa, 2000b; Ceriello, 2003)
- Inhibitoren der Aldose-Reduktase (Tilton, 1988; Stribling, 1990; Sarges und Oates, 1993; Oates und Mylari, 1999; Mylari, 2003)
- Inhibitoren der Proteinkinase C (Ishii, 1996; Jirousek, 1996; Aiello, 1997) oder
- Substanzen, welche die Bildung und/oder die Wirkung von AGEs verhindern sollen (Hammes, 1991; Kumari, 1991; Edelstein und Brownlee, 1992; Bierhaus, 1997a; Shoda, 1997; Onorato, 2000; Kern und Engerman, 2001; Price, 2001; Okamoto, 2002b; Gardiner, 2003)

Eindeutig reproduzierbare Therapieerfolge sind bislang jedoch rar. Auch wenn einige Substanzen in einzelnen Studien teils beachtliche Wirkungen aufweisen, fehlt häufig die Bestätigung durch breit angelegte Studien am Menschen. So verminderte beispielsweise α -Tocopherol die Hyperglykämie-induzierte DAG-Produktion und PKC-Aktivierung in diabetischen Ratten und trug bei Typ 1-Patienten zur Normalisierung des retinalen Blutflusses bei (Kunisaki, 1995; Bursell, 1999). Die Verabreichung von α -Tocopherol in einer Studie mit 387 Typ 2-Diabetikern hatte jedoch keinerlei positiven Effekt auf das Krankheitsbild der diabetischen Retinopathie (Mayer_Davis, 1998).

Andere Studien, die initiiert wurden, um die diabetische Retinopathie mit Aldose-Reduktase-Inhibitoren zu therapieren, gaben ebenfalls nur wenig Anlass zur Hoffnung. Zwar verminderten die eingesetzten Substanzen (Sobrinil, Ponalrestat, Tolrestat) zum Teil die Entstehung von Mikroaneurysmen oder die Leckage von injiziertem Fluoreszein in das Gewebe, jedoch wurde das Fortschreiten der diabetischen Retinopathie letztlich nicht verhindert (Anonymous, 1990; Tromp, 1991; Arauz_Pacheco, 1992; van_Gerven, 1994).

Der Einsatz von Inhibitoren der PKC- β -Isoformen, z.B. von LY333531 normalisierte in diabetischen Ratten den retinalen Blutfluss und verhinderte die Entstehung mikrovaskulärer Komplikationen in Retina und Niere (Ishii, 1996; Bursell, 1997). Ebenso

verhinderte LY333531 in Schweinen die Hypoxie-induzierte Neovaskularisation (Danis, 1998) und in Ratten die VEGF-induzierte retinale Endothelzellproliferation (Aiello, 1997). In Patienten mit beginnender diabetischer Retinopathie bewirkte LY333531 eine Verbesserung und Normalisierung des retinalen Blutflusses und demonstrierte dabei eine gute Verträglichkeit (Aiello, 2002). Eine Bestätigung dieser Ergebnisse durch klinische Studien fehlt jedoch (Milton, 2003). Darüber hinaus gibt es auch kritische Stimmen, die – aufgrund von Ergebnissen aus *in vitro* Versuchen – vermuten, dass die Inhibierung der PKC die pro-apoptotischen Effekte hoher Glukosekonzentrationen auf retinale Perizyten verstärkt (Yamagishi und Takeuchi, 2004).

Auch der Einsatz von AGE-Inhibitoren, insbesondere des nukleophilen Hydrazins Aminoguanidin, ist weiterhin Gegenstand der Forschung (Freedman, 1999; Bonnefont-Rousselot, 2001). Neue Studien mit Aminoguanidin bestätigten frühere Untersuchungen, in welchen die Substanz ihre Effektivität bezüglich der Verhinderung der diabetischen Retinopathie bewies (Brownlee, 1986; Hammes, 1991; Kumari, 1991; Edelstein und Brownlee, 1992): So ergab eine Langzeitstudie mit diabetischen Hunden, dass der Einsatz von Aminoguanidin eine signifikante Abnahme der Diabetes-induzierten retinalen Mikroaneurysmen, azellulären Kapillaren und des Perizytenverlusts bewirkte (Kern und Engerman, 2001). Weitere AGE-inhibierende Substanzen, die sich zum Teil als effektiv erwiesen, sind Pyridoxamin (Onorato, 2000; Stitt, 2002), Cerivastatin (Okamoto, 2002b), L-Carnosin (Hipkiss, 1995) und Tenilsetam (Shoda, 1997; Price, 2001).

Zu b) Die Neovaskularisation in der diabetischen Retinopathie ist nicht erwünscht, da sie pathologisch und unkoordiniert abläuft, wobei irreguläre, zarte Gefäße gebildet werden, die schnell einreißen und zu Hämorrhagien führen. Neue Möglichkeiten zur Verhinderung der Neovaskularisation stammen zum Teil aus der Krebsforschung, da hier seit Jahrzehnten intensiv an der Hemmung des malignen Gefäßwachstums geforscht wird, um auf diesem Wege das Wachstum und die Metastasierung von Tumoren zu unterbinden (Folkman, 1983; Folkman und Ingber, 1992).

Das geordnete Wachstum von Gefäßen ist immer das Ergebnis eines dynamischen Gleichgewichts zwischen Angiogenese-Induktoren und -Inhibitoren. Bekannte Inhibitoren wurden zu Zwecken der Angiogenesehemmung in den letzten Jahren vielfach in Versuchen am Tiermodell eingesetzt. Zu diesen Substanzen zählen u.a. Angiostatin

(O'Reilly, 1996; Drixler, 2001), Endostatin (Auricchio, 2002; Folkman, 2002), Thrombospondin (Chavakis und Dimmeler, 2002), PEDF (Spranger, 2001; Stellmach, 2001), Antikörper gegen VEGF (Adams, 1996) und dessen Rezeptor flk-1 (McLeod, 2002), Antikörper gegen Thrombozyten (Rhee, 2004) oder auch Inhibitoren von Matrixmetalloproteinasen (MMPs) (Brooks, 1998; Spurbeck, 2002) und Desintegrin-Metalloproteinasen (ADAMs) (Horiuchi, 2003).

Die Versuchsergebnisse sind zum Teil sehr vielversprechend. Die systemische Gabe der Inhibitoren kann jedoch problematisch sein, da so auch physiologische Angiogeneseprozesse, wie sie beispielsweise für die Wundheilung oder den weiblichen Reproduktionszyklus benötigt werden, inhibiert werden (Ferrara und Alitalo, 1999). Um eine lokale Wirkung zu garantieren, werden die Substanzen in vielen Versuchen intraokular injiziert (Ozaki, 2000): Eine sehr unangenehme und auf Dauer unpraktikable Lösung. Vorteilhaft könnte hingegen die lokale Applikation mit Hilfe von Augentropfen sein (Riecke, 2001).

1.4 Fragestellung

Für die Entwicklung neuer Therapieansätze ist es von Bedeutung, den genauen Beitrag eines jeden pathogenetischen Mechanismus zur Erkrankung zu kennen, um gezielt und in richtiger Dosierung dagegen vorgehen zu können. Obwohl der initiale Perizytenverlust als Startsignal für die Entstehung der diabetischen Retinopathie angesehen wird, ist die Bedeutung der Verhinderung des Perizytenverlust und damit auch die genaue Funktion der Perizyten weiterhin ungeklärt. Es wird davon ausgegangen, dass Perizyten die retinalen Kapillaren stabilisieren und dass folglich ihr Verlust für den beobachteten Gefäßverschluss mit verantwortlich ist. Die folgenden Ergebnisse zur Untersuchung des AGE-Inhibitors Tenilsetam lassen diesbezüglich jedoch Zweifel aufkommen.

Das die AGE-Bildung einen deutlichen Einfluss auf die Entstehung der diabetischen Retinopathie hat, wurde in zahlreichen Studien bewiesen (Brownlee, 1986; Fu, 1994; Onorato, 2000). In welchem Umfang die nicht-enzymatische Glykierung von Molekülen zur Mikroangiopathie beiträgt, ist jedoch noch immer ungeklärt, da viele Inhibitoren der AGE-Bildung auch andere positive Eigenschaften besitzen, die zur Verhinderung der diabetischen Retinopathie beitragen: So ist z.B. Aminoguanidin ein AGE-Inhibitor und hat in vielen Studien eine Besserung der Retinopathie bewirkt (Brownlee, 1986; Hammes, 1991; Hammes, 1995b). Gleichwohl ist Aminoguanidin ein Inhibitor der PKC, der iNOS und der Aldose-Reduktase und besitzt zudem stark antioxidative Kapazitäten (Kumari, 1991; Corbett, 1992; Misko, 1993; Giardino, 1998; Kowluru, 2000; Kern und Engerman, 2001; Du, 2002). Somit ist es wahrscheinlich, dass seine positive Wirkung auf den Krankheitsverlauf nicht allein über eine AGE-Inhibierung zu erklären ist.

Von Tenilsetam ist bislang – neben seiner Eigenschaft als Metallchelator (s. Punkt 1.5.1) (Price, 2001) – keine andere Wirkung als die der AGE-Inhibierung beschrieben: Weder hat die Substanz stark antioxidative Fähigkeiten (Brownlee, unpubliziert, persönliche Mitteilung), noch hemmt sie die PKC oder die Aldose-Reduktase (Peter Oates, unpubliziert; Peter Presseck, unpubliziert, persönliche Mitteilungen).

Aufbauend auf den Mitteilungen von Shoda et al., wurde die Wirkung von Tenilsetam auf die Entstehung der diabetischen Retinopathie getestet. Shoda et al. hatten zuvor Streptozotocin-diabetischen Sprague-Dawley-Ratten über einen Zeitraum von vier

Monaten täglich 50 mg Tenilsetam pro Kilogramm Körpergewicht (kg KG) verabreicht. Sie zeigten, dass die AGE-Bildung nach den vier Monaten in Aorten und Nierengewebe geringer war, als in der diabetischen Vergleichsgruppe. Zudem beschrieben sie, dass die diabetischen Ratten, die mit Tenilsetam behandelt wurden, keine bzw. nur eine schwache Linsentrübung des Auges aufwiesen (im Gegensatz zu der diabetischen Vergleichsgruppe).

Diesem Hinweis folgend wurde ein ähnlicher Versuch initiiert: Der Diabetes wurde bei sechs Wochen alten männlichen Wistar-Ratten mittels einmaliger Streptozotocin-Injektion induziert und über neun Monate aufrechterhalten. Eine Gruppe der diabetischen Tiere erhielt täglich 50 mg Tenilsetam/kg KG über das Trinkwasser. Nach Ablauf der neun Monate wurden die Tiere getötet und ihre Retinae auf den Grad der diabetischen Retinopathie hin untersucht. Das Ergebnis war, dass Tenilsetam die Entstehung von azellulären Kapillaren reduzierte, den ebenfalls Diabetes-typischen Perizytenverlust jedoch nicht verhindern konnte (Abb. 5).

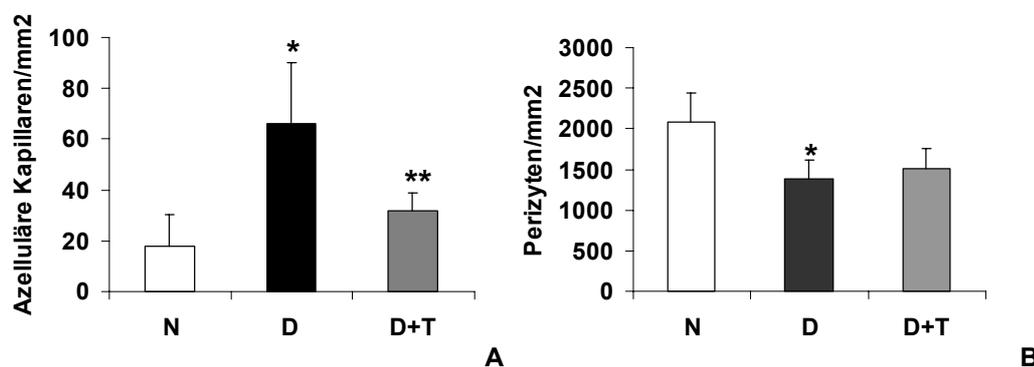


Abb. 5: Ergebnis der quantitativen Retinamorphometrie Streptozotocin-diabetischer Wistar-Ratten nach 9-monatiger Behandlung mit Tenilsetam

Dargestellt ist die Anzahl azellulärer Kapillaren (A), bzw. die Zahl an Perizyten (B) pro Quadratmillimeter Retinafläche von nicht-diabetischen (N), diabetischen (D), bzw. diabetischen und mit Tenilsetam behandelten Ratten (D+T). * $P < 0.001$ vs N; ** $P < 0.05$ vs. D.

Ob dieser positive Effekt auf die Hemmung der AGE-Bildung zurückzuführen ist, konnte nicht geklärt werden, da die Ergebnisse der Untersuchungen, die diesbezüglich durchgeführt wurden (Western Blot, Dot Blot und Immunhistochemie), auf Dauer keine konsistenten Ergebnisse erbrachten.

Die Ergebnisse warfen zudem neue Fragen auf: Der diabetische Perizytenverlust wird häufig mit der Akkumulation von AGE-Produkten erklärt (s. Kapitel 1.2.4). Da Tenilsetam

diesen jedoch nicht verhindern konnte, liegt die Vermutung nahe, dass die Substanz entweder kein AGE-Inhibitor ist (zumindest nicht in der verabreichten Dosis) oder die AGE-Akkumulation nur geringfügig an dem Prozess des Perizytenverlusts beteiligt ist.

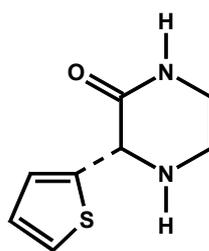
Indes scheint Tenilsetam eine direkte Wirkung auf Endothelzellen auszuüben, da die Bildung von azellulären Kapillaren nach 9-monatiger Therapie reduziert wurde (Abb.5), obwohl die Zahl an perivaskulären Zellen deutlich abgenommen hatte. Der Effekt von Tenilsetam auf Endothelzellen ist bislang jedoch gänzlich unerforscht.

Grundsätzlich geht es in dieser Arbeit um die Beantwortung folgender Fragen:

1. Welchen Effekt hat Tenilsetam auf Endothelzellen? Ist der Einsatz von Tenilsetam zur Therapie der diabetischen Retinopathie denkbar?
2. Von welcher Bedeutung ist die oft erwähnte stabilisierende Wirkung von Perizyten auf retinale Kapillaren? Gibt es bezüglich der Perizyten-dichte einen Schwellenwert, ab dem Kapillaren instabil werden? Welche Funktionen erfüllen Perizyten?

1.4.1 Tenilsetam

Tenilsetam (3-(2-thienyl)-2-piperazinon)) ist ein von Piracetam abgeleitetes Nootropikum und wurde von Cassella, Frankfurt (jetzt Aventis) entwickelt (Pepeu und Spignoli, 1989). Die Substanz entstammt der Alzheimer-Forschung und ist der therapeutischen Klassifizierung nach ein Psychopharmakon, das in Studien an Tier und Mensch deren kognitiven Fähigkeiten verbesserte (Saletu, 1986; Saletu, 1987; Ihl, 1989; Saletu, 1989; Schindler, 1994).



Tenilsetam
(+/-)-3-(2-thienyl)-2-piperazinon

MG = 182.25 g/l

Abb. 6: Strukturformel des AGE-Inhibitors Tenilsetam

Der Wirkmechanismus von Tenilsetam ist nicht vollständig erforscht, es ist bisher nur bekannt, dass die Substanz kovalent an glykierte Proteine oder AGEs bindet (Münc, 1994). Da die Modifikation des β -Amyloidpeptids durch AGEs einen entscheidenden Beitrag zur Progression der Alzheimer Demenz leistet, wird vermutet, dass Tenilsetam durch seine kovalente Bindung reaktive Seitenketten blockiert und damit eine weitere Vernetzung der Proteine verhindert (Münc, 1997b; Münc, 2002). Allerdings zeigten Price et al., dass Tenilsetam auch Chelate mit Kupfer-Ionen bildet, wodurch die metallkatalysierte Autoxidation von Glukose – ein Prozess, der zur Entstehung von reaktiven Dicarbonyl-Zwischenprodukten und somit zur AGE-Bildung beiträgt – vermindert werden könnte (Price, 2001).

Im Plasma hat Tenilsetam eine relativ lange Halbwertszeit von über 18 Stunden, gegenüber Licht und Sauerstoff ist die Substanz jedoch sehr empfindlich (persönliche Mitteilung Dr. U. Schindler, Aventis). Der Nachweis von Tenilsetam kann über HPLC (*high performance liquid chromatography*) erfolgen (Burrows und Coppin, 1990).

1.4.2 Perizyten

1.4.2.1 Morphologie

Während größere Gefäße aus Endothelzellen und mehreren Lagen an vaskulären Glattmuskelzellen bestehen, setzen sich die kleinsten Gefäße aus Endothelzellen und einer einschichtigen Lage an perivaskulären Zellen, den Perizyten zusammen. Ende des 19. Jahrhunderts wurde ihre Morphologie durch Rouget beschrieben, wodurch sie zunächst als Rouget-Zellen bekannt wurden (Sims, 1986; Herman, 1993). Die Bezeichnung "Perizyt" wurde erstmals 1923 von Zimmermann geprägt (Diaz_Flores, 1991; Tilton, 1991).

Perizyten sind neben Kapillaren auch mit postkapillären Venolen assoziiert (Rhodin, 1968; Simionescu, 1975). Ihre genaue Herkunft ist bis heute umstritten. Es wird angenommen, dass Perizyten und vSMC auf ein bestimmtes Signal hin aus mesenchymalen Vorläuferzellen differenzieren (Drake, 1998; Hungerford und Little, 1999; Allt und Lawrenson, 2001). Perizyten sind in jedem Kapillarbett präsent, allerdings variiert die Perizyten-dichte von Gewebe zu Gewebe ganz erheblich. Es scheint, dass sie umso höher ist, je geringer die Turnover-Rate der jeweiligen Endothelzellen ist (Tilton, 1985; Wakui, 1997). Die Retina ist das Gewebe mit der höchsten Perizyten-dichte im ganzen Körper. So sind bei der Ratte 41 % der retinalen Kapillarfläche mit Perizyten bedeckt, wohingegen im Cerebrum nur 22-32 %, im Skelettmuskel 21 % und im Herzmuskel nur 11 % der Kapillarfläche mit Perizyten ummantelt sind (Sims, 1991; Allt und Lawrenson, 2001). Adulte Perizyten teilen sich nach ihrer Differenzierung nicht mehr (Engerman, 1967). Sie besitzen einen prominenten Zellkern, den nur wenig Zytoplasma umgibt (Sims, 1986).

Anders als andere Wandzellen liegen die retinalen Perizyten innerhalb der Basalmembran, welche die Kapillaren umgibt (Abb. 7) und halten über Zellfortsätze direkten Kontakt zu den Endothelzellen. Diese Zellfortsätze sind zum Teil sehr lang, wodurch Perizyten häufig mit mehr als einer Kapillare in Verbindung stehen. Da auch Endothelzellen ähnliche Zellfortsätze ausbilden, sind Endothelzellen und Perizyten richtiggehend miteinander "verzahnt" (Matsusaka, 1975; Leeson, 1979; Tilton, 1979; Wakui, 1989). An den Kontaktstellen zwischen den beiden Zelltypen fehlt die Basalmembran. Statt dessen finden sich dort – je nach Gewebe in ihrer Anzahl stark variierend – *gap junctions*, *tight junctions* und *adhesion plaques* (Zell-Zell-Verknüpfungen) (Courtoy und Boyles, 1983; Heimark, 1993; Allt und Lawrenson, 2001).

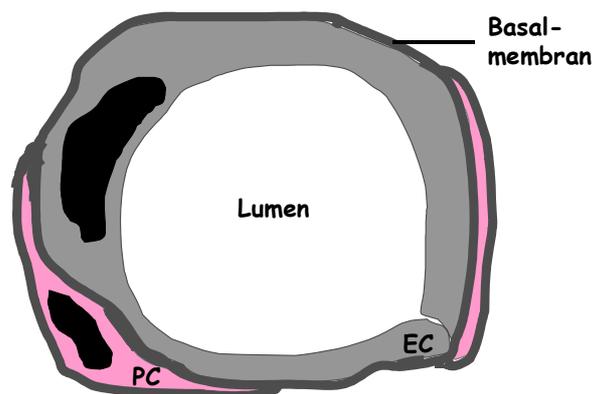


Abb. 7: Schematischer Querschnitt durch eine Kapillare

Innerhalb der Basalmembran, welche die Endothelzellen (EC) umgibt, finden sich die eng anliegenden perivaskulären Zellen (PC).

1.4.2.2 Funktion

Eine Funktion der Perizyten liegt nach *in vitro*- und *in vivo*-Daten in ihrem Beitrag zur Gefäßstabilisierung und der Kontrolle von angiogenen Prozessen: Wie erwähnt folgen dem frühen Perizytenverlust in der diabetischen Retina eine gesteigerte vaskuläre Permeabilität, die Ausbildung von Mikroaneurysmen, die Entstehung von azellulären Kapillaren und letztlich die Regression ganzer Kapillaren. Über die Ursachen des Perizytenverlusts ist inzwischen einiges bekannt (s. Punkt 1.2.4), die Konsequenzen für das adulte Gefäß sind dagegen nur unzureichend definiert. Weitere Antworten ergeben sich möglicherweise aus der detaillierten Erforschung der Perizytenfunktion während der physiologischen Angiogenese der Retina.

Vaskularisierung der Retina und Rekrutierung von Perizyten

Die Gefäße in der Mausretina werden über den Prozess der Angiogenese – nicht den der Vaskulogenese – gebildet (Fruttiger, 2002). Während die Vaskulogenese die Entstehung von Gefäßen aus Vorläuferzellen (Angioblasten) bezeichnet, wird unter Angiogenese die Neubildung von Gefäßen aus bereits existierenden Gefäßen verstanden (Carmeliet, 2000a). Der Zeitpunkt der retinalen Vaskularisierung ist bei Menschen und Nagern unterschiedlich: Während die Gefäße in der humanen Retina in den letzten Schwangerschaftswochen angelegt werden (Gariano, 1994), findet die physiologische Angiogenese in der Ratten- und Mausretina erst postnatal statt (Connolly, 1988). Aus diesem Grund und aufgrund der technisch simplen Organisation, eignet sich dieses Modell besonders gut zur Erforschung

von Angiogeneseprozessen. Mit Hilfe spezifischer Marker bietet sich auch die Möglichkeit den Zeitpunkt und insbesondere den Umfang der Perizytenrekrutierung zum Gefäßspröss zu untersuchen.

An der Angiogenese beteiligt sind eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren, Wachstumsinhibitoren und deren Rezeptoren, die den physiologischen Prozess geordnet ablaufen lassen. Bekannt ist, dass das retinale Gefäßnetz initial auf einem Gefüge von Astrozyten gebildet wird, welche die Retina – vom *Nervus opticus* ausgehend – besiedeln (Stone und Dreher, 1987; Fruttiger, 1996). Die Astrozyten wandern über die Axone retinaler Ganglienzellen, die die Retina durchstrecken und PDGF-A (*platelet derived growth factor A*) sezernieren. PDGF-A wirkt chemotaktisch auf Astrozyten, die den Rezeptor PDGF-R α besitzen (Fruttiger, 1996). Die Migration von Astrozyten in ihrer bipolaren Form ist abhängig vom Sauerstoffgehalt in der Retina: Sobald ungenügend Sauerstoff zur Verfügung steht, wird die Astrozytenmigration inhibiert und VEGF lokal sezerniert (Stone, 1995; Zhang, 1999). VEGF bindet an den VEGF-R2 (flk-1) auf Endothelzellen, welche zusammen bzw. leicht zeitversetzt mit den Astrozyten die Retina besiedeln (Abb. 8) und zu ihrer Sauerstoffversorgung Gefäße bilden (Gerhardt, 2003).

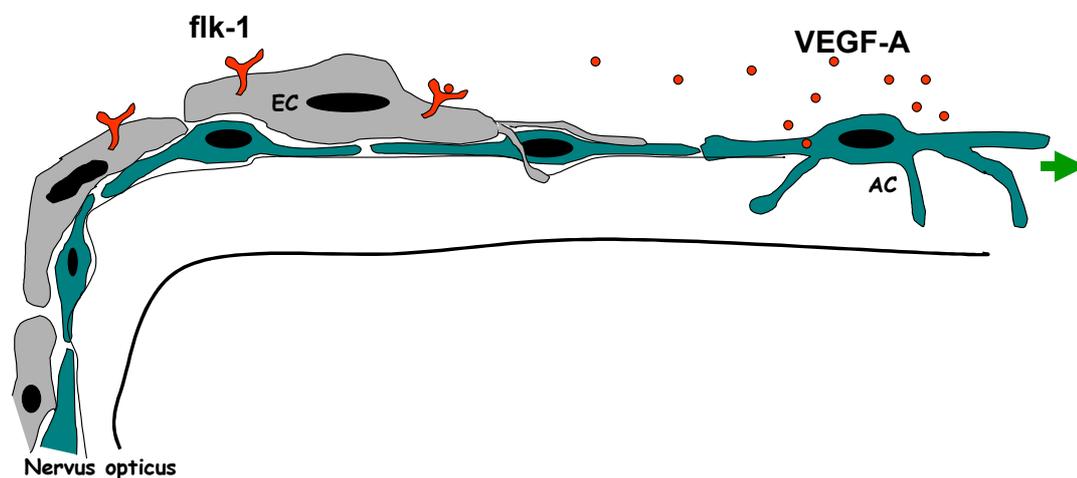


Abb. 8: Schematische Darstellung von Angiogeneseprozessen in der Retina

Migration von Endothelzellen (EC) über ein Netzwerk aus Astrozyten (AC) in Richtung *Ora serrata*.

Die Gefäße wachsen in der oberen Ganglienzellschicht zunächst bis zum äußeren Rand der Retina (der *Ora serrata*). Von diesen Gefäßen ausgehend erfolgt anschließend das

Wachstum von Kapillaren in tiefere Schichten der Retina (bis zur inneren Körnerschicht, s. Abb. 37, Kapitel 3.2.5).

Zu welchem Zeitpunkt die Rekrutierung der Perizyten zum endothelialen Gefäßgeflecht erfolgt, war zu Beginn dieser Arbeit umstritten: Während einige Autoren der Ansicht waren, dass Perizyten bereits früh während der Entwicklung eine Rolle spielen, z.B. indem sie Endothelzellen den Weg weisen oder Lücken zwischen Endothelzellen überspannen, um den Austritt von Blutbestandteilen zu verhindern (Rhodin und Fujita, 1989; Nehls, 1992; Wesseling, 1995; Schlingemann, 1996), vertraten andere Autoren die Hypothese, dass Perizyten erst spät während der Entwicklung rekrutiert werden (Orlidge und D_Amore, 1987; Sato und Rifkin, 1989; Beck und D_Amore, 1997; Benjamin, 1998; Hirschi, 1999). In diesem Zusammenhang prägten Benjamin et al. 1998 den Begriff *window of plasticity*, der für ein Zeitfenster steht, in dem die Gefäße noch nicht von Perizyten ummantelt sind und sich so im Zuge des Gefäßmodelings dem aktuellen Nähr- und Sauerstoffbedarf der Umgebung anpassen können. Mit der Rekrutierung von Perizyten – die ihrer Meinung nach einige Tage bis eine Woche hinter der Gefäßbildung liegt – verliert das Gefäß seine Plastizität und wird Wachstums- und/oder Apoptosesignalen gegenüber resistent (Benjamin, 1998).

Gesichert ist, dass Perizyten über den Faktor PDGF-B rekrutiert werden (Hellström, 1999; Betsholtz, 2001). Dieser Wachstumsfaktor wird unter anderem von Endothelzellen gebildet. Perizyten besitzen den entsprechenden Rezeptor, den PDGF-Rezeptor- β , über den sie das Signal empfangen (Abb. 9) (D_Amore und Smith, 1993).

Wird das PDGF-B Signal ausgeschaltet oder blockiert, z.B. bei PDGF-B Knockout-Mäusen oder über Antikörper gegen den Rezeptor, so findet keine Rekrutierung von perivaskulären Zellen während der Gefäßentwicklung statt. Das Gefäßsystem ohne Perizyten weist ähnliche Besonderheiten auf wie das der diabetischen Retina: Mikroaneurysmen, Ödeme und Hämorrhagien (Lindahl, 1997; Hellström, 2001; Hammes, 2002). Es wird vermutet, dass das wechselseitige Signaling zwischen Endothelzellen und Perizyten ihre Bindung zueinander festigt und zur Stabilisierung des Gefäßnetzes beiträgt: So exprimieren Perizyten u.a. Angiopoietin-1 (Ang-1), welches an den Tie-2 Rezeptor auf Endothelzellen bindet (Abb. 9). Versuche mit Knockout-Mäusen, bzw. Überexpressionsmodellen zeigen, dass das Ang-1/Tie2-System essenziell für die Reifung

des Gefäßsystems ist (Maisonpierre, 1997; Suri, 1998; Hayes, 1999; Thurston, 1999; Jain und Munn, 2000).

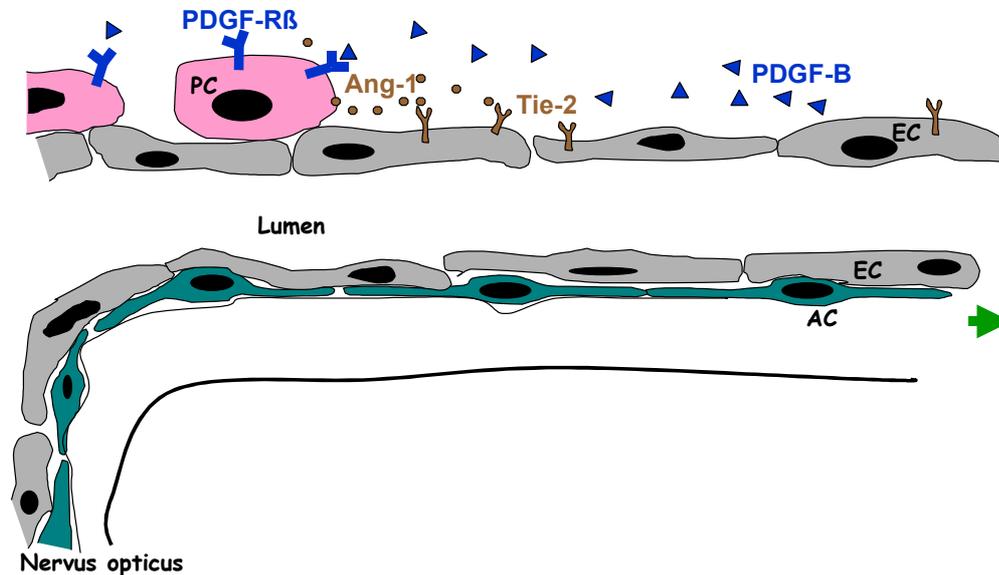


Abb. 9: Schematische Darstellung von Angiogeneseprozessen in der Retina

Rekrutierung von Perizyten (PC) zum endothelialen Gefäßgeflecht durch das PDGF-B/R β -System und Stabilisierung der Bindung über das Ang-1/Tie2-System.

Generell scheint also die Rekrutierung von Perizyten für die Stabilisierung von Kapillaren und damit für den Schutz von Endothelzellen gegenüber Wachstums- und/oder Degenerationsreizen von Bedeutung zu sein. Die zeitliche und räumliche Dynamik zwischen Perizytenrekrutierung und Kapillarstabilität ist jedoch nur unzureichend geklärt.

Eine weitere – für diese Arbeit nicht relevante – Funktion von Perizyten scheint in ihrer Fähigkeit zur Kontraktion begründet zu sein: Sie besitzen – wie die vSMC - α -Aktin und sind demnach möglicherweise aktiv an der Regulation des Blutflusses beteiligt (Kelley, 1987, 1988; DeNofrio, 1989; Skalli, 1989). Sie besitzen Rezeptoren für Endothelin-1 (Lee, 1989a; Takahashi, 1989; Masaki, 1995; Kawamura, 2002), das von Endothelzellen als Signal zur Gefäßkontraktion gebildet wird und die zyklische GMP-abhängige Kinase, die an der Regulation der Kontraktion vaskulärer Glattmuskelzellen beteiligt ist (Joyce, 1984). Somit ist es wahrscheinlich, dass auch das endotheliale NO zur Regulation des Blutflusses über die Perizyten beiträgt (Hirschi und D'Amore, 1996).

1.5 Zielsetzung

Aufgrund der unterschiedlichen Fragestellung ist die vorliegende Arbeit in zwei Projekte unterteilt:

Ziel von Projekt I ist es, die Wirkung von Tenilsetam auf die Endothelzelle näher zu charakterisieren, da hierzu bislang noch keine Daten vorliegen. Mit Hilfe von funktionellen Tests an humanen venösen Nabelschnur-Endothelzellen (HUVECs) sowie an bovinen retinalen Endothelzellen (BRECs) wurde untersucht, ob Tenilsetam einen Einfluss auf die zelluläre Proliferation, Apoptose, Adhäsion, Migration, Expression von Adhäsionsmolekülen und das Zellsprouting hat. Nach Durchsicht und Diskussion der Ergebnisse stellt sich die Frage, ob Tenilsetam unter Umständen einen neuen Ansatzpunkt zur Therapie der diabetischen Retinopathie liefert.

Neben der diabetischen Retinopathie gibt es noch eine andere Erkrankung, die mit dem Fehlen von Perizyten in Verbindung gebracht wird: die Frühgeborenenretinopathie. Auch hier kommt es nach vorangegangenem Gefäßuntergang zu Hypoxie-induzierten reaktiven Neovaskularisationen, die letztlich zur Erblindung führen können. Während die Perizyten beim Diabetes kontinuierlich verloren gehen, sind sie bei den Frühgeborenen zum Zeitpunkt der Erkrankung wahrscheinlich noch nicht vorhanden. Es gibt ein Mausmodell, welches in seinem Verlauf der Frühgeborenenretinopathie gleicht: das ROP-Modell (ROP, *retinopathy of prematurity*, s. Kapitel 2.2.3.4). Mit Hilfe dieses Modells soll geklärt werden, ob ein zeitlicher und räumlicher Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von Perizyten und der Stabilität des retinalen Gefäßnetzes besteht.

Folglich wurde zunächst die retinale Perizyten-dichte bei jungen Mäusen an den Tagen p7 bis p12 ermittelt. Anschließend wurde überprüft, wie stark die Angiogeneseantwort auf eine an diesen Tagen einsetzende Hyperoxie mit anschließender Hypoxie ausfällt (ROP-Modell). Der Nachweis von an diesem Prozess beteiligten Wachstumsfaktoren und Rezeptoren, wurde mit Hilfe der Western Blot-Analyse durchgeführt.

Projekt II verfolgt das Ziel, die gewonnenen Erkenntnisse über die Bedeutung von Perizyten während der retinalen Angiogenese auf die pathologische Situation beim Diabetes zu übertragen, um auf diesem Wege neue Möglichkeiten der Prävention und Behandlung der diabetischen Retinopathie zu diskutieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Software

Mikroskop BMR	Leica, Bensheim
Kamera RT Slider	Visitron Systems GmbH, Puchheim
Software MetaMorph (Version 4.6r9)	Visitron Systems GmbH, Puchheim
Elektrophorese-Apparatur	BioRad, München
Western Blot-Apparatur	BioRad, München
Elma Sonicator	Transsonic Digital, Singen
Translumiator Gel Doc™ 2000	BioRad, München
Software Quantity One® (Version 4.2.1)	BioRad, München
Zentrifuge Mikro 22 R	Hettich AG, Bäch, Schweiz
Zentrifuge Labofuge 400R	Heraeus, Osterode/Harz
Sauerstoffsensoren (ROP-Modell)	medicap Medizintechnik GmbH, Ulrichstein
Inkubator (ROP-Modell)	Keutz, Reiskirchen
Einbettmaschine ,Tissue Tek II'	Vogel, Medizinische Technik und Elektronik, Gießen
Zellzähler CASY 1	Schärfe System GmbH, Reutlingen
Chemotaxis-Kammer (48-Well)	Corning Costar, Bodenheim
Freezing Container, Nalgene™ Cryo 1°C	Fisher Scientific GmbH, Nidderau
FACS Epics® XL	Beckmann-Coulter, Krefeld
Software Expo32 ADC	Beckmann-Coulter, Krefeld
Photometer ,thermomax microplate reader'	Molecular Devices, München
Software SOFTmax (Version 2.22)	Molecular Devices, München

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Dextrankügelchen Cytodex 3	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
FACS-Röhrchen (5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
6-well Kulturplatten, Costar®	Corning Costar, Bodenheim

12-well Kulturplatten, Costar®	Corning Costar, Bodenheim
96-well Kulturplatten, Nunclon™	Fisher Scientific GmbH, Nidderau
Nalgene Bottle Top Filter 0,2 µm für 500 ml	Fisher Scientific GmbH, Nidderau
Petrischalen für Zellkultur Ø 94 mm	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Polycarbonat-Membran Ø 8µm, PVP frei	Whatman nucleopore®, Maidstone, UK
PVDF-Membran	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Röntgenfilm Hyperfilm™ ECL	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Suspensionskulturflaschen (50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

2.1.3 Chemikalien und Lösungen

ABTS-Substrat	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Amidoschwarz 10B	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat	BioRad, München
Aprotinin (Trasylol) [500 000 KIE/50 ml]	Bayer, München
Bromphenolblau	Roth GmbH, Karlsruhe
Butanol	Merck, Darmstadt
n-Butylacetat zur Synthese	Merck, Darmstadt
Collagen Typ I	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Color Marker Wide Range	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Complete™Mini, Proteasen-Inhibitoren-Cocktail	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Deoxycholat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
Dulbecco's MEM 25 mM Hepes	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Dulbecco's PBS, pH 7,4	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
ECL™	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
EDTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EGTA	Merck, Darmstadt
Endothelzellen-Basalmedium	PromoCell GmbH, Heidelberg

Eosin	Merck, Darmstadt
Fibrinogen, bovines	Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden (seit 1.1.03: Merck, Biosciences GmbH, Darmstadt)
FORENE [®] Inhalationsnarkotikum	Abott GmbH, Wiesbaden
Formaldehyd 3,5-3,7 %	Otto Fischar GmbH & Co KG, Saarbrücken
Gelatine (2 %ige Lösung)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
D-(+)-Glucose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycerol	Roth GmbH, Karlsruhe
Glycin	Roth GmbH, Karlsruhe
Hepes	Roth GmbH, Karlsruhe
Kaisers Glyceringelatine	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumferricyanid, $K_3Fe(CN)_6$	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kaliumferrocyanid, $K_4Fe(CN)_6 \times 3 H_2O$	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kristallviolett	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Mayers Hämalaunlösung	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Methanol	Merck, Darmstadt
Milchpulver, entfettet	Fluka, über Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Paraplast, Schmelzpunkt 58°C	Firma medim Histotechnologie, Altenbusek
Rinderserum, fetales	BioWest, Nuailé, Frankreich
Rotihistol [®] zum Entwachsen	Roth GmbH, Karlsruhe
Roti Histokit [®] zum Eindeckeln	Roth GmbH, Karlsruhe
Rotiphorese [®] Gel 30	Roth GmbH, Karlsruhe
RPMI 1640	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Restore™ Western Blot	Pierce Chemical Company, Rockford, USA
Serumalbumin, bovines (Fraktion V)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
SDS	Pierce Chemical Company, Rockford, USA
Staurosporin aus <i>Streptomyces sp.</i>	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
TEMED p.a. 99 % (für d. Elektrophorese)	Roth GmbH, Karlsruhe
Tenilsetam	Aventis Pharma, Frankfurt/Main
TRITC-Lectin aus <i>Bandeiraea simplicifolia</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trizma® Base	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin-EDTA (10fach konzentriert)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Tween 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
X-gal	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

2.1.4 Chemokine und Wachstumsfaktoren

bFGF, human (Nr. 13256-029) rekombinant; 10 µg/ml	Gibco BRL, Life Technologies, Gaithersburg, USA
Interleukin-1β, human (Nr. 1457756) rekombinant (<i>E. coli</i>); 2 µg/ml	Boehringer Mannheim, Mannheim
VEGF (165), human (Nr. 293-VE-050) rekombinant; 50 µg/ml	R&D Systems GmbH, Wiesbaden - Nordenstadt

2.1.5 Enzyme

Thrombin (T-7513)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
-------------------	----------------------------

2.1.6 Antikörper

Primärantikörper:

Anti-Aktin (A-2066) polyklonal aus Kaninchen; 0.5 mg/ml	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti-Angiopoietin-1 (N-18) sc-6319 polyklonal aus Ziege; 0.2 mg/ml	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

Anti-Angiopoietin-2 (F-18) sc-7017 polyklonal aus Ziege; 0.2 mg/ml	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-E-Selektin (Nr. 555 648) Klon: 68-5H11 monoklonal aus Maus; 0.1 mg/ml	BD PharMingen, Heidelberg
Anti-ICAM-1 (M7063) Klon: 6.5B5 monoklonal aus Maus; 0.38 mg/ml	Dako, Hamburg
Anti-PDGF-B (C-9115) polyklonal aus Kaninchen; 5.24 mg/ml	von Charles E. Hart, Novo Nordisk, Seattle, Washington, USA
Anti-PDGF-R β (Nr. 06-498) polyklonal aus Kaninchen; 1 mg/ml	Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA
Anti-Tie-2 (C-20) sc-324 polyklonal aus Kaninchen; 0.1 mg/ml	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-VCAM-1 (M7106) Klon: 1.4C3 monoklonal aus Maus; 0.35 mg/ml	Dako, Hamburg
Anti-VEGF (A-20) sc-152 polyklonal aus Kaninchen; 0.2 mg/ml	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

Sekundärantikörper:

Anti-Kaninchen, HRP-Konjugat (P 0217) (1.3 mg/ml)	Dako, Hamburg
Anti-Maus, HRP-Konjugat (P 0447) (1.0 mg/ml)	Dako, Hamburg
Anti-Ziege-IgG, HRP-Konjugat (205-035-108) (1.0 mg/ml)	Jackson ImmunoResearch Laboratories, über Dianova, Hamburg

2.1.7 Kits

Annexin V-FITC Kit (PN IM3546)	Immunotech (Coulter Company), Marseille, France
Cell Proliferation ELISA, BrdU (Nr. 1647229)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

2.2 Methoden

2.2.1 Grundlagen der Zellkultur

Als Zellkultursystem wurden HUVECs (*human umbilical vein endothelial cells*) und BRECs (*bovine retinal endothelial cells*) eingesetzt. Die Isolierung von Endothelzellen aus der Nabelschnur geht auf das ursprüngliche Protokoll von Jaffe et al. (Jaffe, 1973) zurück. Die Isolierung von Endothelzellen aus der bovinen Retina erfolgte nach einem Protokoll von Schor et al. (Schor und Schor, 1986).

Die HUVECs wurden in ECBM (*endothelial cell basal medium*) von PromoCell kultiviert. Neben 5 % FCS enthält das Vollmedium Zusätze aus dem *Supplement Pack* von PromoCell (0.1 µg/ml EGF, 1 µg/ml bFGF, 1 mg/ml Hydrocortison, 50 mg/ml Gentamycinsulfat und 50 µg/ml Amphotericin B). BRECs wurden in ECBM mit 10 % FCS kultiviert, allerdings wurde neben den oben genannten Wachstumsfaktoren und Antibiotika zusätzlich 0.1 % ECGS (*endothelial cell growth supplement/heparin*) aus dem *Supplement Pack* zugesetzt. Medium, welches ausschließlich zum Waschen der Zellen verwendet wurde, enthielt 10 % FCS und keinerlei weitere Zusätze. Die Zellen wurden bei 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit und 37°C inkubiert.

2.2.1.1 Kryokonservierung von Zellen

Zellen, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden, wurden zweimal mit warmen PBS gewaschen und durch Zugabe von Trypsin-EDTA von der Platte gelöst. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von FCS-haltigem Waschmedium abgestoppt und die Zellsuspension in ein *Blue Cup* überführt. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation mit 125 g wurde das Zellpellet in 500 µl Vollmedium mit 20 % FCS aufgenommen und in ein Kryoröhrchen gegeben, in das bereits 500 µl Vollmedium mit 20 % DMSO vorgelegt wurde. DMSO ist ein kleines, fettlösliches Molekül, welches durch die Plasmamembran in das Innere der Zellen diffundiert. Dort verhindert DMSO die Entstehung von Eiskristallen, die eine Zerstörung der Zelle herbeiführen würden. Das Röhrchen wurde anschließend in eine Einfrierbox gestellt und bei -80°C für ca. 85 min eingefroren. Die Einfrierbox enthält Isopropanol, was bewirkt, dass sich die Zellen gleichmäßig mit 1°C/min abkühlen. Nach 85 min wurden die Kryoröhrchen aus der Einfrierbox in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.1.2 Auftauen der Zellen

Die Zellen wurden unter Schwenken des Kryoröhrchens im 37°C-Wasserbad aufgetaut. Der Inhalt des Röhrchens wurde dann umgehend in ein *Blue Cup* pipettiert, welches bereits 9 ml angewärmtes Waschmedium enthielt. Um die Zusätze des Einfriermediums zu entfernen, wurden die Zellen für 3 min mit 80 g zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Anschließend wurde das Zellpellet vorsichtig in 10 ml Vollmedium aufgenommen und in eine mit Gelatine beschichtete Zellkulturschale ausgesät.

2.2.1.3 Passagieren von Zellen

Hatten die Zellen den Zustand der Konfluenz erreicht (nach ca. 4-6 Tagen), wurden sie subkultiviert. In der Regel wurde eine konfluente Schale auf vier neue Kulturschalen aufgeteilt. Hierzu wurde zunächst das Medium abgesaugt und der Zellrasen zweimal mit jeweils 10 ml warmen PBS gewaschen. Um die Zellen von der Platte zu lösen, wurden sie mit 1.5 ml angewärmtem Trypsin-EDTA überschichtet. Sobald sich die Zellen von der Substratoberfläche abkugelten, wurde die Trypsinaktivität durch Zugabe von 8,5 ml Waschmedium inaktiviert und die Zellsuspension in ein *Blue Cup* pipettiert. Mit 125 g wurden die Zellen zentrifugiert und das Medium anschließend abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 8 ml Vollmedium resuspendiert und auf 4 Zellkulturschalen verteilt, in die zuvor je 8 ml Vollmedium vorgelegt wurde.

Für die Versuche wurden Zellen der Passage 3 bis 5 verwendet. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe des *Cell Counters* CASY 1 (Schärfe System GmbH, Reutlingen).

2.2.1.4 Einsatz von Tenilsetam

Tenilsetam wurde vor Versuchsbeginn in PBS gelöst und sterilfiltriert. Da die Substanz licht- und sauerstoffempfindlich ist, wurden die Arbeitsschritte im Dunkeln vorgenommen. Die angesetzte Lösung wurde nach der Sterilfiltration zügig aliquotiert und dann entweder sofort für den Versuch eingesetzt oder bis zu ihrem Gebrauch bei -20°C eingefroren. Einmal aufgetaute Aliquots wurden nicht wieder eingefroren.

2.2.2 Funktionelle Tests

2.2.2.1 Proliferation

Prinzip: Um die Wirkung von Tenilsetam auf die Proliferation von Endothelzellen zu untersuchen, wurden diese in eine 96-Well-Platte ausgesät und mit oder ohne Wachstumsfaktoren, bzw. mit oder ohne Tenilsetam inkubiert. 48 Stunden später wurden die Zellen fixiert, gefärbt und quantifiziert.

Durchführung: HUVECs wurden in einem Volumen von 100 µl Medium, welches entweder 0.2 % FCS oder 10 % FCS enthielt, in eine 96-Well-Kulturschale ausgesät (5000 Zellen/Well). Unterschiedliche Konzentrationen an Tenilsetam wurden der Zellsuspension direkt zugefügt und der Ansatz für 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit warmen PBS vorsichtig gewaschen und mit 100 µl kalter Methanol/Aceton-Lösung (1:1) für mindestens 30 min fixiert. Die fixierten Zellen wurden mit 50 µl Kristallviolett-Lösung (0.5 % Kristallviolett, 20 % Methanol, 79.5 % ddH₂O) für 30 min bei RT gefärbt und dann in einer Wanne mit Leitungswasser so lange gewaschen, bis alle überschüssige Farbe entfernt war. Die gefärbten Zellen wurden kurz luftgetrocknet und anschließend durch Zugabe von 50 µl einer Lösung aus 30 % Methanol, 10 % Eisessig und 60 % ddH₂O entfärbt. Die Quantifizierung der Zellen erfolgte im ELISA-Reader über die Bestimmung der optischen Dichte bei 590 nm (OD₅₉₀).

2.2.2.2 DNA-Synthese

Prinzip: Zelluläre Proliferation benötigt immer zunächst auch eine Vervielfältigung der DNA. Deshalb ist es möglich, das Ausmaß der zellulären Proliferation über die Menge des bei der Replikation eingebauten Pyrimidin-Analogs 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) zu bestimmen. BrdU wird bei diesem Versuchsansatz anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut und kann nach Versuchsende mit einem Peroxidase-gekoppelten Antikörper nachgewiesen und quantifiziert werden. Der Versuch wurde mit dem BrdU-ELISA Kit von Roche (Mannheim) durchgeführt.

Durchführung: HUVECs wurden in 96-Well-Kulturplatten ausgesät (5000 Zellen/Well) und für 3 Tage in Vollmedium kultiviert. Das Medium wurde anschließend gegen serumfreies ECBM ohne jegliche Wachstumsfaktoren ausgetauscht, um die Zellen in eine "Hungerphase" zu versetzen. Nach 24 Stunden wurde auch dieses Medium abgesaugt und

durch ECBM mit 0.05 % FCS ersetzt. Dem Medium zugesetzt wurden VEGF (20 ng/ml), um die Zellen zur Proliferation zu stimulieren, sowie unterschiedliche Konzentrationen an Tenilsetam, um zu testen, welchen Einfluss Tenilsetam auf die DNA-Synthese von Endothelzellen hat. Die Inkubation dieses Versuchsansatzes erfolgte für 24 Stunden bei 37°C. Die letzten 6 Stunden wurde das Substrat BrdU in einer Endkonzentration von 10 µM zugesetzt. Anschließend wurde das Medium entfernt, und die Zellen wurden mit 200 µl "FixDenat" für 30 min bei Raumtemperatur fixiert, bevor die unspezifischen Bindungsstellen über Nacht mit 100 µl 3 % BSA in PBS bei 4°C abgeblockt wurden. Daraufhin wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und dann für 90 min bei RT mit dem monoklonalen BrdU-Antikörper inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen entfernt, bevor je Well 100 µl der Substratlösung (Tetramethylbenzidin, TMB) zugegeben wurde. Nachdem eine deutliche Farbentwicklung stattgefunden hatte (nach ca. 15 – 30 min im Dunkeln), wurde die Reaktion durch Zugabe von 25 µl 1 M Schwefelsäure (H₂SO₄) beendet. Die Quantifizierung der DNA-Synthese erfolgte direkt im Anschluss über die Messung der Farbintensität bei 450 – 650 nm im ELISA-Reader.

2.2.2.3 Apoptose

Prinzip: Das integrale Membranprotein Phosphatidylserin befindet sich in intakten Zellen auf der zytoplasmatischen Seite der Membran. Während der Apoptose von Zellen wird es jedoch an die Membranaußenseite transloziert. Annexin V, ein Kalzium-abhängiges, Phospholipid-bindendes Protein, bindet mit hoher Affinität an Phosphatidylserin, wodurch an FITC gekoppeltes Annexin in der FACS-Analytik als Marker der Apoptose dienen kann. Nekrotische Zellen, die durch den Verlust der Membranintegrität ebenfalls Annexin binden, werden durch Gegenfärbung mit Propidiumiodid von den apoptotischen Zellen unterschieden, da Propidiumiodid nur mit der DNA geschädigter Zellen interkaliert.

Es wurde überprüft, ob Tenilsetam bei Endothelzellen eine Apoptose induziert. Als Positivkontrollen dienten Zellen, die mit dem unspezifischen PKC-Inhibitor Staurosporin inkubiert wurden, sowie Zellen, die auf BSA-beschichteten Kulturschalen an der Adhäsion gehindert wurden. Der Versuch wurde mit dem Annexin V-FITC Kit von Immunotech (Coulter Company) durchgeführt.

Durchführung: Konfluente HUVECs (zweier 90 mm-Kulturschalen) wurden mittels Trypsin abgelöst, in HUVEC-Vollmedium aufgenommen und auf zwei 6-Well-Platten verteilt. Die Wells waren entweder Gelatine- oder BSA-beschichtet. Die Zellen wurden für 20 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen Tenilsetam oder mit der entsprechenden Menge an PBS (Negativkontrolle) inkubiert. Ein Teil der Zellen wurde nach 16 Stunden für 4 Stunden mit 1 μ M Staurosporin behandelt (Positivkontrolle).

Zur Bestimmung der nekrotischen und apoptotischen Zellen, wurde das überstehende Medium in ein FACS-Röhrchen überführt. Die FACS-Röhrchen wurden zuvor mit 0.3 % BSA beschichtet, um eine Adhäsion von Zellen an die Wandung zu verhindern. Der Zellrasen wurde zweimal mit je 500 μ l kaltem PBS gewaschen und auch die dadurch abgelösten Zellen wurden in das Röhrchen pipettiert. Die adhären Zellen wurden durch 200 μ l Trypsin-EDTA pro Well abgelöst und zusammen mit 800 μ l Waschmedium in das jeweilige FACS-Röhrchen gegeben. Anschließend wurden die Röhrchen mit 180 g für 5 min zentrifugiert und das Zellpellet in einem Puffer resuspendiert, der 100 μ l kalten *binding buffer*, 1 μ l Annexin V-FITC- und 5 μ l Propidiumiodid-Lösung enthielt. Die Zellsuspension wurde für 10 min im Dunkeln inkubiert. Dann wurden je 400 μ l *binding buffer* zugegeben und der Prozentsatz an apoptotischen und nekrotischen Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt.

2.2.2.4 Adhäsion

Prinzip: Endothelzellen werden auf unterschiedlich beschichtete Wells einer 96-Well-Kulturplatte ausgesät. Eine Stunde später werden die nicht adhären Zellen abgewaschen und die adhären Zellen fixiert, gefärbt und quantifiziert.

Durchführung: Eine 96-Well-Zellkulturplatte wurde über Nacht bei 4°C entweder mit 3 % BSA (Negativkontrolle), 5 % FCS oder 0.2 % Gelatine beschichtet. Die unspezifischen Bindungsstellen wurden durch Zugabe von je 100 μ l 3 % BSA in PBS für 1 Stunde bei RT geblockt. HUVECs wurden abtrypsiniert, zweimal mit serumfreien ECBM gewaschen, und das Zellpellet in Adhäsionsmedium (ECBM mit 0.3 % BSA) resuspendiert. 30 000 Zellen wurden in einem Volumen von 100 μ l pro Well pipettiert und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Zellen waren entweder für 24 Stunden mit Tenilsetam in unterschiedlichen Konzentrationen präinkubiert oder es wurden die entsprechenden Konzentrationen der Substanz direkt vor Versuchsbeginn zur

Zellsuspension gegeben. Anschließend wurden die nicht adhärenen Zellen abgesaugt, die Wells mit 100 µl warmen PBS gewaschen und die verbliebenen Zellen wie unter Punkt 2.2.2.1 fixiert und gefärbt. Die Quantifizierung der adhärenen Zellen erfolgte über die Bestimmung der optischen Dichte bei 590 nm (OD_{590}) im ELISA-Reader.

2.2.2.5 Migration

Prinzip: Endothelzellen werden auf eine Polycarbonatmembran (Porengröße: 8 µm) ausgesät. Das unterhalb der Membran befindliche Medium kann chemotaktische Agenzien enthalten, auf deren Reiz hin die Zellen die Membran durchwandern und an ihrer Unterseite adhären. Die migrierten Zellen werden mit Kristallviolett angefärbt und über die optische Dichte quantifiziert.

Der Migrationsassay wird in einer Chemotaxis-Kammer durchgeführt. Diese Apparatur besteht aus zwei Acrylplatten, zwischen denen die Polycarbonatmembran gespannt wird. Die Oberplatte enthält 48 durchgehende Löcher, die Unterplatte die dazu korrespondierenden 48 Wells. Bei zusammengesetzter Kammer werden diese Löcher zu Wells für die Zellsuspension. Mit dieser Methode wurde untersucht, ob Tenilsetam die Migration von Endothelzellen auf einen chemotaktischen Reiz hin verändert.

Durchführung: Die Polycarbonatmembran wurde mit 100 µg/ml Collagen Typ I über Nacht bei 4°C beschichtet. Vor Versuchsbeginn wurde sie der Collagen-Lösung entnommen und an der Luft getrocknet. Die Wells der Bodenplatte wurden mit 25 µl ECBM (0.2 % FCS) befüllt, welches je nach Versuchsbedingung entweder 20 ng/ml VEGF, 20 ng/ml VEGF in Kombination mit 20 ng/ml bFGF oder keinerlei chemotaktisches Agens (Negativkontrolle) enthielt. Auf die so befüllte Bodenplatte wurde die Membran mit der rauen Seite nach unten gelegt. Anschließend wurde die Oberplatte mit der Silikondichtung zusammen auf die Bodenplatte gedrückt und das entstandene "Sandwich" fest zusammengeschaubt.

In die Wells der Oberplatte wurde nun 50 µl Zellsuspension pipettiert. Zur Vorbereitung der Zellsuspension wurden die HUVECs von der Kulturschale abtrypsiniert, in ECBM mit 0.2 % FCS resuspendiert und ihre Zahl mit dem *Casy Counter* bestimmt. Die Zellen wurden erneut mit 125 g für 5 min zentrifugiert und anschließend in so viel Medium aufgenommen, dass sich 30 000 Zellen in 50 µl befanden. Je nach Fragestellung wurden

die Zellen entweder vor der Trypsinbehandlung für 24 Stunden mit Tenilsetam präinkubiert oder Tenilsetam wurde direkt vor Versuchsbeginn zur Zellsuspension gegeben.

Die befüllte Chemotaxis-Kammer wurde für 4 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran der Kammer entnommen und die nicht migrierten Zellen auf der glatten Oberseite abgestreift. Hierfür wurde sie zwischen zwei breite Plastikklammern gespannt, die Seite mit den nicht migrierten Zellen in Kochsalzlösung getaucht und an einem Wischblatt aus Gummi abgestreift. Dieser Prozess wurde dreimal wiederholt, bis alle nicht migrierten Zellen auf der Membranoberseite entfernt waren. Die migrierten Zellen, die an der Membranunterseite hefteten, wurden in einem 20-minütigen Bad in Methanol/Aceton (1:1) fixiert und über Nacht in Kristallviolettlösung (s. Punkt 2.2.2.1) gefärbt. Um überschüssiges Kristallviolett zu entfernen, wurde die Membran in ddH₂O gewaschen und nass auf einen sauberen Objektträger gezogen. Nach Lufttrocknung, wurde die Membran photographiert und die Menge der migrierten Zellen wurde über die Stärke der Kristallviolettanfärbung ermittelt. Die Analyse erfolgte mit Hilfe des Gel Doc 2000™ Dokumentationssystem und der QuantityOne-Software von BioRad (München). Zur Aufbewahrung der Membran wurde diese mit einem zweiten Objektträger mit Rotikit eingedeckelt.

2.2.2.6 ELISA zur Bestimmung der Adhäsionsproteine

Prinzip: Unter inflammatorischen Bedingungen exprimieren Monozyten, Makrophagen, B-Zellen und andere Zellen Interleukin-1 β (IL-1 β), das an einen Rezeptor auf Endothelzellen bindet und dadurch eine Hochregulation der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin bewirkt. Diese Moleküle sind an der Adhäsion von Leukozyten an die Endothelzellen beteiligt. Um zu untersuchen, ob Tenilsetam seine positive Wirkung auf Endothelzellen möglicherweise über eine Regulierung dieser Adhäsionsmoleküle ausübt, wurden Endothelzellen in 96-Well-Kulturplatten herangezüchtet, mit IL-1 β sowie Tenilsetam behandelt und die Expression von Adhäsionsmolekülen über eine Immundetektion beurteilt.

Durchführung: HUVECs wurden in 96-Well-Kulturplatten ausgesät (5000 Zellen/Well) und für 3 Tage in Vollmedium kultiviert. Anschließend wurde das Vollmedium entfernt, einmal mit warmen PBS gewaschen und 100 μ l serumfreies ECBM pro Well pipettiert.

Dem Medium wurden nun IL-1 β in einer Endkonzentration von 1 ng/ml zugegeben, um die Expression der Adhäsionsmoleküle zu stimulieren, sowie unterschiedliche Konzentrationen an Tenilsetam, um dessen Effekt auf die Molekülexpression zu untersuchen. Nach einer Inkubationsperiode von 6 Stunden bei 37°C wurden die Zellen mit warmen PBS gewaschen und entweder mit 100 μ l 3 % Paraformaldehyd für eine Stunde bei RT (ICAM-1 Färbung) oder mit 100 μ l Methanol-Aceton-Lösung (1:1) für 30 min bei 4°C (VCAM-1, bzw. E-Selectin Färbung) fixiert. Die Fixationslösung wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und unspezifische Bindungsstellen über Nacht bei 4°C mit 100 μ l 3 % BSA in PBS abgeblockt. Die Blockierungslösung wurde abgesaugt und die Primärantikörper wurden in 100 μ l TBS-T auf die Zellen gegeben (Verdünnung 1:200). Nach einer Inkubationsdauer von 90 min bei RT, wurden die Zellen dreimal mit TBS-T gewaschen und mit einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper für 60 min bei RT inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift mit TBS-T wurden 750 μ l ABTS und 10 μ l H₂O₂ in 15 ml ABTS-Puffer gelöst und davon je 100 μ l pro Well pipettiert. Nach 45 min Inkubation im Dunkeln wurden die Proben bei 405 nm im ELISA-Reader gemessen.

2.2.2.7 Sprouting

Prinzip: Um zu testen, ob Tenilsetam einen Einfluss auf das Aussprossen von Endothelzellen hat, werden BRECs auf kleinen, Gelatine-beschichteten Dextranskugelchen (Cytodex 3, Pharmacia) angezüchtet. Diese *microcarrier* (MC) werden anschließend in ein Fibringel eingebettet und mit Medium überschichtet, welchem entweder Wachstumstimulatoren oder – Inhibitoren zugegeben werden. Das Ausmaß des Aussprossens wird ermittelt, indem die Anzahl der Sprouts pro MC gezählt werden.

Durchführung: Die trockenen MC wurden in Ca²⁺- und Mg²⁺-freiem PBS (pH 7.4) für mindestens 3 Stunden bei RT hydriert (ca. 50 – 100 ml/g MC). Dann wurde das über den aufgequollenen MC stehende PBS dekantiert und durch 50 ml frisches PBS ersetzt. Nach diesem Waschschrift wurde das PBS erneut durch 50 ml frisches PBS ersetzt und die Lösung anschließend bei 115°C für 15 min autoklaviert. Die sterilisierten MC wurden bei 4°C gelagert.

Anzucht von BRECs auf MC:

Vor Versuchsbeginn wurden 1 ml der MC-Lösung in ein steriles Röhrchen überführt und die MC mit 10 ml warmen Waschmedium aufgewirbelt. Nachdem sich die MC am Boden

des Röhrchens abgesetzt hatten, wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und ein weiteres Mal auf diese Weise gewaschen. Die MC wurden dann in 1 ml Vollmedium aufgenommen und in eine 50 ml-Suspensionskulturflasche überführt.

Im nächsten Schritt wurden konfluent gewachsene BRECs von einer 90 mm-Zellkulturschale abtrypsiniert, gewaschen, in 3 ml Vollmedium aufgenommen und zu den MC in die Kulturflasche pipettiert. Die Flasche wurde anschließend für 4 Stunden im Brutschrank aufrecht inkubiert und jede Stunde einmal leicht geschwenkt, um den BRECs eine gleichmäßige Adhäsion an die MC zu ermöglichen. Anschließend wurden der MC-BREC-Lösung weitere 5 ml Vollmedium zugegeben, die Zellkulturflasche hingelegt und für ca. 48 Stunden im Brutschrank belassen.

Vorbereitung der Fibringele und Einbettung der MC:

Für drei 6-well Zellkulturplatten wurden 14.5 ml Dulbeccos PBS (PBS⁺, d.h. mit Ca²⁺ und Mg²⁺) mit 10 ml Fibrinogenlösung (1.8 mg/ml in PBS⁺) und 500 µl Aprotinin (200 U/ml) gemischt und je 600 µl dieser Lösung pro Well pipettiert.

Die mit BREC bewachsenen MC wurden mit Hilfe von PBS⁺ quantitativ in ein 15 ml-Röhrchen überführt. Nachdem sich die MC abgesetzt hatten, wurde der Überstand abgesaugt, ein zweites Mal mit 12 ml warmen PBS⁺ gewaschen und die MC anschließend in 2.5 ml PBS⁺ aufgenommen. In jedes Well wurden 60 µl dieser MC-BREC-Lösung pipettiert und die MC durch Schwenken der Platte gleichmäßig über das Well verteilt. Die Polymerisierung der Lösung wurde durch Zugabe von 0.65 U/ml Thrombin induziert. Nach einer 20-minütigen Polymerisierungsperiode bei 37°C, wurde das Gel zum Äquilibrieren für 1 Stunde mit 1 ml ECBM (0.5 % FCS) überschichtet.

Stimulation der Zellen und Zugabe von Tenilsetam:

Das Äquilibriermedium wurde abgesaugt und durch 1 ml frisches ECBM (0.5 % FCS) ersetzt. Diesem frischen Medium wurde entweder bFGF in einer Endkonzentration von 2 ng/ml (Positivkontrolle), nur PBS (Negativkontrolle) oder Tenilsetam in verschiedenen Konzentrationen zugegeben. Nach einer Inkubationsdauer von 48 Stunden bei 37°C waren die Sprouts der Positivkontrolle so lang, dass der Versuch ausgewertet werden konnte. Das Medium wurde abgesaugt und die Gele mit 3%igem Paraformaldehyd fixiert (500 µl/well). Die Auswertung des Versuchs erfolgte, indem die Zahl der Sprouts auf 50 MC pro Well

bestimmt wurde. Ein Sprout wurde als positiv bewertet, wenn seine Länge die des MC-Durchmessers übertraf. War ein positiver Sprout nach einer Verzweigungsstelle erneut länger als der MC-Durchmesser, galt er ebenfalls als Sprout.

2.2.3 Versuche mit XlacZ- und C57BL/6-Mäusen

2.2.3.1 Haltung der Tiere

Die Haltung der XlacZ- und C57BL/6-Mäuse erfolgte nach den ethischen Richtlinien in einem abgeschlossenen Tierstall mit standardisierten Bedingungen (künstlichem Licht mit Hell-/Dunkelphasen (12:12 Stunden) und 18-21°C Raumtemperatur). Im Falle der transgenen XlacZ-Maus handelte es sich um einen S1-Tierstall. Die Mäuse wurden in normierten Makrolonkäfigen (Kunststoffkäfige aus Polycarbonat) der Firma Tecniplast (Hohenpeißenberg) auf Standarddeinstreu für Labortiere gehalten und hatten freien Zugang zu Futter und Wasser. Es wurde eine Standard-Diät ("Haltungsdiaät" 1324) für Ratten und Mäuse der Firma Altromin GmbH (Lage) verfüttert.

Alle Untersuchungen wurden unter Beachtung des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

2.2.3.2 Bestimmung der retinalen Perizyten-dichte bei der XlacZ-Maus

Prinzip: Der Perizytenbesatz von Retinakapillaren wurde mit Hilfe der XlacZ-Maus bestimmt. Diese transgene Maus wurde von der Arbeitsgruppe um Shani in Israel generiert (Tidhar, 2001) und trägt die β -Galaktosidase als Reporterenzym in Perizyten und vaskulären Glattmuskelzellen. Da der Perizytenbesatz im Verlauf der retinalen Entwicklung dargestellt wurde, wurden XlacZ-Mäuse an den Tagen p7 bis p12 und p26 getötet, die Retina entnommen und durch Zugabe von X-gal gefärbt. Das Substrat X-gal wird von der β -Galaktosidase gespalten und das blaue Endprodukt (ein Indolderivat) freigesetzt, das im Lichtmikroskop deutlich erkennbar ist.

Durchführung: Die Mäuseaugen wurden nach ihrer Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu Versuchsbeginn bei -80°C gelagert. Vor Retinaentnahme wurden die gefrorenen Augen zunächst für 20 min bei Raumtemperatur fixiert. Die Fixationslösung wurde stets vor Versuchsbeginn frisch angesetzt.

Fixationslösung:

0.4 ml 25 %iges Glutaraldehyd
2 ml 37 %iges Formaldehyd
2.5 ml 100 mM EGTA (pH 7.3)
0.1 ml 1 M Magnesiumchlorid (MgCl₂)
auf 50 ml mit 0.1 M Phosphatpuffer auffüllen

0,1 M Phosphatpuffer:

1.8 g NaH₂PO₄ x H₂O
10.3 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O
auf 500 ml mit ddH₂O auffüllen
pH-Wert auf 7.3 einstellen

Nach Fixierung der Augen wurden die Retinae entnommen. Hierfür wurden sie äquatorial mit einer Mikroschere eingeschnitten und die Cornea durch Schneiden entlang der *Ora serrata* abgetrennt. Mit einem rautenförmigen Spatel wurden nun Linse und Glaskörper entfernt. Anschließend wurde die Retina mit einer Präparationsnadel vorsichtig von der Sklera gelöst und mit Hilfe des rautenförmigen Spatels in 1 ml Waschlösung überführt. Um die Fixationslösung ausreichend zu entfernen, wurden die Retinae dreimal für 15 min gewaschen.

Waschlösung:

0.5 ml 1 M Magnesiumchlorid (MgCl₂)
2.5 ml 1 %iges Deoxycholat
2.5 ml 2 %iges Nonidet P-40
auf 250 ml mit 0.1 M Phosphatpuffer auffüllen

Anschließend wurden die Retinae über Nacht mit ca. 1 ml Färbelösung bei 37 °C inkubiert.

Färbelösung:

0.1 % X-gal (in Dimethylformamid, 25 mg X-gal/ml)
5 mM Kaliumferrocyanid (K₄Fe(CN)₆)
5 mM Kaliumferricyanid (K₃Fe(CN)₆)
auf 50 ml mit Waschlösung auffüllen

Die Färbelösung wurde am nächsten Tag gegen eine gleiche Menge an Waschlösung ausgetauscht. Nach ca. 3 – 4 Stunden bei 4°C war die Farbentwicklung in den Perizyten optimal, und die Retinae wurden mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckelt. Nach Trocknung der Präparate über Nacht, wurden die Perizyten unter dem Mikroskop bei 40-facher Vergrößerung quantifiziert. Zu diesem Zweck wurde ein Integrationsokular benutzt. Im Uhrzeigersinn wurden jeweils 6 Felder in der Peripherie der Retina, sowie 6 Felder im Zentrum der Retina begutachtet. Objektfelder mit größeren Gefäßen wurden nicht berücksichtigt. Das Ergebnis wurde in mittlerer Perizytenzahl pro mikroskopischem Feld angegeben.

2.2.3.3 Darstellung des Gefäßnetzes nach erfolgter X-gal Färbung

Prinzip: Nach einer reinen X-gal Färbung kann nur eine Aussage über die Zahl an Perizyten in der Retina getroffen werden. Ob die erfassten Perizyten mit Kapillaren assoziiert sind und an welchen Stellen sie zu finden sind, lässt sich durch eine Anfärbung des Gefäßnetzes mit einem TRITC-konjugierten Lectin aus *Bandeiraea simplicifolia* klären. Dieses Lectin besitzt die Eigenschaft unspezifisch an Kohlenhydratreste der Gefäßwand zu binden.

Durchführung: Anstatt die X-gal gefärbten Retinae einzudeckeln wurden sie für 10 min in PBS gewaschen, unspezifische Bindungsstellen für eine Stunde bei RT in 1 % BSA in PBS geblockt und dann für mindestens 24 Stunden bei 4°C mit der Lectinlösung inkubiert. Die Lectin-Stammlösung [1 mg/ml] wurde für diesen Zweck 1:100 in PBS verdünnt. Bevor die Retinae mit 1%igem Glycerol in PBS eingedeckelt wurden, wurden sie kurz in PBS gewaschen, um sie von überschüssiger Lectinlösung zu befreien.

Die Präparate wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop BMR von Leica (Deutschland) begutachtet. FITC wurde mit einer Wellenlänge von 480 nm (blau) angeregt und emittierte bei 527 nm (grün). Die Photos wurden mit der Kamera "RT Slider" von Visitron Systems aufgenommen und über das Programm "MetaMorph" der gleichen Firma verwaltet und abgespeichert.

2.2.3.4 ROP-Modell mit C57BL/6-Mäusen

Prinzip: Da es bisher kein adäquates Tiermodell gibt, in dem die chronische Hyperglykämie eine proliferative Retinopathie verursacht, wurde ein Mausmodell entwickelt (Smith, 1994), welches in seinem Verlauf der Frühgeborenenretinopathie beim Menschen gleicht. Über die Induktion einer relativen Hypoxie wird eine retinale Angiogeneseantwort verursacht, die in ihrem Prinzip und in allen Schritten den Neovaskularisationen im humanen, diabetischen Auge gleicht. Ursprünglich wurde das Mausmodell entwickelt, um antiangiogene Therapieprinzipien zu erforschen.

Durchführung: Neugeborene C57BL/6-Mäuse werden an Tag 7 nach der Geburt (postnatal, p7) zusammen mit ihrer Mutter für 5 Tage in einer geschlossenen Atmosphäre einem Sauerstoffgehalt von 75 ± 3 % ausgesetzt. Die Luft wird über steriles Wasser befeuchtet und der Sauerstoffgehalt wird über einen Sensor (medicap) kontinuierlich kontrolliert. Nach Ablauf der 5 Tage werden die Mäuse der normalen Raumluft ausgesetzt, wodurch das an einen höheren Sauerstoffgehalt angepasste Gefäßsystem, eine relative Hypoxie erfährt. Auf diesen Reiz hin wird die Gefäßneubildung angeregt, die 5 Tage nach Rückführung maximal ist (an p17). Zu diesem Zeitpunkt werden die Mäuse getötet und das Ausmaß der Angiogeneseantwort sowohl quantitativ als auch qualitativ bestimmt (siehe unten).

Bei erwachsenen Mäusen lässt sich mit diesem Verfahren keine proliferative Retinopathie erzeugen. Das Gefäßsystem ist so stabil, dass auf den Hyperoxiereiz hin keine Gefäßregression stattfindet. Somit entfällt die Phase relativer Hypoxie und der Anreiz zur Neovaskularisation. Um zu testen, ab welchem Zeitpunkt die murine Retina diesen stabilen Zustand erreicht hat, wurde das ROP-Modell leicht modifiziert: die neugeborenen Mäuse wurden nicht an p7, sondern um ein bis mehrere Tage zeitversetzt dem hohen Sauerstoff ausgesetzt. D.h. anstelle von p7 wurden die Mäuse an p8, p9, p10, p11 und p12 mit dem ROP-Modell konfrontiert und die Angiogeneseantwort jeweils 10 Tage später an p17, p18, p19, p20, p21 und p22 bestimmt (s. Abb. 10).

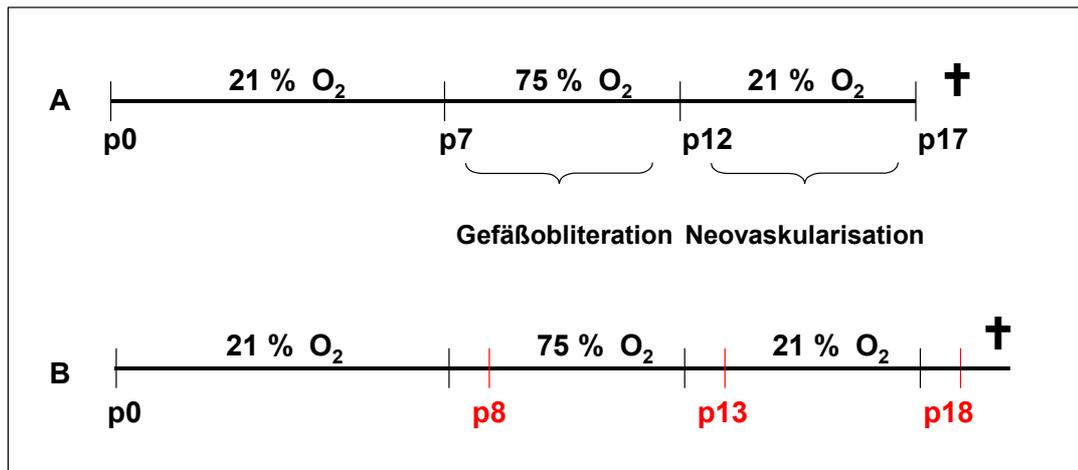


Abb. 10: Zeitverlauf des ROP-Modells (A) und des modifizierten ROP-Modells (B)

Quantitative Darstellung der Angiogeneseantwort:

Die Zellkerne der Endothelzellen, die sich im Zuge der Angiogenese vor die innere Grenzmembran der Retina ausgebreitet hatten, wurden gezählt. Zu diesem Zweck wurden die Augen in Paraffin eingebettet, geschnitten und gefärbt.

An p17 wurden die Mäuse mit Isofluran (FORENE[®], Abbott) narkotisiert und getötet. Die Augen wurden entnommen und in 4 % Formalin für 48 Stunden fixiert. Anschließend wurde ein Auge in Paraffin eingebettet, woraufhin mit Hilfe des Mikrotoms 6 µm dicke, axiale Schnitte des Präparates angefertigt werden konnten. Zur Darstellung der Zellkerne wurden die Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Bei 40-facher Vergrößerung wurde im Abstand von jeweils 18 µm (also jeder 3. Schnitt) die Zahl der Zellkerne gezählt, die sich vor die innere Grenzmembran ausgebreitet hatten. Insgesamt wurden 15 Schnitte nach dem gleichen Prinzip ausgewertet. Dadurch, dass jeweils 8 Schnitte vor und 7 Schnitte hinter dem *Nervus Opticus* gezählt wurden, waren die Schnitte von relativ gleicher Länge und das Verfahren gut standardisiert. Angegeben wird die mittlere Zellkernzahl pro Schnitt.

Paraffineinbettung:

Die Augen wurden zunächst in kleine Einbettenschälchen gegeben und in aufsteigender Alkoholreihe (30 min in 80 %, 60 min in 96 % und 60 min 99.6 % Ethanol) bei Raumtemperatur dehydriert. Anschließend wurde der Alkohol in einer aufsteigenden Essigsäure-Butylester (EBE)-Reihe entfernt:

- 60 min EBE Lösung I (1 Teil EBE und 2 Teile 99.6 % Ethanol)
- 60 min EBE Lösung II (2 Teile EBE und 1 Teil 99.6 % Ethanol)
- 30 min EBE Lösung III (100 % EBE)
- 30 min EBE Lösung IV (100 % EBE)

Die eigentliche Paraffineinbettung begann anschließend mit der Inkubation der Augen in Paraplast bei 60°C über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Präparate nochmals für 3 Stunden in frisches Paraplast gegeben, bevor sie mit Hilfe des *Tissue Embedding Center* (Tissue Tek II, Vogel, Gießen) endgültig mit Paraplast in kleine Förmchen eingegossen wurden. Nach Erhaltung wurde der Paraffinblock in ein Mikrotom eingespannt und geschnitten.

Hämatoxylin-Eosin-Färbung:

Die Schnitte wurden auf einen entfetteten Objektträger gezogen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Vor der Färbung wurden sie zunächst mit Hilfe von Rotihistol entwacht (2 x 5 min in jeweils frischem Rotihistol) und dann über eine absteigende Alkoholreihe rehydriert (je 3 min in 99.6 %, 96 %, 80 %, 70 % und 50 %). Nach einem 5-minütigen Bad in ddH₂O wurden die Schnitte 5 min in Hämatoxylin gefärbt, und zum Bläuen für 9 min in fließendes Leitungswasser gegeben. Anschließend wurden sie kurz in ddH₂O gewaschen und für 4 min in Eosin-Lösung gefärbt. Nach einem weiteren, kurzen Bad in ddH₂O wurden sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe wieder dehydriert und das restliche Wasser durch 2 x 5 min Rotihistol entfernt. Direkt im Anschluss an diese Prozedur, wurden die Schnitte mit Depex eingedeckelt und über Nacht getrocknet.

Qualitative Darstellung der Angiogeneseantwort:

Zur qualitativen Darstellung der Angiogeneseantwort wurde das retinale Gefäßnetz mit einem TRITC-konjugierten Lectin aus *Bandeiraea simplicifolia* angefärbt:

Nach der Fixierung wurde das kontralaterale Auge zunächst bei Raumtemperatur gewaschen (4 x 1 Stunde in PBS und 1 x 2 Stunden in 0.5 % Triton X-100 in PBS, um überschüssiges Formalin zu entfernen. Anschließend wurde die Retina isoliert und mit 50 µl der Lectinlösung bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Lectin-Stocklösung [1 mg/ml] wurde zuvor 1:50 in 0.5 % Triton X-100 in PBS verdünnt. Am nächsten Tag wurde die Retina im Dunkeln bei 4°C ein weiteres Mal in PBS gewaschen (4 x 1 Stunde), bevor sie auf einem Objektträger ausgebreitet und mit Kaiser's Glycerin Gelatine eingedeckelt wurde. Die Retinae wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop (BMR, Leica) begutachtet und mit Hilfe der Kamera "RT Slider" von Visitron Systems fotografiert.

2.2.4 Western Blot-Analyse von Retinalysaten

Prinzip: Zur Analyse von retinalen Proteinen, wurde die SDS-PAGE nach Laemmli (Laemmli, 1970) verwendet. Die Retinae wurden lysiert und die extrahierten Proteine durch SDS denaturiert und auf eine negative Gesamtladung eingestellt. Diese verleiht den Proteinen ein einheitliches Verhältnis von Ladung zu Masse, wodurch die Auftrennung des Proteingemisches während der diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese allein von der Größe der Moleküle und der Porengröße des Gels abhängt. Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Proteine zur Durchführung einer Immunfärbung auf eine Membran transferiert.

Durchführung:

2.2.4.1 Probenaufbereitung

Die für die Retinaentnahme vorgesehenen Augen, wurden bis zur Probenaufbereitung in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur Vermeidung von Auftau-Artefakten wurden die Augen auf Eis eröffnet. Die Retinaentnahme erfolgte wie unter Punkt 2.2.3.2 beschrieben. Je Probeneinheit wurden 5 Retinae (bei C57BL/6-Mäusen) bzw. 3 Retinae (bei XlacZ-Mäusen) in 300 µl, bzw. 100 µl kaltem Lysis-Puffer gelöst. Um Proteindegradation vorzubeugen wurden dem Lysis-Puffer Proteaseinhibitoren zugesetzt (1 Tablette Complete™ Mini auf 10 ml).

Lysis-Puffer:

150 mM	NaCl
30 mM	Tris pH 7.5
1 mM	EDTA
<u>0.2 %</u>	<u>Triton X-100</u>

in ddH₂O lösen

Mit einem kleinen Stößel wurden die Retinae 2 min lang mechanisch zerrieben. Um die Reibung durch die Bildung von Eiskristallen zu erhöhen, wurden die Proben nach 1 Minute kurz in flüssigen Stickstoff getaucht. Eine anschließende Ultraschallbehandlung (3 x 2 min bei 100 % im Wasserbad (Elma Sonicator, Transsonic Digital) vervollständigte die Auflösung der Zellstruktur. Um die unlöslichen Zelltrümmer von den löslichen Inhaltsstoffen zu trennen, wurden die Proben für 2 min bei 14 000 rpm (= 21910 g) zentrifugiert (Mikro 22 R, Hettich AG), der Überstand abgenommen, aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

2.2.4.2 Proteinbestimmung:

Um eine Vorstellung über die Menge an gelöstem Protein zu erhalten, wurde bei den Proben der C57BL/6-Retinae eine Proteinbestimmung mit Hilfe des "BCA Protein Assay Reagent Kit" von Pierce (Rockford, USA) durchgeführt: Je 10 µl einer BSA-Standardreihe, bzw. der Probenlösung wurden in die Vertiefung einer 96-well Platte pipettiert und mit jeweils 200 µl der BCA-Lösung versetzt. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37°C, wurde die Absorption bei 590 nm gemessen. Der Proteingehalt der Proben wurde letztlich über die Standardkurve errechnet.

Bevor die Proben auf das Gel aufgetragen wurden, wurden sie mit SDS-Probenpuffer versetzt (Verhältnis: 4 Teile Proteinlösung mit 1 Teil 4 x Probenpuffer) und bei 100°C im Wasserbad für 5 min denaturiert.

4 x Probenpuffer:

12.5 ml (1/4 Vol.)	Sammelgelpuffer (Tris-HCl/SDS, pH 6.8)
2.5 g (5 %)	SDS
20.0 ml (40 %)	Glycerin
<u>2.0 mg</u>	<u>Bromphenolblau</u>

auf 50 ml mit ddH₂O auffüllen

2.2.4.3 Herstellung der Polyacrylamidgele

Die Glasplatten wurden gründlich gereinigt und nach Angaben des Herstellers (Bio-Rad) zu einem "Sandwich" zusammengebaut. Für zwei 10 % Polyacrylamidgele wurden 3.75 ml Trenngelpuffer mit 5.0 ml 30 %iger Acrylamid-Stammlösung, 6.1 ml ddH₂O, 150 µl APS und 15 µl TEMED versetzt, vorsichtig vermischt und zwischen die Glasplatten gegossen. Damit die Gele während der Polymerisation eine flache Grenzschicht ausbildeten, wurden sie mit Wasser-gesättigtem Butanol überschichtet. Nach vollendeter Polymerisation, wurde die über den Gelen stehende Flüssigkeit abgegossen und das Sammelgel, inklusive der Probenkämme, hinzugefügt.

Für zwei 3 %ige Sammelgele wurden 1.25 ml Sammelgelpuffer mit 0.5 ml Acrylamid-Lösung, 3.4 ml ddH₂O, 50 µl APS und 10 µl TEMED vermischt.

Trenngelpuffer:

1.5 M Trizma[®]-Base

0.4 % 10 %iges SDS

auf 500 ml mit ddH₂O auffüllen

(pH-Wert auf 8.8 einstellen)

Sammelgelpuffer:

1.0 M Trizma[®]-Base

0.4 % 10%iges SDS

auf 200 ml mit ddH₂O auffüllen

(pH-Wert auf 6.8 einstellen)

2.2.4.4 Elektrophorese

Die Probenkämme wurden vorsichtig aus dem polymerisierten Gel entfernt und die Gele in die Elektrophoreseapparatur eingespannt. Beide Elektrodenkammern wurden mit 1 x SDS-Laufpuffer gefüllt und die Probenaschen sorgfältig mit demselben Puffer gespült, um nicht polymerisiertes Acrylamid zu entfernen. Mit einer Pipette wurden die Proben in die Taschen gefüllt. Als Größenstandard für die Gele wurden je nach Molekulargewicht des zu analysierenden Proteins entweder der "Color Wide Range Marker" (C-3437, Sigma) oder

der "Color High Range Marker" verwendet (Tab. 2). Die Auftrennung erfolgte bei 100 V für ca. 2 Stunden.

5 x SDS-Laufpuffer:

0.125 M Trizma[®]-Base

1.250 M Glycin

5 % 10%iges SDS

auf 2 l mit ddH₂O auffüllen

(vor Gebrauch mit ddH₂O zu 1 x Puffer verdünnen)

Tab. 2: Color Markers von Sigma

Protein	Farbe	kDa	C-3437	C-3312
Myosin	blau	205	X	X
β-Galaktosidase	türkis	116	X	X
Albumin	pink	66	X	X
Ovalbumin	gelb	45	X	X
Carboanhydrase	orange	29	X	X
Trypsin-Inhibitor (Sojabohne)	grün	20	X	
α-Lactalbumin	lila	14.2	X	
Aprotinin	blau	6.5	X	

2.2.4.5 Tank-Blotting

Unmittelbar nach Abschluss der Elektrophorese erfolgte der Transfer der getrennten Proteine auf eine proteinbindende Polyvinylidendifluorid(PVDF)-Membran mit Hilfe des Wet-(Tank)-Blot-Verfahrens.

Auf Gelgröße zurechtgeschnittene Filterkartons, die PVDF-Membranen, die benötigten Schwammtücher wie auch die Gele selbst wurden zunächst in Transferpuffer äquilibriert. Zu beachten ist, dass die PVDF-Membranen vor dem Äquilibrieren erst für einige Sekunden mit 100 % Methanol und dann einige Minuten mit ddH₂O benetzt werden

müssen. Nach der Äquilibration wird der Wet-Blot zwischen zwei Kunststoffgittern nach folgendem Schema luftblasenfrei zusammengebaut (von unten nach oben):

- durchsichtiges Kunststoffgitter
- 1 Schwammtuch
- 2 Filterkartons
- PVDF-Membran
- Gel
- 2 Filterkartons
- 1 Schwammtuch
- schwarzes Kunststoffgitter

Anschließend wurden die beiden Gitter miteinander verriegelt und das "Sandwich" so in die Halteschienen der Wet-Blot-Apparatur eingesetzt, dass die Membran der Anode und das Gel der Kathode zugewandt war. Nach dem Auffüllen des Tanks mit Puffer wurde der Transfer für 1 Stunde bei 100 V durchgeführt. Während dieser Zeit wurde ein Überhitzen der Blot-Apparatur durch den Einsatz eines Kühlaggregats verhindert.

Transfer-Puffer:

0.02 M Trizma[®]-Base

0.15 M Glycin

auf 5 l mit ddH₂O auffüllen

2.2.4.6 Protein-Nachweis

Nach Beendigung des Transfers wurden die PVDF-Membranen zunächst auf einem sauberen Filtertuch vollständig getrocknet, um die Verluste an geblottetem Protein zu reduzieren. Vor dem Absättigen der Membranen wurden sie mit Methanol erneut rehydriert und kurz in TBS mit 0.1 % Tween 20 gewaschen. Die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen ("Blocken") erfolgte über eine ein- bis zweistündige Inkubation der Membranen mit einer Lösung aus TBS-Tween und 5 % entfettetem Milchpulver (w/v). Die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgte entweder über Nacht bei 4°C oder für 2 Stunden bei RT. Nach dreimaligem Waschen der Membranen mit TBS-T für insgesamt 20-30 min, folgte die 30-minütige Inkubation mit dem HRP-

konjugierten Zweitantikörper. Ein zweiter Waschschrift mit TBS-T beendete die Immunreaktion.

Die Detektion der Proteine erfolgte mit Hilfe des ECL™ Western Blotting Systems von Amersham: In Gegenwart von H₂O₂ katalysiert die an den Zweitantikörper gekoppelte Peroxidase unter alkalischen Bedingungen die Oxidation von Luminol (5-Amino-1, 2, 3, 4-tetrahydrophthalazin-1, 4-dion), wobei die freiwerdende Energie in Form von Licht mit einem Wellenlängenmaximum bei 428 nm emittiert wird. Diese wird auf einem blaublichtsensitivem Röntgenfilm (Hyperfilm™ ECL) sichtbar.

Im Anschluss an die Detektion wurden die Membranen erneut zu einer Immunreaktion mit verschiedenen Antikörpern herangezogen. Hierzu wurden sie mit dem Restore™ Western Blot Puffer von Pierce behandelt: Zunächst wurden die Membranen für 5 min in TBS-T gewaschen, dann 15 min bei RT mit dem Stripping-Puffer inkubiert und abschließend erneut für 3 x 5 min in TBS-T gewaschen. Danach erfolgte der Proteinnachweis wie bereits beschrieben.

2.2.5 Statistik

Alle Daten wurden zunächst in Excel erfasst und anschließend mit SPSS für Windows (Version 11.5) ausgewertet. Die berechneten Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung wurden für die deskriptive Statistik (Abbildungen) herangezogen.

Projekt I:

Wurden in dem jeweiligen Versuch Wiederholungsmessungen durchgeführt, um den systematischen und den zufälligen Messfehler zu reduzieren, wurde aufgrund der Verteilung der Daten sowie deren Skalenniveau, der Median berechnet. Dieser ging in die jeweilige statistische Modellierung ein.

Das erste Modell (Zellzahlbestimmung) wurde mit Hilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholung berechnet. Bei Versuchen zur Proliferation, DNA-Synthese, Adhäsion, Migration und Zellsprouting wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung durchgeführt, und zwar mit den Faktoren Konzentration (4-5 Faktorstufen) und Stimulation (ja/nein). Die anschließenden Paarvergleiche erfolgten nach LSD (Least Square Difference), bzw. Sidak.

Es handelt sich bei der vorliegenden statistischen Auswertung um eine explorative Datenanalyse. Die berechneten p-Werte sind deshalb rein deskriptiv zu beurteilen.

Projekt II:

Die Auswertung der Tierversuchsergebnisse (Quantifizierung von Perizyten und Angiogeneseantwort nach ROP-Modell) erfolgte wiederum mit Hilfe einer einfaktorischen Varianzanalyse und anschließendem Tukey-HSD-Test im Sinne der konfirmatorischen Analyse. Die der Auswertung zugrundeliegenden Hypothesen waren a) die retinale Perizyten-dichte nimmt mit dem Alter der Mäuse zu, und b) die reaktive Neovaskularisation in der Retina nimmt mit steigendem Perizytenbesatz ab.

3 Ergebnisse

3.1 Projekt I: Beeinflussung der Endothelzellfunktion durch Tenilsetam

3.1.1 Tenilsetam verändert die Morphologie von HUVECs und hemmt deren Proliferation

Um die Wirkung von Tenilsetam auf Endothelzellen zu untersuchen, wurden HUVECs zunächst für 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen an Tenilsetam inkubiert. Das Ergebnis war, dass sich die Morphologie der Zellen von einem runden, kugeligen zu einem eher länglichen Phänotyp wandelte. Das geschah unabhängig davon, ob sich die HUVECs in der Wachstumsphase oder nahe der Konfluenz befanden. Je höher die Tenilsetam-Konzentration, desto stärker war der beobachtete Effekt. In Abb. 11 sind Zellen gezeigt, denen nach 3-tägiger Kultur im Vollmedium für einen weiteren Tag Tenilsetam zum Medium gegeben wurde. Da Tenilsetam in PBS gelöst wird, diente der Zusatz des gleichen Volumens an PBS als Kontrolle.

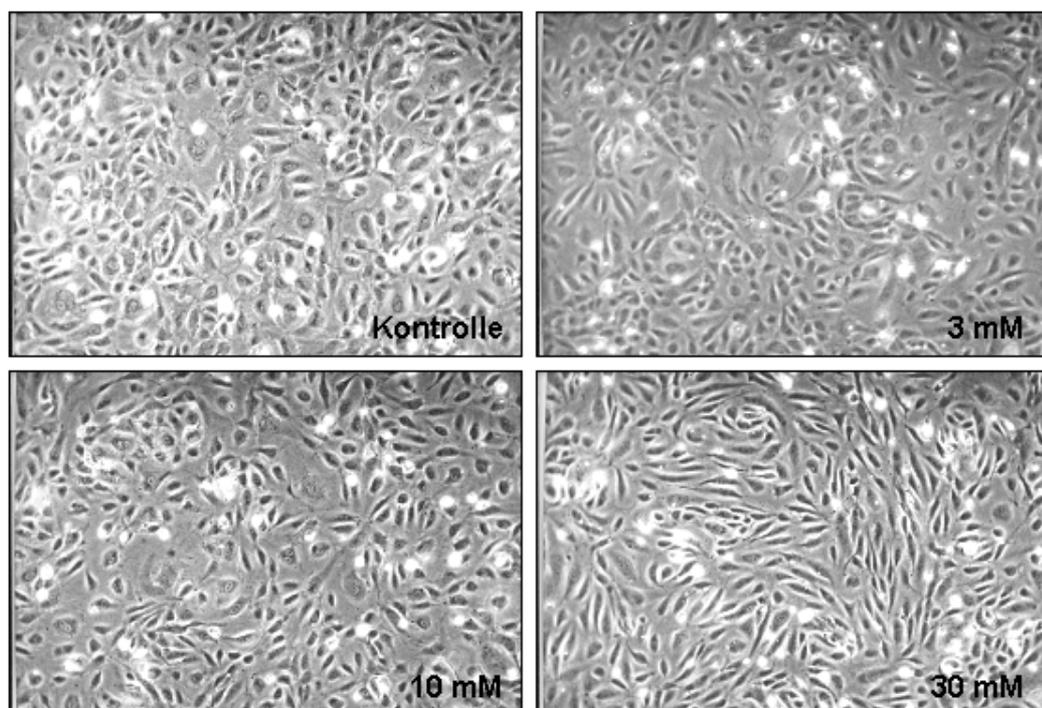


Abb. 11: Änderung der Morphologie von HUVECs durch Tenilsetam

Die Zellen wurden für 24h mit verschiedenen Konzentrationen an Tenilsetam inkubiert. Vergrößerung: 100fach.

Um festzustellen, ob Tenilsetam einen Effekt auf die Proliferation der Zellen ausübt, wurden sie nach der 24-stündigen Inkubation mit Tenilsetam abtrypsiniert, und ihre Zellzahl mit Hilfe des Zellzählers CASY 1 ermittelt.

Das Ergebnis zeigt (Abb. 12), dass die Zellzahl mit steigender Tenilsetam-Konzentration deutlich abnimmt ($p = 0.004$).

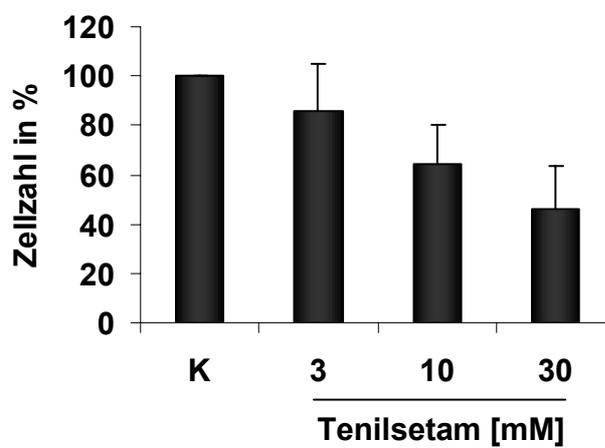


Abb. 12: Zellzahl von HUVECs nach 24-stündiger Behandlung mit Tenilsetam

Die Ergebnisse sind in Prozent zur Kontrolle (K) dargestellt. MW \pm SD (n = 5).

Tab. 3: Paarweise Vergleiche (LSD-Test) zu Abb. 12

	Kontrolle	3 mM	10 mM	30 mM
Kontrolle		0.101	0.047*	0.034*
3 mM	0.101		0.107	0.061
10 mM	0.047*	0.107		0.035*
30 mM	0.034*	0.061	0.035*	

* die gekennzeichneten p-Werte zeigen deutliche Unterschiede

Wurden HUVECs über einen längeren Zeitraum mit Tenilsetam inkubiert, so wurde dieser Effekt noch deutlicher: Abb. 13 zeigt Endothelzellen nach einer 4-tägigen Inkubation mit Tenilsetam.

Da die Substanz licht- und sauerstoffempfindlich ist, wurde das Medium nach zwei Tagen Kultur gewechselt und frisches Tenilsetam für weitere zwei Tage zugegeben.

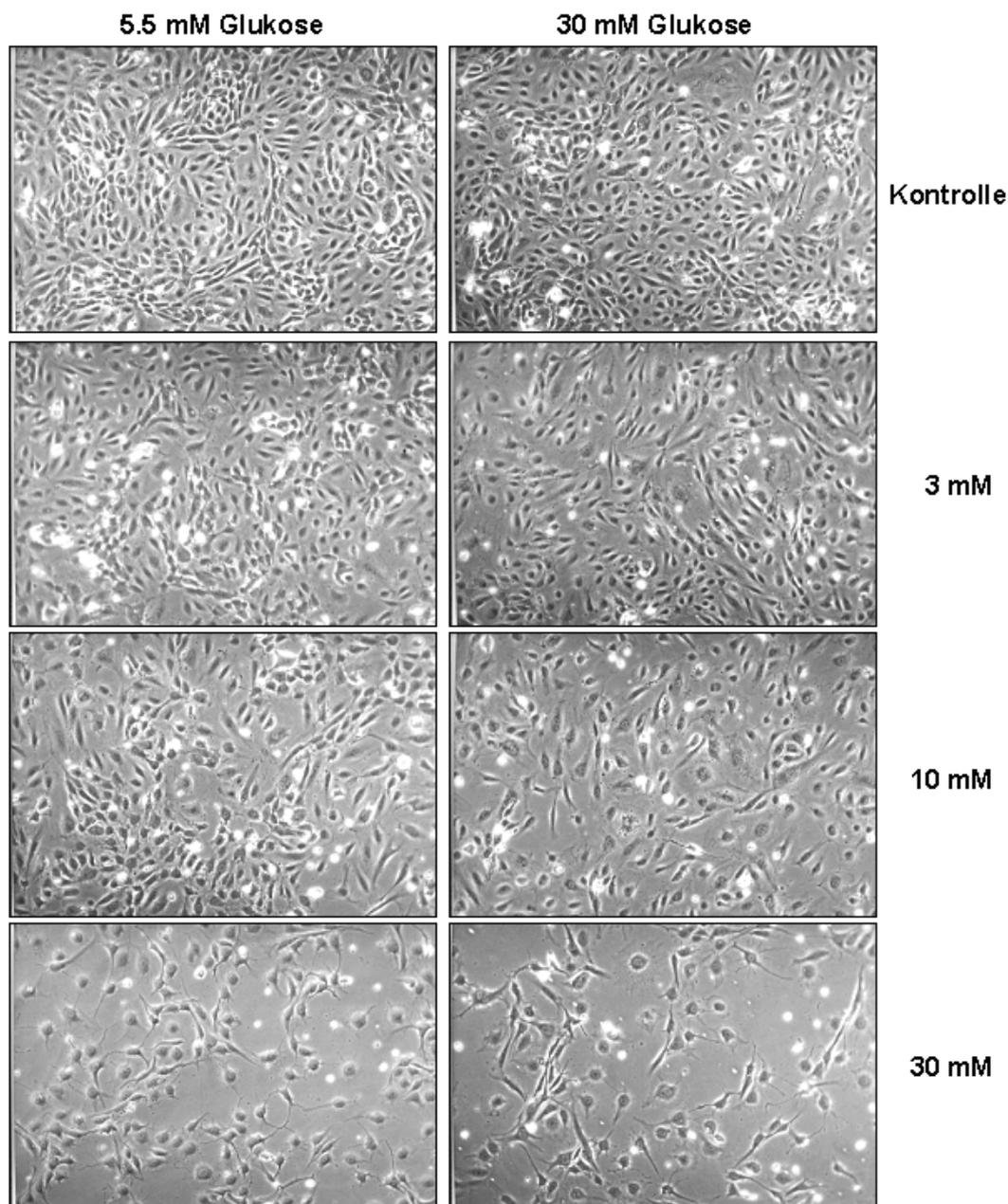


Abb. 13: Morphologie von HUVECs nach 4-tägiger Behandlung mit Tenilsetam

Die Angaben 3, 10 und 30 mM rechts neben der Abbildung beziehen sich auf die eingesetzte Tenilsetam-Konzentration. Die Inkubation erfolgte unter normalen (5.5 mM Glukose) und hyperglykämischen (30 mM Glukose) Bedingungen. Vergrößerung: 100fach.

Die HUVECs sahen nach den vier Tagen gesund aus, es schwammen kaum abgekugelte Zellen umher, ihre Struktur war glatt und der Phänotyp zumeist kugelig oder leicht

länglich. Auffällig war, dass die Zellen umso mehr Zellfortsätze ausbildeten, je höher die Tenilsetam-Konzentration war.

Um den Effekt einer erhöhten Glukose-Konzentration – ähnlich der diabetischen Stoffwechsellage – zu untersuchen, wurden die Zellen in vielen Experimenten nicht nur in Medium mit normaler Glukose-Konzentration (5.5 mM Glukose) kultiviert, sondern auch in Medium, welchem zusätzlich Glukose zugesetzt wurde, so dass eine Endkonzentration von 30 mM Glukose erreicht wurde. Da in allen hier durchgeführten Experimenten kein Unterschied im Zellverhalten zwischen normaler (NG) und hoher (HG) Glukosekonzentration zu verzeichnen war, werden im Folgenden nur die Ergebnisse unter NG-Bedingungen gezeigt. Im Anhang sind jedoch gleichfalls die Ergebnisse unter HG-Bedingung aufgeführt.

Die Zellzahlbestimmung nach 4-tägiger Inkubation mit Tenilsetam bestätigte die proliferationshemmende Wirkung der Substanz: Wird die Zellzahl der unbehandelten Kontrolle gleich 100 % gesetzt, so liegt die Zellzahl nach Inkubation mit 3 mM Tenilsetam nur noch halb so hoch (46 % NG, bzw. 63 % HG). Je höher die Tenilsetam-Konzentration und je länger die Inkubationsperiode, umso deutlicher wird der antiproliferative Effekt (Abb. 14). Nach 6-tägiger Inkubation mit 3 mM Tenilsetam liegt die Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle bei nur noch 38 % (NG), bzw. 35 % (HG).

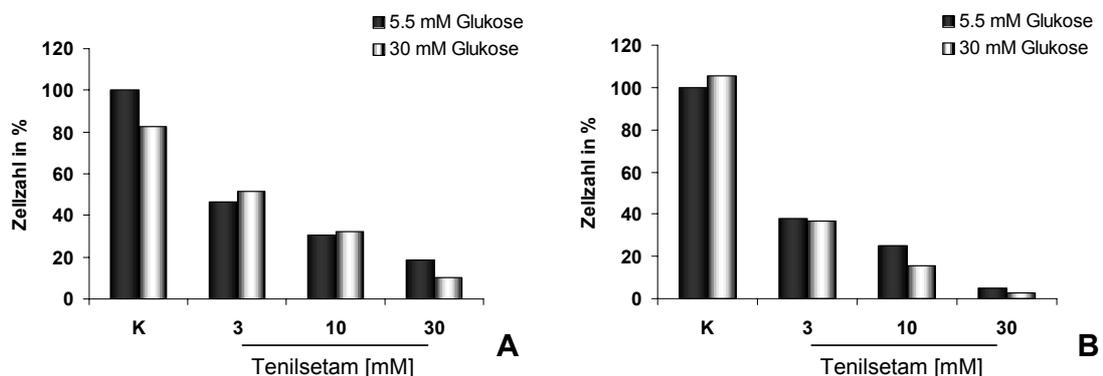


Abb. 14: Zellzahlbestimmung bei HUVECs

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte nach 4-tägiger (A), bzw. 6-tägiger (B) Behandlung mit Tenilsetam unter normalen und hyperglykämischen Bedingungen (n = 1).

Wird die Proliferation von HUVECs durch Zugabe von 10 % FCS stimuliert, so wird der hemmende Effekt von Tenilsetam sogar noch prägnanter. Untersucht wurde dieser Zusammenhang mit Hilfe eines Tests, in dem HUVECs in 96-Well-Platten ausgesät wurden und nach 3-tägiger Wachstumsphase in Vollmedium entweder in Medium mit 0.2 % oder 10 % FCS kultiviert wurden. Dem Ansatz wurden 3, 10 oder 30 mM Tenilsetam bzw. PBS als Kontrolle zugesetzt. Nach 48 Stunden wurde die Quantität an Zellen über die optische Dichte bei 590 nm bestimmt.

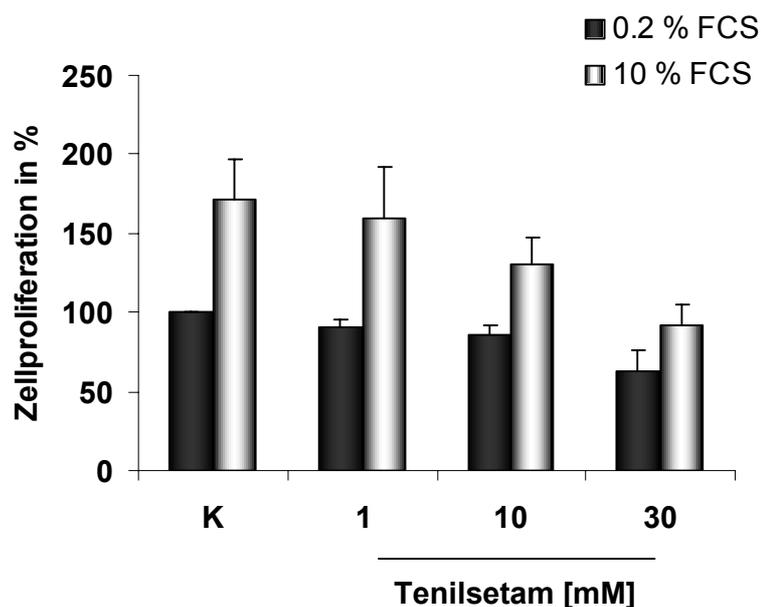


Abb. 15: Hemmung der Zellproliferation durch Tenilsetam

Die Abbildung zeigt die basale (dunkle Balken) und durch 10 % FCS stimulierte (helle Balken) Proliferation von HUVECs nach 48-stündiger Behandlung mit Tenilsetam. MW \pm SD (n = 3, jeweils mit 3-6-facher Wiederholungsmessung).

Tab. 4: Paarweise Vergleiche (LSD-Test) zu Abb. 15

0.2 % FCS	Kontrolle	1 mM	10 mM	30 mM
Kontrolle		0.406	0.063	0.001*
1 mM	0.406		0.073	0.039*
10 mM	0.063	0.073		0.071
30 mM	0.001*	0.039*	0.071	
10 % FCS				
Kontrolle		0.650	0.083	0.002*
1 mM	0.650		0.003*	0.035*
10 mM	0.083	0.003*		0.096
30 mM	0.002*	0.035*	0.096	

* die gekennzeichneten p-Werte zeigen deutliche Unterschiede

Die Ergebnisse zeigen (Abb. 15), dass Zellen, die mit 10 % FCS behandelt werden, deutlich stärker proliferieren als Zellen, die mit 0.2 % FCS behandelt werden ($p = 0.008$). Global gibt es einen Einfluss der Tenilsetam-Konzentration ($p = 0.001$), der von der Bedingung abhängig ist, unter der die Zellen kultiviert wurden. Der antiproliferative Effekt von Tenilsetam macht sich deutlicher bemerkbar, wenn die Zellen mit 10 % FCS inkubiert werden ($p = 0.003$). Tab. 4 präsentiert das Ergebnis des verwendeten Anschlussstests (LSD-Test) und zeigt die statistisch relevanten Unterschiede zwischen den Tenilsetam-Konzentrationen im Paarvergleich auf.

Da die Proliferation von Zellen immer auch eine Vermehrung von DNA bedeutet, wurde untersucht, inwieweit die DNA-Synthese durch Tenilsetam-Zusatz beeinflusst wird. Als Versuchsansatz dienten HUVECs, die für 24 Stunden in An- oder Abwesenheit von Tenilsetam, bzw. VEGF kultiviert wurden. Die basale DNA-Synthese – ohne Zusatz von Tenilsetam oder VEGF – wurde gleich 100 % gesetzt und mit der DNA-Synthese unter Tenilsetam- und/oder VEGF-Einfluss verglichen (Abb. 16).

Zellen, die mit VEGF inkubiert werden, weisen tendenziell eine stärkere DNA-Synthese auf, als Zellen, die ohne VEGF inkubiert werden ($p = 0.105$). Insgesamt nimmt die DNA-Synthese mit steigender Tenilsetam-Konzentration deutlich ab ($p = 0.002$).

Bereits die Zugabe von 3 mM Tenilsetam bewirkt eine Abnahme der basalen DNA-Synthese um 24 %. Die durch VEGF stimulierte DNA-Synthese wird hier um 31 % reduziert. Ab einer Konzentration von 10 mM Tenilsetam wird die durch VEGF stimulierte Mehrsynthese von DNA vollständig gehemmt, nach Inkubation mit 30 mM Tenilsetam ist sowohl die basale, als auch die stimulierte DNA-Synthese um 90 % gegenüber der Kontrolle reduziert. Generell ist der Konzentrationseffekt von Tenilsetam trendweise höher, wenn die Zellen mit VEGF inkubiert werden. ($p = 0.052$).

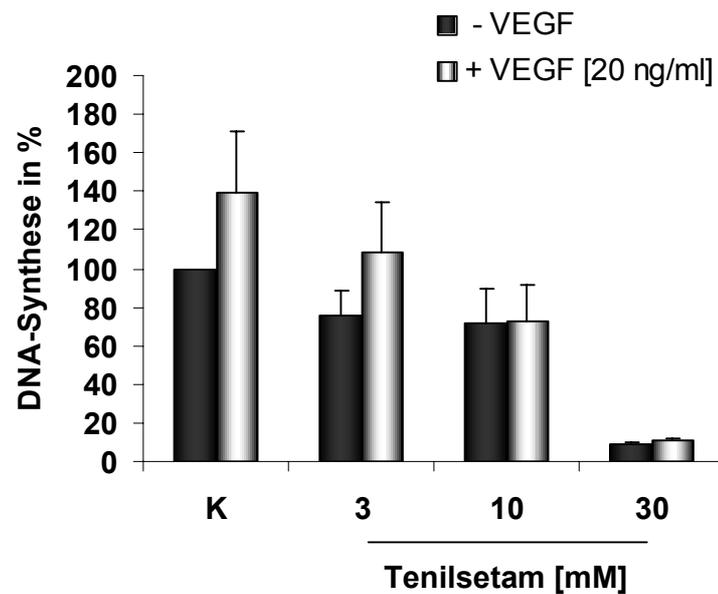


Abb. 16: Hemmung der DNA-Synthese von HUVECs durch 24-stündige Behandlung mit Tenilsetam.

Die Zellen wurden mit 3, 10 und 30 mM Tenilsetam inkubiert und ihr Wachstum mit (helle Balken) und ohne (dunkle Balken) Zugabe von VEGF ermittelt. Die basale DNA-Synthese der Zellen (ohne Zusatz von VEGF und Tenilsetam) wurde gleich 100 % gesetzt und mit der DNA-Synthese unter VEGF- und/oder Tenilsetam-Einfluss verglichen. MW \pm SD (n = 3, jeweils mit 2-6-facher Wiederholungsmessung).

Tab. 5: Paarweise Vergleiche (LSD-Test) zu Abb. 16

Ohne VEGF	Kontrolle	3 mM	10 mM	30 mM
Kontrolle	-	-	0.106	0.029*
3 mM	-	-	-	-
10 mM	0.106	-	-	0.011*
30 mM	0.029*	-	0.011*	-
Mit VEGF				
Kontrolle	-	-	0.010*	0.020*
3 mM	-	-	-	-
10 mM	0.010*	-	-	0.046*
30 mM	0.020*	-	0.046*	-

* die gekennzeichneten p-Werte zeigen deutliche Unterschiede

(-) nicht auswertbar, da zu geringe Wiederholungsmessung

3.1.2 Tenilsetam induziert weder Apoptose noch Nekrose von HUVECs

Die verminderte Zellzahl nach Tenilsetam-Inkubation kann bedeuten, dass ein Teil der Endothelzellen apoptotisch oder nekrotisch wird. Diesem möglichen Zusammenhang wurde in zwei voneinander unabhängigen Versuchen nachgegangen.

Zunächst wurden HUVECs entweder auf Gelatine- oder BSA-beschichtete Zellkulturschalen ausgesät und jeweils für 20 Stunden mit 3 oder 10 mM Tenilsetam behandelt. Einem Teil der Zellen, die auf Gelatine kultiviert wurden, wurde vier Stunden vor Versuchsende 1 μM Staurosporin hinzugegeben. Sowohl die Verhinderung der Zelladhäsion (durch die BSA-Beschichtung), als auch die Zugabe des unspezifischen PKC-Inhibitors Staurosporin diente der Apoptose-Induktion (Positivkontrollen).

Die in Abb. 17 dargestellten Ergebnisse weisen auf eine leichte Erhöhung der Apoptoserate unter Tenilsetam-Einfluss hin.

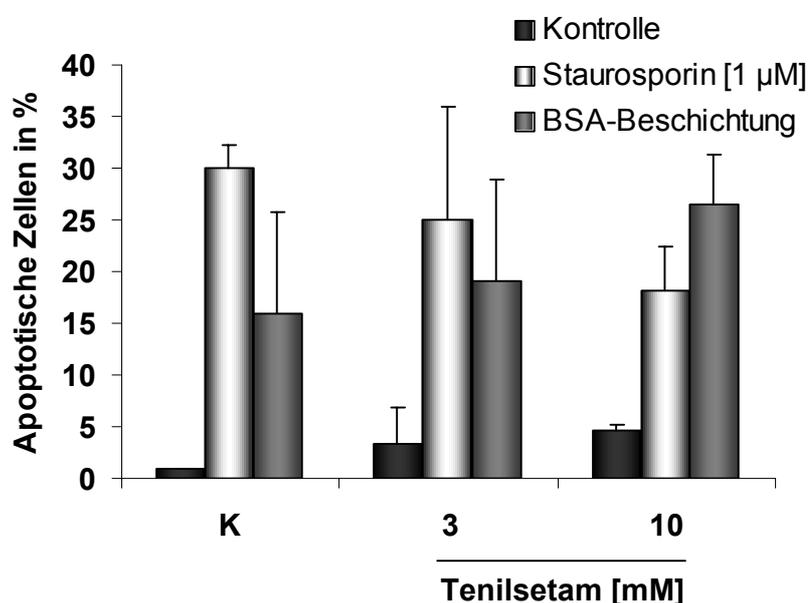


Abb. 17: Apoptoserate von HUVECs unter Tenilsetam-Einfluss mit und ohne Apoptose-Induktion durch Staurosporin oder BSA-Beschichtung

Die Zellen wurden für 20 Stunden mit 3 und 10 mM Tenilsetam inkubiert. Die Apoptose-Induktion erfolgte entweder durch den Zusatz von 1 μM Staurosporin oder durch Kultivierung auf BSA-beschichteten Wells. Zellen, die nicht mit Tenilsetam behandelt wurden, dienten als Kontrolle (K). MW \pm SD (n = 1, 2-fache Wiederholungsmessung).

Verglichen mit der Staurosporin- und der BSA-Gruppe, ist der Prozentsatz apoptotischer Zellen in der Tenilsetam-Gruppe jedoch sehr gering: Nach 20-stündiger Inkubation mit 3 mM und 10 mM Tenilsetam liegt der Prozentsatz apoptotischer Zellen bei 3.3 %, bzw. 4.7 %. Wird zusätzlich die Apoptose durch Staurosporin oder BSA-Beschichtung induziert, so liegt der Prozentsatz apoptotischer Zellen deutlich höher (25.1 % und 18.1 % nach Zusatz von 1 μ M Staurosporin, bzw. 19.1 % und 26.4 % bei HUVECs, die auf BSA-beschichtete Wells ausgesät wurden).

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass Tenilsetam die Apoptose-Induktion durch Staurosporin leicht hemmt, und dass umgekehrt die Apoptose-Induktion über die Verhinderung der Zelladhäsion durch gleichzeitige Gabe von Tenilsetam verstärkt wird. Allerdings lassen die starken Schwankungen zwischen den beiden Wiederholungsmessungen und der geringe Stichprobenumfang keine Verallgemeinerung zu. Für eine derartige Aussage sind weiterführende Untersuchungen von Nöten.

Zelltrümmer, die mit Propidiumiodid markiert werden, weisen auf einen nekrotischen Prozess hin. Abb. 18 zeigt, dass der Prozentsatz nekrotischer Zellbestandteile in der unbehandelten Kontrolle bei 3.4 % liegt. Die Zugabe von 3 und 10 mM Tenilsetam bewirkt keine deutliche Zunahme dieses Prozentsatzes (5.2 % und 2.4 %). Der Zusatz von Staurosporin hingegen erhöht in diesem Versuch nicht nur die Anzahl apoptotischer Zellen, sondern auch die Anzahl an Zellen, die nekrotisch werden (9 % in der Kontrolle). Die Zugabe von 3 und 10 mM Tenilsetam erhöht diesen Prozentsatz weiter auf 10.8 %, bzw. auf 15.4 %. Die Zellen, die auf BSA-Beschichtung gehalten werden, sind in ihrem Prozentsatz nekrotischer Zelltrümmer mit der Staurosporin-Gruppe vergleichbar. Auch hier bewirkt Tenilsetam eine weitere Verstärkung der Nekrose.

Nach der vorliegenden Untersuchung scheint Tenilsetam weder einen stark anti-apoptotischen noch einen stark pro-apoptotischen Effekt während der Apoptose-Induktion auf Endothelzellen auszuüben. Allerdings erhöht die Substanz den Prozentsatz nekrotischer Zellen bei gleichzeitiger Apoptose-Induktion durch Staurosporin oder BSA-Beschichtung.

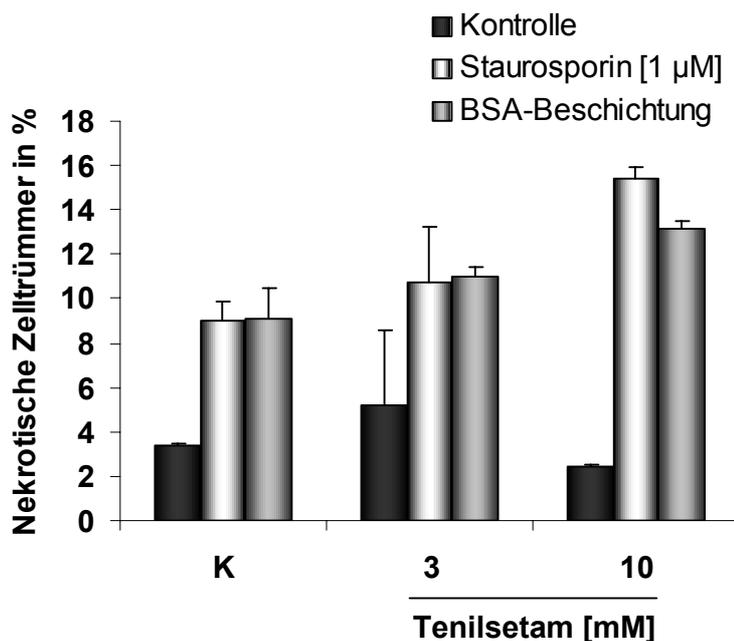


Abb. 18: Prozentsatz nekrotischer Zelltrümmer in An- und Abwesenheit von Tenilsetam sowie mit und ohne Apoptose-Induktion durch Staurosporin oder BSA-Beschichtung

Die Zellen wurden für 20 Stunden mit 3 und 10 mM Tenilsetam inkubiert. Die Apoptose-Induktion erfolgte entweder durch den Zusatz von 1 µM Staurosporin oder durch Kultivierung auf BSA-beschichteten Wells. Zellen, die nicht mit Tenilsetam behandelt wurden, dienten als Kontrolle (K). MW ± SD (n = 1, 2-fache Wiederholungsmessung).

In einem zweiten Versuch wurde überprüft, ob der Einsatz von 30 mM Tenilsetam zu einer weiteren Steigerung der Apoptose- und/oder Nekroserate bei HUVECs führt. Tatsächlich erhöht sich der Prozentsatz apoptotischer Zellen von 0.5 ± 0.6 % (Kontrolle), über 1.5 ± 1.0 % (3 mM Tenilsetam), bzw. 2.0 ± 0.7 % (10 mM Tenilsetam), auf 8.2 ± 4.3 % nach Inkubation mit 30 mM dieser Substanz (Abb. 19). Im Vergleich dazu lag der Prozentsatz apoptotischer Endothelzellen die auf BSA-beschichteten Platten kultiviert wurden bei 13.6 ± 10.4 % und die mit 1 µM Staurosporin behandelt wurden bei 46.5 ± 22.5 %.

Der Anteil nekrotischer Zellen lag in diesem zweiten Versuch deutlich niedriger: In der unbehandelten Kontrolle sind nur 0.7 ± 0.2 % der Zellen, bzw. Zelltrümmer mit Propidiumiodid markiert. Der Zusatz von 30 mM Tenilsetam hebt diesen Prozentsatz auf 2.1 ± 0.2 %, der Zusatz von Staurosporin auf 3.2 ± 0.2 % und die BSA-Beschichtung erhöht die Nekrose bei HUVECs auf 4.2 ± 1.6 %.

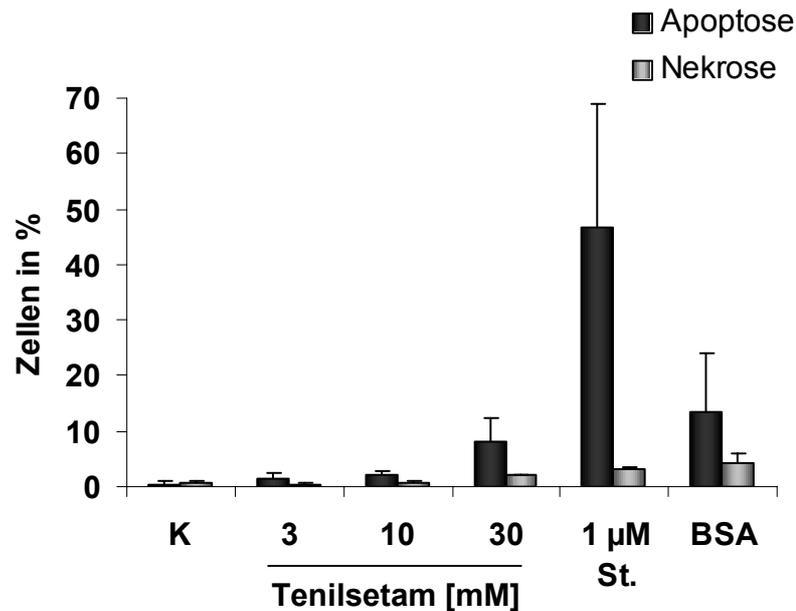


Abb. 19: Apoptose- und Nekroserate von HUVECs unter dem Einfluss von Tenilsetam, bzw. Staurosporin sowie nach Kultivierung auf BSA-beschichteten Wells

Die Zellen wurden über 20 Stunden mit 3, 10 und 30 mM Tenilsetam oder für 4 Stunden mit 1 µM Staurosporin (Positivkontrolle) inkubiert. Die Verhinderung der Zelladhäsion durch Kultivierung auf BSA-beschichteten Wells diente als zusätzliche Positivkontrolle. Zellen, die keinerlei Behandlung unterzogen wurden, bildeten die Negativkontrolle (K). Die dunklen Balken zeigen den Prozentsatz apoptotischer Zellen, die hellen Balken den Prozentsatz nekrotischer Zelltrümmer. MW ± SD (n = 1, 2-fache Wiederholungsmessung).

Indes erklärt eine Apoptoserate von 8.2 % und eine Nekroserate von 2.1 % nach 20-stündiger Tenilsetam-Inkubation nicht die um 50 % inhibierte Proliferation oder die um 90 % reduzierte DNA-Synthese von HUVECs nach 24-stündiger Inkubation mit 30 mM Tenilsetam. Die Hemmung der Zellproliferation kann offensichtlich nicht allein durch eine erhöhte Apoptose- oder Nekrose-Induktion erklärt werden.

3.1.3 Hohe Tenilsetam-Konzentrationen nehmen Einfluss auf das Adhäsionsverhalten von HUVECs

Um zu untersuchen, ob Tenilsetam in der Lage ist, die Adhäsion von Endothelzellen an eine Matrix zu verändern, wurden zwei Bedingungen gewählt: Zum einen wurde Tenilsetam direkt mit der Zellsuspension vermischt und überprüft, ob dadurch Zellen ihr Adhäsionsverhalten verändern. Zum anderen wurde untersucht, ob Zellen, die über einen Zeitraum von 24 Stunden mit Tenilsetam inkubiert wurden, ein anderes Adhäsionsverhalten zeigen als Zellen, die nur mit der gleichen Menge an PBS in Kontakt kamen.

Die direkte Zugabe von Tenilsetam zur Zellsuspension bewirkte eine leichte, konzentrationsabhängige Abnahme der Adhäsion an FCS-beschichtete Wells (Abb. 20): In Anwesenheit von 30 mM Tenilsetam adhärten durchschnittlich 15 % weniger Zellen. Unter den gleichen Bedingungen wurde ein weiterer Versuch durchgeführt, jedoch fand die Adhäsion hier nicht an FCS-beschichtete Wells, sondern an eine Gelatine-Beschichtung statt. Werden die Kontrollen der drei Versuche gleich 100 % gesetzt (Abb. 20), so zeigt sich, dass die Endothelzellen generell stärker an Gelatine adhäreren, als an die komplexe FCS-Beschichtung.

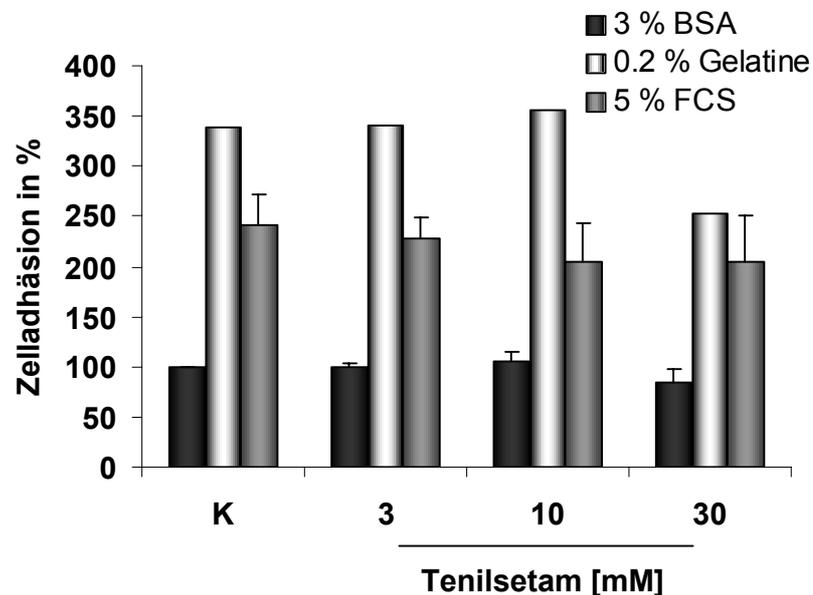


Abb. 20: Adhäsion von HUVECs auf BSA-, FCS- bzw. Gelatine-beschichteten Wells in Anwesenheit von Tenilsetam

Frisch passagierte Zellen wurden in serumfreiem Medium resuspendiert und in die mit BSA-, FCS- bzw. Gelatine-beschichteten Wells pipettiert. Diesem Ansatz wurden 3, 10, bzw. 30 mM Tenilsetam oder PBS als Kontrolle (K) zugegeben. Nach einer Stunde wurden die nicht-adhären Zellen abgewaschen und die adhären Zellen fixiert, gefärbt und über die OD_{590} quantifiziert. Die Ergebnisse sind in Prozent zur Kontrolle (K) dargestellt. $MW \pm SD$ ($n = 3$ (BSA), $n = 1$ (Gelatine), $n = 2$ (FCS), mit jeweils 3-7-facher Wiederholungsmessung).

Abgesehen von einer um 26 % verringerten Zelladhäsion in der höchsten Konzentration, bewirkte Tenilsetam in diesem Versuch kein reduziertes Adhäsionsverhalten. Die Adhäsion an BSA-beschichtete Wells unter der Einflussnahme von 3 und 10 mM Tenilsetam blieb in allen drei Versuchen unverändert. Nur in der hohen Konzentration von 30 mM kam es auch hier zu einer Abnahme der Zelladhäsion um 15 %.

Aufgrund dieser Tatsache sowie des geringen Stichprobenumfangs liegt die Schlussfolgerung nahe, dass der Zusatz von Tenilsetam zur Zellsuspension keinen offensichtlichen Einfluss auf den Adhäsionsprozess hat.

Anders ist die Situation, wenn HUVECs erst für 24 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen an Tenilsetam vorbehandelt werden (Abb. 21). Diese präinkubierten Endothelzellen adhärten mit steigender Tenilsetam-Konzentration tendenziell stärker an Gelatine-beschichtete Kulturschalen ($p = 0.093$). Nach der Präinkubation mit 30 mM Tenilsetam war die Adhäsion um 29 % gegenüber der unbehandelten Kontrolle erhöht. Zellen, die nach der Vorbehandlung mit Tenilsetam auf FCS-beschichteten Wells ausplattiert wurden, adhärten dagegen um 49 % (10 mM), bzw. um 40 % (30 mM) stärker, als ihre unbehandelte Kontrolle.

Erstaunlicherweise adhärten die Endothelzellen mit ansteigender Konzentration auch stärker an der Oberfläche, die dem Versuch als Negativkontrolle dient, d.h. an BSA-beschichtete Wells ($p = 0.006$): Verglichen mit der unbehandelten Kontrolle, adhärten 29 % mehr Zellen, wenn sie mit 10 mM und 80 % mehr Zellen, wenn sie mit 30 mM Tenilsetam präinkubiert wurden (siehe auch Tab. 6). Generell ist die Adhäsion von HUVECs an FCS und Gelatine deutlich stärker als an BSA-beschichtete Wells ($p < 0.001$).

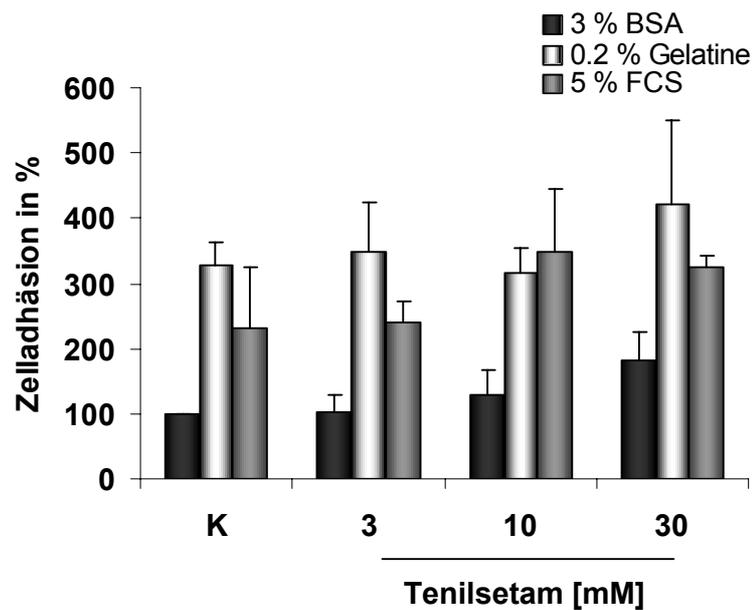


Abb. 21: Adhäsion von HUVECs auf BSA- bzw. FCS-beschichteten Wells nach 24-stündiger Vorbehandlung mit Tenilsetam

Die Zellen wurden zunächst für 24 Stunden mit 3, 10, bzw. 30 mM Tenilsetam oder PBS als Kontrolle (K) inkubiert. Vor Versuchsbeginn wurden sie abtrypsiniert, gewaschen und in serumfreien Medium auf BSA-, FCS-, bzw. Gelatine-beschichteten Wells ausplattiert. Nach einer Stunde wurden die nicht-adhärenenten Zellen abgewaschen und die adhärenenten fixiert, gefärbt und über die OD_{590} quantifiziert. Die Ergebnisse sind in Prozent zur Kontrolle (K) dargestellt. MW \pm SD (n = 5 (BSA), n = 3 (Gelatine), n = 2 (FCS), jeweils mit 3-12-facher Wiederholungsmessung).

Tab. 6: Paarweise Vergleiche (LSD-Test) der Adhäsion auf BSA-Beschichtung zu Abb. 21

	Kontrolle	3 mM	10 mM	30 mM
Kontrolle		0.588	0.155	0.026*
3 mM	0.588		0.259	0.041*
10 mM	0.155	0.259		0.046*
30 mM	0.026*	0.041*	0.046*	

* die gekennzeichneten p-Werte zeigen deutliche Unterschiede

3.1.4 Hohe Tenilsetam-Konzentrationen fördern die Migration von HUVECs

Wie schon bei den Versuchen zur Adhäsion, wurde bei den Versuchen zur Zellmigration der Aspekt der Präinkubation berücksichtigt. Das bedeutet, dass der Versuch sowohl mit als auch ohne 24-stündige Tenilsetam-Vorbehandlung der HUVECs durchgeführt wurde.

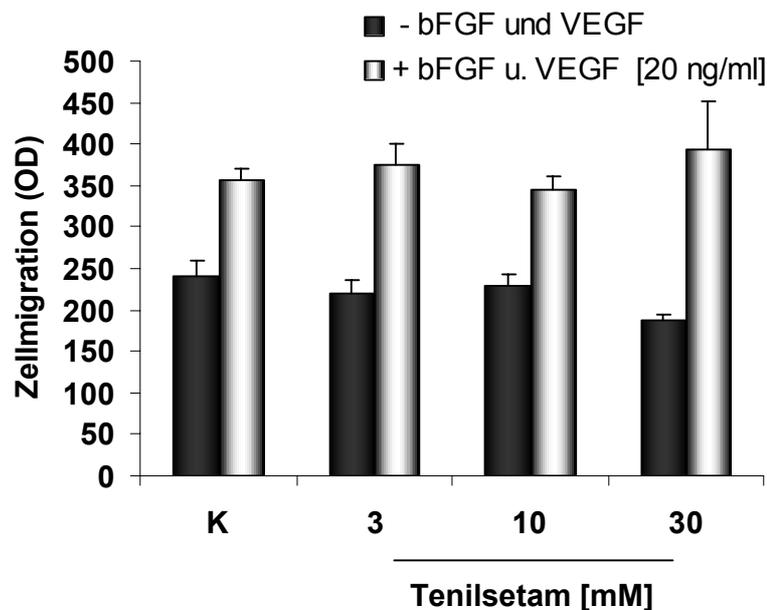


Abb. 22: Migrationsverhalten von HUVECs in Anwesenheit von Tenilsetam

Frisch passagierte Zellen wurden in Medium mit 0.2 % FCS aufgenommen und mit 3, 10 oder 30 mM Tenilsetam, bzw. dem äquivalenten Volumen PBS als Kontrolle (K) versetzt. Die Zellen wurden auf die Polycarbonatmembran der Chemotaxis-Kammer ausgesät und bei 37°C inkubiert. Die unteren Wells enthielten entweder nur Medium mit 0.2 % FCS (basale Migration) oder Medium mit bFGF und VEGF (Stimulation der Migration). Nach 4 Stunden wurden die migrierten Zellen auf der Unterseite der Membran fixiert, gefärbt und quantifiziert. MW \pm SD (n = 1, jeweils mit 4-6-facher Wiederholungsmessung).

Abb. 22 zeigt das Ergebnis eines Versuchs, bei dem Tenilsetam direkt vor Versuchsbeginn zur Zellsuspension gegeben wurde. Die dunklen Balken des Diagramms repräsentieren die basale Migrationsrate von Zellen (ohne chemotaktischen Stimulus), wohingegen die hellen Balken die Migrationsrate der Zellen in Antwort auf die chemotaktisch aktiven Wachstumsfaktoren bFGF und VEGF zeigen. Es scheint, dass sich die Migrationsrate unter dem direkten Einfluss von 3 und 10 mM Tenilsetam nicht erheblich verändert. Es ist erneut die Konzentration von 30 mM, die einen gewissen Effekt auf die Zellen ausübt: Die basale Migrationsrate wurde um 22 % gesenkt und die stimulierte Migration um 10 % gesteigert.

Zellen, die mit verschiedenen Konzentrationen an Tenilsetam präinkubiert wurden, migrieren offensichtlich geringfügig stärker als unbehandelte Zellen (Abb. 23), allerdings ist dieser Konzentrationseffekt statistisch nicht bedeutsam ($p = 0.666$). Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erhöht sich die basale Migrationsrate um 10 % (3 mM), 15 % (10 mM), bzw. um 23 % nach Präinkubation mit 30 mM Tenilsetam.

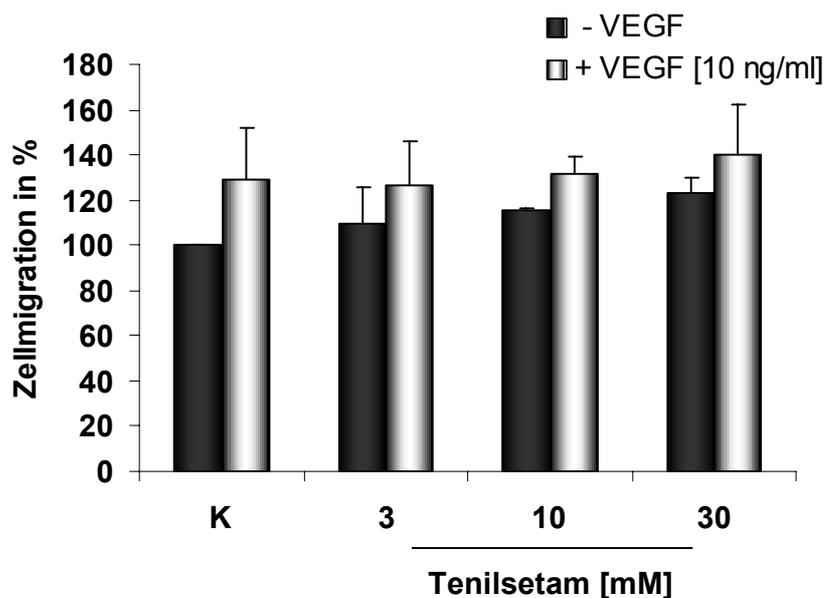


Abb. 23: Migrationsverhalten von HUVECs nach 24-stündiger Vorbehandlung mit Tenilsetam

Die Zellen wurden zunächst für 24 Stunden mit 3, 10, bzw. 30 mM Tenilsetam oder PBS als Kontrolle (K) inkubiert. Die Zellen wurden auf die Polycarbonatmembran der Chemotaxis-Kammer ausgesät und bei 37°C inkubiert. Die unteren Wells enthielten entweder nur Medium (basale Migration) oder Medium mit VEGF (Stimulation der Migration). Nach 4 Stunden wurden die migrierten Zellen auf der Unterseite der Membran fixiert, gefärbt und quantifiziert. Die Ergebnisse sind in Prozent zur Kontrolle (K) dargestellt. MW \pm SD ($n = 3$, jeweils mit 2-3-facher Wiederholungsmessung)

Tab. 7: Paarweise Vergleiche (LSD-Test) zu Abb. 23

Ohne VEGF	Kontrolle	3 mM	10 mM	30 mM
Kontrolle		0.452	0.072	0.104
3 mM	0.452		0.564	0.300
10 mM	0.072	0.564		0.162
30 mM	0.104	0.300	0.162	
Mit VEGF				
Kontrolle		0.376	0.819	-
3 mM	0.376		0.546	-
10 mM	0.819	0.546		-
30 mM	-	-	-	

(-) nicht auswertbar, da zu geringe Wiederholungsmessung

Die leichte Erhöhung der zellulären Migrationsrate durch den Einfluss der Tenilsetam-Präinkubation liegt bei gleichzeitiger VEGF-Stimulation unter 10 %. Da die in allen drei Versuchen eingesetzte Menge an VEGF [10 ng/ml] sich als nicht ausreichend erwies, um die Migrationsrate signifikant gegenüber der basalen Migrationsrate zu erhöhen ($p = 0.145$), wurde anschließend ein weiterer Versuch durchgeführt, in dem sowohl VEGF als auch bFGF als chemotaktisches Agens fungierten (Abb. 24).

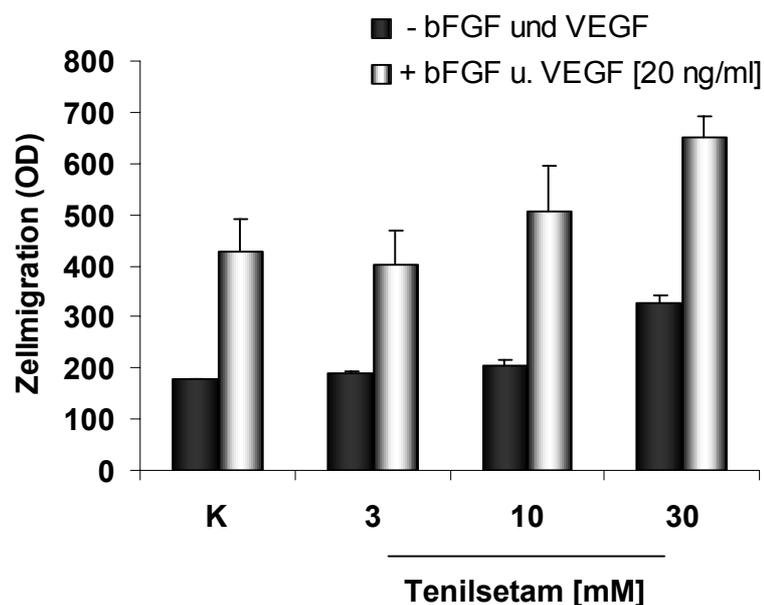


Abb. 24: Migrationsverhalten von HUVECs nach 24-stündiger Vorbehandlung mit Tenilsetam

Die Zellen wurden zunächst für 24 Stunden mit 3, 10, bzw. 30 mM Tenilsetam oder PBS als Kontrolle (K) inkubiert. Die Zellen wurden auf die Polycarbonatmembran der Chemotaxis-Kammer ausgesät und bei 37°C inkubiert. Die unteren Wells enthielten entweder nur Medium (basale Migration) oder Medium mit bFGF und VEGF (Stimulation der Migration). Nach 4 Stunden wurden die migrierten Zellen auf der Unterseite der Membran fixiert, gefärbt und quantifiziert. MW \pm SD ($n = 1$, jeweils mit 4-6-facher Wiederholungsmessung).

Dieser Versuch bestärkte die Annahme, dass die 24-stündige Präinkubation mit Tenilsetam das Migrationsverhalten von HUVECs verändert und zwar derart, dass sie nach Tenilsetam-Einfluss stärker migrieren als die unbehandelten Kontrollzellen. Sowohl die unstimulierten, als auch die stimulierten Zellen migrierten ab einer Tenilsetam-Konzentration von 10 mM stärker als die Zellen, die stattdessen nur mit PBS behandelt wurden. So erhöhte sich beispielsweise die Migrationsrate der mit VEGF und bFGF behandelten Zellen um 17 % nach Inkubation mit 10 mM Tenilsetam und um 51 % nach Inkubation mit 30 mM.

3.1.5 Tenilsetam beeinflusst die Expression von ICAM-1, aber nicht die von VCAM-1 und E-Selektin bei HUVECs

Das Zytokin IL-1 β wird vor allem von aktivierten mononukleären Phagozyten gebildet und ist ein wichtiger Vermittler der Entzündungsantwort bei der natürlichen Immunität. Auf Endothelzellen wirkt es u.a., indem es die Expression von Oberflächenmolekülen, welche die Leukozytenadhäsion vermitteln, verstärkt. Ruhendes Endothel exprimiert nur geringe Mengen dieser Adhäsionsmoleküle. Wird es jedoch durch Zytokine aktiviert, wird innerhalb weniger Stunden E-Selektin, VCAM-1 und ICAM-1 exprimiert, wodurch die Endothelzellen adhäsiv für Leukozyten werden.

Um zu untersuchen, ob Tenilsetam eine Wirkung auf die Expression dieser Adhäsionsmoleküle hat, wurden HUVECs auf 96-Well-Platten kultiviert, durch IL-1 β aktiviert und das Ausmaß der Molekülexpression über eine Antigen-Antikörper-Reaktion ermittelt. Tenilsetam wurde diesem Versuchsansatz in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt.

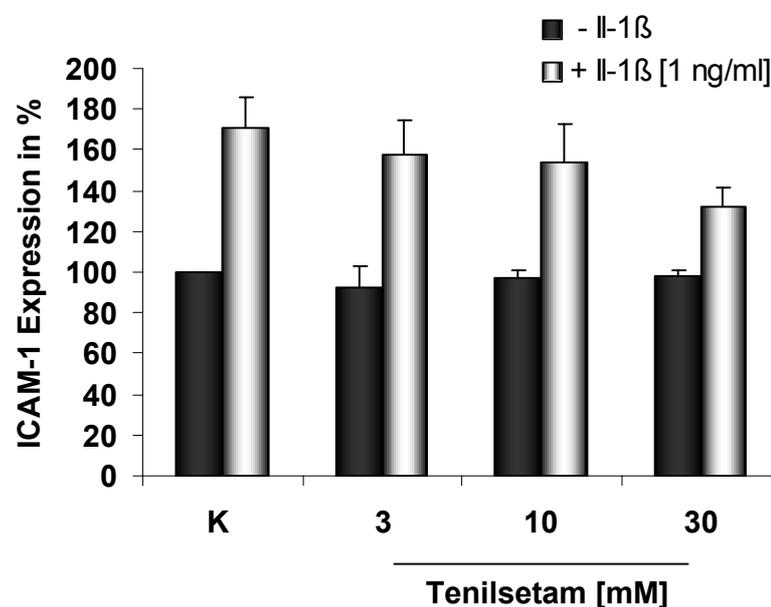


Abb. 25: Einfluss von Tenilsetam auf die Expression von ICAM-1 nach IL-1 β -Stimulation bei HUVECs

Die basale ICAM-1 Expression (dunkle Balken) wurde mit der stimulierten Expression (helle Balken) verglichen. Die Ergebnisse sind in Prozent zur Kontrolle (K) dargestellt. MW \pm SD (n = 2, jeweils mit 3-6-facher Wiederholungsmessung).

Wie in Abb. 25 dargestellt, erhöhte sich die ICAM-1 Expression nach der Zugabe von 1 ng/ml IL-1 β über einen Zeitraum von sechs Stunden um 70 % gegenüber der unstimulierten Kontrolle. Die basale ICAM-1 Expression wurde durch den gleichzeitigen Zusatz von Tenilsetam nicht verändert. Die durch IL-1 β induzierte Expression des Adhäsionsmoleküls wurde jedoch durch Tenilsetam konzentrationsabhängig leicht reduziert: Die Anwesenheit von 3 mM Tenilsetam verringerte die ICAM-1 Expression um 8 %, die von 10 mM Tenilsetam um 10 %, und der gleichzeitige Zusatz von 30 mM Tenilsetam reduzierte die ICAM-1 Expression um 22 % gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Aufgrund der geringen Anzahl an Versuchen (n = 2) konnte der beobachtete Effekt jedoch nicht statistisch abgesichert werden.

Die Expression von VCAM-1 erhöhte sich nach 6-stündiger Stimulation mit IL-1 β um 36 % gegenüber der unstimulierten Kontrolle (Abb. 26).

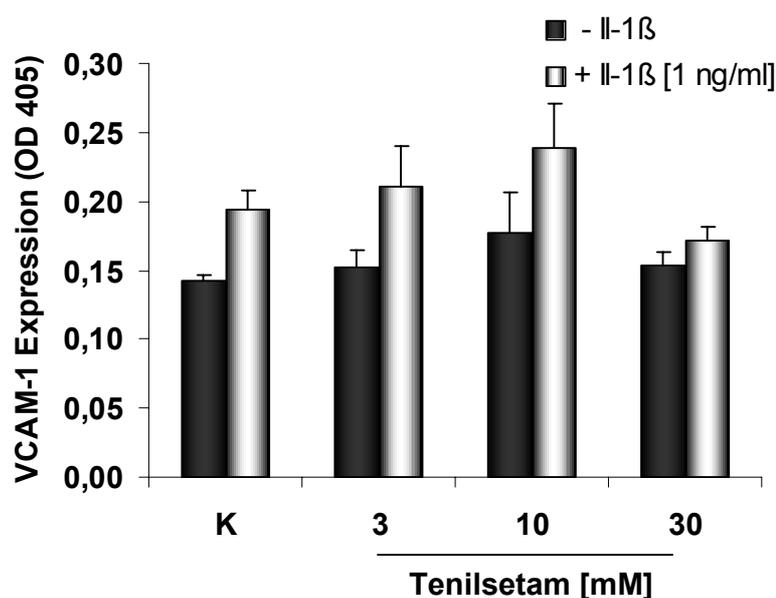


Abb. 26: Einfluss von Tenilsetam auf die Expression von VCAM-1 nach IL-1 β -Stimulation bei HUVECs

Die basale VCAM-1 Expression (dunkle Balken) wurde mit der stimulierten Expression (helle Balken) verglichen. Die Ergebnisse sind in Prozent zur Kontrolle (K) dargestellt. MW \pm SD (n = 1, jeweils mit 3-facher Wiederholungsmessung).

In diesem Fall wurde sowohl die basale, als auch die stimulierten Expression von VCAM-1 durch 3 und 10 mM Tenilsetam leicht erhöht: Prozentual steigerte sich die Expression nach gleichzeitigem Zusatz von 3 mM Tenilsetam um 6 % (basal), bzw. 8 % (stimuliert) und

nach Zusatz von 10 mM Tenilsetam jeweils um 24 %, bzw. 22 %. Der Zusatz von 30 mM Tenilsetam reduzierte die über IL-1 β stimulierte Mehrexpression von VCAM-1 um 12 % gegenüber der unbehandelten Kontrolle, und auch die basale VCAM-1 Expression wurde durch diese Konzentration nicht wesentlich beeinflusst.

Da alle Versuche zur Expression von Adhäsionsmolekülen ebenso in Medium mit 30 mM Glukose (HG) durchgeführt wurden (siehe Anhang) und die Ergebnisse bei diesen Untersuchungen in Bezug auf ICAM-1 und E-Selektin praktisch identisch mit den Untersuchungen in normaler Glukosekonzentration (NG) waren, kann der Versuch unter HG-Bedingungen zur VCAM-1 Expression als Interpretationshilfe der Ergebnisse unter NG-Bedingungen dienen: In Anwesenheit von hoher Glukose war der leichte Anstieg der VCAM-1 Expression sowohl bei nicht-aktivierten, als auch bei aktivierten Endothelzellen so gering, dass geschlussfolgert werden kann, dass Tenilsetam keinen Einfluss auf die VCAM-1 Expression ausübt.

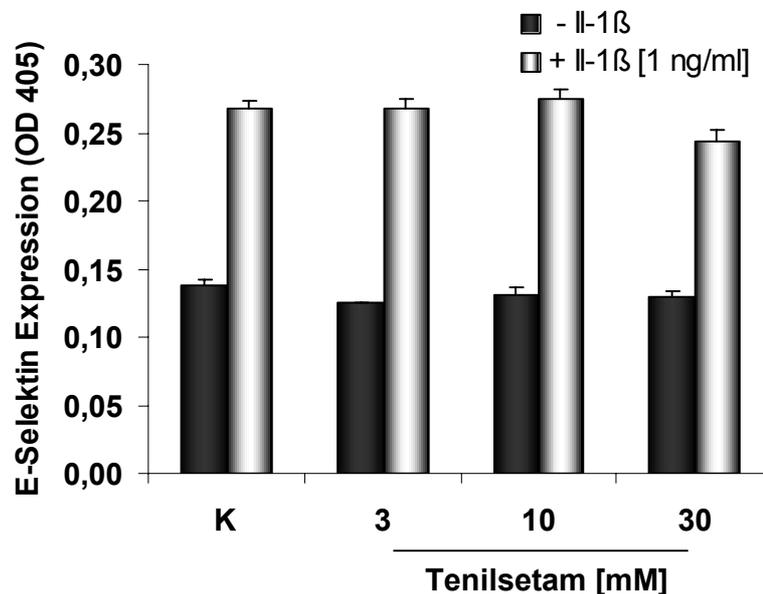


Abb. 27: Einfluss von Tenilsetam auf die Expression von E-Selektin nach IL-1 β -Stimulation bei HUVECs

Die basale ICAM-1 Expression (dunkle Balken) wurde mit der stimulierten Expression (helle Balken) verglichen. Die Ergebnisse sind in Prozent zur Kontrolle (K) dargestellt. MW \pm SD (n = 1, jeweils mit 3-facher Wiederholungsmessung).

Die Inkubation mit IL-1 β erhöhte die Expression von E-Selektin um 70 % gegenüber der basalen Expression von Endothelzellen (Abb. 27). Die Expression von E-Selektin wird durch die Zugabe von verschiedenen Konzentrationen an Tenilsetam offensichtlich nicht beeinflusst.

3.1.6 Tenilsetam fördert das Aussprossen von BRECs

Neben der Adhäsion, Migration und Proliferation ist besonders das Sprouten von Endothelzellen bei der Gefäßneubildung von Bedeutung. Um zu untersuchen, ob Tenilsetam Einfluss auf diesen initialen Schritt der Angiogenese nimmt, wurden Endothelzellen auf Dextranskugeln ausgesät, in eine Fibrinmatrix eingebettet und die Ausbildung von Sprouts durch Zugabe von 2 ng/ml bFGF stimuliert.

Das Ergebnis zeigt (Abb. 28), dass Zellen, die mit bFGF inkubiert wurden, deutlich stärker sprouten als Zellen, die ohne Wachstumsfaktor inkubiert wurden ($p = 0.034$). Aber auch die Konzentration von Tenilsetam hatte einen deutlichen Einfluss auf das Verhalten der BRECs ($p = 0.031$): Wurde die mit bFGF stimulierte Kontrolle gleich 100 % gesetzt, so bewirkte der Zusatz von 1 mM Tenilsetam eine Steigerung der Sproutbildung um 44 %. Dieser Anstieg war relativ gesehen sogar noch stärker, wenn die BRECs nicht mit bFGF stimuliert wurden: Der Zusatz von 1 mM Tenilsetam zum Medium erhöhte das Zellsprouting hier um 80 %, d.h. es besteht eine Wechselwirkung zwischen der Konzentration an Tenilsetam und der Stimulation durch bFGF ($p = 0.027$).

Der Zusatz von 3 und 10 mM Tenilsetam bewirkte eine weitere Steigerung der Sproutbildung (um 59 % und 72 % unter Stimulation mit bFGF, bzw. um 180 % und 300 % unter Kontrollbedingung). Eine Inkubation der Zellen mit 30 mM Tenilsetam förderte die Entstehung von Sprouts jedoch nicht weiter; vielmehr lag das Niveau der Sproutbildung unter diesen Bedingungen auf der gleichen Höhe wie das der jeweiligen Kontrolle.

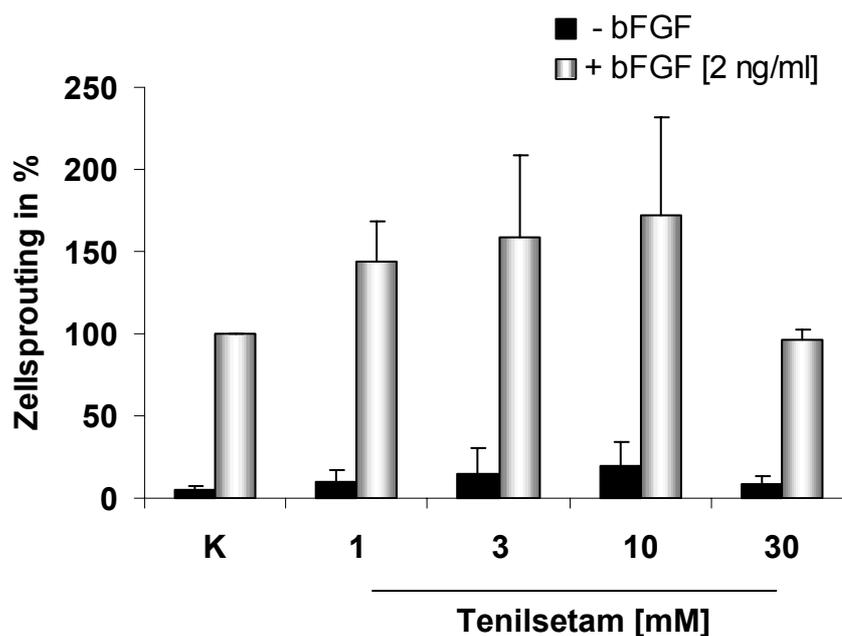


Abb. 28: Einfluss von Tenilsetam auf das Aussprossen von BRECs mit und ohne Stimulation durch bFGF

Auf *microcarrier* (MC) gewachsene BRECs wurden in ein Fibringel eingebettet und mit Medium (mit und ohne bFGF) überschichtet. Dem Medium wurden unterschiedliche Konzentrationen an Tenilsetam oder PBS als Kontrolle (K) zugesetzt. Nach 48 Stunden wurden die Gele fixiert und die Zahl der Sprouts auf 50 MC pro Well bestimmt. Die Ergebnisse sind in Prozent zur stimulierten Kontrolle (K) dargestellt. MW \pm SD (n = 3, jeweils mit 2-3-facher Wiederholungsmessung).

Tab. 8: Paarweise Vergleiche (nach Sidak) zu Abb. 28

Ohne bFGF	Kontrolle	1 mM	3 mM	10 mM	30 mM
Kontrolle		0.423	0.394	0.096	1.000
1 mM	0.423		0.392	0.089	0.899
3 mM	0.394	0.392		0.056	0.510
10 mM	0.096	0.089	0.056		0.173
30 mM	1.000	0.899	0.510	0.173	
2 ng/ml bFGF					
Kontrolle		0.142	0.129	0.120	0.644
1 mM	0.142		0.874	0.475	0.165
3 mM	0.129	0.874		0.203	0.107
10 mM	0.120	0.475	0.203		0.111
30 mM	0.644	0.165	0.107	0.111	

Die Ergebnisse zeigen, dass das Aussprossen von mikrovaskulären Endothelzellen durch Tenilsetam konzentrationsabhängig stark gefördert wird.

Zusammenfassend stellt sich die Wirkung von Tenilsetam wie folgt dar:

1. Tenilsetam hemmt – in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration – die DNA-Synthese und die Proliferation von HUVECs. Dieser Effekt wurde weder über eine gesteigerte Apoptose noch Nekrose vermittelt.
2. Die 24-stündige Inkubation von HUVECs mit Tenilsetam erhöhte die Bereitschaft der Zellen zur Adhäsion und Migration im jeweiligen Versuchsansatz, wobei klar hervorzuheben ist, dass diese Beobachtung statistisch nicht relevant ist. Die direkte Zugabe von Tenilsetam zum Versuchsansatz hatte keinen Einfluss auf die Adhäsion und die Migration von HUVECs.
3. Die IL-1 β -induzierte Expression der Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und E-Selektin wurde durch Tenilsetam nicht beeinflusst. Die IL-1 β -induzierte Expression von ICAM-1 hingegen wurde durch den Zusatz von Tenilsetam leicht vermindert.
4. Moderate Tenilsetam-Konzentrationen (d.h. 1, 3 und 10 mM) fördern das Aussprossen mikrovaskulärer BRECs im so genannten *sprouting-* oder auch *tube formation-assay*.

3.2 Projekt II: Rolle der retinalen Perizyten in der physiologischen Angiogenese

3.2.1 Rekrutierung von Perizyten und vaskulären Glattmuskelzellen entlang der retinalen Gefäße

Die Vaskularisation der Retina erfolgt vom *Nervus Opticus* aus. Die Gefäße sprouten in Richtung Peripherie und erreichen bei der Maus sieben Tage nach der Geburt den äußeren Rand der Retina (die *Ora serrata*). Zunächst erfolgt die Gefäßbildung nur in der oberen Ganglienzellschicht. Da die transgene XlacZ-Maus das Reportergen β -Galaktosidase in Perizyten und vSMC exprimiert, lassen sich diese Zellen mit Hilfe des Substrats X-gal blau anfärben. Ihre Verteilung und Morphologie kann so in retinalen Ganzorganpräparaten analysiert werden.

Abb. 29 zeigt, dass die größeren Gefäße an Tag p7 mit lacZ-positiven Zellen ummantelt sind. Die zwischen den Arteriolen und Venolen liegenden Kapillaren weisen nur selten eine Assoziation mit gefärbten Zellen auf. Aus der Literatur ist jedoch bekannt, dass die sproutenden Kapillaren in der Ganglienzellschicht vom ersten Tag an mit Perizyten besetzt sind (Fruttiger, 2002).

Ergebnisse aus der eigenen Arbeitsgruppe zeigen, dass die Anfärbung von Perizyten und vSMC mit X-gal erst ab Tag p7 möglich ist, was bedeutet, dass die Expression der β -Galaktosidase unter dem aP2-Promotor erst ab diesem Tag stattfindet. Tidhar et al beschreiben, dass die Expression des Enzyms von dem Kontakt der Wandzellen mit den Endothelzellen abhängt (Tidhar, 2001). Wahrscheinlich liegt hier der Grund für die teilweise schwache Anfärbung der Zellen an p7 (siehe Abb. 29, 31 und 32).

Ab Tag p8 ist die Färbung der Zellen kräftiger und nicht mehr nur auf die größeren Gefäße beschränkt, auch die Kapillaren sind mit lacZ-positiven Zellen besetzt. In den folgenden Tagen nimmt die Zahl der lacZ-positiven Zellen weiter zu und bedeckt schließlich die zweiten und dritten Äste der Arteriolen und Venolen an p12. Dieser Entwicklungsstand ist dem der erwachsenen Retina bereits sehr ähnlich, wie das Gefäßnetz einer 26 Tage alten Maus im Vergleich zeigt (Abb. 29, links unten).

Die kombinierte Anfärbung des Gefäßnetzes der Retina mit einem TRITC-konjugierten Lectin aus *Bandeiraea simplicifolia* und den Perizyten mit dem Substrat X-gal (Abb. 29, linke Spalte) ist insofern sehr praktisch, als dass sie die genaue Lokalisation der Perizyten am Gefäß ermöglicht.

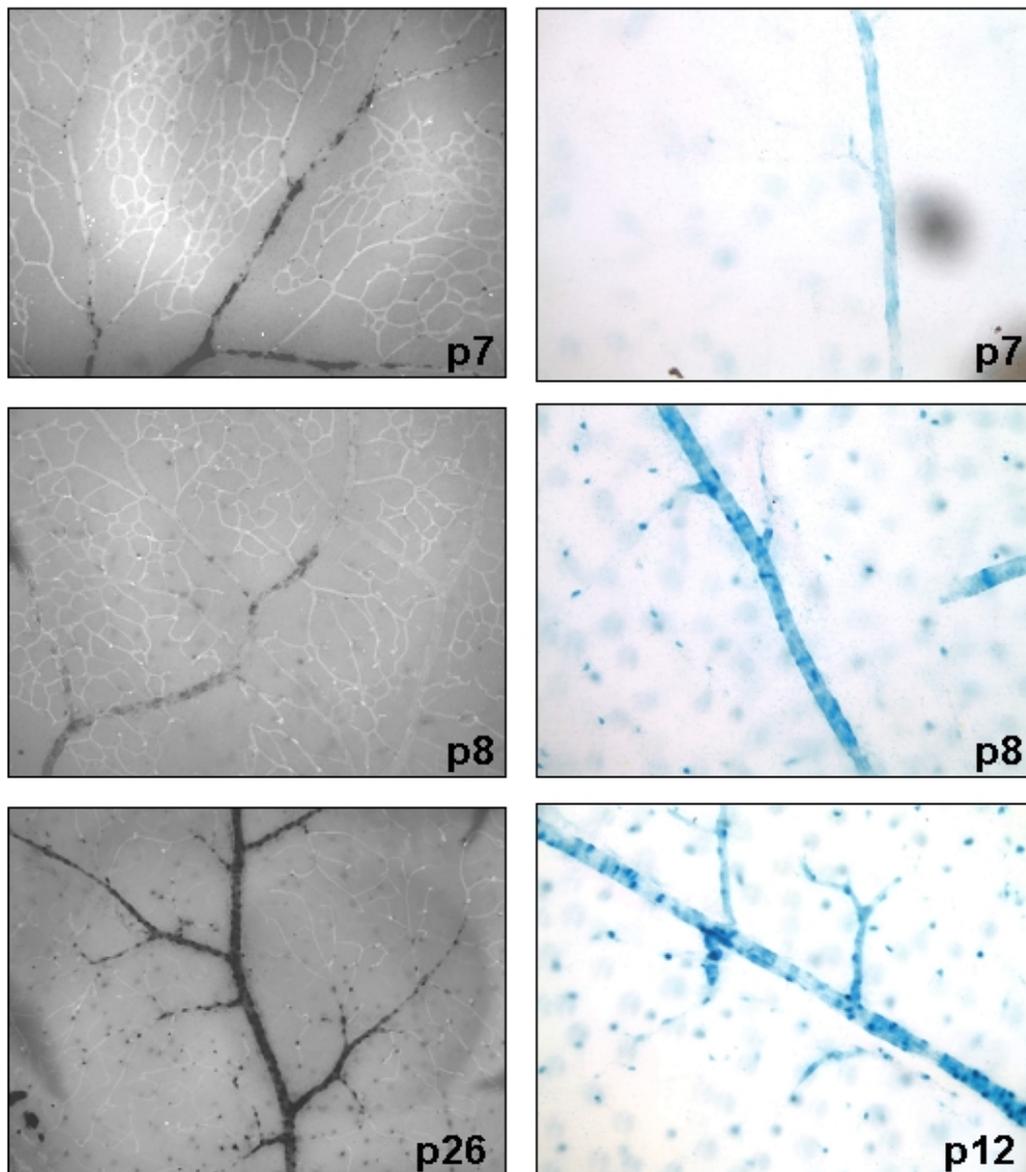


Abb. 29: Rekrutierung und Migration von vSMC und Perizyten entlang der Gefäße in der retinalen Ganglienzellschicht bei XlacZ-Mäusen

Links Färbung: X-gal und Lectin in Kombination, Vergrößerung: 100fach; *Rechts* Färbung: X-gal, Vergrößerung: 200fach.

So wird deutlich, dass keine lacZ-positiven Zellen abseits der Gefäße zu finden sind, was auf eine eventuelle Differenzierung und Rekrutierung von Perizyten aus dem umgebenden

Gewebe hindeuten würde. Allerdings scheint die starke Fluoreszenz, die von den Lectin-markierten Gefäßen ausgeht, die dunklen X-gal gefärbten Zellen leicht zu überlagern, wodurch in diesen Aufnahmen auf den ersten Blick weniger Perizyten sichtbar sind, als auf den lichtmikroskopischen Aufnahmen, wo auch die blauen Zellen aus tieferen Schichten sofort zu erkennen sind (Abb. 29 und 33).

3.2.2 Das tiefe Kapillarnetz der Maus entsteht 8 Tage nach der Geburt

Die adulte Retina hat neben den Gefäßen in der Ganglienzellschicht ein tiefer liegendes Kapillarnetz, welches sich – ausgehend vom oberen Gefäßnetz – in die innere Körnerschicht erstreckt. Abb. 30 zeigt ein- und denselben Ausschnitt eines Retinapräparates einer 26 Tage alten XlacZ-Maus. Im oberen Photo sind Kapillaren der Ganglienzellschicht zu sehen. Fokussiert man durch das Präparat, so werden die darunter liegenden Kapillaren der inneren Körnerschicht sichtbar.

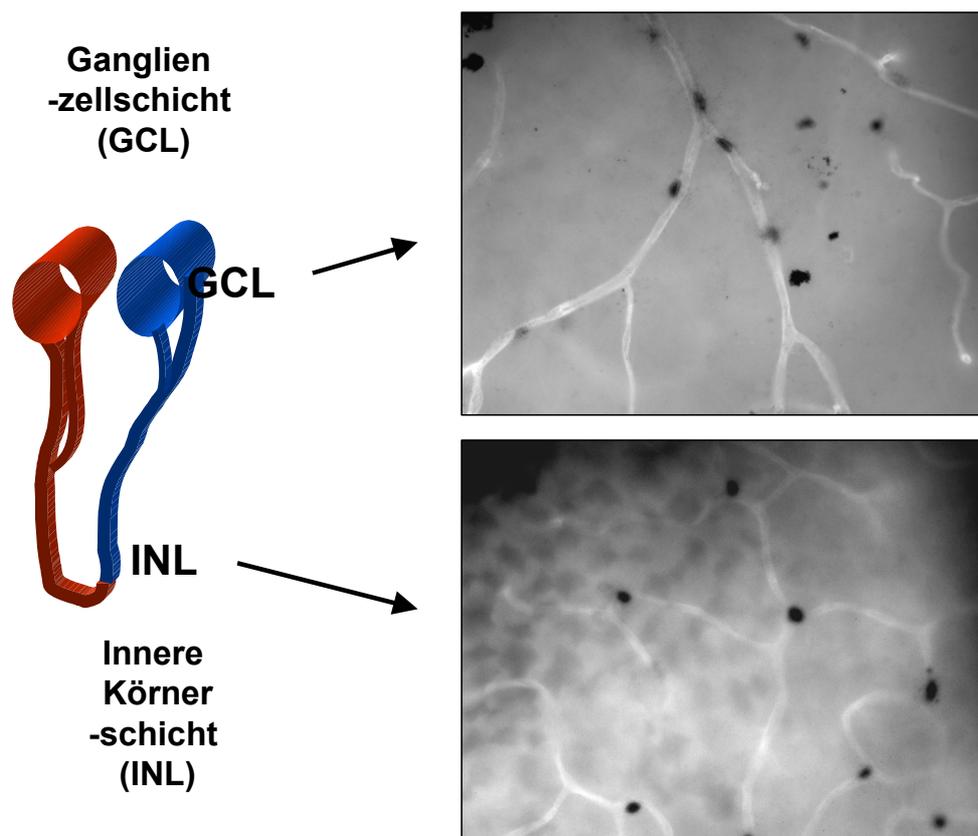


Abb. 30: Lokalisation der Perizyten an den Kapillaren

Gezeigt ist die Retina einer adulten XlacZ-Maus (p26). Färbung: X-gal und Lectin in Kombination; Vergrößerung: 400fach.

Wie in Abb. 31 dargestellt existiert das tiefe Kapillarnetz an p7 noch nicht, eine Fokussierung zwischen den Schichten ist zu diesem Zeitpunkt nicht möglich. Des Weiteren fällt auf, dass die Färbung der Perizyten an Tag p7 sehr schwach ist. Erst an p8 scheint die Expression der β -Galaktosidase so stark zu sein, dass sich die gesamte Zelle dunkel vor dem fluoreszierenden Gefäßnetz abhebt. Die Position der angefärbten Zellen an p7 – vornehmlich an Gefäßgabelungen – weist aber auf ihre perizytäre Natur hin.

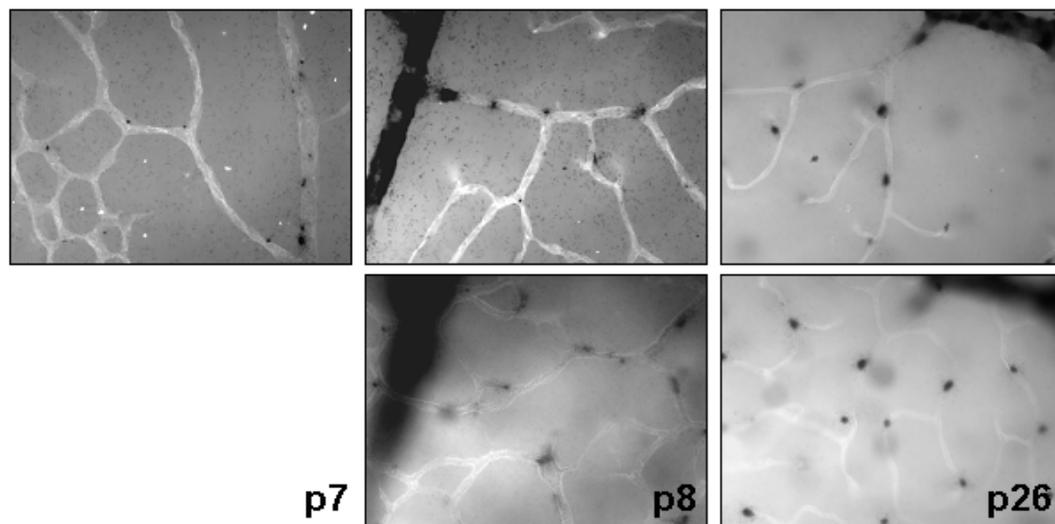


Abb. 31: Darstellung der retinalen Gefäße der Ganglienzellschicht und der inneren Körnerschicht bei 7-, 8-, bzw. 26-Tage alten XlacZ-Mäusen

Die obere Photoserie zeigt die Gefäße der Ganglienzellschicht, die untere die der inneren Körnerschicht. Färbung: X-gal und Lectin in Kombination; Vergrößerung: 400fach.

Einen Tag später – an p8 – hat sich auch das tiefe Kapillarnetz ausgebildet. Von Bedeutung ist, dass das tiefe Netzwerk ebenfalls von Beginn an mit Perizyten assoziiert ist und es somit anscheinend keine Phase gibt, in der Kapillaren frei von Perizyten sind. Vergleicht man die Morphologie der Perizyten an p8 mit der von Perizyten an p26, so fällt auf, dass die Intensität und Ausprägung der X-gal Färbung an p8 schwächer ist. Der Umriss wirkt verwaschen und faserig. An p26 ist die Kontur schärfer umrissen und die Färbung konzentrierter. Es scheint, dass sich die Perizyten im Laufe ihrer Entwicklung verändern.

3.2.3 Die Morphologie der Perizyten verändert sich während der Gefäßreifung

Die bereits in Abb. 31 auffällige Änderung der Perizytenmorphologie lässt sich in der reinen X-gal-Färbung noch besser beobachten: Abb. 32 zeigt Perizyten in der 400fachen Vergrößerung an den Tagen p7 bis p12.

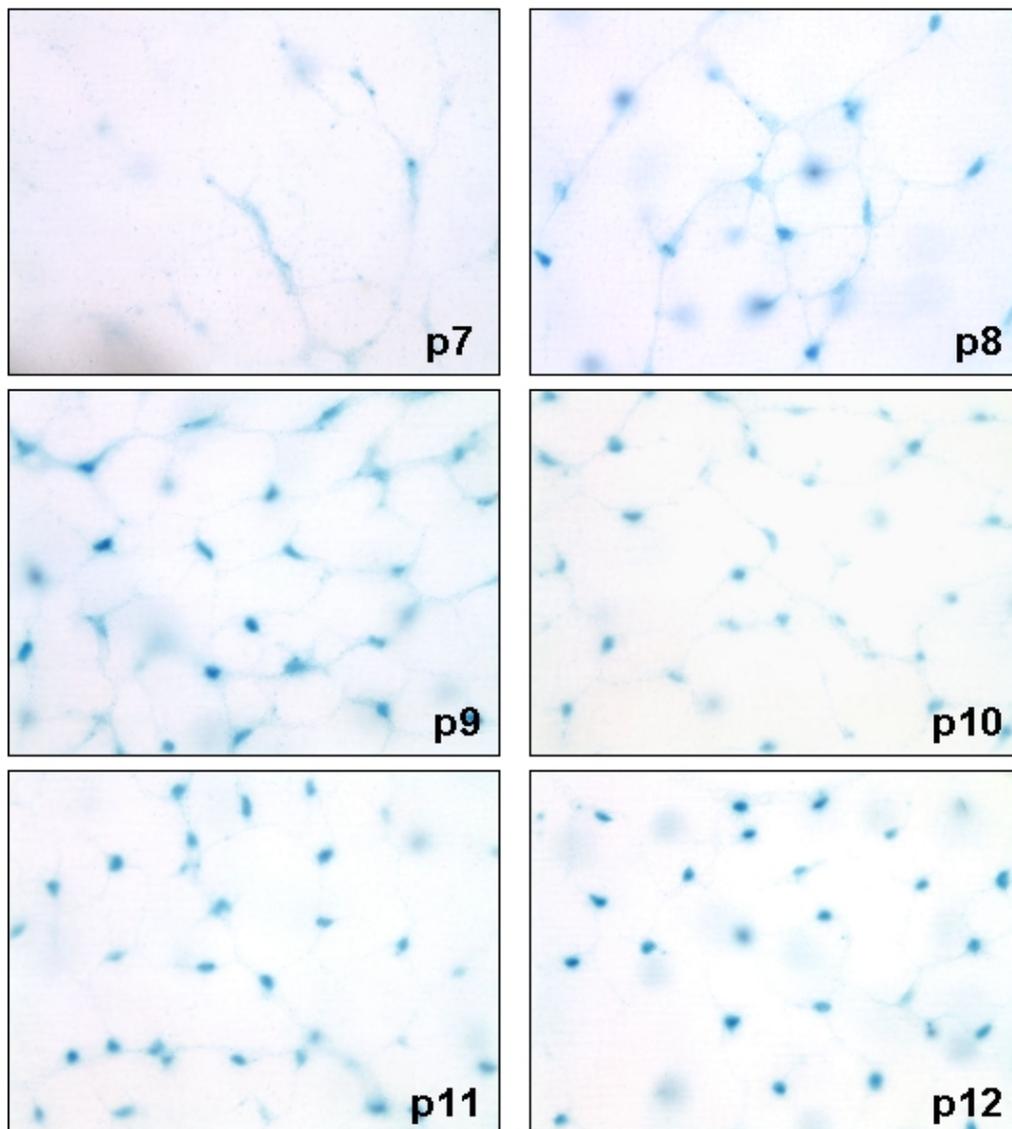


Abb. 32: Morphologie von Perizyten während der Entwicklung des retinalen Gefäßsystems von Tag p7 bis p12 bei der *XlacZ*-Maus

Die Gestalt der lacZ-positiven Zellen in den Retinakapillaren wandelt sich in diesem Zeitraum von einem länglichen, migrierenden Phänotyp mit vielen Filopodien (p7 bis p9) zu einem runden, sesshaften Phänotyp mit nur vereinzelt Filopodien (p10 bis p12). Färbung: X-gal; Vergrößerung: 400fach.

Ihre Gestalt ändert sich in diesem Zeitraum von einem eher länglichen migrierenden zu einem runden sesshaften Phänotyp. An p7 ist die Intensität der Färbung noch schwach, aber bereits deutlich sichtbar. Auffällig ist die Ausprägung von langen Zellfortsätzen, so genannten Filopodien, die den Zellen ein sternförmiges Aussehen verleihen. Auch an den Tagen p8 und p9 sind diese Filopodien zahlreich vorhanden. Von Tag p10 an scheinen sich die Zellfortsätze zurückzubilden und an p12 sind sie fast vollständig verschwunden. Zurück bleibt der intensiv blau gefärbte runde Zellkörper.

In der kombinierten Lectin- und X-gal-Färbung sind die Filopodien nicht zu erkennen, wahrscheinlich weil die starke Fluoreszenz der Lectin-markierten Gefäße diese zarten Strukturen überstrahlt. In Abb. 33 sind zwei unterschiedlich gefärbte Präparate acht Tage alter XlacZ-Mäuse gegenübergestellt.

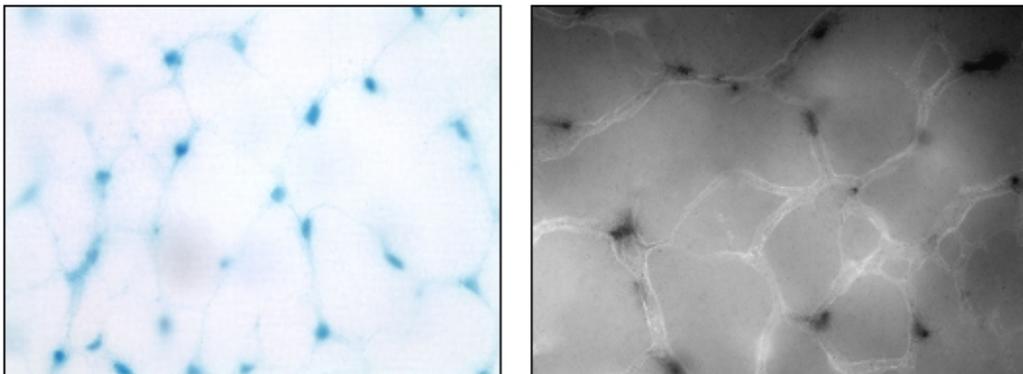


Abb. 33: Vergleichende Darstellung retinaler Perizyten der XlacZ-Maus in der X-gal-Färbung und der kombinierten X-gal- und Lectin-Färbung

Gezeigt sind zwei Präparate acht Tage alter Retinae: links die X-gal-Färbung unter dem Lichtmikroskop, rechts die kombinierte Färbung unter dem Fluoreszenzmikroskop. Die langen Filopodien der Zellen sind nur in der X-gal-Färbung zu beobachten. Vergrößerung: 400fach.

3.2.4 Die Zahl der Perizyten steigt von p7 auf p8 sprunghaft an

Wie zuvor rein subjektiv beschrieben, scheint die Zahl der lacZ-positiven Zellen in der Retina mit der Entwicklung zuzunehmen. Um ihre Zahl zu quantifizieren, wurden je Retina zwölf mikroskopische Felder bei 400facher Vergrößerung auf die Anwesenheit von blauen Zellen hin ausgezählt. Um sicher zu stellen, dass nur Perizyten und keine vSMC in die Quantifizierung mit eingehen, wurden Felder mit größeren Gefäßen ausgelassen.

Wie vermutet, nimmt die Zahl an rekrutierten Perizyten mit dem Alter der Mäuse signifikant zu ($p < 0.001$): Von Tag p7 auf p12 erhöht sich ihre Zahl von 2.8 ± 2.5 auf 34.4 ± 1.3 pro mikroskopischen Feld (Abb. 34). Von p8 bis p12 erfolgt dieser Anstieg relativ linear, d.h. die Perizytenzahl erhöht sich täglich um durchschnittlich 14 %. Sehr auffällig ist indessen der enorme Zuwachs von lacZ-positiven Zellen zwischen p7 und p8: In nur einem Tag verfünffacht sich ihre Zahl!

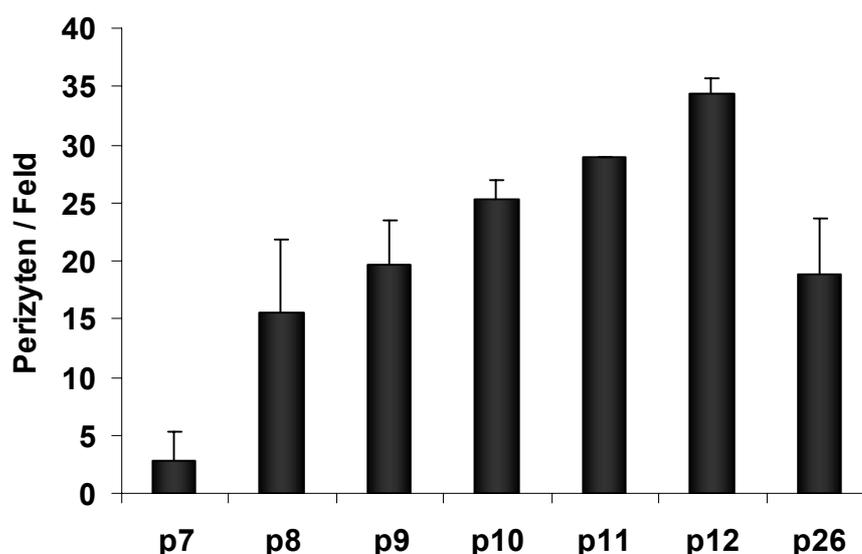


Abb. 34: Quantifizierung des Perizytenbesatzes in Retinakapillaren von *XlacZ*-Mäusen von p7 bis p12 und an p26

Die Dichte der Perizyten wurde durch Zählen der LacZ-positiven Zellen in Ganzorgan-Präparaten bestimmt. Je Retina wurden zwölf mikroskopische Felder bei 400facher Vergrößerung ausgezählt. Dargestellt ist die mittlere Perizytenzahl mehrerer Mausretinae je angegebenen Zeitpunkt ($n = 2$ bis 9).

Tab. 9: Paarweise Vergleiche (Tukey-HSD) zu Abb. 34

	p7	p8	p9	p10	p11	p12	p26
p7		< 0.001*	< 0.001*	< 0.001*	< 0.001*	< 0.001*	< 0.001*
p8	< 0.001*		0.764	0.034	0.008*	< 0.001*	0.840
p9	< 0.001*	0.764		0.628	0.204	0.009*	1.000
p10	< 0.001*	0.034	0.628		0.950	0.209	0.412
p11	< 0.001*	0.008*	0.204	0.950		0.812	0.107
p12	< 0.001*	< 0.001*	0.009*	0.209	0.812		0.003*
p26	< 0.001*	0.840	1.000	0.412	0.107	0.003*	

* unterhalb eines Signifikanzniveaus von 2.5 %

Die Dichte an Perizyten nimmt bis zum Erwachsenenalter (p26) wieder ab, was eventuell auf den Remodeling-Prozess in späteren Entwicklungsstadien zurückzuführen ist.

3.2.5 Die Hyperoxie-induzierte Gefäßregression in der Retina ist nur bis zum siebten Tag nach der Geburt möglich

Um zu klären, ob die Perizyten-dichte einen Einfluss auf die Stabilität von Retinakapillaren hat und ihre Anwesenheit diese vor Regression schützen kann, wurden sieben bis zwölf Tage alte C57BL/6-Mäuse mit dem ROP-Modell konfrontiert: Werden sieben Tage alte Mäuse für fünf Tage in einer Atmosphäre mit 75 % Sauerstoff gehalten, so induziert die Hyperoxie eine deutliche zentrale Gefäßobliteration um den *Nervus opticus* (Abb. 35, Sternchen). In der sich anschließenden 5-tägigen Phase in normaler Raumluft erfahren die Mäuse eine relative Hypoxie, was zu einer überschießenden Gefäßneubildung an der Grenze zur avaskulären Zone führt. Diese neugebildeten "Gefäßbüschel" (*neovascular tufts*) sind in der Ganzorganpräparation (Abb. 35, Pfeile) gut zu erkennen.

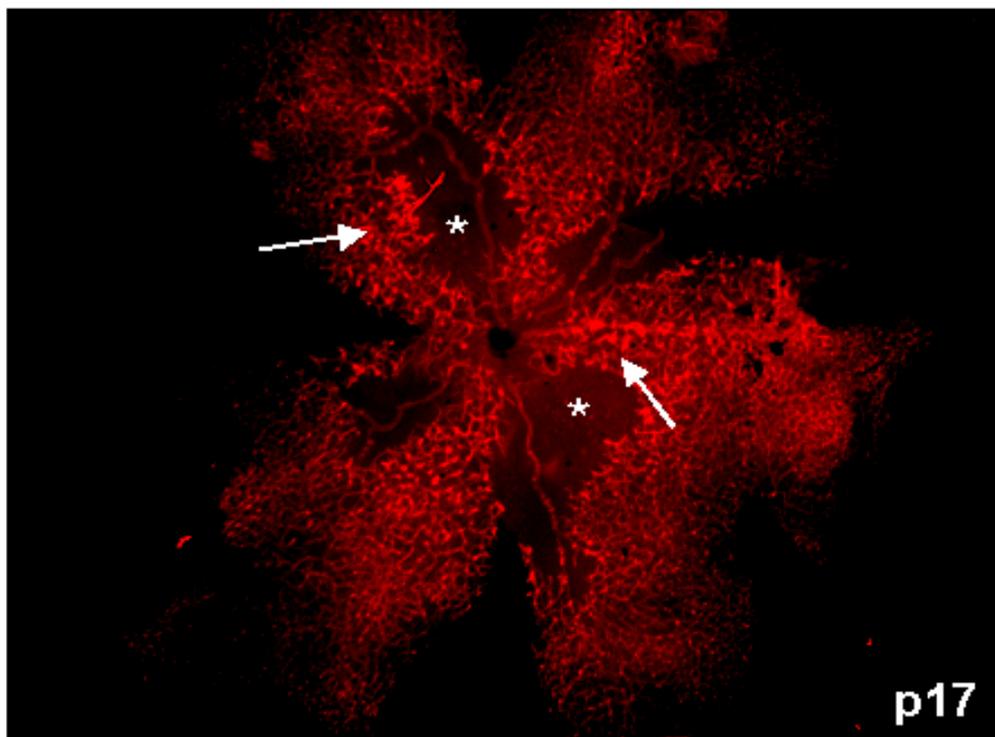


Abb. 35: Qualitative Darstellung von Gefäßregression und Neovaskularisation nach ROP-Modell an Tag 17

Das Photo zeigt die Fluoreszenzaufnahme einer Mausretina im Ganzorgan-Präparat. Deutlich zu erkennen sind die avaskuläre Zone im Zentrum der Retina (*) und die direkt angrenzenden *neovascular tufts* (→). Färbung: TRITC-konjugiertes Lectin; Vergrößerung: 25fach.

Wird dieselbe Prozedur nur einen Tag später (an p8) durchgeführt, so bleibt das retinale Gefäßnetz relativ unbehelligt: Die Hyperoxie bewirkt keine sichtbare Gefäßregression mehr (Abb. 36), so dass in der anschließenden Hypoxiephase keine reaktive Gefäßneubildung stattfindet.

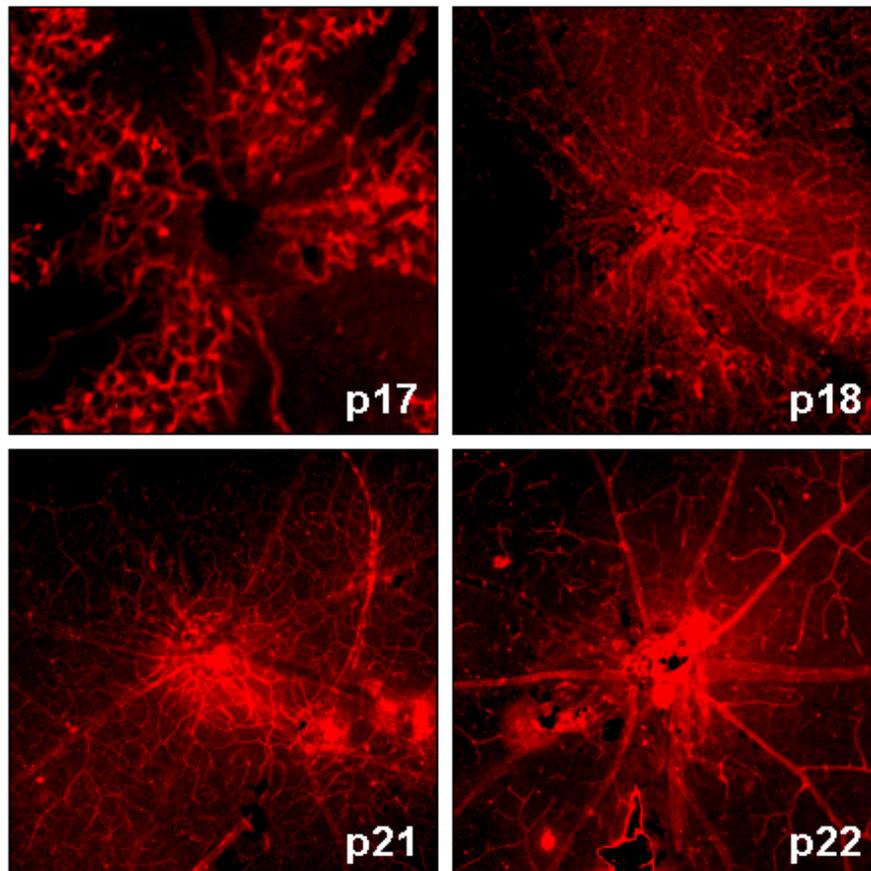


Abb. 36: Vergleichende qualitative Darstellung von Gefäßregression und Neovaskularisation nach ROP-Modell bei unterschiedlich alten C57BL/6-Mäusen (p17, p18, p21 und p22); zentrale Ansicht, Region um den *Nervus opticus*

Färbung: TRITC-konjugiertes Lectin; Vergrößerung: 100fach.

Auch an den folgenden Tagen (p9 bis p12) scheint das retinale Gefäßnetz unempfindlich gegenüber dem hohen Sauerstoffangebot zu sein: es werden weder Gefäße zurückgebildet noch findet eine reaktive Neovaskularisation statt.

Die Gefäßneubildung an p17 – als Reaktion auf den Gefäßuntergang an p7 – findet nicht nur innerhalb der Retina statt. Einige Gefäße durchbrechen die innere Grenzmembran und sprossen in den Glaskörper des Auges, was im Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Querschnitt der Retina quantifizierbar ist.

In Abb. 37 sind beispielhaft zwei Retinapräparate nach ROP-Modell gezeigt: links eine Retina an p17, rechts die einer 22 Tage alten Maus. An p17 sind vaskuläre Zellkerne zu erkennen, die sich im Zuge der Hypoxie-induzierten Neovaskularisation vor die innere Grenzmembran ausgebreitet haben (Pfeile!).

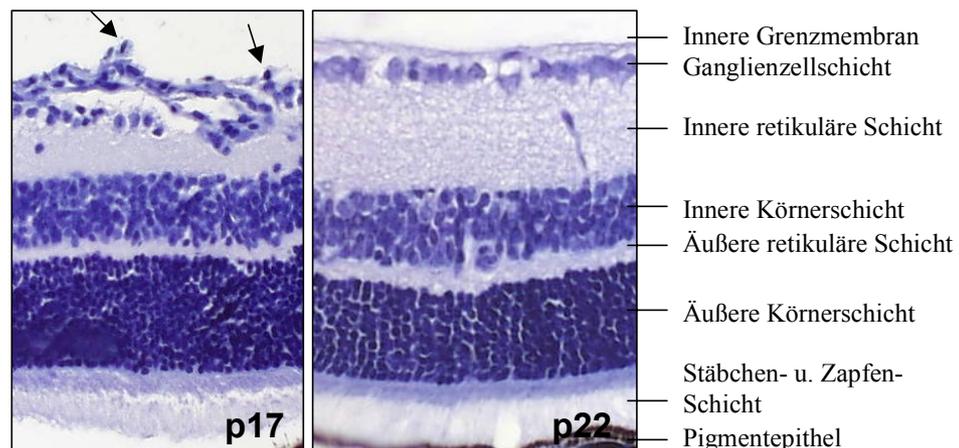


Abb. 37: Histologischer Schnitt durch die Retinae von C57BL/6-Mäusen nach ROP-Modell

Links ein Querschnitt durch die 17 Tage alte Retina (nach Hyperoxie ab Tag 7), rechts ein Querschnitt durch die 22 Tage alte Retina (nach Hyperoxie ab Tag 12). Färbung: Hämatoxylin-Eosin; Vergrößerung: 200fach.

Das Ausmaß der Angiogeneseantwort lässt sich über das Auszählen der präretinalen Zellkerne quantifizieren. Das Resultat ist, dass es einen Zusammenhang zwischen dem Zeitpunkt des Einsetzens des Hyperoxiereizes und der Angiogeneseantwort gibt ($p < 0.001$): Nach Hyperoxie an p7 befinden sich zehn Tage später im Mittel 50.9 ± 21.0 neovaskuläre Zellkerne pro Schnitt vor der inneren Grenzmembran (Abb. 38).

Wie bereits aus dem Ganzorgan-Präparat ersichtlich, nimmt die Angiogeneseantwort an p8 enorm ab, es werden zehn Tage später durchschnittlich nur noch 7.4 ± 6.3 präretinale Zellkerne pro Schnitt gezählt. Von p21 an – nach Hyperoxie an p11 – ist keine neovaskuläre Reaktion mehr vorhanden.

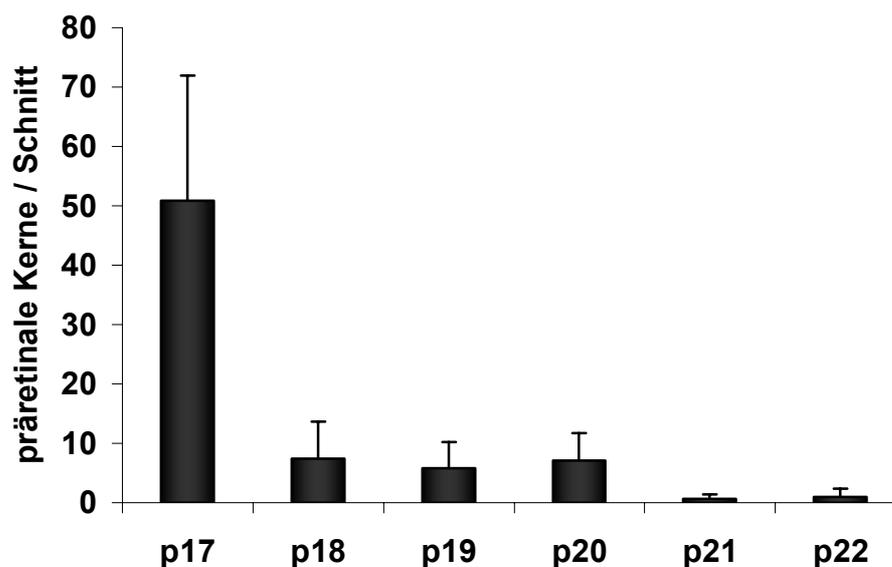


Abb. 38: Quantifizierung der retinalen Neovaskularisationen nach ROP-Modell bei C57BL/6-Mäusen

Das Ausmaß der Hypoxie-induzierten Neovaskularisation wurde über die Menge an vaskulären Zellkernen bestimmt, die sich vor die innere Grenzmembran der Retina erstreckten. Je Auge wurden 15 Querschnitt-Präparate ausgezählt ($n \pm SD$; $n = 5-6$ Retinae/Zeitpunkt).

Tab. 10: Paarweise Vergleiche (Tukey-HSD) zu Abb. 38

	p17	p18	p19	p20	p21	p22
p17		< 0.001*	< 0.001*	< 0.001*	< 0.001*	< 0.001*
p18	< 0.001*		0.999	1.000	0.564	0.675
p19	< 0.001*	0.999		0.999	0.764	0.852
p20	< 0.001*	1.000	0.999		0.551	0.670
p21	< 0.001*	0.564	0.764	0.551		1.000
p22	< 0.001*	0.675	0.852	0.670	1.000	

* unterhalb eines Signifikanzniveaus von 2.5 %

Auf den ersten Blick scheint es einen Zusammenhang zwischen dem starken Anstieg der Perizytenzahl und der ausbleibenden Angiogeneseantwort an p8 zu geben. Es sieht so aus, als wenn die höhere Perizyten-dichte einen Schutz vor Gefäßregression darstellt. Zu bedenken ist jedoch, dass die Kapillaren, die an p7 vorhanden sind, ebenfalls mit Perizyten assoziiert sind und trotzdem unter der einsetzenden Hyperoxie zu Grunde gehen. Was also schützt die Kapillaren an p8, was an p7 noch nicht vorhanden ist?

3.2.6 Immundetektion von Wachstumsfaktoren und Rezeptoren, die an der Angiogenese beteiligt sind

An der Neubildung von Gefäßen sind eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren beteiligt. So ist z.B. bekannt, dass VEGF essenziell für die Initiierung von Angiogeneseprozessen und PDGF-B essenziell für die Perizytenrekrutierung ist. Angiopoietin-1 spielt eine Rolle bei der Gefäßreifung und die Ephrine bei der Differenzierung in Arterien und Venen. Um zu erfahren, in welcher Beziehung die retinale Perizytenrekrutierung zu der Expression dieser Faktoren steht, wurden sieben bis zwölf Tage alte Retinae von C57BL/6-Mäusen, bzw. sieben, acht und 26 Tage alte Retinae von XlacZ-Mäusen für einen Western Blot aufbereitet.

3.2.6.1 VEGF-A und flk-1

Für den Nachweis von VEGF-A wurden zu jedem Zeitpunkt jeweils fünf Retinae von C57BL/6-Mäusen für einen Western Blot aufbereitet. Je Probentasche wurden ca. 8 µg Retinaprotein geladen. In sechs voneinander unabhängigen Versuchen wurde der VEGF-A Antikörper von Santa Cruz (A20) in einer Verdünnung von 1:500 bis 1:1000 eingesetzt. Da die VEGF-Kontrolle (25 – 250 ng/well, R&D) immer stark positiv war, die restliche Membran jedoch blank blieb, wurde geschlussfolgert, dass die Konzentration an Maus-VEGF für diesen Antikörper hier unterhalb der Nachweisgrenze lag.

Also wurden die Augen derjenigen XlacZ-Mäuse für eine Western Blot-Analyse aufbereitet, die nicht für die Perizytenzählung benötigt wurden, d.h. die jeweils kontralateralen Augen sowie die Augen eines Wurfs, die nicht lacZ-positiv waren. In diesem zweiten Ansatz wurde ca. neunmal mehr Protein geladen. Der Antikörper – welcher sich gegen drei Isoformen von VEGF-A richtet – zeigte diesmal Banden auf Höhe der VEGF-Kontrolle (bei ca. 45 kDa, da die Proben nicht reduziert wurden) (Abb. 39).

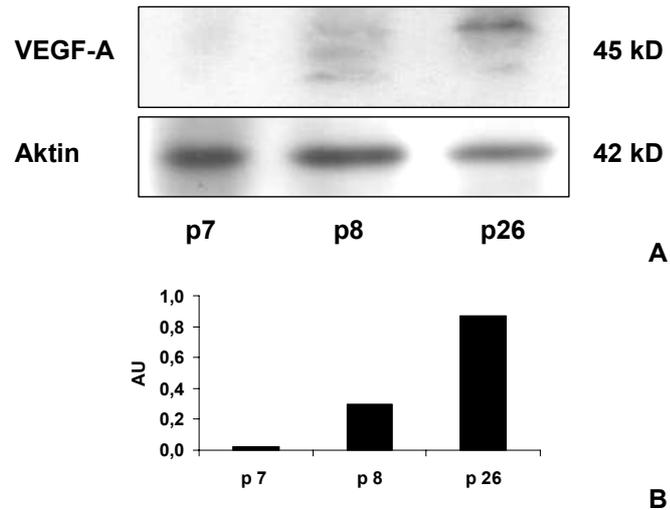


Abb. 39: Expression von VEGF-A in Retinae von 7, 8 und 26 Tage alten XlacZ-Mäusen

(A) Western Blot gegen VEGF-A sowie Aktin zur Verifizierung der Ladungsmenge. Je Spur wurden die Proteinlysate dreier Retinae unterschiedlicher Mäuse geladen. Die Auftrennung erfolgte unter nicht-reduzierenden Bedingungen (B) Densitometrische Auswertung des Western Blots. Zur Abgleichung der Ladungsunterschiede wurde der Quotient von VEGF-A zu Aktin aufgetragen (AU = arbitrary units).

An Tag p7 sind diese Banden sehr schwach, an Tag p8 sind sie jedoch gut voneinander zu unterscheiden. In der erwachsenen Mausretina scheint die Isoform mit 188 Aminosäuren zu überwiegen. Werden die VEGF-Banden zu der korrespondierenden Aktin-Bande ins Verhältnis gesetzt, so zeigt sich, dass die VEGF-Expression von p7 auf p8 und weiter bis p26 deutlich ansteigt. Um einen eindeutigen Nachweis zu erbringen, müsste dieser Versuch jedoch mehrmals wiederholt werden, was hier aufgrund von Materialmangel nicht mehr möglich war.

Der gegen flk-1 gerichtete Antikörper von Santa Cruz (C-1158) erkannte wie erwartet zwei Banden bei 195 und 235 kDa und zeigte in der Versuchswiederholung ein reproduzierbares Ergebnis: Wird die flk-1-Bande zu der korrespondierenden Aktin-Bande ins Verhältnis gesetzt, so scheint die Expression an den Tagen p7 bis p9 auf einem Niveau zu liegen und ab p10 auf ein höheres Expressionsniveau anzusteigen (Abb. 40).

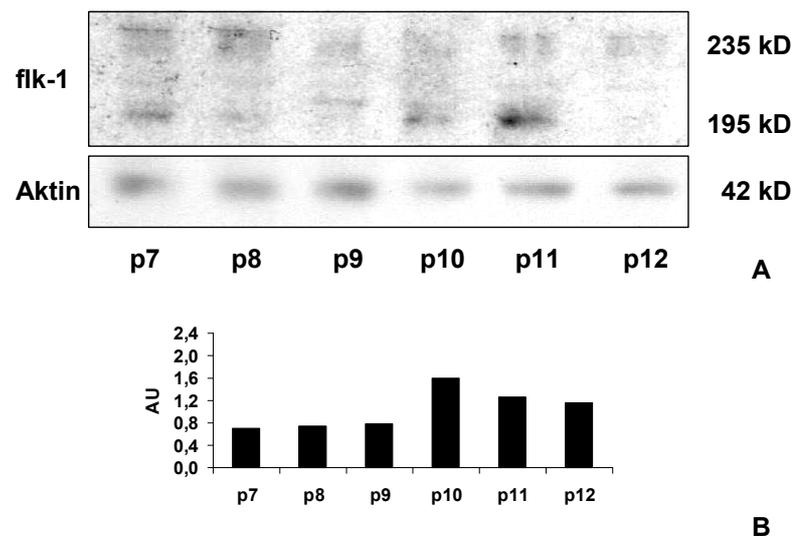


Abb. 40: Expression von flk-1 in Retinae von C57BL/6-Mäusen

(A) Exemplarischer Western Blot gegen flk-1 sowie Aktin zur Verifizierung der Ladungsmenge. Je Spur wurde Retinalysat von fünf verschiedenen Mäusen geladen. Die Auftrennung erfolgte unter nicht-reduzierenden Bedingungen. (B) Densitometrische Auswertung des Western Blots. Zur Abgleichung der Ladungsunterschiede wurde jeweils der Quotient von flk-1 zu Aktin aufgetragen (AU = arbitrary units).

3.2.6.2 PDGF-B und PDGF-R β

Da PDGF-B essenziell für die Rekrutierung von Perizyten ist, wurde dieser Wachstumsfaktor sowie sein korrespondierender Rezeptor PDGF-R β auf Proteinebene nachgewiesen. Wie bei der Analyse von VEGF wurde hier zunächst Retinalysat von C57BL/6-Mäusen im Western Blot eingesetzt. In drei unabhängigen Versuchen detektierte der PDGF-B-Antikörper jeweils eine Bande in der zu erwartenden Höhe von 29 kDa. Die densitometrische Auswertung ergab, dass das Expressionsniveau von p7 bis p12 leicht ansteigt, dabei in seiner Ausprägung jedoch sehr schwankt (s. Tab. 31, Anhang).

Auch hier wurden die Retinalysate der XlacZ-Mäuse an p7, p8 und p26 analysiert. Das Ergebnis ist in Abb. 41 dargestellt: Während die PDGF-B-Expression an p7 sehr schwach ist, steigt der Gehalt von PDGF-B an p8 auf das 2.8-fache des Wertes an p7. In der adulten Retina wird wieder weniger PDGF-B exprimiert, möglicherweise, weil zu diesem Zeitpunkt die Rekrutierung von Perizyten zum Gefäßnetz abgeschlossen ist.

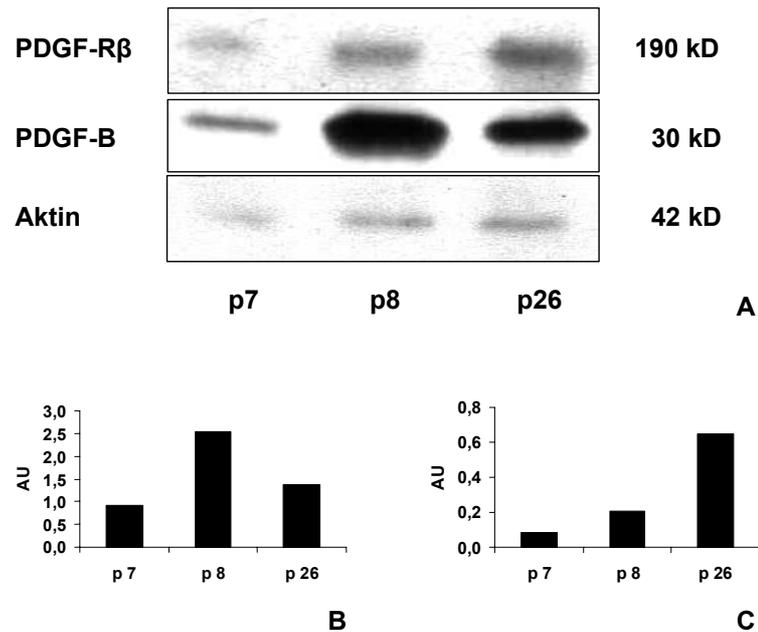


Abb. 41: Expression von PDGF-B und PDGF-R β in Retinae von 7-, 8- und 26-Tage alten XlacZ-Mäusen

(A) Exemplarischer Western Blot gegen PDGF-B und PDGF-R β sowie Aktin zur Verifizierung der Ladungsmenge. Je Spur wurden die Proteinlysate dreier Retinae unterschiedlicher Mäuse geladen. Die Auftrennung erfolgte unter nicht-reduzierenden Bedingungen. (B) Densitometrische Auswertung des PDGF-B- und (C) des PDGF-R β -Blots. Zur Abgleichung der Ladungsunterschiede wurde jeweils der Quotient von PDGF-B bzw. PDGF-R β zu Aktin aufgetragen (AU = arbitrary units).

Der Nachweis des Rezeptors ergab, dass sich dessen Expression in der XlacZ-Mausretina von Tag p7 auf p8 und weiter bis p26 deutlich erhöhte (Abb. 41). Da PDGF-R β von Perizyten und glatten Muskelzellen exprimiert wird, geht diese Erhöhung sehr wahrscheinlich auf die steigende Perizytenzahl während der Gefäßreifung zurück. Ein zweiter Versuch bestätigte dieses Ergebnis, und auch der Nachweis von PDGF-R β in den Retinalysaten von C57BL/6-Mäusen zeigte eine zunehmend starke Bande im Bereich von 190 kDa von p7 nach p12 (s. Tab. 31, Anhang).

3.2.6.3 *Angiopoietin-1/-2 und Tie2*

Bisherige Versuche haben gezeigt, dass dem Faktor Ang-1 eine entscheidende Rolle bei der Stabilisierung von Gefäßen zukommt, wahrscheinlich indem er über den membranständigen Rezeptor Tie-2 die Endothelzellen dazu veranlasst, ihre Zell-Zell-Kontakte untereinander zu festigen (Uemura, 2002). Der Antagonist Ang-2 bindet ebenfalls an Tie-2, hat aber keine gefäßstabilisierende Wirkung, sondern wird eher mit Gefäßuntergang und Gefäßremodeling in Verbindung gebracht.

Im Gegensatz zu anderen, bereits veröffentlichten Studien mit den hier verwendeten Antikörpern (Chang, 2003; Shyu, 2003), war der Nachweis der beiden Faktoren problematisch: Die Antikörper von Santa Cruz zeigten nur einmal ein positives Ergebnis, welches in Abb. 42 dargestellt ist. Alle weiteren Versuche, dieses Ergebnis zu reproduzieren, blieben erfolglos. Nur selten zeigte sich eine Bande in der erwarteten Höhe von 80 kDa und meistens war diese Bande verwaschen und schief, obgleich derselbe Blot beim Reprobing gegen ein anderes Protein sehr gute Ergebnisse lieferte (klare, gerade Banden und keinen Hintergrund). Da andere Arbeitsgruppen von ähnlichen Problemen hinsichtlich des Angiopoietin-Nachweises auf Proteinebene berichteten, wurde geschlussfolgert, dass zur Zeit keine geeigneten Antikörper gegen diese Proteine auf dem Markt sind. Der Nachweis dieser Faktoren erfolgte in unserer Arbeitsgruppe daraufhin nur noch auf mRNA-Ebene, wobei sich das hier vorgestellte Ergebnis bezüglich der Ang-1-Expression bestätigte.

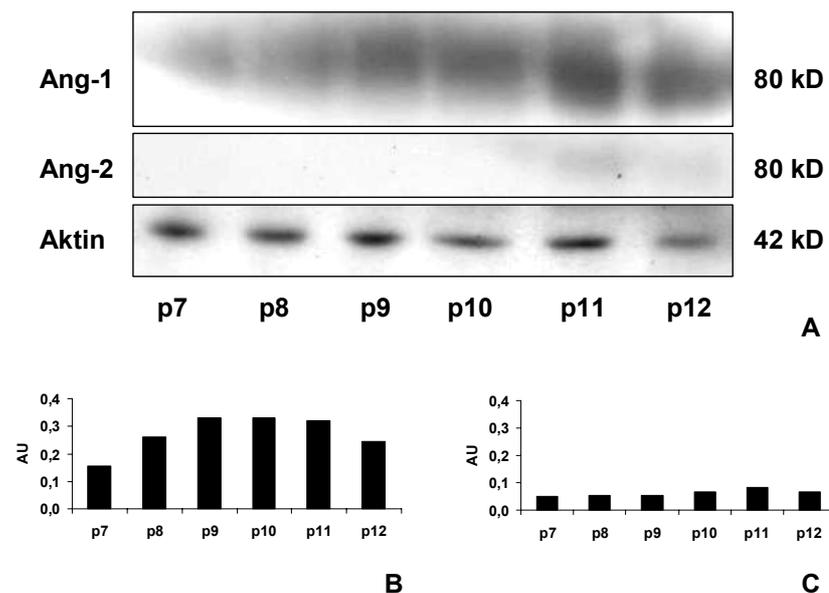


Abb. 42: Expression von Ang-1 und Ang-2 in Retinae von C57BL/6-Mäusen

(A) Western Blot gegen Ang-1 und Ang-2 sowie Aktin zur Verifizierung der Ladungsmenge. Je Spur wurde Retinalysat von fünf verschiedenen Mäusen geladen. Die Auftrennung erfolgte unter nicht-reduzierenden Bedingungen (B) Densitometrische Auswertung des Ang-1- und (C) des Ang-2-Blots. Zur Abgleichung der Ladungsunterschiede wurde jeweils der Quotient von Ang-1 bzw. Ang-2 zu Aktin aufgetragen.

Die Expression von Ang-1 erhöhte sich während der retinalen Gefäßentwicklung bei C57BL/6-Mäusen von p7 bis p9 um 100 % (verglichen mit dem Expressionsniveau an p7). Dann blieb das Expressionsniveau bis p11 stabil und fiel an p12 wieder leicht ab.

Ang-2 wurde während dieser Zeit nicht, bzw. ab p10/p11, nur in sehr geringer Menge exprimiert, möglicherweise im Zuge des beginnenden Gefäßmodellings.

Die Detektion des Tie-2-Rezeptors zeigte in allen drei durchgeführten Western Blot-Analysen eine einzelne klare Bande bei ca. 60 kDa. In Abb. 43 ist ein exemplarischer Blot gegen Tie-2 gezeigt: Die Expression des Rezeptors scheint über den dargestellten Zeitraum nicht reguliert zu werden, so dass die Stabilität von retinalen Gefäßen wahrscheinlich eher über die An- bzw. Abwesenheit von Ang-1 und Ang-2 gesteuert wird, als über die Rezeptorexpression.

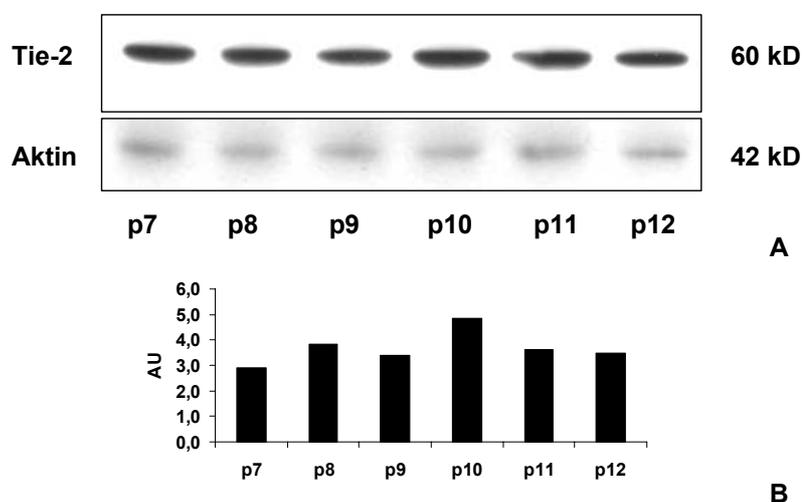


Abb. 43: Expression von Tie-2 in Retinae von C57BL/6-Mäusen

(A) Exemplarischer Western Blot gegen Tie-2 sowie Aktin zur Verifizierung der Ladungsmenge. Je Spur wurde Retinalysat von fünf verschiedenen Mäusen geladen. Die Auftrennung erfolgte unter nicht-reduzierenden Bedingungen. (B) Densitometrische Auswertung des Western Blots. Zur Abgleichung der Ladungsunterschiede wurde jeweils der Quotient von Tie-2 zu Aktin aufgetragen (AU = arbitrary units).

3.2.6.4 Ephrin B1 und B2

Die Ephrin Bs spielen eine wichtige Rolle bei der Differenzierung der Gefäße in Arterien und Venen. Auch in den kleinsten Kapillaren findet diese Unterscheidung statt, so dass man durch den Nachweis von Ephrin B1 und B2 venöse und arterielle Kapillaren voneinander unterscheiden kann (Adams, 1999; Shin, 2001). Um zu überprüfen, ob diese Faktoren möglicherweise an der Reifung und Stabilisierung des Gefäßsystems beteiligt sind, wurde ihre Expression in der Retina von C57BL/6-Mäusen von Tag p7 bis p12 bestimmt. Der Antikörper gegen Ephrin B1 richtet sich gegen die extrazelluläre Domäne

des Transmembran-Proteins und detektierte in drei voneinander unabhängigen Versuchen eine deutliche Bande bei 47 kDa. In Abb. 44 ist ein exemplarischer Blot dargestellt: Ephrin B1 scheint in diesem Zeitraum nicht auffällig reguliert zu werden, im Mittel (der drei Versuche) stieg dessen Expression mit der Zeit leicht an (s. Tab. 33, Anhang).

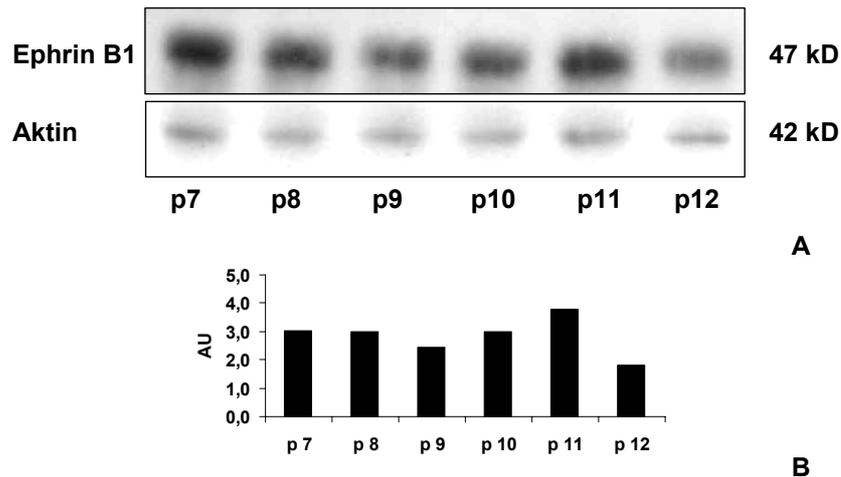


Abb. 44: Expression von Ephrin B1 in Retinae von C57BL/6-Mäusen

(A) Exemplarischer Western Blot gegen Ephrin B1 sowie Aktin zur Verifizierung der Ladungsmenge. Je Spur wurde Retinalysat von fünf verschiedenen Mäusen geladen. Die Auftrennung erfolgte unter nicht-reduzierenden Bedingungen. (B) Densitometrische Auswertung des Western Blots. Zur Abgleichung der Ladungsunterschiede wurde jeweils der Quotient von Ephrin B1 zu Aktin aufgetragen (AU = arbitrary units).

Im Gegensatz zu der starken Bande beim Ephrin B1-Blot zeigt der Ephrin B2-Blot nur eine schwache Bande (Abb. 45). Da Ephrin B2 nur im arteriellen und nicht wie Ephrin B1 im gesamten Gefäßsystem exprimiert wird, ist es möglich, dass die geladene Proteinmenge gerade an der Nachweisgrenze liegt. Der Antikörper richtet sich gegen das gesamte Ephrin B2-Protein und zeigt eine Bande auf der Höhe von 47 kDa. Der densitometrischen Auswertung dieses Blots nach zu urteilen, schwankt der Gehalt an Ephrin B2 etwas stärker als der von Ephrin B1. Allerdings kann ein einzelner Blot nur eine gewisse Vorstellung über das Expressionsniveau vermitteln und lässt keine allgemeine Schlussfolgerung zu.

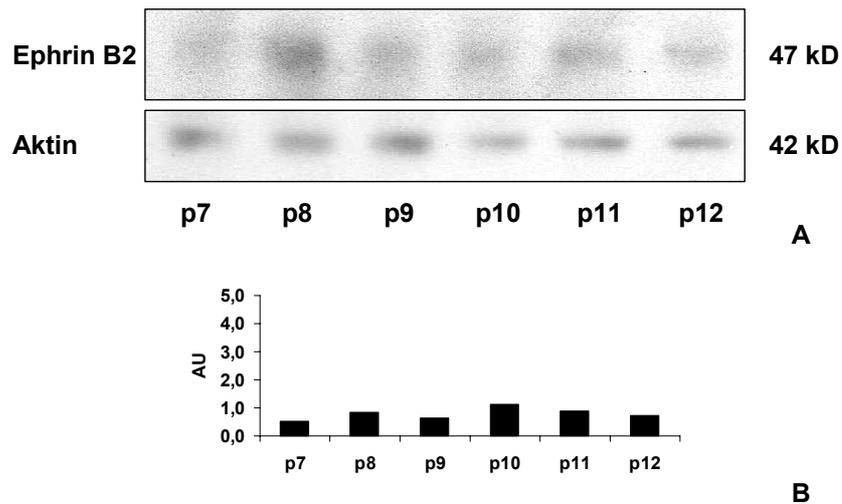


Abb. 45: Expression von Ephrin B2 in Retinae von C57BL/6-Mäusen

(A) Western Blot gegen Ephrin B2 sowie Aktin zur Verifizierung der Ladungsmenge. Je Spur wurde Retinalysat von fünf verschiedenen Mäusen geladen. Die Auftrennung erfolgte unter nicht-reduzierenden Bedingungen. (B) Densitometrische Auswertung des Western Blots. Zur Abgleichung der Ladungsunterschiede wurde jeweils der Quotient von Ephrin B2 zu Aktin aufgetragen (AU = arbitrary units).

Da auffällig starke Expressionsunterschiede zwischen p7 und p8 bei dem Nachweis der Ephrin Bs nicht gefunden wurden, wird eine Beteiligung dieser Faktoren – beim Übergang vom reaktiven Gefäßsystem an p7 zum stabilen Gefäßsystems an p8 – als nicht wahrscheinlich angesehen.

4 Diskussion

4.1 Effekt von Tenilsetam auf Endothelzellen

Der AGE-Inhibitor Tenilsetam hat im diabetischen Tiermodell gezeigt, dass er die Zahl an azellulären Kapillaren reduziert, ohne den Perizytenverlust zu beeinflussen. Da unbekannt ist, welchen Effekt Tenilsetam auf Endothelzellen ausübt, wurde in dieser Arbeit die Wirkung der Substanz auf HUVECs und BRECs näher untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass HUVECs unter dem Einfluss verschiedener Tenilsetam-Konzentrationen in ihrer Proliferation und DNA-Synthese gehemmt werden, und dass dieser Effekt in Gegenwart von Tenilsetam nicht über eine erhöhte Apoptose- oder Nekroserate zu erklären ist. Zudem verändert der längerfristige Kontakt von HUVECs mit Tenilsetam deren Bereitschaft zur Adhäsion und Migration und fördert deutlich das Aussprossen von BRECs in einem Fibringel. Weiterhin scheint Tenilsetam einen Einfluss auf die Il-1 β -induzierte ICAM-1-Expression von HUVECs zu haben. Diese Ergebnisse und deren mögliche Bedeutung für die diabetische Mikrovaskulatur sollen hier diskutiert werden.

4.1.1 Einfluss von Tenilsetam auf die Zellproliferation von HUVECs

Die Versuche an HUVECs haben gezeigt, dass Tenilsetam die Proliferation der Endothelzellen konzentrationsabhängig inhibiert. Dieser hemmende Effekt findet seine Entsprechung in der DNA-Synthese: Diese wird innerhalb von 24 Stunden durch die Inkubation mit 3 mM Tenilsetam um 24 % gesenkt. Wird die DNA-Synthese durch VEGF stimuliert, so ist der inhibierende Effekt noch größer und liegt bei 31 %. Fraglich war, ob die starke Reduktion der Zellzahl Folge einer vermehrten Apoptose oder Nekrose ist. Tatsächlich weist die Markierung der Zellen mit Annexin V, bzw. Propidiumiodid auf einen geringen Anstieg der Apoptose-, bzw. Nekroserate hin. Allerdings ist der Prozentsatz der apoptotischen und nekrotischen Zellbestandteile – relativ gesehen – zu gering, um die beobachtete Proliferationshemmung zu erklären: Während die Zahl der apoptotischen Zellen unter Kontrollbedingungen im Mittel bei 0.7 % lag, waren nach Inkubation mit 3 mM Tenilsetam nur 2.4 % der Zellen apoptotisch. Der Prozentsatz nekrotischer Zelltrümmer lag unter Kontrollbedingungen im Mittel bei 2.0 % und nach Inkubation mit 3 mM Tenilsetam bei 2.8 %.

Mit seinen antiproliferativen Eigenschaften könnte Tenilsetam durchaus einen positiven Effekt auf das diabetische Endothel ausüben. Bereits im Stadium der nicht-proliferativen Retinopathie werden Wachstumsfaktoren wie VEGF und Ang-2 in der Retina vermehrt exprimiert (Lutty, 1996; Amin, 1997; Tilton, 1997; Matsumura, 1999). AGEs selbst können die Proliferation von Endothelzellen fördern: So zeigten Chibber et al., dass bereits geringe Konzentrationen von AGE-BSA (62.5 µg/ml) die Proliferation von BRECs um 56 % gegenüber der unbehandelten Kontrolle erhöhen (Chibber, 1997). Yamagishi et al. beobachteten, dass die AGE-induzierte Proliferation von mikrovaskulären Endothelzellen auf die autokrine Induktion des Wachstumsfaktors VEGF zurückzuführen ist (Yamagishi, 1997). Neuere Untersuchungen lassen vermuten, dass diese Wirkung von AGEs über RAGE vermittelt wird, da RAGE-überexprimierende Endothelzellen signifikant stärker proliferieren als ihre Kontrollzellen. Des Weiteren wurde in diesen Versuchen beobachtet, dass AGEs über eine erhöhte Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF-κB (*nuclear factor-κB*) und AP-1 (*activator protein-1*) die Konzentration von VEGF- und Ang-2-mRNA erhöhen (Okamoto, 2002b). Die gleiche Arbeitsgruppe zeigte weiter, dass AGEs auch *in vivo* – bei befruchteten Hühnereiern im so genannten CAM-Assay (*chorioallantoic membrane assay*) – die Angiogenese deutlich verstärkten. Die unter dem Einfluss der AGEs gebildeten Gefäße waren interessanterweise frei von Perizyten, möglicherweise ein typisches Merkmal der pathologischen Angiogenese beim Diabetes (Okamoto, 2002a).

Über welchen Mechanismus Tenilsetam die Proliferation der Zellen inhibiert ist bislang allerdings unbekannt.

4.1.2 Einfluss von Tenilsetam auf das Adhäsions- und Migrationsverhalten von HUVECs

Die direkte Zugabe der unphysiologisch hohen Dosis von 30 mM Tenilsetam zur Zellsuspension verringerte die Zahl der Zellen, die nach einer Stunde an einer Gelatinebeschichteten Platte adhärten, geringfügig. Die niedrigeren Konzentrationen von 3 und 10 mM besaßen keinen Einfluss auf das Adhäsionsverhalten. Versuche, in denen die Zellen an FCS-beschichtete Platten adhärten, führten unter den gleichen Bedingungen (Zugabe von Tenilsetam zur Zellsuspension und 1-stündige Adhäsion bei 37°C) zu einem ähnlichen Ergebnis, wobei anzumerken ist, dass hier die Konzentration von 10 mM Tenilsetam ebenfalls zu einer leicht verringerten Adhäsion führte. Mit diesen Resultaten vergleichbar ist das Ergebnis eines Migrationversuchs, in welchem Tenilsetam ebenfalls direkt der

Zellsuspension zugesetzt wurde: Die basale Migrationsrate durch die Membran blieb in Anwesenheit geringer Konzentrationen an Tenilsetam (3 und 10 mM) nahezu unbeeinflusst, wohingegen 30 mM Tenilsetam die Migrationsrate um 22 % senkte. Die Migrationsrate lag um ca. 50 % höher, wenn die Zellen durch Zugabe von bFGF und VEGF stimuliert wurden, die Zugabe von Tenilsetam beeinflusste diesen Effekt nicht.

Hieraus wurde gefolgert, dass die direkte Zugabe von moderaten Mengen an Tenilsetam zu einer Suspension von Endothelzellen keine deutliche Beeinflussung des Adhäsions-, bzw. Migrationsverhaltens in dem gewählten Zeitraum von einer Stunde, bzw. vier Stunden bewirkt. Lediglich die sehr hohe Konzentration von 30 mM beeinträchtigt beide Prozesse geringfügig, was möglicherweise auf die oben beschriebene proliferationsinhibierende Wirkung zurückzuführen ist.

Anders ist die Situation, wenn Endothelzellen zuvor für 24 Stunden mit Tenilsetam inkubiert wurden. Der Kontakt der Zellen mit Tenilsetam veränderte nicht nur ihre Morphologie (s. Abb. 11 und 12, Kapitel 3.1.1), sondern gleichsam ihr Verhalten bezüglich der Adhäsion und Migration. Es zeigte sich, dass präinkubierte Zellen mit steigender Tenilsetam-Konzentration etwas stärker adhärten. Dieser Effekt wurde sowohl auf Gelatine-, als auch auf FCS-beschichteten Platten beobachtet und – erstaunlicherweise – ebenfalls auf der Beschichtung, die dem Versuch als Negativkontrolle dient, d.h. der BSA-Beschichtung. Auf letzterer ist die adhäsionssteigernde Wirkung sogar am deutlichsten ausgeprägt: Wurden die Zellen, die unter Kontrollbedingungen auf BSA-beschichteten Platten adhärten gleich 100 % gesetzt, so lag der Prozentsatz der adhären Zellen, die mit 30 mM Tenilsetam präinkubiert wurden mit 180 % deutlich höher. Auch die Migration von Zellen, die zuvor über 24 Stunden mit Tenilsetam in Kontakt kamen, war leicht – in einem Versuch sogar stark – erhöht.

Die Adhäsion an die extrazelluläre Matrix ist eine wichtige Grundvoraussetzung für das Überleben von Endothelzellen (Meredith, 1993). Werden sie an der Adhäsion gehindert – in der Zellkultur gewährleistet durch die Beschichtung der Platten mit bovinem Serumalbumin (BSA) – so leiten sie den Prozess der Apoptose ein. Aus diesem Grund dient die BSA-Beschichtung als Negativkontrolle für den Adhäsionsversuch. Umso erstaunlicher ist die Tatsache, dass Tenilsetam gerade unter diesen "unwirtlichen" Bedingungen eine deutliche Steigerung der Adhäsionsrate bedingt.

Vermittelt wird die Adhäsion von Endothelzellen über Integrine – heterodimere transmembrane Glykoproteine – die Interaktionen zwischen dem Zellinneren (dem Zytoskelett) und der Umgebung ermöglichen (Hynes, 1992). Neben Zell-Matrix-Interaktionen vermitteln sie über die Bindung an zelluläre Adhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie auch Zell-Zell-Adhäsionen. Viele Integrine werden konstitutiv an der Zelloberfläche exprimiert, sind aber inaktiv und müssen erst durch ihren Agonisten aktiviert werden (Sanchez_Mateos, 1996; Xiong, 2001). Durch Bindung eines Liganden an ein Integrin wird ein Signal in die Zelle übertragen (*outside-in signaling*), was zu einer Umorientierung des Zytoskeletts führt. Dieser Prozess kann die Veränderung der Zellform, die Migration oder die Proliferation steuern (Yamada und Geiger, 1997; Arnaout, 2002). Umgekehrt können aber auch Faktoren in der Zelle die Integrine aus einem passiven schwach adhäsiven in einen aktiven adhäsiven Zustand umschalten (*inside-out signaling*) (Dedhar, 1999). Beeinflusst Tenilsetam möglicherweise die Expression oder die Aktivierung von endothelialen Integrinen?

Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen verändern die Endothelzellen nach Tenilsetam-Zugabe ihre Morphologie derart, dass sie von einem eher rundlichen zu einem länglichen migrierenden Phänotyp wechseln. Ob diese Umstrukturierung der Zelle auf die Beeinflussung der Integrin-Expression zurückzuführen ist und ob diese Beeinflussung gegebenenfalls über ein *outside-in* oder *inside-out signaling* erfolgt, bleibt zu untersuchen. Die Vermutung liegt jedoch nahe, dass es sich – wenn überhaupt – um ein *inside-out signaling* handelt, da der beobachtete Effekt von Tenilsetam auf die Zellen erst nach 24-stündiger Inkubation deutlich wurde.

Tenilsetam ist ein kleines lipophiles Molekül, wodurch es durch die endotheliale Zellmembran diffundieren kann und auf diesem Wege intrazelluläre Signalwege beeinflussen könnte. Es gibt andere Substanzen, die sich aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften in die Zellmembran einlagern, deren Fluidität erhöhen und somit die Migration der Zelle fördern (z.B. α -Tocopherol) (Ghosh, 2002). Es wäre interessant zu untersuchen, ob Tenilsetam auf einem dieser Wege auf die Zelle einwirkt.

4.1.3 Einfluss von Tenilsetam auf die IL-1 β -induzierte Expression von Adhäsionsmolekülen bei HUVECs

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Tenilsetam möglicherweise einen direkten Einfluss auf die Expression der Adhäsionsmoleküle hat. Tatsächlich konnte Tenilsetam die IL-1 β -induzierte Expression von ICAM-1 konzentrationsabhängig um bis zu 23 % reduzieren. Die basale Expression von ICAM-1 sowie die basale und IL-1 β -induzierte Expression von VCAM-1 und E-Selektin blieben durch Zugabe von Tenilsetam jedoch unbeeinflusst.

Die hyperglykämische Stoffwechselsituation beim Diabetes führt am Endothel zu einer erhöhten Expression von Zelladhäsionsmolekülen wie E-Selektin aus der Familie der Selektine sowie VCAM-1 und ICAM-1 aus der Immunglobulin-Superfamilie und damit zu einer als proinflammatorisch und prokoagulatив beschriebenen Situation (Carlos und Harlan, 1994; Schmidt, 1995; Chappey, 1996; Nozaki, 2001; Basta, 2002; Jousen, 2002; Wen, 2002; Bai, 2003). E-Selektin vermittelt eine schwache, reversible Bindung von Leukozyten an die Gefäßwand und stellt auf endothelialer Seite einen der Hauptvermittler des *rolling* der Leukozyten auf dem Endothel dar. VCAM-1 und ICAM-1 vermitteln die Adhäsion der Leukozyten sowie deren transzelluläre Migration in das Gewebe über Integrine (Gearing und Newman, 1993), wobei VCAM-1 vor allem VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$) und ICAM-1 an LFA-1 ($\alpha L\beta 2$) bindet (Larson und Springer, 1990; Stewart, 1995). Die vermehrte Rekrutierung von Leukozyten zur mikrovaskulären Strombahn wird von vielen Autoren als Problem beschrieben, da Leukozyten aufgrund ihres großen Durchmessers und ihres hochviskösen Zytoplasmas zu einer Abnahme des retinalen Blutflusses führen und teilweise sogar ganze Kapillaren verstopfen können (Lipowsky, 1991; Bursell, 1996; Miyamoto, 1997; Miyamoto, 1998).

Im Unterschied zu anderen Arbeiten wurde hier keine vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen unter hyperglykämischen Bedingungen (30 mM Glukose für sechs Stunden) beobachtet (s. Tab. 24-26, Anhang). Takami et al. zeigten bei HUVECs einen 1.4-fachen Anstieg der ICAM-1-Expression, wenn diese über sechs Stunden mit nur 16.7 mM Glukose inkubiert wurden (Takami, 1998). Auch andere Arbeitsgruppen konnten den positiven Zusammenhang zwischen Hyperglykämie und der ICAM-1-Expression auf Endothelzellen nachweisen, allerdings erst nach einer 24-stündigen Inkubationsperiode (Baumgartner_Parzer, 1995; Morigi, 1998). Warum die hohe Glukosekonzentration hier

keine erhöhte Expression der Adhäsionsmoleküle bewirkt ist nicht bekannt. Gleichmaßen unklar ist, auf welchem Wege Tenilsetam die ICAM-1-Expression reduziert, da diese Ergebnisse unabhängig von Hyperglykämie und AGE-Bildung – und demnach unabhängig von der Aktivierung der Signalkaskade "RAGE → NFκB → ICAM-1" – gemessen wurden.

Andere Autoren konnten zeigen, dass die Reduktion der ICAM-1-Expression zu einer verringerten Leukozytenadhäsion *in vivo* führt. So untersuchten Booth et al. die Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen in der mikrovaskulären Strombahn von Rattenmesenterium und zeigten, dass die Infusion des PKC-Inhibitors Bisindolylmaleimid-I die ICAM-1-Expression signifikant reduzierte und in Folge auch die Adhäsion von Leukozyten an das Endothel postkapillärer Venolen. In weiteren Versuchen fanden sie heraus, dass auch die Zugabe des antioxidativen Enzyms Superoxid-Dismutase die Adhäsion von Leukozyten verminderte (Booth, 2002). Es wäre also möglich, dass Tenilsetam durch die Reduktion von ICAM-1 einen positiven Effekt auf das Endothel ausübt. Die Bestätigung dieser Ergebnisse bedarf jedoch dringend weiterer Versuche.

4.1.4 Einfluss von Tenilsetam auf das Sprouten mikrovaskulärer BRECs

Der so genannte *sprouting-* oder *tube formation-assay* wurde 1995 von Nehls et al. etabliert und ermöglicht die Quantifizierung von endothelialen Sprouts in einem 3-dimensionalen Fibrinigel (Nehls und Drenckhahn, 1995b). Die Zugabe von Tenilsetam zu diesem Versuchsansatz hat einen unerwartet deutlichen Einfluss auf das Sprouten von BRECs: Bereits 1 mM der Substanz erhöht die Anzahl an Sprouts nach 48 Stunden um 44 % gegenüber der Kontrolle, wenn die Zellen gleichzeitig mit dem Wachstumsfaktor bFGF stimuliert werden. Unstimulierte Zellen steigern ihr Zellsprouting in Anwesenheit von 1 mM Tenilsetam sogar ungleich stärker (um 80 %), was bedeutet, dass Tenilsetam allein in der Lage ist das Sprouten von Endothelzellen zu induzieren. Die maximale Stimulation erreicht Tenilsetam in der Konzentration von 10 mM, wohingegen 30 mM Tenilsetam die Sproutbildung nicht weiter erhöhte, sondern vielmehr wieder auf das Niveau der Kontrolle reduzierte.

Carmeliet bezeichnete das Sprouting als einen möglichen Angiogeneseprozess in den die Zellproliferation und -migration involviert sind (Carmeliet, 2000a). Dass Tenilsetam die Zellproliferation inhibiert, gleichzeitig aber das Sprouten stark fördert, dürfte nach dieser

Definition nicht möglich sein. Andererseits schrieben Sholley et al. bereits 1984, dass das Sprouting prinzipiell mit der Proliferation von Zellen einhergeht, jedoch auch zeitweise unabhängig davon sein kann. In diesem Fall würde die Migration und die Reorganisation vorhandener Endothelzellen zu der Sproutbildung, also zu der Ausbildung eines Gefäßsprosses, führen (Sholley, 1984). Unter normalen physiologischen Bedingungen bezeichnet das Sprouting jedoch den Prozess der Entstehung eines neuen Gefäßsprosses aus einem bereits existierenden Gefäß. Zu diesem Zweck lösen sich die Endothelzellen vom Untergrund, exprimieren Proteasen, welche die umgebene Matrix lysieren und beginnen in die entstandene Lücke zu migrieren. Mit zunehmender Länge des Sprouts proliferieren die Zellen und formen ein Lumen, durch das später Blut fließt (Carmeliet, 2000a; Vestweber, 2000).

Warum Tenilsetam in den unterschiedlichen Versuchen die Proliferation und die Proteinsynthese der Zellen hemmt, aber die Migration leicht und das Sprouting stark fördert, ist nicht bekannt. Eine mögliche Erklärung für diese scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse, ist die Tatsache, dass die Proliferationshemmung bei HUVECs und das Sprouten bei BRECs beobachtet wurde. BRECs sind, im Gegensatz zu HUVECs, mikrovaskuläre Endothelzellen. Für den Sprouting-Assay wurden BRECs gewählt, weil HUVECs unter den gleichen Bedingungen nicht mit einer konsistenten Sproutbildung reagieren. Allerdings bestehen zwischen mikro- und makrovaskulären Endothelzellen teilweise charakteristische Unterschiede hinsichtlich ihres Phänotyps und Verhaltens, die sich auch in Kultur über mehrere Passagen bewahren (Stolz und Jacobson, 1991; Geiger, 1997; Lang, 2003). So wurde beispielsweise gezeigt, dass Endothelzellen aus mikro- bzw. makrovaskulären Strombahnen unterschiedliche Expressionsprofile hinsichtlich der Matrixmetalloproteasen (MMPs) und deren Inhibitoren, den TIMPs (*tissue inhibitor of MMPs*), aufweisen (Jackson und Nguyen, 1997). Auch die Expression von Zytokinrezeptoren variiert zwischen mikro- und makrovaskulären Endothelzellen erheblich (Salcedo, 2000).

Um die gewonnenen Daten eindeutig interpretieren zu können, müssten weitere Versuche angesetzt werden, in denen sowohl die Proliferation als auch das Sprouting in Antwort auf Tenilsetam von HUVECs und BRECs miteinander verglichen werden.

4.1.5 Grundsätzliche Überlegungen zum Einsatz und Wirkmechanismus von Tenilsetam

Tenilsetam ist eine von Piracetam abgeleitete Substanz. Piracetam ist ein Medikament, welches bereits seit 1971 auf dem Markt ist und die Lern-, Auffassungs- und Konzentrationsfähigkeit positiv beeinflussen kann, weshalb es als Nootropika bezeichnet wird (Ihl und Kretschmar, 1997). Tenilsetam wurde einige Jahre später von Cassella (jetzt Aventis, Frankfurt/Main) entwickelt und zeigte in einem Screening an Tieren ähnliche Eigenschaften wie Piracetam. Die beim Menschen üblicherweise verabreichte Dosis von Piracetam liegt zwischen 35 und 70 mg/kg KG pro Tag, was erklärt, warum Shoda et al. die Dosierung von 50 mg/kg KG Tenilsetam für ihre Versuche an Ratten wählten (Shoda, 1997). Umgerechnet auf das Blutvolumen der Ratte (ca. 24 ml bei 0.4 kg) entsprechen 50 mg/kg etwa 4.56 mM, so dass die in der Zellkultur eingesetzte Dosis durchaus mit der im Tierversuch sowie der Dosis, die Patienten an Piracetam erhalten, vergleichbar ist. Aufgrund der Tatsache, dass auch in senilen Plaques in den Gehirnen von Alzheimer-Patienten AGEs und eine Hochregulation des Rezeptors RAGE nachgewiesen wurde (Vitek, 1994; Colaco, 1996; Münch, 1997a), vermuteten Shoda et al., dass Tenilsetam möglicherweise über die Inhibierung von AGE-Addukten wirkt, was sie 1997 mit Hilfe ihrer *in vitro* Versuche und den Versuchen an diabetischen Ratten bestätigen konnten (Shoda, 1997).

Die direkte Wirkung auf Endothelzellen wurde bislang nicht untersucht (persönliche Mitteilung Dr. U. Schindler, Aventis). In der vorliegenden Arbeit bewies Tenilsetam einen deutlichen antiproliferativen Effekt. Von den Effekten auf das Sprouten abgesehen war der Zusammenhang stets: Je höher die Konzentration an Tenilsetam, desto stärker der Effekt auf die Endothelzellen. Um rein osmotische Effekte aufgrund der hohen Dosierung von 30 mM auszuschließen, wäre es sinnvoll die Versuche mit einer ähnlichen Substanz (wie z.B. Piracetam) zu wiederholen. Der Zusatz von 30 mM Glukose zeigte allerdings keinerlei Effekte auf die Zellen (s.Anhang).

Abgesehen von der Eigenschaft als AGE-Inhibitor und Metallchelator (Price, 2001) ist der Wirkmechanismus von Tenilsetam gänzlich unbekannt. Aber auch der von Piracetam ist nur ansatzweise bekannt, weshalb der Substanz beinahe die Zulassung als Arzneimittel durch das Bundesgesundheitsamt versagt geblieben wäre (Ihl und Kretschmar, 1997). Indes war Piracetam in klinischen Studien sehr effektiv und darüber hinaus sehr gut

verträglich. Untersuchungen führten zu dem Ergebnis, dass die Absorption von Piracetam schnell und vollständig erfolgt, die Substanz kein besonderes Proteinbindungsverhalten zeigt (auch nicht für zentrale neuronale Rezeptoren) und sie keiner hepatischen Metabolisierung unterliegt. Die Ausscheidung von Piracetam erfolgt über die Niere (Shorvon, 2001). Es wird vermutet, dass die Hauptaktionen von Piracetam über eine Veränderung der Membraneigenschaften (erhöhte Fluidität) und der Proteinsynthese und/oder einer Steigerung der oxidativen Glykolyse und einer Reduktion der Plättchenaggregation erfolgen (Ihl und Kretschmar, 1997; Stockmans, 1998; Muller, 1999; Scheuer, 1999; Shorvon, 2001; Gualtieri, 2002). Es wäre denkbar, dass Tenilsetam zum Teil ähnliche Wirkungen erzielt. Eine Vermutung, die bisher jedoch rein hypothetisch ist und weiterer Untersuchung bedarf.

4.1.6 Ist der Einsatz von Tenilsetam zu Therapie Zwecken vorstellbar?

Die Bildung von Glykierungs-Endprodukten, den AGEs, ist an der Pathologie der diabetischen Mikroangiopathie beteiligt. Der Einsatz von potenten AGE-Inhibitoren ist dementsprechend für die Minderung diabetischer Komplikationen von großem Wert. Tenilsetam wurde zunächst entwickelt, um als Anti-Demenz-Mittel eingesetzt zu werden, jedoch gibt es auf diesem Sektor neuere und effektivere Medikamente als Tenilsetam – wie beispielsweise Nefiracetam und Levetiracetam – die ebenfalls von Piracetam abgeleitet wurden (Rashid und Ueda, 2002; Marini, 2004).

In anderen Bereichen ist Tenilsetam jedoch keineswegs wirkungslos, konnte es doch *in vitro* die Glykierung von Collagen verhindern und *in vivo* die Akkumulation des AGEs Pyrralin in Aorta und Niere von Ratten nach 4-monatiger Diabetesdauer vermindern (Shoda, 1997). Auch in Versuchen der eigenen Arbeitsgruppe zeigte Tenilsetam einen positiven Effekt, indem es in der Retina von diabetischen Ratten die azellulären Kapillaren reduzierte.

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, verändert der Kontakt von Endothelzellen mit Tenilsetam deren Eigenschaften. Es wäre möglich, dass die Substanz – ähnlich wie Piracetam – mit den Phospholipiden der Zellmembran interagiert und so die Membranfluidität erhöht (Mingeot_Leclercq, 2003), was die Neigung der Zellen zu migrieren und zu sprouten fördert (Ghosh, 2002).

Der deutlichste Effekt von Tenilsetam auf HUVECs ist jedoch die Inhibierung der Zellproliferation sowie der DNA-Synthese. Es wäre interessant zu untersuchen, ob Tenilsetam in den Zellzyklus eingreift, indem es z.B. Inhibitoren der Cyclin-abhängigen Kinasen, der CDKs (*cyclin dependent kinases*), aktiviert. Dadurch könnte der Übergang von der G₁ in die S-Phase verhindert werden und die Zelle so an der DNA-Synthese gehindert werden. Diese Arretierung der Zelle könnte sich in sofern positiv auswirken, als dass die diabetische Endothelzelle die Möglichkeit bekommt eventuelle – durch oxidativen Stress hervorgerufene – Schäden an der DNA zu reparieren, bevor eine neue Zellteilung ansteht. Möglicherweise ist der ruhende, adhäsive Phänotyp gegenüber Diabetes-induzierten Schädigungen weniger empfänglich als der proliferierende Phänotyp. Falls Tenilsetam darüber hinaus auch *in vivo* die Expression von ICAM-1 und die Adhäsion von Leukozyten vermindern könnte, würde dies einen weiteren Schutz für das diabetische Endothel bedeuten.

Wenig Beachtung fand bisher die Metall-chelierende Eigenschaft von Tenilsetam, obwohl Price et al. zeigten, dass Tenilsetam die kupferkatalysierte Oxidation von Ascorbinsäure sehr viel effektiver verhindern konnte als Aminoguanidin oder Pyridoxamin. Dabei könnte gerade diese Eigenschaft dazu beitragen die metallkatalysierte Autoxidation von Glukose zu vermindern, welche zu der Bildung von Glykoxidationsprodukten wie CML (Carboxymethyllysine) und Pentosidin führt (Price, 2001). Chelatoren, welche Übergangsmetalle binden, sind potente Inhibitoren dieser oxidativ gebildeten AGEs (Fu, 1994). Auf diesem Wege könnte Tenilsetam einen Beitrag zur Senkung des oxidativen Endothelzellschadens leisten.

Da der Wirkmechanismus von Tenilsetam weitestgehend unbekannt ist, sind jedoch weitere Versuche von Nöten, um sämtliche Wirkungen – und auch eventuelle Nebenwirkungen – näher zu charakterisieren.

Interessant ist in jedem Fall der Aspekt, dass Tenilsetam die Endothelzellen diabetischer Ratten vor Hyperglykämie-induzierten Schäden zu schützen vermochte, ohne einen Effekt auf die Perizyten auszuüben. Ausgehend von der Vorstellung, dass der Perizytenverlust eine Frühveränderung der diabetischen Retinopathie ist, sollten Therapiekonzepte aber auch den Schutz der Perizyten beinhalten.

4.2 Die Bedeutung perivaskulärer Zellen für retinale Kapillaren

Unser Wissen über die Herkunft und die Funktion von Perizyten ist im Vergleich zu unserem Wissen über Endothelzellen sehr gering (Gerhardt, 2003). Die Arbeitshypothese bestand in der Annahme, dass die Anwesenheit von Perizyten retinale Kapillaren vor Regression schützen kann. Die Hypothese rührt daher, dass dem frühen Perizytenverlust zu Beginn der diabetischen Retinopathie letztlich der Gefäßuntergang folgt (Cogan, 1961; Engerman, 1976). Zudem wird angenommen, dass die Gefäßregression bei Frühgeborenen Folge eines unreifen retinalen Gefäßsystems ist, welches zum Zeitpunkt der Sauerstofftherapie noch keine stabilisierenden Perizyten rekrutiert hat (Smith, 1994; Reynolds, 2001). Um diesen Zusammenhang zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit die retinale Perizyten-dichte unterschiedlich alter Mäuse bestimmt und mit der jeweiligen Empfindlichkeit der Gefäße gegenüber 75 %igem Sauerstoff verglichen.

Es zeigte sich, dass die Perizyten-dichte mit dem Alter der Mäuse zunimmt. Besonders auffällig war der deutliche Anstieg der Perizytenzahl von Tag p7 auf p8. Des Weiteren wurde gezeigt, dass ein entscheidender Entwicklungsschritt – die Entstehung des tiefen Netzwerks – ebenfalls auf den Zeitraum zwischen p7 und p8 fällt und dass eine Induktion der Gefäßregression durch Hyperoxie ab Tag p8 nicht mehr möglich ist. Ob ein direkter Zusammenhang zwischen Perizytenzahl und Gefäßstabilität bzw. zwischen der Entstehung des tiefen Gefäßnetzes und Gefäßstabilität besteht und ob die gewonnenen Erkenntnisse für die Therapie der diabetischen Retinopathie von Bedeutung sind, wird hier diskutiert.

4.2.1 Rekrutierung von Perizyten und vSMC während der physiologischen Angiogenese

Die Vaskularisierung der Mausretina erfolgt postnatal (Connolly, 1988). Eine Woche nach der Geburt, an p7, erreichten die vom *Nervus opticus* aussprossenden Gefäße der XlacZ-Mäuse den äußeren Rand der Retina. Zu diesem Zeitpunkt waren sowohl die Arteriolen und Venolen, als auch die Kapillaren in der Ganglienzellschicht mit lacZ-positiven Zellen assoziiert. Dass sowohl die Perizyten der Kapillaren, als auch die vSMC der größeren Gefäße lacZ-positiv waren, bestätigt die Theorie einer gemeinsamen Vorläuferzelllinie dieser Wandzellen (Nehls und Drenckhahn, 1993; Carmeliet, 2000b; Sims, 2000).

Dass Perizyten bereits vom ersten Tag nach der Geburt an zusammen mit den sproutenden Endothelzellen die Retina besiedeln, wurde mittlerweile in zahlreichen Experimenten bewiesen (Ozderdem, 2001; Fruttiger, 2002; Gerhardt, 2003). Dieser Umstand war zu Beginn der Arbeit umstritten und die Hypothese des *windows of plasticity*, nach der die neugebildeten Gefäße über einen gewissen Zeitraum frei von Wandzellen bleiben, um sich den aktuellen Nähr- und Sauerstoffkonzentrationen aktiv anpassen zu können, war eine allgemein anerkannte Theorie (Benjamin, 1998). Inzwischen ist bekannt, dass das Plastizitätsfenster in dieser Form nicht existiert, sondern durch den Irrtum zustande kam, dass alle Perizyten glattmuskuläres Aktin (*α -smooth muscle actin*, *α -SMA*) exprimieren: Benjamin et al. verwendeten Antikörper gegen α -SMA als spezifischen Perizytenmarker und stellten fest, dass α -SMA-positive Zellen erst einige Tage bis zu einer Woche später zum endothelialen Kapillarnetz rekrutiert wurden. Dabei ist α -SMA als Perizytenmarker ungeeignet, da nur wenige Perizyten-Populationen α -SMA exprimieren (Nehls und Drenckhahn, 1991; Hellström, 1999; Gerhardt und Betsholtz, 2003).

Die einwandfreie Identifizierung von Perizyten blieb über einen langen Zeitraum eines der Hauptprobleme der Erforschung dieser Zellen (Nehls und Drenckhahn, 1991; Hirschi und D'Amore, 1996). Bis vor kurzem war die zweifelsfreie Darstellung von Perizyten am Gefäß nur über die beschwerliche Methode der Retinadigestion mit anschließender PAS-Färbung (Kuwabara und Cogan, 1960; Hammes, 1991) oder mit Hilfe der Elektronenmikroskopie möglich (Rhodin und Fujita, 1989; Tilton, 1991). Erst die Entdeckung neuer charakteristischer Perizytenmarker, wie das Proteoglykan NG2 (Ozderdem, 2001), das GTPase-aktivierendes Protein RGS5 (Bondjers, 2003; Cho, 2003), die XlacZ-Maus (Tidhar, 2001) und auch die Visualisierung von Perizyten über den Nachweis des PDGF-R β s (Fruttiger, 2002), erleichterte die Arbeit mit Perizyten und führte innerhalb kurzer Zeit zu einer Fülle an neuen Erkenntnissen (Stalmans, 2002; Uemura, 2002).

Für den schnellen quantitativen Nachweis von Perizyten im lichtmikroskopischen Präparat ist die XlacZ-Maus gut geeignet (Gerhardt, 2003). Die β -Galaktosidase wird im Zellkern exprimiert und das bei der X-gal-Färbung gebildete blaue Produkt verteilt sich – vom Zellkern ausgehend – über den gesamten Zellkörper bis in die Zellfortsätze. Dadurch wird deutlich, dass sich die Morphologie der retinalen Perizyten mit der Zeit verändert: An p7 ist die Färbung schwach, jedoch sind deutlich lange filamentöse Zellfortsätze (Filopodien)

zu erkennen, die an p8 in ihrer Ausprägung zunehmen. Nach Wood und Martin erfüllen Filopodien in einer ganzen Reihe von Zelltypen mindestens drei verschiedene Funktionen: Sie dienen der interzellulären Kommunikation sowie der Zellmigration und Zelladhäsion (Wood und Martin, 2002). Der eher längliche Phänotyp der Perizyten mit den vielen Fortsätzen an p7, p8 und p9 weist dementsprechend auf einen aktiven Migrationsprozess hin. Ab p10 geht die Zahl der Filopodien deutlich zurück und der Perizyt erscheint kugelig. Bis p26 ändert sich die perizytäre Morphologie nicht weiter. Diese Beobachtung wurde in der Literatur bislang nicht beschrieben, was möglicherweise auf die Wahl der perizytären Marker und ihrer Darstellung zurückzuführen ist.

Durch die quantitative Bestimmung der Perizyten zu verschiedenen Zeitpunkten der Gefäßentwicklung wurde gezeigt, dass die Perizytenzahl mit der Entwicklung signifikant zunahm: Von p7 auf p8 verfünffachte sich zunächst ihre Zahl, ab p8 verlief der weitere Zuwachs linear. Der unerwartet rasche Anstieg der Perizytenzahl an p8 weist auf einen bedeutenden Entwicklungsschritt hin: Die Entwicklung des tiefen Kapillargeflechts.

4.2.2 Perizyten und die Entwicklung des tiefen Kapillargeflechts

Das Gefäßnetz der adulten Retina erstreckt sich von der oberen Ganglienzellschicht bis in die tiefer liegende innere Körnerschicht. Entwicklungsbiologisch formt sich zunächst das obere Gefäßnetz auf einem Netzwerk aus Astrozyten, bevor – ausgehend von den Venolen – Kapillaren in die tiefer liegenden Schichten sprossen (Connolly, 1988; Zhang, 1999). Die Entwicklung dieses sekundären Gefäßnetzes verläuft unabhängig von Astrozyten (Gariano, 1996; Fruttiger, 2002), es wird angenommen, dass der Reiz für das Tiefenwachstum von Müllerzellen ausgeht, die ebenfalls VEGF exprimieren und die Retina der Länge nach durchstrecken (Stone, 1995). Connolly et al. sahen den Antrieb für die Entwicklung des tiefen Netzes in dem Dickenwachstum der Retina. Sie verwiesen auf Versuche anderer Autoren, die postulierten, dass die Retina solange ausreichend mit Sauerstoff versorgt ist, wie alle Schichten nicht weiter als 140 µm von einem blutführenden Gefäß entfernt sind (Michaelson, 1954; Bellhorn, 1980). Ihrer Theorie nach, dürfte die Retina dementsprechend bis zum siebten Tag nach der Geburt nur aus einer einschichtigen Lage an Blutgefäßen bestehen (Connolly, 1988). Die Beobachtungen dieser Arbeit widersprechen dieser Theorie nicht: In Retinapräparaten sieben Tage alter Mäuse konnte unter dem Mikroskop nur das primäre Gefäßnetz dargestellt werden. Einen Tag später hingegen, an p8, konnten beim Fokussieren der unterschiedlichen Retinaschichten auch

tiefer liegende Kapillaren abgebildet werden. Ein weiterer Auslöser für den Beginn des Tiefenwachstums mag in einem erhöhten Nährstoffbedarf begründet liegen. So vermuteten Chan-Ling et al., dass die beginnende Aktivität der retinalen Pigmentepithelzellen, kurz vor dem ersten Öffnen der Augen, den Nähr- und Sauerstoffbedarf der Retina stark erhöht und die Kapillaren als Antwort auf die physiologische Hypoxie in tiefere Retinaschichten wachsen (Chan_Ling, 1995; Stone, 1995). Die Entwicklung des murinen sekundären Gefäßnetzes um den siebten bis achten Tag nach der Geburt wurde auch von anderen Autoren beschrieben (McKenna, 2001; Dorrell, 2002; Fruttiger, 2002).

Die Tatsache, dass auch die neugebildeten Kapillaren der inneren Körnerschicht von Beginn an mit Perizyten assoziiert sind, erklärt die Zunahme der Perizytenzahl an p8. Da sich durch die Ausbildung des tiefen Netzes die absolute Kapillarfläche vergrößerte, stellte sich die Frage, ob – relativ gesehen – die Zahl an Perizyten pro Kapillarfläche zu- oder abnahm. Die Klärung dieser Frage ist insofern von Relevanz, als dass ohne die Angabe der Perizytenzahl pro Quadratmillimeter Kapillarfläche keine generelle Aussage über die stabilisierende Funktion der Perizyten zu treffen ist. Dementsprechend erfolgte durch unsere Arbeitsgruppe eine zweite Bestimmung der Perizytenzahl, wobei das obere und tiefe Gefäßnetz gesondert betrachtet wurden. Das Ergebnis zeigte eine unverändert hohe Perizytenkonzentration in der oberen Ganglienzellschicht (702 ± 40 Zellen/mm² Kapillarfläche an p7 und 704 ± 143 Zellen/mm² Kapillarfläche an p8) und eine etwas geringere Konzentration an Perizyten in den tiefer liegenden Gefäßen (518 ± 156 Zellen/mm² Kapillarfläche) an p8 (Hoffmann, 2004).

Wie bedeutsam die Präsenz von Perizyten zu diesem Zeitpunkt ist, wurde erst kürzlich an Mäusen deutlich, in denen die Rekrutierung der Perizyten durch tägliche intraokulare Injektionen eines PDGF-R β -spezifischen Antikörpers vollständig verhindert wurde: Bis p8 entwickelte sich das retinale Gefäßnetz relativ normal, ab p8/p9 kollabierte die Retina aufgrund von schweren Ödemen und Hämorrhagien (Uemura, 2002). Auch Beobachtungen an PDGF-B^{lox/-} Mäusen zeigten, dass ein Mangel an Perizyten mit einem abnormen Gefäßwachstum korreliert: Mäuse, denen PDGF-B spezifisch in Endothelzellen fehlte, rekrutierten weniger Perizyten zum endothelialen Gefäßgeflecht als gesunde Kontrollmäuse. Die Folge waren unregelmäßig geformte Kapillaren, eine irreguläre Kapillardichte und die Präsenz von Mikroaneurysmen in der Retina. Durch inter- und intra-individuelle Variationen dieser Knockout-Mäuse konnte gezeigt werden, dass eine

geringe Perizytdichte im tiefen Kapillarnetz mit einer starken Gefäßregression korrelierte. Enge et al. schlossen aus ihren Versuchen, dass Perizyten für die Stabilität von Retinakapillaren essenziell sind. Aufgrund der Beobachtung, dass ein geringer Perizytenverlust zu keinerlei vaskulären Veränderung führte, folgerten sie, dass ein Schwellenwert existiert, ab dem der Verlust von perivaskulären Zellen schwerwiegende Konsequenzen mit sich bringt (Enge, 2002).

4.2.3 Gefäßreifung und die Hyperoxie-induzierte Gefäßregression

Um einen Zusammenhang zwischen der Rekrutierung von Perizyten während der physiologischen Angiogenese und einer beginnenden Kapillarstabilität zu erstellen, wurden C57BL/6-Mäuse zu Zeitpunkten, an denen zuvor bei XlacZ-Mäusen die Perizytdichte bestimmt wurde, mit dem ROP-Modell konfrontiert.

Das Modell der Sauerstoff-induzierten Gefäßregression wurde von Smith et al. etabliert, mit dem Ziel ein quantifizierbares und reproduzierbares Angiogenesemodell zum Zwecke der Erprobung antiangiogenetischer Therapien zu entwickeln (Smith, 1994): Sie setzten Mäuse im Alter von einem bis sieben Tage einer Atmosphäre von 75 %igem Sauerstoff aus. Nach fünf Tagen Hyperoxie folgten ein bis fünf Tage Normoxie, anschließend wurde die Retina auf Anzeichen von Gefäßregression und Neovaskularisation hin untersucht.

Sie beobachteten, dass die Hyperoxie bei ein bis sechs Tage alten Mäusen eine starke Dilatation der anfänglichen hyaloiden Gefäße bewirkte, und dass die Neovaskularisationen – welche sich in der anschließenden Normoxiephase bildeten – weder quantifizierbar noch reproduzierbar waren. Waren die Mäuse bei Beginn der Hyperoxiephase sieben Tage alt, so wurde die Hypoxie-induzierte Neovaskularisation nach fünf-tägigem Aufenthalt in normaler Raumluft sowohl quantifizierbar als auch reproduzierbar. Sie vermuteten, dass der Grund hierfür in einem zu diesem Zeitpunkt optimalen Verhältnis von hyaloidem Gefäßrückgang und normaler Gefäßentwicklung lag, vergleichbar mit dem Entwicklungsstand des Gefäßsystems in der Retina humaner Frühgeborener.

Die Arbeitsgruppe um Smith zeigte auch, dass die Hyperoxie-induzierte Gefäßregression bei adulten Mäusen mit einem reifen Gefäßsystem (an p24) nicht mehr auszulösen war. Die Folgen einer Hyperoxie bei über sieben Tage alten Mäusen wurde jedoch nicht

untersucht, so dass der genaue Zeitpunkt, ab dem die Gefäße gegenüber dem Sauerstoffreiz resistent wurden, nicht bekannt war.

Der räumliche und zeitliche Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von Perizyten und der Resistenz der Kapillaren gegenüber VEGF-Depletion wurde ebenfalls nicht erstellt. Benjamin et al. versuchten diese Beziehung bei jungen Ratten zu analysieren und zeigten, dass der Beginn einer zwei-tägigen Behandlung mit 80 %igem Sauerstoff vier Tage nach der Geburt zu massivem Gefäßverschluss in der Retina führte. Die gleiche Behandlung sechs Tage später, an p10, blieb ohne Folgen, d.h. zu diesem Zeitpunkt war das Gefäßsystem bereits resistent gegenüber der einsetzenden Hyperoxie (Benjamin, 1998). Sie führten diese Widerstandsfähigkeit auf das Vorhandensein von Perizyten zurück. Jedoch quantifizierten sie weder die Perizytenzahl noch das Ausmaß der Gefäßregression, so dass ein eindeutiger Zusammenhang nicht bewiesen werden konnte. Hinzu kommt, dass α -SMA als Perizytenmarker verwendet wurde, wodurch die absolute Perizytenzahl nicht erfasst werden konnte, da nicht alle Perizyten α -SMA exprimieren (Nehls und Drenckhahn, 1991). Nicht bekannt war, ob die Unempfindlichkeit gegenüber hohen Sauerstoffkonzentrationen bereits vor p10 bestand.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eindeutig, dass die Resistenz gegenüber der Hyperoxie-induzierten Gefäßregression bei Mäusen bereits an p8 existiert: Die retinalen Präparate weisen weder eine avaskuläre Zone noch reaktive Neovaskularisationen auf. Der Grund für diese Resistenz ist unklar, bislang wurde davon ausgegangen, dass sie Folge der Rekrutierung von stabilisierenden Perizyten sei (Benjamin, 1998).

Der plötzliche Anstieg der Perizytenzahl an p8 ließ zunächst auch hier auf einen derartigen Zusammenhang schließen, jedoch wurde bald klar, dass dieser Anstieg durch die Ausbildung des tiefen Kapillarbett bedingt war und keinen Schwellenwert für einen stabilisierenden Perizytenbesatz darstellte. Durch die Verwendung der neuen Perizytenmarker ist zudem bekannt, dass Perizyten von p1 an mit den retinalen Gefäßen assoziiert sind (Fruttiger, 2002; Uemura, 2002), so dass nicht der Mangel an Perizyten für die hohe Sensibilität des Kapillarnetzes vor p8 verantwortlich sein kann.

Selbst heterozygote PDGF-B Knockout-Mäuse (PDGF-B^{+/-}-Mäuse), die nur etwa halb soviel PDGF-B exprimieren und an p7 eine signifikant reduzierte Perizytenzahl (- 30 %) in

den retinalen Kapillaren aufweisen, erfuhren im ROP-Modell keine stärkere Gefäßregression als gesunde Kontrollmäuse (Hammes, 2002). Das kann bedeuten, dass entweder

- ein höherer Perizytenbesatz nicht gleichbedeutend mit einem höherem Schutz vor Gefäßregression ist, dass
- eine Reduktion der Perizytenzahl um ca. 30 % noch über dem Schwellenwert liegt, ab dem die Gefäßstabilität nachlässt oder dass
- der Präsenz der Perizyten an p7 eine andere Funktion als die der Gefäßstabilisierung zukommt.

Letztere Vermutung resultiert aus der Betrachtung der Perizyten in der XlacZ-Maus: An p7 erscheinen sie in der X-gal-Färbung nur als kleine Punkte, an p8 dagegen ist die Färbung intensiver und die Kontur der Zellen wird deutlich. Wie bereits erwähnt (s. Kapitel 3.2.1), vermuteten Tidhar et al., dass das lacZ-Reportergen erst dann detektiert werden kann, wenn Perizyten und Endothelzellen einen festen Kontakt zueinander hergestellt haben. Diese Annahme ist bislang rein hypothetisch, eine Untersuchung dieses Zusammenhangs, könnte allerdings dazu beitragen, die Funktion der Perizyten während der Angiogenese aufzuklären (Tidhar, 2001). Takahasi et al. vermuteten zudem, dass auch die Expression von α -SMA bei vSMC von dem Kontakt zu den Endothelzellen abhängig ist (Takahashi, 1996).

Obwohl die PDGF-B^{+/-}-Mäuse im ROP-Modell keine stärkere Gefäßregression als die Kontrollmäuse zeigten, so entwickelten sie in der anschließenden Hypoxiephase doch etwa doppelt so viele Neovaskularisationen wie die Kontrollen (Hammes, 2002), wodurch deutlich wurde, dass die vorhandenen Perizyten zu diesem Zeitpunkt durchaus einen kontrollierenden Einfluss auf Endothelzellen ausüben.

4.2.4 Beteiligung von Wachstumsfaktoren während der Angiogeneseprozesse

Zu der Frage, welche Faktoren an der Ausbildung der Sauerstoffresistenz (der Maturierung an p8) beteiligt sind, wurden Wachstumsfaktoren mit Hilfe der Western Blot-Analyse untersucht. Wie in Kapitel 1.4.2.2 beschrieben ist die physiologische Angiogenese ein Prozess, der über eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren und Rezeptoren gesteuert und koordiniert wird. Die am häufigsten erwähnten und am besten untersuchten dieser Faktoren

sind VEGF-A, PDGF-B und die Angiopoietine: VEGF-A ist essenziell für die Initiierung von Angiogeneseprozessen, PDGF-B für die Perizytenrekrutierung und Angiopoietin-1 für die Gefäßreifung (Carmeliet, 2003). In letzter Zeit wurde des Öfteren das Augenmerk auf die Funktion der Ephrine gelegt, da sie an der Differenzierung zwischen Arterien und Venen beteiligt sind (Yancopoulos, 2000). Ihre Bedeutung für die Plastizität von Kapillaren ist jedoch unklar.

4.2.4.1 VEGF-A

Der Wachstumsfaktor VEGF-A – hier der Einfachheit halber nur VEGF genannt – ist ein homodimeres Glykoprotein, das während der retinalen Angiogenese von Astrozyten und Müllerzellen exprimiert wird (Stone, 1995; Ferrara und Davis_Smyth, 1997). VEGF ist für die Initiierung von Vaskulogenese und Angiogenese essenziell: Bereits der Verlust eines Allels (VEGF^{+/-}-Mäuse) führt um den elften Tag der Embryonalentwicklung aufgrund von schweren Endothelschäden zum Tod der Tiere (Carmeliet, 1996; Ferrara, 1996). Auch der Knockout der endothelialen VEGF-Rezeptoren VEGF-R1 (flt-1) und VEGF-R2 (flk-1) ist während der Embryonalentwicklung letal. Während flk-1 Knockout-Mausembryonen keine Endothelzellen besitzen (Shalaby, 1995), sterben flt-1 Knockout-Mäuse an einer generellen Fehlorganisation der Endothelzellen (Fong, 1995).

Der Nachweis von VEGF im Western Blot zeigte, dass das Expressionsniveau an p7 und p8 verhältnismäßig gering ist. An p8 ist es zwar deutlich stärker als am Tag zuvor, aber schwächer als an p26. Der verwendete Antikörper richtet sich gegen die drei wichtigsten Isoformen des Wachstumsfaktors VEGF-A₁₂₀, VEGF-A₁₆₄ und VEGF-A₁₈₈. Es fällt auf, dass an p8 alle drei Isoformen gleichermaßen stark exprimiert werden, wohingegen an p26 die längste Isoform VEGF₁₈₈ überwiegt. Dieser Unterschied ist vermutlich auf die unterschiedlichen Funktionen der drei Isoformen bei der Bildung und beim Erhalt der Blutgefäße zurückzuführen (Stalmans, 2002).

VEGF₁₂₀ fehlt die Bindungsdomäne für Heparin, wodurch sie sehr löslich ist und vom Ort der Expression diffundiert. Mäuse, die nur diese Form exprimieren (VEGF^{120/120}-Mäuse), weisen ein primitives Blutgefäßsystem mit eher kapillarähnlichen Gefäßen auf. Zudem ist die Rekrutierung der Perizyten verzögert. Die Isoform VEGF₁₈₈ enthält Exon 6 und 7, was bewirkt, dass sie sehr stark heparinbindend ist, dadurch mit hoher Affinität an Zell- und Matrixoberflächen bindet und kaum vom Expressionsort aus diffundiert. Bei VEGF^{188/188}-

Mäuse treten hauptsächlich Probleme bei der Entwicklung der Arterien auf, die der Kapillaren und Venen verläuft weitestgehend normal. Der Isoform VEGF₁₆₄ fehlt nur das Exon 6, wodurch ihre Diffusionsneigung zwischen der von VEGF₁₂₀ und VEGF₁₈₈ einzuordnen ist. VEGF^{164/164}-Mäuse sind in ihrer Gefäßentwicklung normal und es ist anzunehmen, dass diese Isoform alle Informationen enthält, um eine normale Vaskulogenese und Angiogenese zu ermöglichen (Stalmans, 2002). Aufgrund des anhaltenden Gefäßwachstums an p7 und p8 ist es wahrscheinlich, dass die Präsenz von VEGF₁₆₄ zu diesem Zeitpunkt die Gefäßstabilität entscheidend beeinflusst.

Der Nachweis des Endothelzell-spezifischen Rezeptors flk-1 in Western Blot offenbarte eine relativ gleichmäßige Expression im Zeitraum von p7 bis p12, wodurch seine Beteiligung an der Sauerstoffresistenz um p8 eher unwahrscheinlich ist. Wahrscheinlicher ist der direkte Einfluss von VEGF, da die Hypoxie eines der stärksten Signale seiner Induktion ist (Shweiki, 1992): Ist ein Gewebe mit Nähr- und Sauerstoff unterversorgt, so produziert eine Vielzahl von Zellen VEGF, woraufhin die Endothelzellen proliferieren und zum Ort der Hypoxie migrieren (Chan_Ling, 1995). Umgekehrt bewirkt ein hoher Sauerstoffgehalt einen Abfall an VEGF. Alon et al. bewiesen, dass die an p7 einsetzende Hyperoxie im ROP-Modell die VEGF-Expression in der Neuroglia stark herunterreguliert. Dieser VEGF-Entzug inhibiert die weitere Angiogenese und bewirkt sogar die teilweise Regression von bereits gebildeten Gefäßen (Alon, 1995).

Da der VEGF-Entzug an p8 zu keiner derartigen Gefäßregression führt, liegt der Schluss nahe, dass die Sauerstoffresistenz der Endothelzellen mit einer Unabhängigkeit gegenüber VEGF einhergeht. Diese Unabhängigkeit korreliert zeitlich mit dem Ausbau des tiefen Netzwerks und wird bis zu diesem Zeitpunkt nicht wesentlich von der An- oder Abwesenheit der Perizyten beeinflusst. Die Ursache der Frühgeborenenretinopathie ist folglich der VEGF-Entzug zum falschen Zeitpunkt, d.h. während des anhaltenden Angiogeneseprozesses, welcher für die Vervollständigung des tiefen Kapillarnetzes erforderlich ist. Es ist denkbar, dass eine Stabilisierung der Kapillaren durch Perizyten bis zu diesem Zeitpunkt verhindert wird, um die andauernden Angiogeneseprozesse nicht zu unterbinden.

Würden die perivaskulären Zellen schon während des Angiogeneseprozesses einen engen Kontakt zu den Endothelzellen etablieren, so würden diese an der weiteren Proliferation gehindert. Bereits 1987 zeigten Orlidge und D'Amore mit Hilfe eines *in vitro* Ko-

Kultursystems, dass Perizyten die Proliferation von Endothelzellen hemmen (Orlidge und D_Amore, 1987). Auch Sato et al. beobachteten in Zellkulturexperimenten, dass Perizyten die Migration von Endothelzellen blockieren (Sato und Rifkin, 1989). Folglich dürfte bis p8 nur eine lockere Verbindung zwischen den beiden Zelltypen bestehen, um das Sprouten der Endothelzellen in die tieferen Retinaschichten zu ermöglichen. Eine frühere Beobachtung von Nehls et al. kann diese Theorie stützen: Sie untersuchten das Zusammenspiel von Endothelzellen und Perizyten/vSMC *in vitro* in einem 3-dimensionalen Fibringel und stellten fest, dass die entstandenen kapillarähnlichen Strukturen aus Endothelzellen keinesfalls von den anwesenden Perizyten und vSMC stabilisiert wurden, zumindest nicht in der initialen Phase der Sproutbildung (Nehls und Drenckhahn, 1995a).

Doch auf welchem Wege wird ein allzu enger Kontakt zwischen Endothelzellen und Perizyten während der Angiogenese verhindert? Das deutlichste Signal für anhaltende Angiogeneseprozesse ist ein hoher VEGF-Spiegel. Es wurde gezeigt, dass VEGF nur lokal hochreguliert und sogleich vermindert wird, wenn das gebildete Gefäß sauerstoffreiches Blut transportiert. Stone et al. beobachteten die VEGF-Expression in der Rattenretina mit Hilfe der *In situ*-Hybridisierung und konnten zeigen, dass die höchste VEGF-Konzentration jeweils an der "Wachstumsfront" zu beobachten ist: In der ersten Phase – in der die Astrozyten, gefolgt von den Endothelzellen, in der oberen Ganglienzellschicht Richtung *Ora serrata* sprouten – findet sich dementsprechend die höchste VEGF-Konzentration in der vordersten Reihe der Astrozyten. Sie wiesen nach, dass bis p7 die jeweils äußersten Astrozyten VEGF produzieren, während in der zentralen Region um den *Nervus opticus* die VEGF-Konzentration drastisch absinkt. Ab p8 verläuft das Gefäßwachstum nicht mehr radiär, sondern folgt dem VEGF-Signal der Müllerzellen aus den tieferen Retinaschichten, während die VEGF-Expression in der oberen Ganglienzellschicht abnimmt (Stone, 1995). Die An- oder Abwesenheit von VEGF könnte den Perizyten mitteilen, ob das Gefäßwachstum anhält oder nicht. Wirkt VEGF also nicht nur auf proliferierende Endothelzellen, sondern in gleichem Maße auch auf die perivaskulären Zellen?

Der Nachweis von flk-1 undflt-1 mit Hilfe der *In situ*-Hybridisierung (Stalmans, 2002), zeigte eine deutliche Verteilung der VEGF-Rezeptoren in der Retina: Während der flk-1-Rezeptor nur auf Endothelzellen in Kapillaren und Venolen gefunden wurde, war der flt-1

Rezeptor auf Endothelzellen, vSMC und Perizyten in Arterien und Venen präsent. Auch andere Autoren beschrieben die Anwesenheit des flt-1 Rezeptors auf Perizyten und vSMC (Grosskreutz, 1999; Yamagishi, 1999b; Suzuma, 2000; Ishida, 2001; Parenti, 2002), was die Möglichkeit eröffnet, dass VEGF auch die Reaktionen von Perizyten beeinflusst.

Die Rolle von VEGF bei der Reifung des retinalen Gefäßsystems stellt sich demnach wie folgt dar: VEGF ist für die initialen Angiogeneseprozesse bis p7 essenziell. Ein Hyperoxie-induzierter VEGF-Entzug an p7 führt zum Stopp der Angiogenese und zur Regression zentraler Kapillaren. Ab p8 sind die retinalen Gefäße jedoch resistent gegenüber einem einsetzenden VEGF-Entzug. Die genaue Ursache ist unklar, wahrscheinlich ist nicht allein die Präsenz von Perizyten entscheidend, sondern vielmehr ihre Bindung an bzw. ihre Beziehung zu den Endothelzellen: Wie in den folgenden Kapiteln beschrieben, gewinnen an p8 weitere Wachstumsfaktoren an Bedeutung, die zur Stabilisierung des neu gebildeten Gefäßnetzes beitragen. Das Signal für die Expression dieser Faktoren könnte der lokal abfallende VEGF-Gehalt sein, den die Endothelzellen und Perizyten über ihre Rezeptoren wahrnehmen.

Von Bedeutung ist hier der Hinweis auf den örtlich begrenzten Abfall der VEGF-Konzentration, denn wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, steigt der gesamte VEGF-Gehalt in der Retina in dem untersuchten Zeitraum an. Der Grund hierfür ist möglicherweise in der unterschiedlichen Verfügbarkeit und Funktion der VEGF-Isoformen zu suchen. So mag die starke Expression der VEGF₁₈₈-Isoform an p26 eine andere Funktion als die der Gefäßbildung ausüben (Hoehn, 2002; Ruhrberg, 2002).

4.2.4.2 PDGF-B

Der Wachstumsfaktor PDGF ist für mesenchymale und gliale Zellen mitogen. PDGF setzt sich aus zwei Polypeptidketten zusammen, A und B, die entweder Homo- oder Heterodimere bilden können (Ross, 1986). Die resultierenden Isoformen PDGF-AA, PDGF-AB und PDGF-BB binden mit unterschiedlicher Affinität an zwei Rezeptoren mit Tyrosinkinaseaktivität (R α und R β) (Hart, 1988).

PDGF-BB, kurz PDGF-B genannt, wird während der retinalen Angiogenese hauptsächlich von proliferierenden Endothelzellen exprimiert und bindet mit hoher Affinität an den PDGF-R β auf mesenchymalen Zellen. Letztere werden hierdurch zum endothelialen Sprout rekrutiert und differenzieren zu Perizyten bzw. zu vSMC. Belegt wird diese Theorie

durch Ergebnisse aus Knockout-Studien: Mäuse, denen entweder PDGF-B oder PDGF-R β fehlt, besitzen kaum Perizyten/vSMC und sterben kurz vor der Geburt aufgrund einer hohen mikrovaskulären Permeabilität und schweren Hämorrhagien (Leveen, 1994; Soriano, 1994; Lindahl, 1997).

Bereits der Knockout eines PDGF-B-Allels führt in der Retina zu einer signifikanten Reduktion der Perizytenzahl und zu vaskulären Anomalien, ähnlich den pathologischen Veränderungen bei diabetischer Retinopathie (Hammes, 2002). Ein vergleichbares Bild bieten Mäuse, in denen PDGF-B Endothelzell-spezifisch ausgeschaltet wurde (Enge, 2002), woraus gefolgert werden kann, dass nur das endotheliale PDGF-B zur Perizytenrekrutierung beiträgt (Bjarnegard, 2004). Der PDGF-B-Knockout in hämatopoetischen Zellen (Buetow, 2001; Kaminski, 2001) oder Neuronen (Enge, 2003) – zwei weitere Hauptquellen dieses Wachstumsfaktors – hat keinen erkennbaren Einfluss auf die Gefäßbildung.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe des Western Blots das Expressionsprofil von PDGF-B und PDGF-R β in der Retina untersucht: Es zeigte sich, dass der Ausbau des tiefen Netzwerks und der starke Anstieg der Perizytenzahl an p8, mit einer Erhöhung der PDGF-B-Expression einhergeht. Das auch der Gehalt an PDGF-B mRNA zu diesem Zeitpunkt zunimmt, konnte von der eigenen Arbeitsgruppe mittels quantitativer RT-PCR verifiziert werden (Hoffmann, 2004). Kürzlich wurde von Gerhardt et al. gezeigt, dass die retinale Expression von PDGF-B in hohem Maße durch die Endothelzellen erfolgt, die sich an der Spitze eines vaskulären Sprouts befinden. Diese so genannten ‚*tip cells*‘ weisen ein von den anderen Endothelzellen abweichendes Genexpressionsprofil auf: Neben der starken PDGF-B-Expression ist auch die des VEGF-Rezeptors flk-1 erhöht. Eine weitere Besonderheit dieser Zellen ist, dass sie lange Filopodien besitzen, mit denen sie die Umgebung "erkunden". Außerdem wurde gezeigt, dass sie zwar auf einen chemotaktischen Reiz hin sprouten, aber nicht proliferieren (Gerhardt, 2003). Es ist wahrscheinlich, dass die Zunahme der PDGF-B-Konzentration an p8 durch die Zunahme an sproutenden endothelialen ‚*tip cells*‘ bedingt ist, die ausgehend vom oberen Gefäßnetz in die tiefer liegenden hypoxischen Retinaschichten vordringen.

An p26 – einem Zeitpunkt, an dem die Perizytenrekrutierung weitestgehend abgeschlossen ist – ist das Expressionsniveau von PDGF-B in der Retina von XlacZ-Mäusen noch

unerwartet hoch, was möglicherweise auf eine zusätzliche Funktion dieses Wachstumsfaktors hinweist: Es gibt Anhaltspunkte dafür, dass PDGF-R β nicht nur auf Perizyten und vSMC, sondern auch auf Endothelzellen exprimiert wird. Zumindest in Kultur wurde die Präsenz des Rezeptors und ein direkter Effekt von PDGF-B auf Endothelzellen nachgewiesen (Smits, 1989; Beitz, 1992; Battegay, 1994; Koyama, 1994; Marx, 1994; Thommen, 1997; Castellon, 2002). Einen weiteren Hinweis für die direkte Wirkung von PDGF-B auf Endothelzellen mag ein Modell liefern, in welchem die Überexpression von PDGF-B in der Photorezeptorschicht von Mäusen nicht nur die Proliferation von Perizyten und Gliazellen, sondern gleichfalls die von Endothelzellen bewirkte (Seo, 2000; Vinos, 2003). Allerdings könnte dieser Effekt auch sekundär durch eine VEGF-Hochregulation in sproutenden Gliazellen hervorgerufen werden. Interessanterweise wird das tiefe Kapillarnetz bei den so genannten rho/PDGF-B-Mäusen nie gebildet, was die Bedeutung einer zeitlich und lokal koordinierten Expression von Wachstumsfaktoren unterstreicht (Vinos, 2003).

Bereits Benjamin et al. erkannten, dass die intraokulare Injektion von PDGF-B keine gesteigerte Perizytenrekrutierung, sondern vielmehr eine Ablösung PDGF-R β -positiver Zellen von neuen unreifen Kapillaren bewirkte (Benjamin, 1998). Das extern zugeführte PDGF-B störte offensichtlich den Konzentrationsgradienten des Faktors am Gefäß, woraufhin die PDGF-R β -positiven Zellen die Orientierung verloren und sich neu ausrichteten. Es scheint, dass die lokale Expression von PDGF-B ein wichtiger und streng regulierter Prozess ist (Gerhardt und Betsholtz, 2003). Wie auch andere Mitglieder der PDGF/VEGF-Familie enthält PDGF-B eine C-terminale Sequenz, welche die Bindung des Faktors innerhalb der Zelle oder außerhalb der Zelle an Proteoglykane von Zelloberflächen oder der Matrix vermittelt (Thyberg, 1990; LaRochelle, 1991; Raines und Ross, 1992; Eming, 1999). Wird diese Sequenz – das so genannte ‚*retention motif*‘ – entfernt, so ist die Rekrutierung von Perizyten bei PDGF-B^{ret/ret}-Mäusen verschlechtert. Wie Beobachtungen an Tumorgefäßen ergaben, ist bei diesen Mäusen überdies die Integration der Wandzellen in das Gefäß gestört: Anstatt einen engen Kontakt zu den Endothelzellen aufzubauen, sind sie nur locker mit der Gefäßwand assoziiert. Vermutlich ist ein gestörter PDGF-B-Konzentrationsgradient zwischen Endothelzelle und Perizyt Ursache dieses Phänotyps (Abramsson, 2003; Jain und Booth, 2003).

Die Proteinkonzentration des PDGF-Rezeptor- β in Retinae von XlacZ- sowie von C57BL/6-Mäusen nahm von p7 bis p12 und weiter bis p26 kontinuierlich zu, höchstwahrscheinlich bedingt durch den Zuwachs an rekrutierten Perizyten/vSMC. Auch dieses Ergebnis wurde auf mRNA-Ebene bestätigt (Hoffmann, 2004).

Zusammen mit den Erkenntnissen anderer Arbeiten sprechen diese Ergebnisse dafür, dass das endotheliale PDGF-B für die Rekrutierung PDGF-R β -positiver Zellen zum Gefäß sowie deren Assoziation mit der Gefäßwand verantwortlich ist. Die beobachtete Hochregulation von PDGF-B an p8 ist wahrscheinlich Folge der Zunahme an sproutenden Endothelzellen und geht mit einer vermehrten Perizytenrekrutierung einher. Eine weitere Option – die hier jedoch nicht geklärt werden konnte – ist, dass PDGF-B direkt auf Endothelzellen einwirken kann und auf diesem Wege das Endothel vor Hyperoxie-induzierter Regression zu schützen vermag. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass die rekrutierten Perizyten ihrerseits Faktoren exprimieren, die zur Reifung und Stabilisierung des neugebildeten Gefäßes beitragen: die Angiopoietine.

4.2.4.3 Angiopoietin-1 und -2

Auch die Angiopoietin-Familie ist für den geordneten Ablauf der physiologischen Angiogenese essenziell. 1996 wurde zunächst Angiopoietin-1 (Ang-1) als spezifischer Ligand für den endothelialen Tyrosinkinase-Rezeptor Tie2 beschrieben (Davis, 1996), 1997 identifizierten Maisonpierre et al. während eines Homologie-Screenings den mit Ang-1 verwandten Faktor Ang-2 (Maisonpierre, 1997). Ang-2 bindet mit vergleichbarer Affinität an Tie2, doch obwohl sie die gleiche Bindungsdomäne am Rezeptor besetzen, vermittelt diese Bindung völlig gegensätzliche Aktionen (Fiedler, 2003): Während Ang-1 die Phosphorylierung und Dimerisierung der intrazellulären Domänen bewirkt (Suri, 1996), induziert die Bindung von Ang-2 keinerlei Phosphorylierung und antagonisiert so kompetitiv die Wirkung von Ang-1 (Maisonpierre, 1997). Niu et al. zeigten, dass der intrazelluläre Carboxylrest für diese negative Regulation zuständig ist, denn die Deletion des Carboxylrests bewirkte eine gesteigerte Autophosphorylierung und Aktivierung des PI-3-Kinase/Akt-Pathways (Niu, 2002).

Der Gen-Knockout von Ang-1 und Tie2 führt bereits während der Embryonalentwicklung (an E12.5 bzw. E10.5), aufgrund einer beeinträchtigten Entwicklung des Myokards, eines fehlenden Remodelings des primitiven Gefäßnetzes in größere und kleinere Gefäße und

einer mangelhaften Rekrutierung von perivaskulären Zellen, zum Tod der Mäuse (Dumont, 1994; Sato, 1995; Davis, 1996; Suri, 1996). Die Überexpression von Ang-2 während der embryonalen Entwicklung führt aufgrund seiner Rolle als Ang-1 Antagonist zu Phänotypen, die denen der Ang-1 und Tie2 Knockout-Mäuse ähnlich sind (Maisonpierre, 1997). Wie Beobachtungen an Ang-2 Knockout-Mäusen zeigen, ist die Anwesenheit von Ang-2 für die embryonale Vaskulogenese durchaus entbehrlich, schwere vaskuläre Probleme treten hier erst während der Phase des postnatalen Remodelings auf, so dass die meisten Mäuse ca. 14 Tage nach der Geburt sterben (Gale, 2002).

Ang-1 wird im Laufe der physiologischen Entwicklung hauptsächlich von mesenchymalen Zellen, darunter vor allem von Perizyten und vSMC, exprimiert (Suri, 1996; Patan, 1998; Sundberg, 2002). Ang-1 ist für Endothelzellen nicht mitogen, allerdings induziert es das endotheliale Sprießen (Sprouten), ein initialer Schritt der Angiogenese (Koblizek, 1998; Hayes, 1999; Kim, 2000). Zudem vermag Ang-1 die Endothelzellen effektiv vor Apoptose zu schützen, selbst wenn diese *in vitro* durch Serumentzug, Strahlung oder hohe Mannitol-Konzentration induziert wurde (Papapetropoulos, 1999; Kwak, 2000; Harfouche, 2002). Eine weitere bedeutungsvolle Eigenschaft von Ang-1 ist seine abdichtende, antipermeable Wirkung auf Blutgefäße (Gamble, 2000; Hori, 2004), was unter anderem sehr anschaulich in einem Ang-1-Überexpressionsmodell bewiesen wurde: Selbst die Injektion von proinflammatorischem Senföl führte in Gefäßen die Ang-1 überexprimierten zu keinerlei Permeabilitätssteigerung und auch die gleichzeitige Überexpression des Permeabilitätsfaktors VEGF vermochte die Durchlässigkeit der Gefäße in Gegenwart von Ang-1 nicht zu steigern (Thurston, 1999; Thurston, 2000). Dieser wichtige Befund weist darauf hin, dass Ang-1 möglicherweise der stabilisierende Faktor ist, der die retinalen Kapillaren vor der Hyperoxie-induzierten Gefäßregression zu schützen vermag.

Wie bereits in Kapitel 3.2.7.3 erwähnt, war der Nachweis von Ang-1 und Ang-2 auf Proteinebene nicht ganz unproblematisch. Nur ein Western Blot zeigte ein eindeutiges Ergebnis, d.h. jeweils eine einzelne Bande in der zu erwartenden Höhe, ohne weitere Anfärbungen im Hintergrund. Bei der Suche nach möglichen Ursachen für diese Schwierigkeiten, fiel auf, dass viele Arbeitsgruppen den quantitativen Nachweis von Ang-1 und Ang-2 auf mRNA-Ebene bevorzugten (Mandriota und Pepper, 1998; Oh, 1999; Hackett, 2000; Yuan, 2000). Der Grund für die beschriebenen Schwierigkeiten ist bislang ungeklärt, allerdings gibt es andere Arbeiten, die ebenfalls die hier eingesetzten Antikörper

von Santa Cruz für den erfolgreichen Nachweis von Ang-1 und Ang-2 in Western Blots und immunhistochemischen Präparaten verwendeten (Shyu, 2003; Umeda, 2003), so dass angenommen werden kann, dass die Antikörper prinzipiell gut funktionieren. Zur Absicherung der gewonnenen Ergebnisse wies die eigene Arbeitsgruppe Ang-1 und Ang-2 jedoch auch auf mRNA-Ebene nach (Hoffmann, 2004).

Der Western Blot mit Retinalysaten von C57BL/6-Mäusen ergab, dass die Ang-1 Konzentration im Zeitverlauf deutlich zunahm: Von Tag p7 bis p9 stieg sie um das Doppelte, blieb dann bis p11 auf konstant hohem Niveau und fiel an p12 wieder leicht ab. Dieser Befund wurde durch den Nachweis von Ang-1 auf mRNA-Ebene gestützt (Hoffmann, 2004): Die Ergebnisse der quantitativen RT-PCR ergaben, dass die retinale Ang-1 Konzentration von p7 auf p8 sogar um das Vierfache ansteigt, in der adulten Retina (p26) jedoch wieder auf dem Niveau von p7 liegt. Der drastische Konzentrationsanstieg von Ang-1 an p8 könnte mit der zeitgleichen Zunahme der Perizytenzahl sowie der Resistenz gegenüber dem Hyperoxie-induzierten VEGF-Entzug in Zusammenhang stehen. Uemura et al. entwickelten ein Modell, welches es ihnen ermöglichte, allein den Einfluss der Perizyten und die von Perizyten exprimierte Wachstumsfaktoren (v.a. Ang-1) auf die retinale Angiogenese zu untersuchen: Durch tägliche, postnatale Injektionen eines PDGF-R β -Antikörpers verhinderten sie die Rekrutierung von Perizyten und vSMC und beobachteten die Entwicklung des vaskulären Plexus: Das Ergebnis war, dass die Gefäße zwar – wie in normalen Kontrollmäusen – in Richtung *Ora serrata* auswuchsen, jedoch wirkte das gesamte Gefäßnetz verzerrt und unorganisiert und erreichte an p8 nicht die äußere Peripherie der Retina. Die Gefäßdichte war indes höher, die Gefäße selbst zeigten sich dilatiert, Arterien und Venen waren kaum voneinander zu unterscheiden und standen zudem über kleine, kurze Gefäße miteinander in Kontakt, die in Kontrollmäusen nicht beobachtet wurden. Ab Tag p8/p9 traten schwere Permeabilitätsstörungen auf, ab p10 kamen massive intraokulare Blutungen hinzu. Die wiederholte Injektion von rekombinanten Ang-1 verhinderte sowohl die Ödembildung, als auch die schweren Hämorrhagien (Uemura, 2002). Zwar konnten nicht alle Gefäßanomalien durch die Ang-1-Injektion behoben werden, dennoch beweist das Experiment, dass Ang-1 ab p8 für die Aufrechterhaltung der Gefäße essenziell ist. In diesem Kontext ist es wichtig darauf hinzuweisen, dass allein die Injektion von Ang-1 die normale Morphologie der Gefäße nicht völlig wiederherstellen konnte, was bedeutet, dass weitere Faktoren an dem *fine-*

tuning der Gefäßstruktur beteiligt sind, die ebenfalls in direktem Zusammenhang mit den Perizyten stehen.

Der Nachweis des Ang-1-Gegenspielers Ang-2 im Western Blot von Retinalysaten zeigte, dass dessen Expression deutlich geringer als die von Ang-1 ist und von p7 bis p12 nur knapp oberhalb der Nachweisgrenze liegt. Die quantitative Auswertung ergab, dass die Ang-2-Expression an p11 und p12 geringfügig stärker ist als von p7 bis p10. Zu einem anderen Ergebnis kamen Hackett et al., die die Expression von Ang-2 auf mRNA-Ebene an den Zeitpunkten p0, p4, p8 und p16 in Retinae von C57BL/6-Mäusen beobachteten: Sie zeigten, dass das Niveau der Ang-2 Konzentration an p0 und p4 unverändert niedrig blieb, an p8 jedoch deutlich anstieg (Hackett, 2000). Die mRNA-Daten der eigenen Arbeitsgruppe widersprechen sowohl den hier vorgestellten, als auch denen von Hackett et al., da sie zeigen, dass die Ang-2 Expression von p7 nach p26 kontinuierlich abnimmt (Hoffmann, 2004). Die Datenlage bezüglich der Ang-2 Expression in der retinalen Angiogenese ist also noch umstritten und bislang nicht durch eindeutige, konsistente Ergebnisse gesichert. Allerdings zeigten Hackett et al. in histologischen Retinaschnitten auch, dass der Anstieg von Ang-2 an p8 hauptsächlich auf dessen Expression im äußeren Rand der inneren Körnerschicht zurückzuführen ist und weniger auf dessen Expression in den oberen Retinaschichten, was bedeutet, dass Ang-2 dort vorhanden ist, wo aktives Gefäßwachstum stattfindet (Hackett, 2000). Die Tatsache, dass viele Wachstumsfaktoren insbesondere lokal stark reguliert werden, muss bei der Bewertung von Western Blot- und RT-PCR-Daten berücksichtigt werden: Die starke Expression von VEGF und Ang-2 an der Spitze von vaskulären Sprouts in tieferen Retinaschichten und eine starke Ang-1-Expression in Perizyten der Ganglienzellschicht schließt sich gegenseitig nicht aus, führt aber zur Verwirrung bei der Interpretation von Daten, die das gesamte Zellspektrum der Retina umfassen.

Da Ang-2 als Antagonist von Ang-1 fungiert, ist anzunehmen, dass während des fein abgestimmten Prozesses der physiologischen Angiogenese nicht beide Faktoren gleichzeitig in Aktion treten. Auch im adulten Organismus wird Ang-2 normalerweise in Bereichen hochreguliert, in denen ein aktiver Gefäßumbau, bzw. aktive physiologische oder pathologische Angiogeneseprozesse (besonders in Tumoren) stattfinden (Maisonpierre, 1997; Stratmann, 1998; Holash, 1999; Zagzag, 2000). Ang-2 destabilisiert dort vorhandene Gefäße, indem es den Kontakt zwischen Endothel und perivaskulären

Zellen, bzw. der extrazellulären Matrix lockert. In Gegenwart von VEGF wird auf diese Weise die Proliferation von Endothelzellen und die Entstehung von neuen Gefäßen ermöglicht, wozu Ang-2 allein nicht in der Lage ist (Asahara, 1998; Korff, 2001). Ang-2 wird unter anderem von Endothelzellen und Gliazellen exprimiert und es wurde gezeigt, dass Ang-2 – wie VEGF – unter hypoxischen Bedingungen hochreguliert wird (Oh, 1999; Hackett, 2000; Takagi, 2003; Pichiule, 2004). Möglicherweise sind beide Faktoren für die Initiierung von Gefäßwachstum von Bedeutung, was durch die Beobachtung gestützt wird, dass hohe retinale VEGF-Konzentrationen ohne einen hypoxischen Stimulus nicht automatisch zur Neubildung von Gefäßen führen (Vinores, 1997; Vinores, 1998). Tatsächlich zeigte die jüngste Arbeit von Hackett et al., dass Mäuse mit einem Mangel an Ang-2 kein tiefes Kapillarnetz in der Retina entwickeln und im Verlauf des ROP-Modells nicht in der Lage waren Hypoxie-induzierte Neovaskularisationen zu bilden (Hackett, 2002).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen weiter, dass der Rezeptor Tie2 zwischen p7 bis p12 keiner nennenswerten Regulation unterliegt, was darauf hinweist, dass die Steuerung der angiogenen Prozesse hauptsächlich über die Expression der Liganden erfolgt. Auch Uemura et al. beobachteten eine kontinuierliche Präsenz von endotheliale Tie2, selbst in Abwesenheit von perivaskulären Zellen und seinem Liganden Ang-1 (Uemura, 2002).

Nach Zusammensicht der Daten kann vermutet werden, dass die Resistenz gegenüber der Hyperoxie-induzierten Gefäßregression an p8 direkt auf die Hochregulation von Ang-1 zurückzuführen ist und somit indirekt auch der Anwesenheit von Perizyten bedarf. Aufgrund der Tatsache, dass neben VEGF auch Ang-2 über Hypoxie reguliert und für die Fertigstellung des tiefen Netzwerks benötigt wird, lässt sich folgern, dass dieser direkte Gegenspieler von Ang-1 zusammen mit VEGF die Aufgabe übernimmt, die Gefäßstabilisierung bis zur Beendigung der Angiogenese in den tiefen Retinaschichten zu verhindern.

4.2.4.4 Ephrin Bs

Die EphB-Rezeptor-Tyrosinkinase und ihre Liganden, die Ephrin Bs, spielen während der embryonalen Angiogenese ebenfalls eine herausragende Rolle: Werden Gene von Mitgliedern der Eph B-Familie ausgeknockt, so sterben die Mausembryonen vor E11.5 an

ähnlichen Defekten, wie sie bei Ang-1- oder Tie2-Knockout-Mäusen gefunden wurden. Unterstützt durch die Beobachtung, dass die Ephrin Bs das kapilläre Sprouten *in vitro* mit der gleichen Effizienz wie Ang-1 zu induzieren vermögen (Adams, 1999), wurde gefolgert, dass auch die Ephrine insbesondere für das vaskuläre Remodeling essenziell sind (Cheng, 2002; Gauthier und Robbins, 2003).

Während Ephrin B1 sowohl von Endothelzellen in Arterien als auch in Venen exprimiert wird, wird Ephrin B2 nur von arteriellen Endothelzellen exprimiert. Da der Rezeptor von Ephrin B2 – EphB4 – ausschließlich auf venösem Endothel zu finden ist, wird angenommen, dass Ephrine an der Differenzierung von Gefäßen in Arterien und Venen beteiligt sind (Wang, 1998; Gerety, 1999; Gale, 2001). Stalmans et al. zeigten, dass die Unterscheidung in Arterien und Venen in der Retina bereits an p2 durch den Nachweis von Ephrin B2 möglich ist (Stalmans, 2002). Außerdem wurde deutlich, dass sich die Expression von Ephrin B2 im Verlauf der Gefäßentwicklung auf die umgebenden Perizyten und vSMC ausbreitete, was vermuten lässt, dass auch die Ephrine an den Interaktionen zwischen Endothelzellen und Wandzellen beteiligt sind (Gale, 2001; Shin, 2001; Gerety und Anderson, 2002; Oike, 2002).

Um abzuklären, ob die Ephrine möglicherweise an der beginnenden Gefäßstabilität an p8 beteiligt sind, wurde sowohl Ephrin B1 als auch Ephrin B2 in Retinalysaten unterschiedlich alter Mäuse mit Hilfe der Western Blot-Methode nachgewiesen. Die Expression von Ephrin B1 war relativ stark und schien zwischen p7 und p12 keinerlei Regulation unterworfen zu sein. Die geringe Konzentration von Ephrin B2 ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass der Faktor nur von arteriellen Endothelzellen exprimiert wird. Generell schien die Ephrin B2-Expression in diesem Zeitraum etwas stärker reguliert zu werden, aufgrund zu geringer Datenmengen lässt sich jedoch keine eindeutige Schlussfolgerung ziehen. Weitere Experimente wären nötig, um diese Beobachtungen zu verifizieren.

4.2.4.5 Einfluss weiterer Wachstumsfaktoren

Neben VEGF, PDGF-B, Ang-1, Ang-2 und den Ephrinen gibt es eine Reihe weiterer Faktoren, die an der Regulation von Angiogeneseprozessen beteiligt sind. Einer der Wichtigsten – in Bezug auf den Einfluss von Perizyten – ist der *transforming growth factor-β* (TGF-β). Erst kürzlich wurde eine Arbeit veröffentlicht, die das Zusammenspiel

von TGF- β mit Ang-1 und PDGF-B bei der Regulation von Endothelzell-Perizyten-Interaktionen näher betrachtet (Nishishita und Lin, 2004). TGF- β wird von vielen Zelltypen produziert, darunter auch von Endothelzellen, und vSMC bzw. Perizyten. Hirschi et al. zeigten bereits 1998, dass neben PDGF-B auch TGF- β die Differenzierung von multipotenten embryonalen 10T1/2-Zellen zu Perizyten/vSMC veranlasste (Hirschi, 1998). In einer weiteren Arbeit demonstrierten sie, dass die Kokultur von Endothelzellen und 10T1/2-Zellen eine gegenseitige Proliferationsinhibierung bewirkte. Sie zeigten, dass diese Inhibierung nicht über eine Verminderung der PDGF-B- oder PDGF-R β -Expression vermittelt wurde. Auch die Gabe von neutralisierenden TGF- β -Antikörpern konnte die Wachstumshemmung nicht aufheben, woraus sie folgerten, dass neben dem direkten Zell-Zell-Kontakt ebenso andere Faktoren eine Rolle spielen müssen (Hirschi, 1999). Nishishita et al. untersuchten diesen Zusammenhang jetzt weiter und fanden heraus, dass PDGF-B sowohl die Expression von Ang-1, als auch die von TGF- β in den mesenchymalen 10T1/2-Zellen stark hochregulierte. Während die PDGF-B-induzierte Expression von Ang-1 über den PI3-Kinase-Weg erfolgte, wurde TGF- β über den MAPK-Weg induziert. Sie beobachteten weiter, dass TGF- β die Expression von Ang-1 in vSMC inhibierte und dass – umgekehrt – sowohl Ang-1 als auch TGF- β alleine eine leichte Verminderung der PDGF-B-Expression in Endothelzellen bewirkte. In Kombination wurde dieser Effekt noch deutlicher (Nishishita und Lin, 2004). Auch Uemura et al. vermuteten, dass neben Ang-1 noch mindestens ein weiterer Faktor an der Modellierung des retinalen Gefäßsystems mitwirken müsste, da die Substitution von Ang-1 – in Abwesenheit von perivaskulären Zellen – zwar einige Gefäßanomalien beseitigen konnte, aber eben doch nicht alle (Uemura, 2002). Diese Ergebnisse lassen auf komplizierte Regulationsmechanismen zwischen Endothelzellen und perivaskulären Zellen schließen, die gesteuert von einer Vielzahl von Faktoren und Rezeptoren für die Gefäßentwicklung und später für die Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase von essenzieller Bedeutung sind.

Einen Hinweis auf die herausragende Bedeutung von TGF- β erbrachten kürzlich Shih et al., die feststellten, dass einige retinale Gefäße die gegenüber der Hyperoxie-induzierten Gefäßregression resistent waren, sich dadurch auszeichneten, dass sie von TGF- β 1-exprimierenden Perizyten ummantelt waren. Sie konnten ferner zeigen, dass TGF- β 1 die endotheliale Expression von VEGFR1 (flt-1) induzierte, und dass auch der flt-1-spezifische Ligand *placental growth factor-1* (PlGF-1) an der Aufrechterhaltung der retinalen Gefäße beteiligt war (Shih, 2003).

4.2.4.6 *Beteiligung von Wachstumsfaktoren: Zusammenfassung*

Eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren und Rezeptoren ist an der Etablierung eines reifen und funktionellen Gefäßnetzes beteiligt. Blutgefäße bestehen aus zwei Zelltypen: Endothelzellen und Wandzellen (Perizyten, bzw. vSMC). Es zeigte sich, dass die Anwesenheit beider Zelltypen und das wechselseitige Signaling untereinander für den Ablauf der Angiogeneseprozesse in der Retina essenziell ist:

Auf das VEGF-Signal hin besiedeln die flk-1-positiven Endothelzellen ausgehend vom *Nervus opticus* die Retina (Fruttiger, 2002). Sie exprimieren PDGF-B, ein Faktor der chemotaktisch auf PDGF-R β -exprimierende, mesenchymale Zellen wirkt (Hellström, 1999). Diese assoziieren mit dem vaskulären Sprout und differenzieren zu Perizyten oder vSMC. Während des anhaltenden Angiogeneseprozesses verhindert möglicherweise die hohe VEGF-Konzentration die Etablierung eines zu engen und stabilisierenden Kontakts zwischen Endothelzellen und Perizyten, vielleicht über den perizytären flt-1-Rezeptor (bislang rein hypothetisch). Auch Ang-2 wird durch physiologische Hypoxie in Endothelzellen hochreguliert und befindet sich, wie VEGF, an der Wachstumsfront (Hackett, 2000). Als Gegenspieler von Ang-1 könnte Ang-2 über die Bindung des endothelialen Tie2-Rezeptors ebenfalls zur Aufrechterhaltung einer gewissen Gefäßplastizität beitragen. Ein zu diesem Zeitpunkt einsetzender VEGF-Entzug – durch Hyperoxie im ROP-Modell – stoppt das Gefäßwachstum und bewirkt die Regression instabiler Kapillaren.

Mit der Ausbildung des tiefen Gefäßnetzes der Retina an p8 steigt die Perizytenzahl stark an. Auch die Expression von PDGF-B und Ang-1 nimmt deutlich zu. Die Konzentration von Ang-2 ist geringer und beschränkt sich auf den äußeren Rand der inneren Körnerschicht (Hackett, 2000). Die X-gal-Färbung der kapillären Perizyten nimmt an p8 an Intensität zu, was laut Tidhar et al. vermuten lässt, dass sich der Kontakt zwischen Endothelzellen und Perizyten verfestigt (Tidhar, 2001). An p8 bewirkt der VEGF-Entzug während der Hyperoxiephase des ROP-Modells keine Gefäßregression mehr. Grund hierfür könnte die erhöhte PDGF-B- und Ang-1-Expression sein. Nach Nishishita et al. induziert das endotheliale PDGF-B die Ang-1- und TGF- β -Expression in Perizyten, welche rückwirkend – vermutlich als negativer Regulationsmechanismus – die endotheliale PDGF-B-Expression hemmen (Nishishita und Lin, 2004).

Die Frage, warum Perizyten von Beginn an mit den Endothelzellen assoziiert sind, aber erst zu einem späteren Zeitpunkt stabilisierend wirken, ist möglicherweise damit zu begründen, dass sie noch weitere Aufgaben wahrnehmen: Beispielsweise die Organisation der Gefäßstruktur und die Beteiligung an der Differenzierung von Gefäßen in Arterien und Venen. Hinweise hierfür liefern Ergebnisse, die zeigen, dass Perizyten doppelt so häufig an Gefäßgabelungen sitzen (Sims und Westfall, 1983), und dass die Verhinderung der Perizytenrekrutierung zu einem Gefäßnetz führt, in dem alle Gefäße dilatiert, verzerrt und unorganisiert sind und darüber hinaus eine Differenzierung in Arterien und Venen kaum erfolgt ist (Uemura, 2002).

4.2.5 Die Bedeutung retinaler Perizyten für die Kapillarstabilität:

Schlussbetrachtung

Es wurde deutlich, dass Perizyten durchaus einen stabilisierenden Einfluss auf das Endothel ausüben und zwar indem sie Faktoren wie Ang-1 und TGF- β exprimieren. Besonders über Ang-1 wird die Bindung der Endothelzellen untereinander, zu den Perizyten und zu der extrazellulären Matrix gefestigt. Fehlt dieser Faktor, kommt es bei Mäusen ab Tag p8/p9 zur Ödembildung und zu schweren Blutungen, die letztlich den Zusammenbruch des retinalen Gefäßnetzes bedeuten (Uemura, 2002). Zu welchem Zeitpunkt Ang-1 in Perizyten hochreguliert wird, scheint entweder genetisch festgelegt zu sein oder durch bestimmte Faktoren direkt induziert zu werden, da Perizyten von der Entstehung des vaskulären Sprouts an anwesend sind (Gerhardt und Betsholtz, 2003), jedoch erst im späteren Verlauf stabilisierend wirken. Im Falle der Mausretina fällt dieser Zeitpunkt mit dem Ausbau des tiefen Gefäßnetzes an p8 zusammen.

Wird die Rekrutierung von Perizyten zum Gefäß verhindert, so führt das zu einem vaskulären Phänotyp, der dem bei diabetischer Retinopathie ähnelt (Uemura, 2002). Dieser Phänotyp ist umso stärker ausgeprägt, je weniger Perizyten rekrutiert werden, d.h. es besteht ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von Perizyten und der Gefäßstabilität (Enge, 2002; Hammes, 2002).

Fraglich bleibt allerdings, ob der Perizyt ein geeignetes Ziel für die Therapie der diabetischen Retinopathie ist. Die antioxidative Substanz Nicanartine (2,6-Di-*tert*-butyl-4-[3-(3-pyridylmethoxy)propyl]phenol) verringerte bei diabetischen Ratten nach sechs Monaten Therapie den Perizytenverlust um 41 % und reduzierte die kapilläre Endothelzell-

proliferation um 34 %. Jedoch konnte der dreifache Anstieg an azellulären Kapillaren durch Nicanartine nicht verhindert werden (Hammes, 1997), was vermuten lässt, dass kein direkter Zusammenhang zwischen dem Perizytenverlust und der Gefäßobliteration bestehen muss. Dass Tenilsetam den Perizytenverlust nicht verhindern konnte, dafür aber die Entstehung azellulärer Kapillaren, bestätigt diese Theorie.

Möglicherweise ist nicht der Perizyt die Zielzelle therapeutischer Bemühungen, sondern vielmehr die Endothelzelle. Kern et al. beschrieben bereits 1995, dass der Perizytenverlust bei Hunden relativ gleichmäßig über die diabetische Retina verteilt war, dass Mikroaneurysmen und azelluläre Kapillaren jedoch häufiger im nasalen und temporalen Quadranten anzutreffen waren (Kern und Engerman, 1995). Folglich kann auch hier nicht allein der Perizytenverlust für die Gefäßobliteration verantwortlich gemacht werden.

Zudem ist ungewiss, ob Perizyten in hyperglykämischen Situationen weiterhin Endothelzell-spezifische Überlebensfaktoren exprimieren, also ob sie den Endothelzellen unter Stresssituationen überhaupt von Nutzen sind. Es existiert auch eine Theorie nach der sich die Endothelzellen unter hyperglykämischen Bedingungen aktiv von den benachbarten Perizyten befreien, um die Umsetzung eigener Regenerationsprozesse zu erleichtern (Hammes, 2004). Diese Hypothese könnte die Hochregulation von VEGF und Ang-2 im frühen Stadium der diabetischen Retinopathie erklären (Matsumura, 1999; Abu_El_Asrar, 2004), denn die beiden Wachstumsfaktoren in Kombination lockern die Kontakte zwischen Endothelzellen und Perizyten, was den Endothelzellen die Möglichkeit eröffnet sich neu zu orientieren und Gefäße zu bilden (Korff, 2001; Zhang, 2003). Dieser Vorgang ist an sich eine sehr sinnvolle Reaktion, zu bedenken ist jedoch, dass sich die diabetische Retina in einer pathologischen Stoffwechselsituation befindet, in der die normalen Angiogeneseprozesse durch proinflammatorische Zytokine (IL-1, IL-6, TNF- α u.a.) und oxidativen Stress behindert werden. Die reaktiven, proliferierenden Endothelzellen sind vermutlich anfälliger gegenüber Diabetes-bedingten Schädigungen als ruhende, nicht-proliferierende Zellen, was die erhöhte Apoptose und die Entstehung von azellulären Kapillaren erklären könnte.

Auch jüngste Ergebnisse mit Benfotiamin lassen vermuten, dass der Schutz der Endothelzelle das primäre Therapieziel ist. Benfotiamin ist ein fettlösliches Thiaminderivat, welches als Co-Substrat der Transketolase den "Abfluss" der beim

Diabetes aufgestauten Zwischenprodukte Fructose-6-phosphat und Glyceraldehyd-3-phosphat über den Pentose-Phosphat-Weg fördert und auf diese Weise die vermehrte Bildung von AGEs und die Aktivierung der PKC reduziert (s. Abb. 3 Kapitel 1.2.2). Durch die 9-monatige Verabreichung von Benfotiamin an diabetische Ratten konnte die Entstehung azellulärer Kapillaren – nicht aber der Perizytenverlust – nahezu komplett verhindert werden (Hammes, 2003).

Generell vorteilhaft ist der Einsatz von Substanzen, welche gleich mehrere gestörte Stoffwechselwege positiv beeinflussen. Aminoguanidin – das sich bereits in klinischen Studien zur Verhinderung der diabetischen Nephropathie behauptet (Freedman, 1999) – ist so eine Substanz: Neben seiner Eigenschaft als Antioxidans ist Aminoguanidin auch ein AGE-Inhibitor, ein Inhibitor der iNOS und der PKC. Mit diesen Fähigkeiten ausgestattet verringerte Aminoguanidin in zahlreichen Versuchen sowohl die Endothelzellproliferation und den Perizytenverlust, als auch die Entstehung von Mikroaneurysmen und azellulären Kapillaren (Brownlee, 1986; Hammes, 1991; Hammes, 1995a; Hammes, 1995b; Kern und Engerman, 2001). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Prävention der diabetischen Retinopathie umso effektiver ist, je früher sie in die Abfolge der pathogenetischen Ereignisse eingreift. Dementsprechend kommt der normnahen Blutzuckereinstellung weiterhin die größte Bedeutung zu. Ferner rückt die Verhinderung von intrazellulär gebildetem oxidativen Stress sowie die Blockierung der durch die ROS verstärkt ablaufenden Stoffwechselwege weiter in den Vordergrund. Möglicherweise könnte auch die Intervention mit Faktoren, welche unter physiologischen Bedingungen perizytären Ursprungs sind (z.B. Ang-1), zu einer Stabilisierung des retinalen Gefäßnetzes beitragen, wodurch der frühe Perizytenverlust selbst nicht das Ziel therapeutischer Bemühungen darstellen muss.

Nach Zusammensicht aller Daten ist anzunehmen, dass es während der physiologischen Angiogenese keinen Schwellenwert für den Perizytenbesatz gibt, ab dem retinale Kapillaren an Stabilität gewinnen. Umgekehrt scheint der diabetische Perizytenverlust nicht die Ursache für nachfolgende Schädigungen, sondern vielmehr selbst ein Epiphänomen der Erkrankung zu sein.

5 Zusammenfassung

Die Retinopathie ist die häufigste mikrovaskuläre Komplikation des Diabetes. Sie ist gekennzeichnet durch fortschreitende Veränderungen kleinster Gefäße innerhalb der Netzhaut, die letztlich zum Gefäßverschluss und reaktiver Gefäßneubildung führen. Die Ursache für diese Gefäßschädigung ist der chronisch erhöhte Blutzucker, wobei der zugrunde liegende pathogenetische Mechanismus nur unzureichend bekannt ist. Zur Zeit wird insbesondere die Bedeutung einiger Hyperglykämie-induzierter Prozesse, darunter v.a. die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), ein vermehrter Umsatz von Glukose über den Polyolweg, die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) und die vermehrte Bildung von Glykierungsendprodukten (AGEs) hervorgehoben.

Ein charakteristisches Merkmal der frühen, nicht-proliferativen Retinopathie ist der Verlust von Perizyten. Es wird angenommen, dass Perizyten – ähnlich wie die glatten Muskelzellen der größeren Gefäße – zur Stabilisierung der Kapillaren beitragen, so dass ihr Verlust zu einer Destabilisierung des Gefäßsystems und zur Ausprägung des klinischen Bilds der Retinopathie führt.

Bislang beschränkt sich die Therapie der diabetischen Retinopathie auf die Einstellung eines normnahen Blutzuckers im frühen Stadium der Erkrankung sowie auf die Laserkoagulation und Vitrektomie im späten, proliferativen Stadium. Leider kann die normnahe Blutzuckereinstellung die Retinopathie nicht vollständig aufhalten und auch die Laserkoagulation dient lediglich der Verhinderung des völligen Visusverlustes. Die Hoffnung liegt in der Entwicklung neuer Therapien, was jedoch eine genaue Kenntnis der Zusammenhänge voraussetzt, die zu Gefäßverschluss und Gefäßneubildung führen.

In welchem Umfang die AGE-Bildung zur Ausprägung der diabetischen Retinopathie beiträgt, sollte mit Hilfe der Substanz Tenilsetam (3-(2-thienyl)-2-piperazinon)) geklärt werden. Tenilsetam – der therapeutischen Klassifizierung nach ein Psychopharmakon – verhinderte in anderen Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* die Entstehung von AGEs. Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe zeigten, dass eine 9-monatige Verabreichung von Tenilsetam an diabetische Ratten die Bildung von azellulären Kapillaren, nicht aber den typischen Perizytenverlust, verhinderte.

Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob

1. Tenilsetam neben der AGE-Inhibierung auch einen direkten Effekt auf das Verhalten von Endothelzellen ausübt.
2. es für den retinalen Perizytenbesatz einen Schwellenwert gibt, ab dem die Kapillaren instabil werden.

Zu 1: Funktionelle Tests mit HUVECs und BRECs ergaben, dass Tenilsetam die Proliferation und DNA-Synthese von HUVECs konzentrationsabhängig hemmt, ohne deren Apoptose- oder Nekroserate wesentlich zu erhöhen. Die Adhäsion und Migration von HUVECs wurde durch die Anwesenheit von Tenilsetam nicht beeinflusst. Wurden die Zellen jedoch vor Versuchsbeginn für 24 Stunden mit Tenilsetam präinkubiert, adhärten und migrierten die so behandelten Zellen stärker als die Kontrollen, welche nur mit PBS inkubiert wurden. Die IL-1 β -induzierte Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen wurde im Falle von ICAM-1 in Gegenwart von Tenilsetam leicht vermindert, die von VCAM-1 und E-Selectin blieb unter den gleichen Bedingungen unverändert. Das Aussprossen von BRECs im dreidimensionalen Fibrinnetz wurde durch den Zusatz von Tenilsetam deutlich gefördert.

Die Ergebnisse zeigen, dass Tenilsetam einen direkten Effekt auf Endothelzellen hat. Eine Übertragung der Ergebnisse auf die *in vivo* Situation ist jedoch nicht ohne weiteres möglich, da HUVECs im Gegensatz zu retinalen Endothelzellen makrovaskuläre Zellen sind, die sich in ihren Eigenschaften zum Teil erheblich von denen mikrovaskulärer Zellen unterscheiden. Die deutlich antiproliferative Eigenschaft von Tenilsetam könnte sich *in vivo* aber durchaus positiv auf das diabetische Endothel auswirken, da sowohl im frühen, als auch im späten Stadium der Retinopathie proliferationsfördernde Faktoren – wie z.B. VEGF und Ang-2 – hochreguliert sind. Auch eine Reduktion der endothelialen ICAM-1-Expression könnte sich im diabetischen Tier vorteilhaft auswirken, da ICAM-1 in der als prokoagulativ und proinflammatorisch beschriebenen Situation, an der Adhäsion und Transmigration von Leukozyten beteiligt ist.

Zu 2: Um die Bedeutung der Perizyten für die Stabilität retinaler Kapillaren zu erforschen, wurde nicht der diabetische Perizytenverlust betrachtet, sondern der umgekehrte Weg beschritten, d.h. die Betrachtung der Perizytenrekrutierung während der physiologischen

Angiogenese. Zu Beginn der Arbeit bestand die Theorie des *windows of plasticity*, welches ein Zeitfenster in der physiologischen Gefäßentwicklung beschreibt, in dem die Kapillaren frei von Perizyten sind, um sich dem aktuellen Nähr- und Sauerstoffbedarf flexibel anpassen zu können. Ein genauer zeitlicher und räumlicher Zusammenhang zwischen der Präsenz von perivaskulären Zellen und der Stabilität von Kapillaren wurde bislang nicht etabliert. Also erfolgte im Rahmen dieser Arbeit zunächst die Bestimmung der retinalen Perizytenzahl während der postnatalen Angiogenese in der Maus (im Zeitraum von p7-p12), um in einem zweiten Schritt die Reaktivität der Kapillaren auf einen einsetzenden Hyperoxiereiz mit der Perizytenzahl zu korrelieren.

Das Ergebnis war, dass die Zahl der Perizyten mit dem Alter der Mäuse zunahm. Besonders auffällig war der fünffache Anstieg der Perizytenzahl von p7 auf p8, während der weitere Zuwachs an Perizyten linear verlief (täglich etwa 14 %). Ein einsetzender Hyperoxiereiz an p7 bewirkte die Regression zentraler Kapillaren um den *Nervus opticus*. Nach Rückführung in die normale Raumluft erfuhren die Tiere eine relative Hypoxie, wodurch neue Gefäße gebildet wurden, die sich – ähnlich wie bei der proliferativen diabetischen Retinopathie – auch vor die Netzhaut ausbreiteten. Wurde dieses so genannte ROP-Modell (*retinopathy of prematurity*) an p8 begonnen, wurde weder eine Gefäßobliteration noch eine anschließende Neovaskularisation beobachtet, d.h. die Kapillaren waren gegenüber dem Hyperoxie-induzierten VEGF-Entzug resistent.

Zunächst wurde vermutet, dass der Anstieg der Perizytenzahl an p8 den Schwellenwert repräsentiert, ab dem Kapillaren an Stabilität gewinnen. Eine genauere Fokussierung der untersuchten Präparate ergab jedoch, dass noch ein weiteres Ereignis auf den achten Tag nach der Geburt fällt: die Etablierung des tiefen Kapillarbetts. Weiterführende Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe zeigten, dass dadurch nur die Menge an Kapillaren, nicht aber die relative Perizyten-dichte an den Kapillaren zunahm, d.h. der Übergang von einem unreifen, reaktiven in ein reifes, stabiles Gefäßsystem wird hier nicht direkt von der Zahl der Perizyten determiniert.

Die weitere Analyse dieser Situation mit Hilfe des Western Blots ergab, dass die Gefäßstabilität an p8 möglicherweise durch die Hochregulation von PDGF-B und Ang-1 bedingt ist. PDGF-B ist essenziell für die Rekrutierung von Perizyten und Ang-1 – welches von Perizyten exprimiert wird – besitzt eine stark antipermeable Wirkung auf Blutgefäße.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass während der physiologischen Angiogenese insofern kein *window of plasticity* existiert, als dass die perivaskulären Zellen von Beginn an mit dem Gefäßspröss assoziiert sind. Dementsprechend kann in diesem System kein Schwellenwert für den retinalen Perizytenbesatz bestimmt werden, ab dem die Kapillaren an Stabilität gewinnen. Ausschlaggebend für den Reifungsprozess scheint vielmehr die genaue zeitlich und räumlich koordinierte Expression bestimmter Wachstumsfaktoren zu sein.

Nach Diskussion der gewonnenen Daten mit denen anderer Arbeitsgruppen wurde deutlich, dass den Perizyten durchaus eine wichtige Funktion bei der Stabilisierung der Retinakapillaren zukommt, da die vollständige Verhinderung der physiologischen Perizytenrekrutierung zum Zusammenbruch des retinalen Gefäßnetzes führt. Indes ist im diabetischen Auge nicht immer ein Zusammentreffen von Perizytenverlust und weiterer Gefäßschädigung zu beobachten, was bedeutet, dass hier kein kausaler Zusammenhang bestehen muss. Der Einsatz von Substanzen wie Tenilsetam oder Benfotiamin – welche das Endothel schützen ohne den Perizytenverlust zu verhindern – zeigt, dass höchstwahrscheinlich die Endothelzelle die Zielzelle therapeutischer Bemühungen ist. Nach der jetzigen Datenlage scheint die Normalisierung der Hyperglykämie-induzierten Stoffwechselwege am ehesten den Schutz des Endothels zu gewährleisten und steht demnach bei der Entwicklung neuer Therapieprinzipien im Vordergrund.

6 Summary

Retinopathy is the major microvascular complication in diabetes. It is characterized by ongoing changes in smallest vessels within the retina, which ultimately lead to vessel occlusion and reactive neovascularization. Hyperglycaemia is the primary cause of microvascular complications, but the underlying pathogenetic mechanisms are only insufficiently identified. At present the significance of some hyperglycaemia-induced pathways is discussed, among them the generation of reactive oxygen species (ROS), an increased flux of glucose through polyol pathway, an increased activation of protein kinase C (PKC) and an increased formation of advanced glycation end-products (AGEs).

A characteristic feature of early diabetic retinopathy is the loss of pericytes. It is supposed that pericytes – like vascular smooth muscle cells in larger vessels – contribute to capillary stabilization, so that their loss leads to destabilization of the vasculature and to the development of clinical symptoms.

To date, treatment of diabetic retinopathy is restricted to good glycaemic control during early phases and to photocoagulation and vitrectomy during later proliferative stages of disease. Unfortunately, good glycaemic control cannot completely stop the progression of eye disease and laser treatment solely prevents total loss of vision. Hope lies in the development of new therapies, which presupposes however an exact knowledge of the circumstances, which lead to vessel regression and neovascularization.

To which extent the AGE formation contributes to the development of diabetic retinopathy, should be clarified with the help of tenilsetam. Tenilsetam, which is – according to the therapeutic classification – a psychopharmacologic drug, inhibited the development of AGEs *in vitro* and *in vivo*. Previous experiments from the own working group demonstrated that a nine-months administration of tenilsetam to diabetic rats prevented the formation of acellular capillaries but not the typical pericyte dropout.

Against this background the present work examined whether

1. Tenilsetam – beside its AGE-inhibiting properties – also exerts a more direct effect on the behaviour of endothelial cells.
2. there is a threshold value for pericyte coverage, from which capillaries start to become instable.

Ad 1: Functional tests with HUVECs and BRECs revealed that tenilsetam decreased dose-dependently the proliferation and DNA-synthesis of HUVECs, without substantially increasing their rate of apoptosis or necrosis. The adhesion and migration of HUVECs was not affected by the presence of tenilsetam. Were the cells however preincubated with tenilsetam 24 hours before the test started, thus treated cells adhered and migrated more intensively than the controls which were only incubated with PBS. The IL-1 β -induced expression of endothelial adhesion molecules was slightly decreased by tenilsetam in the case of ICAM-1, whereas the expression of VCAM-1 and E-Selectin remained unchanged under the same conditions. The sprouting of BRECs in a three-dimensional fibrin gel was clearly enhanced by tenilsetam.

The results show that tenilsetam has a direct effect on endothelial cells. However a transmission of these results to the *in vivo* situation is not in any respect possible, since HUVECs are, contrary to retinal endothelial cells, macrovascular cells, which differ tremendously in their characteristics from microvascular cells. Nevertheless the strong antiproliferative property of tenilsetam might have quite positive effects on diabetic endothelium *in vivo*, since angiogenic factors like VEGF and Ang-2 are up-regulated in early and late stages of diabetic retinopathy. Moreover a reduction of the endothelial ICAM-1-expression could exert beneficial effects on diabetic animals, since ICAM-1 is involved in adhesion and transmigration of leukocytes in this – as procoagulatory and proinflammatory described – situation.

Ad 2: To explore the significance of pericytes for stability of retinal capillaries not the diabetic pericyte loss was regarded, but the reversed way was taken, i.e. the examination of pericyte recruitment during physiologic angiogenesis. At the beginning of this work the theory of the *window of plasticity* existed, which describes a period in physiological vessel development in which capillaries are free from surrounding pericytes in order to adapt

flexibly to the physiological needs of the tissue. Up to now an exact temporal and spatial correlation between the presence of perivascular cells and the stability of capillaries was not established. In the logical consequence the determination of retinal pericyte number during postnatal angiogenesis (from p7 to p12) in the mouse followed in the scope of this work, to correlate in a second step pericyte number with the reactivity of the capillaries to an upcoming hyperoxic insult.

The result was that the number of pericytes increased with the age of mice. The fivefold increase of pericyte number from p7 to p8 was particularly remarkable, whereas the further increase in pericyte number proceeded linearly (about 14 % daily). The hyperoxic insult at p7 caused the regression of central capillaries around the *Nervus opticus*. When returned to room air the animals experienced a relative hypoxia, upon which new vessels were formed also spreading in front of the retina, similar to the situation in proliferative diabetic retinopathy. If this so-called ROP model (*retinopathy of prematurity*) was started at p8, neither a vessel regression nor a following neovascularization could be stated, i.e. the capillaries were resistant to the hyperoxia-induced VEGF withdrawal.

First was assumed that the increase of pericyte number at p8 represents the threshold value, from which capillaries start to become stable. However the more exact focusing of the examined preparations revealed that a second event takes place at day p8: the establishment of the deep capillary bed. Resuming investigations of the own working group showed that thereby only the quantity of capillaries increased, but not the relative pericyte density on these capillaries, i.e. the transition of an immature, reactive vascular system to mature and stable system is not directly determined by the number of pericytes.

The further investigation of this situation with Western Blot-analysis, revealed that vessel stability at p8 is possibly due to PDGF-B and Ang-1 up-regulation. PDGF-B is essential for pericyte recruitment and Ang-1, which is expressed by pericytes, has a strong antipermeable effect on blood vessels.

Since pericytes accompany the capillary sprouts during the development of vasculature, there is no pericyte-determined *window of plasticity*. Hence, no threshold value can be determined in this system for the retinal pericyte coverage, from which on the capillaries

gain in stability. To some extent the temporally and spatially coordinated expression of certain growth factors seems to be important for the maturation process.

After having discussed the data in hand with those of other working groups it became evident that the pericytes have doubtlessly an important function in stabilizing retinal capillaries, since the complete prevention of the physiological pericyte recruitment leads to the collapse of the retinal vasculature. Nevertheless diabetic pericyte dropout is not always associated with vascular damage, which implies that there needn't be a causal connection. The application of substances such as tenilsetam or benfotiamin – which protect the endothelium without preventing pericyte dropout – demonstrates that the target for therapeutic efforts is most likely the endothelial cell and not the pericyte. According to recent data, the normalization of the hyperglycaemia-induced metabolic pathways most likely seems to guarantee the protection of the endothelium and therefore must strongly be respected in the development of new therapy principles.

7 Anhang

7.1 Tabellarische Zusammenfassung der Daten von Projekt I

Tab. 11: Zellzahlbestimmung bei HUVECs nach 24-stündiger Tenilsetam-Behandlung, Angaben in Prozent zur unbehandelten Kontrolle

Medium	Tenilsetam-Konzentration					x [y-fach]
	0 mM	1 mM	3 mM	10 mM	30 mM	
5.5 mM Glukose*	100	-	86 ± 19	65 ± 16	46 ± 17	5 [1-fach]
30 mM Glukose	100	-	74 ± 51	58 ± 20	29 ± 6	2 [1-fach]

X = Anzahl der Versuche

Y = Anzahl der Wiederholungsmessungen innerhalb eines Versuchs

* = Werte dargestellt in Abb. 12

Tab. 12: Zellzahlbestimmung bei HUVECs nach 48-stündiger Tenilsetam-Behandlung, Angaben in Prozent zur unbehandelten Kontrolle

Medium	Tenilsetam-Konzentration					x [y-fach]
	0 mM	1 mM	3 mM	10 mM	30 mM	
5.5 mM Glukose	100	81	48	42 ± 21	23 ± 5	2 (1) [1-fach]

X = Anzahl der Versuche

Y = Anzahl der Wiederholungsmessungen innerhalb eines Versuchs

Tab. 13: Zellzahlbestimmung bei HUVECs nach vier-tägiger Tenilsetam-Behandlung, Angaben in Prozent zur unbehandelten Kontrolle

Medium	Tenilsetam-Konzentration					x [y-fach]
	0 mM	1 mM	3 mM	10 mM	30 mM	
5.5 mM Glukose*	100	-	46	30	19	1 [1-fach]
30 mM Glukose*	100	-	63	39	12	1 [1-fach]

X = Anzahl der Versuche

Y = Anzahl der Wiederholungsmessungen innerhalb eines Versuchs

* = Werte dargestellt in Abb. 14

Tab. 14: Zellzahlbestimmung bei HUVECs nach sechs-tägiger Tenilsetam-Behandlung, Angaben in Prozent zur unbehandelten Kontrolle

Medium	Tenilsetam-Konzentration					x [y-fach]
	0 mM	1 mM	3 mM	10 mM	30 mM	
5.5 mM Glukose*	100	-	38	25	5	1 [1-fach]
30 mM Glukose*	100	-	35	15	3	1 [1-fach]

X = Anzahl der Versuche

Y = Anzahl der Wiederholungsmessungen innerhalb eines Versuchs

* = Werte dargestellt in Abb. 14

Tab. 15: Proliferationsversuch mit HUVECs über einen Zeitraum von 48 Stunden unter Einfluss von (a) 0.2 % bzw. (b) 10 % FCS und Tenilsetam, Angaben in Prozent zur unbehandelten Kontrolle

Medium	Tenilsetam-Konzentration					x [y-fach]
	0 mM	1 mM	3 mM	10 mM	30 mM	
(a) 0.2 % FCS						
5.5 mM Glukose*	100	90 ± 5	-	85 ± 7	63 ± 13	3 [3-6-fach]
30 mM Glukose	100 ± 2	96 ± 8	-	78 ± 5	70 ± 4	2 [3-6-fach]
(b) 10 % FCS						
5.5 mM Glukose*	171 ± 25	159 ± 33	-	131 ± 17	92 ± 13	3 [3-6-fach]
30 mM Glukose	159 ± 34	152 ± 33	-	129 ± 26	101 ± 7	2 [3-6-fach]

X = Anzahl der Versuche

Y = Anzahl der Wiederholungsmessungen innerhalb eines Versuchs

* = Werte dargestellt in Abb. 15

Tab. 16: DNA-Synthese bei HUVECs unter Einfluss von Tenilsetam in (b) An-, bzw. (a) Abwesenheit von 20 ng/ml VEGF, Angaben in Prozent zur unbehandelten Kontrolle

Medium	Tenilsetam-Konzentration					x [y-fach]
	0 mM	1 mM	3 mM	10 mM	30 mM	
(a) ohne VEGF						
5.5 mM Glukose*	100	93	76 ± 13	72 ± 18	9 ± 1	3 (1) [2-6-fach]
30 mM Glukose	101 ± 22	114	70 ± 21	52 ± 13	9 ± 2	2 (1) [3-6-fach]
(b) mit VEGF						
5.5 mM Glukose*	140 ± 32	187	109 ± 25	73 ± 19	11 ± 1	3 (1) [3-6-fach]
30 mM Glukose	121	-	109	52	10	1 [3-6-fach]

X = Anzahl der Versuche

Y = Anzahl der Wiederholungsmessungen innerhalb eines Versuchs

* = Werte dargestellt in Abb. 16

Tab. 17: Prozentsatz (a) apoptotischer und (b) nekrotischer HUVECs in An- und Abwesenheit von Tenilsetam

	Tenilsetam-Konzentration					x [y-fach]
	0 mM	1 mM	3 mM	10 mM	30 mM	
(a) Apoptose*	0.7 ± 0.4	-	2.4 ± 2.4	3.4 ± 1.6	8.2 ± 4.3	2 (1) [2-fach]
(b) Nekrose [#]	2.0 ± 1.5	-	2.8 ± 3.3	1.6 ± 0.9	2.1 ± 0.2	2 (1) [2-fach]

X = Anzahl der Versuche

Y = Anzahl der Wiederholungsmessungen innerhalb eines Versuchs

* = Werte dargestellt in Abb. 17 und 19

= Werte dargestellt in Abb. 18 und 19

Tab. 18: Adhäsion von HUVECs auf (a) BSA-, (b) FCS- und (c) Gelatine-beschichteten Wells in An- und Abwesenheit von Tenilsetam (ohne Präinkubation), Angaben in Prozent zur unbehandelten Kontrolle

Medium	Tenilsetam-Konzentration					x [y-fach]
	0 mM	1 mM	3 mM	10 mM	30 mM	
(a) 3 % BSA						
5.5 mM Glukose*	100	-	100 ± 5	105 ± 10	85 ± 14	3 [3-6-fach]
30 mM Glukose	-	-	-	-	-	-
(b) 5 % FCS						
5.5 mM Glukose*	241 ± 31	227 ± 40	228 ± 21	205 ± 37	204 ± 47	2 [3-6-fach]
30 mM Glukose	231	220	232	199	190	1[3-fach]
(c) 0.2 % Gelatine						
5.5 mM Glukose*	340	-	341	356	252	1 [4-7-fach]
30 mM Glukose	-	-	-	-	-	-

X = Anzahl der Versuche

Y = Anzahl der Wiederholungsmessungen innerhalb eines Versuchs

* = Werte dargestellt in Abb. 20

Tab. 19: Adhäsion von HUVECs auf (a) BSA- und (b) FCS-beschichteten Wells in An- und Abwesenheit von Tenilsetam (nach 4-stündiger Präinkubation), Angaben in Prozent zur unbehandelten Kontrolle

Medium	Tenilsetam-Konzentration					x [y-fach]
	0 mM	1 mM	3 mM	10 mM	30 mM	
(a) 3 % BSA						
5.5 mM Glukose	100	115	104	123	122	1 [2-fach]
30 mM Glukose	98	123	100	109	105	1 [2-fach]
(b) 5 % FCS						
5.5 mM Glukose	305	324	323	355	345	1 [3-fach]
30 mM Glukose	339	309	262	330	277	1 [3-fach]

X = Anzahl der Versuche

Y = Anzahl der Wiederholungsmessungen innerhalb eines Versuchs

Tab. 20: Adhäsion von HUVECs auf (a) BSA-, (b) FCS- und (c) Gelatine-beschichteten Wells in An- und Abwesenheit von Tenilsetam (nach 24-stündiger Präinkubation), Angaben in Prozent zur unbehandelten Kontrolle

Medium	Tenilsetam-Konzentration					x [y-fach]
	0 mM	1 mM	3 mM	10 mM	30 mM	
(a) 3 % BSA						
5.5 mM Glukose*	100	-	103 ± 26	129 ± 37	180 ± 44	5 [3-12-fach]
30 mM Glukose	130 ± 10	103 ± 13	99 ± 37	168 ± 100	144 ± 49	2 [1-2-fach]
(b) 5 % FCS						
5.5 mM Glukose*	233 ± 94	210 ± 52	241 ± 31	347 ± 99	325 ± 19	2 [3-fach]
30 mM Glukose	240 ± 84	267 ± 69	205 ± 9	358 ± 135	335 ± 1	2 [3-fach]
(c) 0.2 % Gelatine						
5.5 mM Glukose*	327 ± 34	-	348 ± 76	316 ± 39	422 ± 129	3 [5-12-fach]
30 mM Glukose	-	-	-	-	-	-

X = Anzahl der Versuche

Y = Anzahl der Wiederholungsmessungen innerhalb eines Versuchs

* = Werte dargestellt in Abb. 21

Tab. 21: Migration von HUVECs in An- und Abwesenheit von Tenilsetam (ohne Präinkubation), mit oder ohne Stimulation durch VEGF und bFGF [20 ng/ml], Angaben in Prozent zur unbehandelten Kontrolle

	Tenilsetam-Konzentration					x [y-fach]
	0 mM	1 mM	3 mM	10 mM	30 mM	
ohne Stimulus*	100	-	92	95	78	1 [4-6-fach]
mit VEGF + bFGF*	148	-	155	143	163	1 [4-6-fach]

X = Anzahl der Versuche

Y = Anzahl der Wiederholungsmessungen innerhalb eines Versuchs

* = Werte dargestellt in Abb. 22

Tab. 22: Migration von HUVECs nach 24-stündiger Präinkubation mit Tenilsetam, mit oder ohne Stimulation durch VEGF [20 ng/ml], Angaben in Prozent zur unbehandelten Kontrolle

Medium	Tenilsetam-Konzentration					x [y-fach]
	0 mM	1 mM	3 mM	10 mM	30 mM	
(a) ohne Stimulus						
5.5 mM Glukose*	100		110 ± 17	115 ± 1	123 ± 7	3 [2-3-fach]
30 mM Glukose	94 ± 0		108 ± 8	112 ± 11	122 ± 11	2 [2-3-fach]
(b) mit VEGF						
5.5 mM Glukose*	130 ± 23		127 ± 19	132 ± 7	141 ± 22	3 [2-3-fach]
30 mM Glukose	115 ± 3		118 ± 1	135 ± 20	133 ± 18	2 [2-3-fach]

X = Anzahl der Versuche

Y = Anzahl der Wiederholungsmessungen innerhalb eines Versuchs

* = Werte dargestellt in Abb. 23

Tab. 23: Migration von HUVECs nach 24-stündiger Präinkubation mit Tenilsetam, mit oder ohne Stimulation durch VEGF und bFGF [20 ng/ml], Angaben in Prozent zur unbehandelten Kontrolle

	Tenilsetam-Konzentration					x [y-fach]
	0 mM	1 mM	3 mM	10 mM	30 mM	
ohne Stimulus*	100	-	106	115	183	1 [4-6-fach]
mit VEGF + bFGF*	239	-	224	281	361	1 [4-6-fach]

X = Anzahl der Versuche

Y = Anzahl der Wiederholungsmessungen innerhalb eines Versuchs

* = Werte dargestellt in Abb. 24

Tab. 24: ICAM-1-Expression von HUVECs unter Einfluss von Tenilsetam

Es wurde die basale (a) und die über IL-1 β [1 ng/ml] induzierte (b) ICAM-1-Expression gemessen. Angaben in Prozent zur unbehandelten Kontrolle

Medium	Tenilsetam-Konzentration					x [y-fach]
	0 mM	1 mM	3 mM	10 mM	30 mM	
(a) basal						
5.5 mM Glukose*	100	-	93 \pm 11	97 \pm 4	98 \pm 3	2 [3-6-fach]
30 mM Glukose	91 \pm 3	-	87 \pm 6	89 \pm 6	88 \pm 5	2 [3-6-fach]
(b) mit IL-1β						
5.5 mM Glukose*	171 \pm 15	-	157 \pm 18	154 \pm 19	132 \pm 9	2 [3-6-fach]
30 mM Glukose	161 \pm 10	-	151 \pm 12	144 \pm 8	122 \pm 3	2 [3-6-fach]

X = Anzahl der Versuche

Y = Anzahl der Wiederholungsmessungen innerhalb eines Versuchs

* = Werte dargestellt in Abb. 25

Tab. 25: VCAM-1-Expression von HUVECs unter Einfluss von Tenilsetam

Es wurde die basale (a) und die über IL-1 β [1 ng/ml] induzierte (b) VCAM-1-Expression gemessen. Angaben in Prozent zur unbehandelten Kontrolle

Medium	Tenilsetam-Konzentration					x [y-fach]
	0 mM	1 mM	3 mM	10 mM	30 mM	
(a) basal						
5.5 mM Glukose*	100	-	106	124	108	1 [3-fach]
30 mM Glukose	103	-	103	116	116	1 [3-fach]
(b) mit IL-1β						
5.5 mM Glukose*	136	-	148	166	120	1 [3-fach]
30 mM Glukose	142	-	138	152	136	1 [3-fach]

X = Anzahl der Versuche

Y = Anzahl der Wiederholungsmessungen innerhalb eines Versuchs

* = Werte dargestellt in Abb. 26

Tab. 26: E-Selectin-Expression von HUVECs unter Einfluss von Tenilsetam

Es wurde die basale (a) und die über IL-1 β [1 ng/ml] induzierte (b) E-Selektin-Expression gemessen. Angaben in Prozent zur unbehandelten Kontrolle

Medium	Tenilsetam-Konzentration					x [y-fach]
	0 mM	1 mM	3 mM	10 mM	30 mM	
(a) basal						
5.5 mM Glukose*	100	-	92	97	94	1 [3-fach]
30 mM Glukose	97	-	92	93	91	1 [3-fach]
(b) mit IL-1β						
5.5 mM Glukose*	203	-	212	216	181	1 [3-fach]
30 mM Glukose	193	-	195	190	184	1 [3-fach]

X = Anzahl der Versuche

Y = Anzahl der Wiederholungsmessungen innerhalb eines Versuchs

* = Werte dargestellt in Abb. 27

Tab. 27: Sprouten von BRECs in An- und Abwesenheit von Tenilsetam, basal (ohne Stimulus) oder über bFGF [2 ng/ml] induziert, Angaben in Prozent zur bFGF-behandelten Kontrolle

	Tenilsetam-Konzentration					x [y-fach]
	0 mM	1 mM	3 mM	10 mM	30 mM	
ohne Stimulus*	5 \pm 3	9 \pm 8	14 \pm 16	20 \pm 14	9 \pm 4	3 [2-3-fach]
mit bFGF*	100	144 \pm 25	159 \pm 49	172 \pm 60	97 \pm 5	3 [2-3-fach]

X = Anzahl der Versuche

Y = Anzahl der Wiederholungsmessungen innerhalb eines Versuchs

* = Werte dargestellt in Abb. 28

7.2 Tabellarische Zusammenfassung der Daten von Projekt II

Tab. 28: Perizyten-dichte bei XlacZ-Mäusen (zu Abb. 35)

	p7	p8	p9	p10	p11	p12	p26
Perizyten/Feld*	2.8 ± 2.5	15.5 ± 6.3	19.7 ± 3.7	25.2 ± 1.7	28.9 ± 0.1	34.4 ± 1.3	18.9 ± 4.7
Mäuse (n)	9	6	3	3	2	2	4

* Je Retina wurden 12 Felder ausgezählt.

Tab. 29: Quantifizierung der reaktiven Neovaskularisation nach ROP-Modell bei C57BL/6-Mäusen (zu Abb. 38)

	p17	p18	p19	p20	p21	p22
Neovaskuläre Kerne/Schnitt*	50.9 ± 21.0	7.4 ± 6.3	5.8 ± 4.4	7.1 ± 4.6	0.6 ± 0.8	1.0 ± 1.4
Mäuse (n)	6	5	6	6	6	5

* Je Auge wurden 15 Schnitte ausgezählt.

Tab. 30: Densitometrische Auswertung von Western Blot-Analysen gegen VEGF und flk-1 (zu Abb. 39 und 40)

	p7*	p8	p9	p10	p11	p12	p26	(n)	Retinae/ Versuch
VEGF b	100	1487	-	-	-	-	4364	1	3
Flk-1 a	100	112 ± 8	100 ± 18	189 ± 59	179 ± 2	141 ± 37	-	2	5

* Das Expressionsniveau des Wachstumsfaktors bzw. Rezeptors an Tag p7 wurde gleich 100 % gesetzt und mit dessen Expressionsniveau an den folgenden Tagen verglichen.

a) Versuche mit Retinalysaten von C57BL/6-Mäusen

b) Versuche mit Retinalysaten von XlacZ-Mäusen

Tab. 31: Densitometrische Auswertung von Western Blot-Analysen gegen PDGF-B und PDGF-R β (zu Abb. 41)

		p7*	p8	p9	p10	p11	p12	p26	(n)	Retinae/ Versuch
PDGF-B	a	100	121 \pm 18	102 \pm 18	137 \pm 9	110 \pm 16	121 \pm 28	-	3	5
	b	100	279	-	-	-	-	151	1	3
PDGF-R β	a	100	116	141	188	240	320	-	1	5
	b	100	214 \pm 61	-	-	-	-	498 \pm 439	2	3

* Das Expressionsniveau des Wachstumsfaktors bzw. Rezeptors an Tag p7 wurde gleich 100 % gesetzt und mit dessen Expressionsniveau an den folgenden Tagen verglichen.

a) Versuche mit Retinalysaten von C57BL/6-Mäusen

b) Versuche mit Retinalysaten von XlacZ-Mäusen

Tab. 32: Densitometrische Auswertung von Western Blot-Analysen gegen Angiopoietin-1 und -2, sowie gegen Tie-2 (zu Abb. 42 und 43)

		p7*	p8	p9	p10	p11	p12	p26	(n)	Retinae/ Versuch
Ang-1		100	164	207	207	200	152	-	1	5
Ang-2		100	107	109	132	165	135	-	1	5
Tie-2		100	106 \pm 21	92 \pm 23	141 \pm 26	105 \pm 22	125 \pm 13	-	3	5

* Das Expressionsniveau der Wachstumsfaktoren bzw. des Rezeptors an Tag p7 wurde gleich 100 % gesetzt und mit deren Expressionsniveau an den folgenden Tagen verglichen.

Versuche mit Retinalysaten von C57BL/6-Mäusen

Tab. 33: Densitometrische Auswertung von Western Blot-Analysen gegen Ephrin B1 und B2 (zu Abb. 44 und 45)

		p7*	p8	p9	p10	p11	p12	p26	(n)	Retinae/ Versuch
Ephrin B1		100	105 \pm 14	111 \pm 31	138 \pm 43	150 \pm 49	125 \pm 62	-	3	5
Ephrin B2		100	154	120	207	163	131	-	1	5

* Das Expressionsniveau der Faktoren an Tag p7 wurde gleich 100 % gesetzt und mit deren Expressionsniveau an den folgenden Tagen verglichen.

Versuche mit Retinalysaten von C57BL/6-Mäusen

8 Literaturverzeichnis

- Abramsson, A., Lindblom, P. and Betsholtz, C. (2003): Endothelial and nonendothelial sources of PDGF-B regulate pericyte recruitment and influence vascular pattern formation in tumors. *J Clin Invest* **112**(8): 1142-1151.
- Abu_El_Asrar, A.M., Meersschaert, A., Dralands, L., Missotten, L. and Geboes, K. (2004): Inducible nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor are colocalized in the retinas of human subjects with diabetes. *Eye* **18**(3): 306-313.
- Adamis, A.P., Miller, J.W., Bernal, M.T., D_Amico, D.J., Folkman, J., Yeo, T.K. and Yeo, K.T. (1994): Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* **118**(4): 445-450.
- Adamis, A.P., Shima, D.T., Tolentino, M.J., Gragoudas, E.S., Ferrara, N., Folkman, J., D_Amore, P.A. and Miller, J.W. (1996): Inhibition of vascular endothelial growth factor prevents retinal ischemia-associated iris neovascularization in a nonhuman primate. *Arch Ophthalmol* **114**(1): 66-71.
- Adams, R.H., Wilkinson, G.A., Weiss, C., Diella, F., Gale, N.W., Deutsch, U., Risau, W. and Klein, R. (1999): Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis. *Genes Dev* **13**(3): 295-306.
- Aiello, L.P. (2002): The potential role of PKC beta in diabetic retinopathy and macular edema. *Surv Ophthalmol* **47 Suppl 2**: S263-269.
- Aiello, L.P., Avery, R.L., Arrigg, P.G., Keyt, B.A., Jampel, H.D., Shah, S.T., Pasquale, L.R., Thieme, H., Iwamoto, M.A. and Park, J.E. (1994): Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* **331**(22): 1480-1487.
- Aiello, L.P., Bursell, S.E., Clermont, A., Duh, E., Ishii, H., Takagi, C., Mori, F., Ciulla, T.A., Wachs, K., Jirousek, M., Smith, L.E. and King, G.L. (1997): Vascular endothelial growth factor-induced retinal permeability is mediated by protein kinase C in vivo and suppressed by an orally effective beta-isoform-selective inhibitor. *Diabetes* **46**(9): 1473-1480.
- Allt, G. and Lawrenson, J.G. (2001): Pericytes: cell biology and pathology. *Cells Tissues Organs* **169**(1): 1-11.
- 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**(10): 1024-1028.
- Amin, R.H., Frank, R.N., Kennedy, A., Elliott, D., Puklin, J.E. and Abrams, G.W. (1997): Vascular endothelial growth factor is present in glial cells of the retina and optic nerve of human subjects with nonproliferative diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **38**(1): 36-47.

- Anonymous (1990): A randomized trial of sorbinil, an aldose reductase inhibitor, in diabetic retinopathy. Sorbinil Retinopathy Trial Research Group. *Arch Ophthalmol* **108**(9): 1234-1244.
- Ansari, N.H., Zhang, W., Fulep, E. and Mansour, A. (1998): Prevention of pericyte loss by trolox in diabetic rat retina. *J Toxicol Environ Health A* **54**(6): 467-475.
- Araki, N., Ueno, N., Chakrabarti, B., Morino, Y. and Horiuchi, S. (1992): Immunochemical evidence for the presence of advanced glycation end products in human lens proteins and its positive correlation with aging. *J Biol Chem* **267**(15): 10211-10214.
- Arauz_Pacheco, C., Ramirez, L.C., Pruneda, L., Sanborn, G.E., Rosenstock, J. and Raskin, P. (1992): The effect of the aldose reductase inhibitor, ponalrestat, on the progression of diabetic retinopathy. *J Diabetes Complications* **6**(2): 131-137.
- Arnaout, M.A., Goodman, S.L. and Xiong, J.P. (2002): Coming to grips with integrin binding to ligands. *Curr Opin Cell Biol* **14**(5): 641-651.
- Asahara, T., Chen, D., Takahashi, T., Fujikawa, K., Kearney, M., Magner, M., Yancopoulos, G.D. and Isner, J.M. (1998): Tie2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2, modulate VEGF-induced postnatal neovascularization. *Circulation Research (Online)* **83**(3): 233-240.
- Ashcroft, S.J. and Ashcroft, F.M. (1990): Properties and functions of ATP-sensitive K-channels. *Cell Signal* **2**(3): 197-214.
- Auricchio, A., Behling, K.C., Maguire, A.M., O_Connor, E.M., Bennett, J., Wilson, J.M. and Tolentino, M.J. (2002): Inhibition of retinal neovascularization by intraocular viral-mediated delivery of anti-angiogenic agents. *Mol Ther* **6**(4): 490-494.
- Badr, G.A., Tang, J., Ismail_Beigi, F. and Kern, T.S. (2000): Diabetes downregulates GLUT1 expression in the retina and its microvessels but not in the cerebral cortex or its microvessels. *Diabetes* **49**(6): 1016-1021.
- Bai, N., Tang, S., Ma, J., Luo, Y. and Lin, S. (2003): Increased expression of intercellular adhesion molecule-1, vascular cellular adhesion molecule-1 and leukocyte common antigen in diabetic rat retina. *Yan Ke Yue Bao* **19**(3): 176-183.
- Barnett, P.A., Gonzalez, R.G., Chylack, L.T. and Cheng, H.M. (1986): The effect of oxidation on sorbitol pathway kinetics. *Diabetes* **35**(4): 426-432.
- Basta, G., Lazzarini, G., Massaro, M., Simoncini, T., Tanganelli, P., Fu, C., Kislinger, T., Stern, D.M., Schmidt, A.M. and De_Caterina, R. (2002): Advanced glycation end products activate endothelium through signal-transduction receptor RAGE: a mechanism for amplification of inflammatory responses. *Circulation* **105**(7): 816-822.
- Battegay, E.J., Rupp, J., Iruela_Arispe, L., Sage, E.H. and Pech, M. (1994): PDGF-BB modulates endothelial proliferation and angiogenesis in vitro via PDGF beta-receptors. *J Cell Biol* **125**(4): 917-928.

- Baumgartner_Parzer, S.M., Wagner, L., Pettermann, M., Gessl, A. and Waldhausl, W. (1995): Modulation by high glucose of adhesion molecule expression in cultured endothelial cells. *Diabetologia* **38**(11): 1367-1370.
- Baynes, J.W. (2002): The Maillard hypothesis on aging: time to focus on DNA. *Ann N Y Acad Sci* **959**: 360-367.
- Baynes, J.W. and Thorpe, S.R. (1999): Role of oxidative stress in diabetic complications. A new perspective on an old paradigm. *Diabetes* **48**: 1-9.
- Beck, L. and D_Amore, P.A. (1997): Vascular development: cellular and molecular regulation. *FASEB J* **11**(5): 365-373.
- Beitz, J.G., Kim, I.S., Calabresi, P. and Frackelton, A.R. (1992): Receptors for platelet-derived growth factor on microvascular endothelial cells. *EXS* **61**: 85-90.
- Bell, G.I., Kayano, T., Buse, J.B., Burant, C.F., Takeda, J., Lin, D., Fukumoto, H. and Seino, S. (1990): Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care* **13**(3): 198-208.
- Bellhorn, R.W. (1980): Control of blood vessel development. *Trans Ophthalmol Soc U K* **100**: 328-331.
- Beltramo, E., Buttiglieri, S., Pomero, F., Allione, A., D_Alù, F., Ponte, E. and Porta, M. (2003): A study of capillary pericyte viability on extracellular matrix produced by endothelial cells in high glucose. *Diabetologia* **46**(3): 409-415.
- Beltramo, E., Pomero, F., Allione, A., D_Alù, F., Ponte, E. and Porta, M. (2002): Pericyte adhesion is impaired on extracellular matrix produced by endothelial cells in high hexose concentrations. *Diabetologia* **45**(3): 416-419.
- Benjamin, L.E., Hemo, I. and 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**(9): 1591-1598.
- Berkowitz, B.A., Garner, M.H., Wilson, C.A. and Corbett, R.J. (1995): Nondestructive measurement of retinal glucose transport and consumption in vivo using NMR spectroscopy. *J Neurochem* **64**(5): 2325-2331.
- Betsholtz, C., Karlsson, L. and Lindahl, P. (2001): Developmental roles of platelet-derived growth factors. *Bioessays* **23**(6): 494-507.
- Betz, A.L. and Goldstein, G.W. (1980): Transport of hexoses, potassium and neutral amino acids into capillaries isolated from bovine retina. *Exp Eye Res* **30**(5): 593-605.
- Bierhaus, A., Chevion, S., Chevion, M., Hofmann, M., Quehenberger, P., Illmer, T., Luther, T., Berentshtein, E., Tritschler, H., Müller, M., Wahl, P., Ziegler, R. and Nawroth, P.P. (1997a): Advanced glycation end product-induced activation of NF-kappaB is suppressed by alpha-lipoic acid in cultured endothelial cells. *Diabetes* **46**(9): 1481-1490.

- Bierhaus, A., Illmer, T., Kasper, M., Luther, T., Quehenberger, P., Tritschler, H., Wahl, P., Ziegler, R., Muller, M. and Nawroth, P.P. (1997b): Advanced glycation end product (AGE)-mediated induction of tissue factor in cultured endothelial cells is dependent on RAGE. *Circulation* **96**(7): 2262-2271.
- Bierhaus, A. and Nawroth, P.P. (1999): Pathophysiologie diabetischer Spätschäden. *Kompendium Diabetologie*. Nawroth, Pp. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag.
- Bjarnegard, M., Enge, M., Norlin, J., Gustafsdottir, S., Fredriksson, S., Abramsson, A., Takemoto, M., Gustafsson, E., Fassler, R. and Betsholtz, C. (2004): Endothelium-specific ablation of PDGFB leads to pericyte loss and glomerular, cardiac and placental abnormalities. *Development (Cambridge, England)* **131**(8): 1847-1857.
- Bondjers, C., Kalen, M., Hellstrom, M., Scheidl, S.J., Abramsson, A., Renner, O., Lindahl, P., Cho, H., Kehrl, J. and Betsholtz, C. (2003): Transcription Profiling of Platelet-Derived Growth Factor-B-Deficient Mouse Embryos Identifies RGS5 as a Novel Marker for Pericytes and Vascular Smooth Muscle Cells. *Am J Pathol* **162**(3): 721-729.
- Bonnefont-Rousselot, D. (2001): [Antioxidant and anti-AGE therapeutics: evaluation and perspectives]. *J Soc Biol* **195**(4): 391-398.
- Booth, G., Stalker, T.J., Lefer, A.M. and Scalia, R. (2002): Mechanisms of amelioration of glucose-induced endothelial dysfunction following inhibition of protein kinase C in vivo. *Diabetes* **51**(5): 1556-1564.
- Boulanger, E., Wautier, M.P., Wautier, J.L., Boval, B., Panis, Y., Wernert, N., Danze, P.M. and Dequiedt, P. (2002): AGEs bind to mesothelial cells via RAGE and stimulate VCAM-1 expression. *Kidney Int* **61**(1): 148-156.
- Bresnick, G.H., Engerman, R., Davis, M.D., De_Venecia, G. and Myers, F.L. (1976): Patterns of ischemia in diabetic retinopathy. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* **81**(4 pt 1): OP694-709.
- Brett, J., Schmidt, A.M., Yan, S.D., Zou, Y.S., Weidman, E., Pinsky, D., Nowygrod, R., Neeper, M., Przysiecki, C. and Shaw, A. (1993): Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. *Am J Pathol* **143**(6): 1699-1712.
- Brinkmann-Frye, E., Degenhardt, T.P., Thorpe, S.R. and Baynes, J.W. (1998): Role of the maillard reaction in aging of tissue proteins. Advanced glycation end product-dependent increase in imidazolium cross-links in human lens proteins. *J Biol Chem* **273**(30): 18714-18719.
- Brooks, P.C., Silletti, S., Von_Schalscha, T.L., Friedlander, M. and Cheresch, D.A. (1998): Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity. *Cell* **92**(3): 391-400.
- Brownlee, M. (1994): Lilly Lecture 1993. Glycation and diabetic complications. *Diabetes* **43**(6): 836-841.

- Brownlee, M. (2001): Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* **414**(6865): 813-820.
- Brownlee, M., Cerami, A. and Vlassara, H. (1988): Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med* **318**(20): 1315-1321.
- Brownlee, M., Vlassara, H., Kooney, A., Ulrich, P. and Cerami, A. (1986): Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. *Science* **232**(4758): 1629-1632.
- Bucala, R., Makita, Z., Vega, G., Grundy, S., Koschinsky, T., Cerami, A. and Vlassara, H. (1994): Modification of low density lipoprotein by advanced glycation end products contributes to the dyslipidemia of diabetes and renal insufficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**(20): 9441-9445.
- Bucala, R., Model, P. and Cerami, A. (1984): Modification of DNA by reducing sugars: a possible mechanism for nucleic acid aging and age-related dysfunction in gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**(1): 105-109.
- Buetow, B.S., Crosby, J.R., Kaminski, W.E., Ramachandran, R.K., Lindahl, P., Martin, P., Betsholtz, C., Seifert, R.A., Raines, E.W. and Bowen_Pope, D.F. (2001): Platelet-derived growth factor B-chain of hematopoietic origin is not necessary for granulation tissue formation and its absence enhances vascularization. *Am J Pathol* **159**(5): 1869-1876.
- Bunn, H.F. and Higgins, P.J. (1981): Reaction of monosaccharides with proteins: possible evolutionary significance. *Science* **213**(4504): 222-224.
- Burrows, J.L. and Coppin, F.G. (1990): Determination of tenilsetam in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* **529**(2): 486-493.
- Bursell, S.E., Clermont, A.C., Aiello, L.P., Aiello, L.M., Schlossman, D.K., Feener, E.P., Laffel, L. and King, G.L. (1999): High-dose vitamin E supplementation normalizes retinal blood flow and creatinine clearance in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* **22**(8): 1245-1251.
- Bursell, S.E., Clermont, A.C., Kinsley, B.T., Simonson, D.C., Aiello, L.M. and Wolpert, H.A. (1996): Retinal blood flow changes in patients with insulin-dependent diabetes mellitus and no diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **37**(5): 886-897.
- Bursell, S.E., Takagi, C., Clermont, A.C., Takagi, H., Mori, F., Ishii, H. and King, G.L. (1997): Specific retinal diacylglycerol and protein kinase C beta isoform modulation mimics abnormal retinal hemodynamics in diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **38**(13): 2711-2720.
- Carlos, T.M. and Harlan, J.M. (1994): Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* **84**(7): 2068-2101.

- Carmeliet, P. (2000a): Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* **6**(3): 389-395.
- Carmeliet, P. (2000b): One cell, two fates. *Nature* **408**: 43-45.
- Carmeliet, P. (2003): Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* **9**(6): 653-660.
- Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenshtein, M., Fahrig, M., Vandenhoek, A., Harpal, K., Eberhardt, C., Declercq, C., Pawling, J., Moons, L., Collen, D., Risau, W. and Nagy, A. (1996): Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* **380**(6573): 435-439.
- Castellon, R., Hamdi, H.K., Sacerio, I., Aoki, A.M., Kenney, M.C. and Ljubimov, A.V. (2002): Effects of angiogenic growth factor combinations on retinal endothelial cells. *Exp Eye Res* **74**(4): 523-535.
- Ceriello, A. (2003): New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a "Causal" antioxidant therapy. *Diabetes Care* **26**(5): 1589-1596.
- Chan_Ling, T., Gock, B. and Stone, J. (1995): The effect of oxygen on vasoformative cell division. Evidence that 'physiological hypoxia' is the stimulus for normal retinal vasculogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **36**(7): 1201-1214.
- Chang, H., Wang, B.W., Kuan, P. and Shyu, K.G. (2003): Cyclical mechanical stretch enhances angiopoietin-2 and Tie2 receptor expression in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Clin Sci (Lond)* **104**(4): 421-428.
- Chappey, O., Wautier, M.P., Boval, B. and Wautier, J.L. (1996): Endothelial cells in culture: an experimental model for the study of vascular dysfunctions. *Cell Biol Toxicol* **12**(4-6): 199-205.
- Chavakis, E. and Dimmeler, S. (2002): Regulation of endothelial cell survival and apoptosis during angiogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology (Online)* **22**(6): 887-893.
- Cheng, N., Brantley, D.M. and Chen, J. (2002): The ephrins and Eph receptors in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* **13**(1): 75-85.
- Chew, E.Y., Klein, M.L., Ferris, F.L., Remaley, N.A., Murphy, R.P., Chantry, K., Hoogwerf, B.J. and Miller, D. (1996): Association of elevated serum lipid levels with retinal hard exudate in diabetic retinopathy. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS) Report 22. *Arch Ophthalmol* **114**(9): 1079-1084.
- Chibber, R., Molinatti, P.A. and Kohner, E.M. (1999): Intracellular protein glycation in cultured retinal capillary pericytes and endothelial cells exposed to high-glucose concentration. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **45**(1): 47-57.
- Chibber, R., Molinatti, P.A., Rosatto, N., Lambourne, B. and Kohner, E.M. (1997): Toxic action of advanced glycation end products on cultured retinal capillary pericytes

- and endothelial cells: relevance to diabetic retinopathy. *Diabetologia* **40**(2): 156-164.
- Cho, H., Kozasa, T., Bondjers, C., Betsholtz, C. and Kehrl, J.H. (2003): Pericyte-specific expression of Rgs5: implications for PDGF and EDG receptor signaling during vascular maturation. *FASEB J* **17**(3): 440-442.
- Cogan, D.G., Toussaint, D. and Kuwabara, T. (1961): Retinal vascular pattern. IV. Diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* **66**: 366-378.
- Colaco, C.A., Ledesma, M.D., Harrington, C.R. and Avila, J. (1996): The role of the Maillard reaction in other pathologies: Alzheimer's disease. *Nephrology, Dialysis, Transplantation : Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* **11 Suppl 5**: 7-12.
- Connolly, S.E., Hores, T.A., Smith, L.E.H. and D'amore, P.A. (1988): Characterization of vascular development in mouse retina. *Microvasc Res* **36**: 275-290.
- Cook, D.L. and Hales, C.N. (1984): Intracellular ATP directly blocks K⁺ channels in pancreatic B-cells. *Nature* **311**(5983): 271-273.
- Corbett, J.A., Tilton, R.G., Chang, K., Hasan, K.S., Ido, Y., Wang, J.L., Sweetland, M.A., Lancaster, J.R., Williamson, J.R. and Mcdaniel, M.L. (1992): Aminoguanidine, a novel inhibitor of nitric oxide formation, prevents diabetic vascular dysfunction. *Diabetes* **41**(4): 552-556.
- Courtoy, P.J. and Boyles, J. (1983): Fibronectin in the microvasculature: localization in the pericyte-endothelial interstitium. *J Ultrastruct Res* **83**(3): 258-273.
- Craven, P.A., Derubertis, F.R., Kagan, V.E., Melhem, M. and Studer, R.K. (1997): Effects of supplementation with vitamin C or E on albuminuria, glomerular TGF-beta, and glomerular size in diabetes. *J Am Soc Nephrol* **8**(9): 1405-1414.
- Cunha_Vaz, J.G. (1976): The blood-retinal barriers. *Doc Ophthalmol* **41**(2): 287-327.
- Cunningham, J.J. (1998): Micronutrients as nutraceutical interventions in diabetes mellitus. *J Am Coll Nutr* **17**(1): 7-10.
- D_Amore, P.A. and Smith, S.R. (1993): Growth factor effects on cells of the vascular wall: a survey. *Growth Factors* **8**(1): 61-75.
- Danis, R.P., Bingaman, D.P., Jirousek, M. and Yang, Y. (1998): Inhibition of intraocular neovascularization caused by retinal ischemia in pigs by PKCbeta inhibition with LY333531. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **39**(1): 171-179.
- 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. and Yancopoulos, G.D. (1996): Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* **87**(7): 1161-1169.

- Dcct (1993): The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N Engl J Med* **329**(14): 977-986.
- Dedhar, S. (1999): Integrins and signal transduction. *Curr Opin Hematol* **6**(1): 37-43.
- DeFronzo, R.A. (1988): Lilly lecture 1987. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes* **37**(6): 667-687.
- Denis, U., Lecomte, M., Paget, C., Ruggiero, D., Wiernsperger, N. and Lagarde, M. (2002): Advanced glycation end-products induce apoptosis of bovine retinal pericytes in culture: involvement of diacylglycerol/ceramide production and oxidative stress induction. *Free Radic Biol Med* **33**(2): 236-247.
- Denofrio, D., Hoock, T.C. and Herman, I.M. (1989): Functional sorting of actin isoforms in microvascular pericytes. *J Cell Biol* **109**(1): 191-202.
- Diaz_Flores, L., Gutierrez, R., Varela, H., Rancel, N. and Valladares, F. (1991): Microvascular pericytes: a review of their morphological and functional characteristics. *Histol Histopathol* **6**(2): 269-286.
- Dorrell, M.I., Aguilar, E. and 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): 3500-3510.
- Drake, C.J., Hungerford, J.E. and Little, C.D. (1998): Morphogenesis of the first blood vessels. *Ann N Y Acad Sci* **857**: 155-179.
- Drixler, T.A., Rinkes, I.H., Ritchie, E.D., Treffers, F.W., Van_Vroonhoven, T.J., Gebbink, M.F. and Voest, E.E. (2001): Angiostatin inhibits pathological but not physiological retinal angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**(13): 3325-3330.
- Drs, T. (1987): Indications for photocoagulation treatment of diabetic retinopathy: Diabetic Retinopathy Study Report no. 14. The Diabetic Retinopathy Study Research Group. *Int Ophthalmol Clin* **27**(4): 239-253.
- Drvs (1990): Early vitrectomy for severe vitreous hemorrhage in diabetic retinopathy. Four-year results of a randomized trial: Diabetic Retinopathy Vitrectomy Study Report 5. *Arch Ophthalmol* **108**(7): 958-964.
- Du, X.L., Edelstein, D., Rossetti, L., Fantus, I.G., Goldberg, H., Ziyadeh, F., Wu, J. and Brownlee, M. (2000): Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**(22): 12222-12226.
- Du, Y., Smith, M.A., Miller, C.M. and Kern, T.S. (2002): Diabetes-induced nitrate stress in the retina, and correction by aminoguanidine. *J Neurochem* **80**(5): 771-779.

- Dumont, D.J., Gradwohl, G., Fong, G.H., Puri, M.C., Gertsenstein, M., Auerbach, A. and Breitman, M.L. (1994): Dominant-negative and targeted null mutations in the endothelial receptor tyrosine kinase, tek, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo. *Genes Dev* **8**(16): 1897-1909.
- Edelstein, D. and Brownlee, M. (1992): Mechanistic studies of advanced glycosylation endproduct inhibition by aminoguanidine. *Diabetes* **41**: 26-29.
- Ellis, E.A., Grant, M.B., Murray, F.T., Wachowski, M.B., Guberski, D.L., Kubilis, P.S. and Luty, G.A. (1998): Increased NADH oxidase activity in the retina of the BBZ/Wor diabetic rat. *Free Radic Biol Med* **24**(1): 111-120.
- Eming, S.A., Yarmush, M.L., Krueger, G.G. and Morgan, J.R. (1999): Regulation of the spatial organization of mesenchymal connective tissue: effects of cell-associated versus released isoforms of platelet-derived growth factor. *Am J Pathol* **154**(1): 281-289.
- Enge, M., Bjarnegard, M., Gerhardt, H., Gustafsson, E., Kalen, M., Asker, N., Hammes, H.P., Shani, M., Fassler, R. and Betsholtz, C. (2002): Endothelium-specific platelet-derived growth factor-B ablation mimics diabetic retinopathy. *EMBO J* **21**(16): 4307-4316.
- Enge, M., Wilhelmsson, U., Abramsson, A., Stakeberg, J., Kuhn, R., Betsholtz, C. and Pekny, M. (2003): Neuron-specific ablation of PDGF-B is compatible with normal central nervous system development and astroglial response to injury. *Neurochem Res* **28**(2): 271-279.
- Engerman, R.L. (1976): Animal models of diabetic retinopathy. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* **81**(4 pt 1): OP710-715.
- Engerman, R.L., Pfaffenbach, D. and Davis, M.D. (1967): Cell turnover of capillaries. *Lab Invest* **17**(6): 738-743.
- Etdrs (1991): Early photocoagulation for diabetic retinopathy. ETDRS report number 9. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. *Ophthalmology* **98**(5 Suppl): 766-785.
- Ferrara, N. and Alitalo, K. (1999): Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat Med* **5**(12): 1359-1364.
- Ferrara, N., Carver_Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O_Shea, K.S., Powell_Braxton, L., Hillan, K.J. and Moore, M.W. (1996): Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* **380**(6573): 439-442.
- Ferrara, N. and Davis_Smyth, T. (1997): The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* **18**(1): 4-25.
- Ferris, F.L. (1993): Diabetic retinopathy. *Diabetes Care* **16**(1): 322-325.

- Fiedler, U., Krissl, T., Koidl, S., Weiss, C., Koblizek, T., Deutsch, U., Martiny_Baron, G., Marme, D. and Augustin, H.G. (2003): Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 share the same binding domains in the Tie-2 receptor involving the first Ig-like loop and the epidermal growth factor-like repeats. *J Biol Chem* **278**(3): 1721-1727.
- Folkman, J. (2002): Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* **29**(6 Suppl 16): 15-18.
- Folkman, J. and Ingber, D. (1992): Inhibition of angiogenesis. *Semin Cancer Biol* **3**(2): 89-96.
- Folkman, J., Langer, R., Linhardt, R.J., Haudenschild, C. and Taylor, S. (1983): Angiogenesis inhibition and tumor regression caused by heparin or a heparin fragment in the presence of cortisone. *Science* **221**(4612): 719-725.
- Fong, G.H., Rossant, J., Gertsenstein, M. and Breitman, M.L. (1995): Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* **376**(6535): 66-70.
- Freedman, B.I., Wuerth, J.P., Cartwright, K., Bain, R.P., Dippe, S., Hershon, K., Mooradian, A.D. and Spinowitz, B.S. (1999): Design and baseline characteristics for the aminoguanidine Clinical Trial in Overt Type 2 Diabetic Nephropathy (ACTION II). *Control Clin Trials* **20**(5): 493-510.
- Fruttiger, M. (2002): Development of the mouse retinal vasculature: angiogenesis versus vasculogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**(2): 522-527.
- Fruttiger, M., Calver, A.R., Kruger, W.H., Mudhar, H.S., Michalovich, D., Takakura, N., Nishikawa, S. and Richardson, W.D. (1996): PDGF mediates a neuron-astrocyte interaction in the developing retina. *Neuron* **17**(6): 1117-1131.
- Fu, M.X., Wells_Knecht, K.J., Blackledge, J.A., Lyons, T.J., Thorpe, S.R. and Baynes, J.W. (1994): Glycation, glycooxidation, and cross-linking of collagen by glucose. Kinetics, mechanisms, and inhibition of late stages of the Maillard reaction. *Diabetes* **43**(5): 676-683.
- Gabbay, K.H. (1975): Hyperglycemia, polyol metabolism, and complications of diabetes mellitus. *Annual Review of Medicine* **26**: 521-536.
- Gale, N.W., Baluk, P., Pan, L., Kwan, M., Holash, J., Dechiara, T.M., McDonald, D.M. and Yancopoulos, G.D. (2001): Ephrin-B2 selectively marks arterial vessels and neovascularization sites in the adult, with expression in both endothelial and smooth-muscle cells. *Dev Biol* **230**(2): 151-160.
- 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. and Yancopoulos, G.D. (2002): Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by Angiopoietin-1. *Dev Cell* **3**(3): 411-423.

- Gamble, J.R., Drew, J., Trezise, L., Underwood, A., Parsons, M., Kasminkas, L., Rudge, J., Yancopoulos, G. and Vadas, M.A. (2000): Angiopoietin-1 is an antipermeability and anti-inflammatory agent in vitro and targets cell junctions. *Circ Res* **87**(7): 603-607.
- Gardiner, T.A., Anderson, H.R. and Stitt, A.W. (2003): Inhibition of advanced glycation end-products protects against retinal capillary basement membrane expansion during long-term diabetes. *J Pathol* **201**(2): 328-333.
- Gariano, R.F., Iruela_Arispe, M.L. and Hendrickson, A.E. (1994): Vascular development in primate retina: comparison of laminar plexus formation in monkey and human. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **35**(9): 3442-3455.
- Gariano, R.F., Sage, E.H., Kaplan, H.J. and Hendrickson, A.E. (1996): Development of astrocytes and their relation to blood vessels in fetal monkey retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **37**(12): 2367-2375.
- Gasic_Milenkovic, J., Loske, C., Deuther_Conrad, W. and Munch, G. (2001): Protein "AGEing"--cytotoxicity of a glycated protein increases with its degree of AGE-modification. *Z Gerontol Geriatr* **34**(6): 457-460.
- Gauthier, L.R. and Robbins, S.M. (2003): Ephrin signaling: One raft to rule them all? One raft to sort them? One raft to spread their call and in signaling bind them? *Life Sciences* **74**(2-3): 207-216.
- Gearing, A.J. and Newman, W. (1993): Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol Today* **14**(10): 506-512.
- Geiger, M., Stone, A., Mason, S.N., Oldham, K.T. and Guice, K.S. (1997): Differential nitric oxide production by microvascular and macrovascular endothelial cells. *The American Journal of Physiology* **273**(1 Pt 1): L275-281.
- Gerety, S.S. and Anderson, D.J. (2002): Cardiovascular ephrinB2 function is essential for embryonic angiogenesis. *Development (Cambridge, England)* **129**(6): 1397-1410.
- Gerety, S.S., Wang, H.U., Chen, Z.F. and Anderson, D.J. (1999): Symmetrical mutant phenotypes of the receptor EphB4 and its specific transmembrane ligand ephrin-B2 in cardiovascular development. *Molecular Cell* **4**(3): 403-414.
- Gerhardt, H. and Betsholtz, C. (2003): Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res* **314**(1): 15-23.
- Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., Abramsson, A., Jeltsch, M., Mitchell, C., Alitalo, K., Shima, D. and Betsholtz, C. (2003): VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol* **161**(6): 1163-1177.
- Ghosh, P.K., Vasanthi, A., Murugesan, G., Eppell, S.J., Graham, L.M. and Fox, P.L. (2002): Membrane microviscosity regulates endothelial cell motility. *Nat Cell Biol* **4**(11): 894-900.

- Giardino, I., Edelstein, D. and Brownlee, M. (1994): Nonenzymatic glycosylation in vitro and in bovine endothelial cells alters basic fibroblast growth factor activity: a model for intracellular glycosylation in diabetes. *J Clin Invest* **94**: 110-117.
- Giardino, I., Fard, A.K., Hatchell, D.L. and Brownlee, M. (1998): Aminoguanidine inhibits reactive oxygen species formation, lipid peroxidation, and oxidant-induced apoptosis. *Diabetes* **47**: 1114-1120.
- Grosskreutz, C.L., Anand_Apte, B., Duplaa, C., Quinn, T.P., Terman, B.I., Zetter, B. and D_Amore, P.A. (1999): Vascular endothelial growth factor-induced migration of vascular smooth muscle cells in vitro. *Microvasc Res* **58**(2): 128-136.
- Gualtieri, F., Manetti, D., Romanelli, M.N. and Ghelardini, C. (2002): Design and study of piracetam-like nootropics, controversial members of the problematic class of cognition-enhancing drugs. *Curr Pharm Des* **8**(2): 125-138.
- Gupta, S., Chough, E., Daley, J., Oates, P., Tornheim, K., Ruderman, N.B. and Keaney, J.F. (2002): Hyperglycemia increases endothelial superoxide that impairs smooth muscle cell Na⁺-K⁺-ATPase activity. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* **282**(3): C560-566.
- Hackett, S.F., Ozaki, H., Strauss, R.W., Wahlin, K., Suri, C., Maisonpierre, P., Yancopoulos, G. and Campochiaro, P.A. (2000): Angiopoietin 2 expression in the retina: upregulation during physiologic and pathologic neovascularization. *J Cell Physiol* **184**(3): 275-284.
- Hackett, S.F., Wiegand, S., Yancopoulos, G. and Campochiaro, P.A. (2002): Angiopoietin-2 plays an important role in retinal angiogenesis. *J Cell Physiol* **192**(2): 182-187.
- Hamada, Y., Araki, N., Horiuchi, S. and Hotta, N. (1996): Role of polyol pathway in nonenzymatic glycation. *Nephrology, Dialysis, Transplantation : Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* **11 Suppl 5**: 95-98.
- Hammes, H.P., Ali, S.S., Uhlmann, M., Weiss, A., Federlin, K., Geisen, K. and Brownlee, M. (1995a): Aminoguanidine does not inhibit the initial phase of experimental diabetic retinopathy in rats. *Diabetologia* **38**: 269-273.
- Hammes, H.P., Bartmann, A., Engel, L. and Wülfroth, P. (1997): Antioxidant treatment of experimental diabetic retinopathy in rats with nicanartine. *Diabetologia* **40**: 629-634.
- Hammes, H.-P., Bertram, B., Bornfeld, N., Gandjour, A., Parandeh-Shab, F., Danne, D., Kroll, P., Lemmen, K.D. and Look, D. (2000): Diagnostik, Therapie und Verlaufskontrolle der diabetischen Retinopathie und Makulopathie. *Leitlinien der Deutschen Diabetes-Gesellschaft*.
- Hammes, H.P., Du, X., Edelstein, D., Taguchi, T., Matsumura, T., Ju, Q., Lin, J., Bierhaus, A., Nawroth, P., Hannak, D., Neumaier, M., Bergfeld, R., Giardino, I. and Brownlee, M. (2003): Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy. *Nat Med* **9**(3): 294-299.

- Hammes, H.P., Lin, J., Renner, O., Shani, M., Lundqvist, A., Betsholtz, C., Brownlee, M. and Deutsch, U. (2002): Pericytes and the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetes* **51**(10): 3107-3112.
- Hammes, H.P., Lin, J., Wagner, P., Feng, Y., Vom_Hagen, F., Krzizok, T., Renner, O., Breier, G., Brownlee, M. and Deutsch, U. (2004): Angiopoietin-2 causes pericyte dropout in the normal retina: evidence for involvement in diabetic retinopathy. *Diabetes* **53**(4): 1104-1110.
- Hammes, H.P., Martin, S., Federlin, K., Geisen, K. and Brownlee, A. (1991): Aminoguanidine treatment inhibits the development of experimental diabetic retinopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 11555-11558.
- Hammes, H.P., Strödter, D., Weiss, A., Bretzel, R.G., Federlin, K. and Brownlee, M. (1995b): Secondary intervention with aminoguanidine retards the progression of diabetic retinopathy in the rat model. *Diabetologia* **38**: 656-660.
- Harfouche, R., Hassessian, H.M., Guo, Y., Faivre, V., Srikant, C.B., Yancopoulos, G.D. and Hussain, S.N. (2002): Mechanisms which mediate the antiapoptotic effects of angiopoietin-1 on endothelial cells. *Microvasc Res* **64**(1): 135-147.
- Harik, S.I., Kalaria, R.N., Andersson, L., Lundahl, P. and Perry, G. (1990): Immunocytochemical localization of the erythroid glucose transporter: abundance in tissues with barrier functions. *J Neurosci* **10**(12): 3862-3872.
- Hart, C.E., Forstrom, J.W., Kelly, J.D., Seifert, R.A., Smith, R.A., Ross, R., Murray, M.J. and Bowen_Pope, D.F. (1988): Two classes of PDGF receptor recognize different isoforms of PDGF. *Science* **240**(4858): 1529-1531.
- Hayes, A.J., Huang, W.Q., Mallah, J., Yang, D., Lippman, M.E. and Li, L.Y. (1999): Angiopoietin-1 and its receptor Tie-2 participate in the regulation of capillary-like tubule formation and survival of endothelial cells. *Microvasc Res* **58**(3): 224-237.
- Heimark, R.L. (1993): Cell-cell adhesion molecules of the blood-brain barrier. *The Blood-Brain Barrier, Cellular and Molecular Biology*. Partridge, Wm. New York, Raven Press: 87-106.
- Helbig, H., Kellner, U., Bornfeld, N. and Foerster, M.H. (1998): [Vitreotomy in diabetic retinopathy: outcome, risk factors, complications]. *Klin Monatsbl Augenheilkd* **212**(5): 339-342.
- Hellström, M., Gerhardt, H., Kalen, M., Li, X., Eriksson, U., Wolburg, H. and Betsholtz, C. (2001): Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J Cell Biol* **153**(3): 543-553.
- Hellström, M., Kal_N, M., Lindahl, P., Abramsson, A. and Betsholtz, C. (1999): Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development (Cambridge, England)* **126**(14): 3047-3055.

- Herman, I.M. (1993): Microvascular pericytes in development and disease. *The Blood-Brain Barrier, Cellular and Molecular Biology*. Partridge, Wm. New York, Raven Press: 127-135.
- Hesse, L., Heller, G., Kraushaar, N., Wesp, A., Schroeder, B. and Kroll, P. (2002): [The predictive value of a classification for proliferative diabetic vitreoretinopathy]. *Klin Monatsbl Augenheilkd* **219**(1-2): 46-49.
- Hipkiss, A.R., Michaelis, J. and Syrris, P. (1995): Non-enzymatic glycosylation of the dipeptide L-carnosine, a potential anti-protein-cross-linking agent. *FEBS Lett* **371**(1): 81-85.
- Hirschi, K.K. and D'amore, P.A. (1996): Pericytes in the microvasculature. *Cardiovasc Res* **32**: 687-698.
- Hirschi, K.K., Rohovsky, S.A., Beck, L.H., Smith, S.R. and D_Amore, P.A. (1999): Endothelial cells modulate the proliferation of mural cell precursors via platelet-derived growth factor-BB and heterotypic cell contact. *Circ Res* **84**(3): 298-305.
- Hirschi, K.K., Rohovsky, S.A. and D_Amore, P.A. (1998): PDGF, TGF-beta, and heterotypic cell-cell interactions mediate endothelial cell-induced recruitment of 10T1/2 cells and their differentiation to a smooth muscle fate. *J Cell Biol* **141**(3): 805-814.
- Hoehn, B.D., Harik, S.I. and Hudetz, A.G. (2002): VEGF mRNA expressed in microvessels of neonatal and adult rat cerebral cortex. *Brain Research. Molecular Brain Research* **101**(1-2): 103-108.
- Hoffmann, J., Feng, Y., Vom_Hagen, F., Hillenbrand, A., Lin, J., Erber, R., Vaikoczy, P., Wolburg, H., Shani, M., Preissner, K.T., Hoffmann, S., Deutsch, U. and Hammes, H.-P. (2004): Endothelial survival factors, but not pericyte coverage of retinal capillaries determine responsiveness to vasoregression in the retina. *FASEB J (eingereicht)*.
- Holash, J., Maisonpierre, P.C., Compton, D., Boland, P., Alexander, C.R., Zagzag, D., Yancopoulos, G.D. and Wiegand, S.J. (1999): Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* **284**(5422): 1994-1998.
- Hori, S., Ohtsuki, S., Hosoya, K., Nakashima, E. and Terasaki, T. (2004): A pericyte-derived angiopoietin-1 multimeric complex induces occludin gene expression in brain capillary endothelial cells through Tie-2 activation in vitro. *J Neurochem* **89**(2): 503-513.
- Horiuchi, K., Weskamp, G., Lum, L., Hammes, H.P., Cai, H., Brodie, T.A., Ludwig, T., Chiusaroli, R., Baron, R., Preissner, K.T., Manova, K. and Blobel, C.P. (2003): Potential role for ADAM15 in pathological neovascularization in mice. *Mol Cell Biol* **23**(16): 5614-5624.
- Horiuchi, S. and Araki, N. (1994): Advanced glycation end products of the Maillard reaction and their relation to aging. *Gerontology Suppl* **2**: 10-15.

- Horiuchi, S., Shiga, M., Araki, N., Takata, K., Saitoh, M. and Morino, Y. (1988): Evidence against in vivo presence of 2-(2-furoyl)-4(5)-(2-furanyl)-1H-imidazole, a major fluorescent advanced end product generated by nonenzymatic glycosylation. *J Biol Chem* **263**(35): 18821-18826.
- Hungerford, J.E. and Little, C.D. (1999): Developmental biology of the vascular smooth muscle cell: building a multilayered vessel wall. *J Vasc Res* **36**(1): 2-27.
- Hunt, J.V., Dean, R.T. and Wolff, S.P. (1988): Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. Glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing. *The Biochemical Journal* **256**(1): 205-212.
- Hynes, R.O. (1992): Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**(1): 11-25.
- Ihl, R. and Kretschmar, C. (1997): [Nootropic drug evaluation for general practice]. *Nervenarzt* **68**(11): 853-861.
- Ihl, R., Perisic, I., Maurer, K. and Dierks, T. (1989): Effect of 3 months treatment with tenilsetam in patients suffering from dementia of Alzheimer type (DAT). *J Neural Transm* **1**: 84-85.
- Inoguchi, T., Battan, R., Handler, E., Sportsman, J.R., Heath, W. and King, G.L. (1992): Preferential elevation of protein kinase C isoform beta II and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats: differential reversibility to glycemic control by islet cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**(22): 11059-11063.
- Ishida, A., Murray, J., Saito, Y., Kanthou, C., Benzakour, O., Shibuya, M. and Wijelath, E.S. (2001): Expression of vascular endothelial growth factor receptors in smooth muscle cells. *J Cell Physiol* **188**(3): 359-368.
- Ishii, H., Jirousek, M.R., Koya, D., Takagi, C., Xia, P., Clermont, A., Bursell, S.E., Kern, T.S., Ballas, L.M., Heath, W.F., Stramm, L.E., Feener, E.P. and King, G.L. (1996): Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC beta inhibitor. *Science* **272**(5262): 728-731.
- Jackson, C.J. and Nguyen, M. (1997): Human microvascular endothelial cells differ from macrovascular endothelial cells in their expression of matrix metalloproteinases. *Int J Biochem Cell Biol* **29**(10): 1167-1177.
- Jaffe, E.A., Nachman, R.L., Becker, C.G. and Minick, C.R. (1973): Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* **52**: 2745-2756.
- Jain, R.K. and Booth, M.F. (2003): What brings pericytes to tumor vessels? *J Clin Invest* **112**(8): 1134-1136.
- Jain, R.K. and Munn, L.L. (2000): Leaky vessels? Call Ang1! *Nat Med* **6**(2): 131-132.

- Jedziniak, J.A., Chylack, L.T., Cheng, H.M., Gillis, M.K., Kalustian, A.A. and Tung, W.H. (1981): The sorbitol pathway in the human lens: aldose reductase and polyol dehydrogenase. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **20**(3): 314-326.
- Jiang, Z., Chung, S.K., Zhou, C., Cammarata, P.R. and Chung, S.S. (2000): Overexpression of Na(+)-dependent myo-inositol transporter gene in mouse lens led to congenital cataract. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**(6): 1467-1472.
- Jirousek, M.R., Gillig, J.R., Gonzalez, C.M., Heath, W.F., McDonald, J.H., Neel, D.A., Rito, C.J., Singh, U., Stramm, L.E., Melikian_Badalian, A., Baevsky, M., Ballas, L.M., Hall, S.E., Winneroski, L.L. and Faul, M.M. (1996): (S)-13-[(dimethylamino)methyl]-10,11,14,15-tetrahydro-4,9:16, 21-dimetheno-1H, 13H-dibenzo[e,k]pyrrolo[3,4-h][1,4,13]oxadiazacyclohexadecene-1,3(2H)-dione (LY333531) and related analogues: isozyme selective inhibitors of protein kinase C beta. *J Med Chem* **39**(14): 2664-2671.
- Joussen, A.M., Poulaki, V., Tsujikawa, A., Qin, W., Qaum, T., Xu, Q., Moromizato, Y., Bursell, S.E., Wiegand, S.J., Rudge, J., Ioffe, E., Yancopoulos, G.D. and Adamis, A.P. (2002): Suppression of diabetic retinopathy with angiopoietin-1. *Am J Pathol* **160**(5): 1683-1693.
- Joyce, N.C., Decamilli, P. and Boyles, J. (1984): Pericytes, like vascular smooth muscle cells, are immunocytochemically positive for cyclic GMP-dependent protein kinase. *Microvasc Res* **28**(2): 206-219.
- Kaiser, N., Sasson, S., Feener, E.P., Boukobza_Vardi, N., Higashi, S., Moller, D.E., Davidheiser, S., Przybylski, R.J. and King, G.L. (1993): Differential regulation of glucose transport and transporters by glucose in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Diabetes* **42**(1): 80-89.
- Kaminski, W.E., Lindahl, P., Lin, N.L., Broudy, V.C., Crosby, J.R., Hellstrom, M., Swolin, B., Bowen_Pope, D.F., Martin, P.J., Ross, R., Betsholtz, C. and Raines, E.W. (2001): Basis of hematopoietic defects in platelet-derived growth factor (PDGF)-B and PDGF beta-receptor null mice. *Blood* **97**(7): 1990-1998.
- Kawamura, H., Oku, H., Li, Q., Sakagami, K. and Puro, D.G. (2002): Endothelin-induced changes in the physiology of retinal pericytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**(3): 882-888.
- Kelley, C., D_Amore, P., Hechtman, H.B. and Shepro, D. (1987): Microvascular pericyte contractility in vitro: comparison with other cells of the vascular wall. *J Cell Biol* **104**(3): 483-490.
- Kelley, C., D_Amore, P., Hechtman, H.B. and Shepro, D. (1988): Vasoactive hormones and cAMP affect pericyte contraction and stress fibres in vitro. *J Muscle Res Cell Motil* **9**(2): 184-194.
- Kern, T.S. and Engerman, R.L. (1995): Vascular lesions in diabetes are distributed non-uniformly within the retina. *Exp Eye Res* **60**: 545-549.

- Kern, T.S. and Engerman, R.L. (2001): Pharmacological inhibition of diabetic retinopathy: aminoguanidine and aspirin. *Diabetes* **50**(7): 1636-1642.
- Kim, I., Kim, H.G., Moon, S.O., Chae, S.W., So, J.N., Koh, K.N., Ahn, B.C. and Koh, G.Y. (2000): Angiopoietin-1 induces endothelial cell sprouting through the activation of focal adhesion kinase and plasmin secretion. *Circ Res* **86**(9): 952-959.
- King, G.L. (1996): The role of hyperglycaemia and hyperinsulinaemia in causing vascular dysfunction in diabetes. *Ann Med* **28**(5): 427-432.
- King, G.L. and Brownlee, M. (1996): The cellular and molecular mechanisms of diabetic complications. *Endocrinol Metab Clin North Am* **25**(2): 255-270.
- Klein, R. (1995): Hyperglycemia and microvascular and macrovascular disease in diabetes. *Diabetes Care* **18**(2): 258-268.
- Klein, R., Klein, B.E., Moss, S.E., Davis, M.D. and Demets, D.L. (1984a): The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. II. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is less than 30 years. *Arch Ophthalmol* **102**(4): 520-526.
- Klein, R., Klein, B.E., Moss, S.E., Davis, M.D. and Demets, D.L. (1984b): The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. III. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is 30 or more years. *Arch Ophthalmol* **102**(4): 527-532.
- Klein, R., Klein, B.E., Moss, S.E., Davis, M.D. and Demets, D.L. (1989): Is blood pressure a predictor of the incidence or progression of diabetic retinopathy? *Arch Intern Med* **149**(11): 2427-2432.
- Knight, R.J., Kofoed, K.F., Schelbert, H.R. and Buxton, D.B. (1996): Inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in post-ischaemic myocardium. *Cardiovasc Res* **32**(6): 1016-1023.
- Koblizek, T.I., Weiss, C., Yancopoulos, G.D., Deutsch, U. and Risau, W. (1998): Angiopoietin-1 induces sprouting angiogenesis in vitro. *Curr Biol* **8**(9): 529-532.
- Koenig, R.J., Blobstein, S.H. and Cerami, A. (1977): Structure of carbohydrate of hemoglobin A1c. *J Biol Chem* **252**(9): 2992-2997.
- Koenig, R.J., Peterson, C.M., Jones, R.L., Saudek, C., Lehrman, M. and Cerami, A. (1976): Correlation of glucose regulation and hemoglobin A1c in diabetes mellitus. *N Engl J Med* **295**(8): 417-420.
- Kohner, E.M., Mcleod, D. and Marshall, J. (1982): Diabetic eye disease. *Complications of diabetes*. Keen, H and J Jarrett. London, Arnold.
- Korff, T., Kimmina, S., Martiny_Baron, G. and Augustin, H.G. (2001): Blood vessel maturation in a 3-dimensional spheroidal coculture model: direct contact with smooth muscle cells regulates endothelial cell quiescence and abrogates VEGF responsiveness. *FASEB J* **15**(2): 447-457.

- Korshunov, S.S., Skulachev, V.P. and Starkov, A.A. (1997): High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett* **416**(1): 15-18.
- Kowaltowski, A.J. and Vercesi, A.E. (1999): Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic Biol Med* **26**(3-4): 463-471.
- Kowluru, R.A., Engerman, R.L. and Kern, T.S. (2000): Abnormalities of retinal metabolism in diabetes or experimental galactosemia VIII. Prevention by aminoguanidine. *Curr Eye Res* **21**(4): 814-819.
- Koya, D., Jirousek, M.R., Lin, Y.W., Ishii, H., Kuboki, K. and King, G.L. (1997): Characterization of protein kinase C beta isoform activation on the gene expression of transforming growth factor-beta, extracellular matrix components, and prostanoids in the glomeruli of diabetic rats. *J Clin Invest* **100**(1): 115-126.
- Koya, D. and King, G.L. (1998): Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes* **47**(6): 859-866.
- Koyama, N., Watanabe, S., Tezuka, M., Morisaki, N., Saito, Y. and Yoshida, S. (1994): Migratory and proliferative effect of platelet-derived growth factor in rabbit retinal endothelial cells: evidence of an autocrine pathway of platelet-derived growth factor. *J Cell Physiol* **158**(1): 1-6.
- Kroll, P., Meyer_Rusenberg, H.W. and Busse, H. (1987): [Recommendation for staging of proliferative diabetic retinopathy]. *Fortschr Ophthalmol* **84**(4): 360-363.
- Kumagai, A.K., Vinoses, S.A. and Pardridge, W.M. (1996): Pathological upregulation of inner blood-retinal barrier Glut1 glucose transporter expression in diabetes mellitus. *Brain Res* **706**(2): 313-317.
- Kumari, K., Umar, S., Bansal, V. and Sahib, M.K. (1991): Inhibition of diabetes-associated complications by nucleophilic compounds. *Diabetes* **40**(8): 1079-1084.
- Kunisaki, M., Bursell, S.E., Clermont, A.C., Ishii, H., Ballas, L.M., Jirousek, M.R., Umeda, F., Nawata, H. and King, G.L. (1995): Vitamin E prevents diabetes-induced abnormal retinal blood flow via the diacylglycerol-protein kinase C pathway. *Am J Physiol* **269**(2 Pt 1): E239-246.
- Kuwabara, T. and Cogan, M. (1960): Studies of retinal vascular pattern. I. Normal architecture. *Arch Ophthalmol* **64**: 904-911.
- Kwak, H.J., Lee, S.J., Lee, Y.H., Ryu, C.H., Koh, K.N., Choi, H.Y. and Koh, G.Y. (2000): Angiopoietin-1 inhibits irradiation- and mannitol-induced apoptosis in endothelial cells. *Circulation* **101**(19): 2317-2324.
- Kwong, L.K. and Sohal, R.S. (1998): Substrate and site specificity of hydrogen peroxide generation in mouse mitochondria. *Arch Biochem Biophys* **350**(1): 118-126.

- Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lang, I., Pabst, M.A., Hiden, U., Blaschitz, A., Dohr, G., Hahn, T. and Desoye, G. (2003): Heterogeneity of microvascular endothelial cells isolated from human term placenta and macrovascular umbilical vein endothelial cells. *Eur J Cell Biol* **82**(4): 163-173.
- Larochelle, W.J., May_Siroff, M., Robbins, K.C. and Aaronson, S.A. (1991): A novel mechanism regulating growth factor association with the cell surface: identification of a PDGF retention domain. *Genes Dev* **5**(7): 1191-1199.
- Larson, R.S. and Springer, T.A. (1990): Structure and function of leukocyte integrins. *Immunol Rev* **114**: 181-217.
- Lee, A.Y. and Chung, S.S. (1999): Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *FASEB J* **13**(1): 23-30.
- Lee, T.S., Hu, K.Q., Chao, T. and King, G.L. (1989a): Characterization of endothelin receptors and effects of endothelin on diacylglycerol and protein kinase C in retinal capillary pericytes. *Diabetes* **38**(12): 1643-1646.
- Lee, T.S., Saltsman, K.A., Ohashi, H. and King, G.L. (1989b): Activation of protein kinase C by elevation of glucose concentration: proposal for a mechanism in the development of diabetic vascular complications. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**(13): 5141-5145.
- Leeson, T.S. (1979): Rat retinal blood vessels. *Can J Ophthalmol* **14**(1): 21-28.
- Leveen, P., Pekny, M., Gebre_Medhin, S., Swolin, B., Larsson, E. and Betsholtz, C. (1994): Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities. *Genes Dev* **8**(16): 1875-1887.
- Li, W., Liu, X., He, Z., Yanoff, M., Jian, B. and Ye, X. (1998): Expression of apoptosis regulatory genes by retinal pericytes after rapid glucose reduction. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **39**(9): 1535-1543.
- Li, W., Liu, X., Yanoff, M., Cohen, S. and Ye, X. (1996): Cultured retinal capillary pericytes die by apoptosis after an abrupt fluctuation from high to low glucose levels: a comparative study with retinal capillary endothelial cells. *Diabetologia* **39**(5): 537-547.
- Li, W., Yanoff, M., Jian, B. and He, Z. (1999): Altered mRNA levels of antioxidant enzymes in pre-apoptotic pericytes from human diabetic retinas. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **45**(1): 59-66.
- Li, W., Yanoff, M., Liu, X. and Ye, X. (1997): Retinal capillary pericyte apoptosis in early human diabetic retinopathy. *Chin Med J (Engl)* **110**(9): 659-663.
- Lindahl, P., Johansson, R.B., Levéen, P. and Betsholtz, C. (1997): Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science* **277**: 242-245.

- Lindsay, J.R., Mckillop, A.M., Mooney, M.H., O_Harte, F.P., Bell, P.M. and Flatt, P.R. (2003): Demonstration of increased concentrations of circulating glycated insulin in human Type 2 diabetes using a novel and specific radioimmunoassay. *Diabetologia* **46**(4): 475-478.
- Lipowsky, H.H., Riedel, D. and Shi, G.S. (1991): In vivo mechanical properties of leukocytes during adhesion to venular endothelium. *Biorheology* **28**(1-2): 53-64.
- Löffler, G. (1997): Endokrine Gewebe II: Die schnelle Stoffwechselregulation. *Biochemie und Pathobiochemie*. Löffler, G and Pe Petrides. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag.
- Lund_Andersen, H. (1979): Transport of glucose from blood to brain. *Physiol Rev* **59**(2): 305-352.
- Lütjen-Drecoll, E. and Rohen, J.W. (1997): *Atlas der Anatomie*. Stuttgart.
- Lutty, G.A., Mcleod, D.S., Merges, C., Diggs, A. and Plouet, J. (1996): Localization of vascular endothelial growth factor in human retina and choroid. *Arch Ophthalmol* **114**(8): 971-977.
- Lynch, J.J., Ferro, T.J., Blumenstock, F.A., Brockenauer, A.M. and Malik, A.B. (1990): Increased endothelial albumin permeability mediated by protein kinase C activation. *J Clin Invest* **85**(6): 1991-1998.
- Maillard, L.C. (1912): Action des acides amines sur les sucres; formation des melanoides par voie methodique. *C R Acad Sci*: 154-166.
- 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. and Yancopoulos, G.D. (1997): Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* **277**(5322): 55-60.
- Makita, Z., Radoff, S., Rayfield, E.J., Yang, Z., Skolnik, E., Delaney, V., Friedman, E.A., Cerami, A. and Vlassara, H. (1991): Advanced glycosylation end products in patients with diabetic nephropathy. *N Engl J Med* **325**(12): 836-842.
- Malone, J.I., Morrison, A.D., Pavan, P.R. and Cuthbertson, D.D. (2001): Diabetes Control and Complications Trial. Prevalence and significance of retinopathy in subjects with type 1 diabetes of less than 5 years' duration screened for the diabetes control and complications trial. *Diabetes Care* **24**(3): 522-526.
- Mamputu, J.C. and Renier, G. (2002): Advanced glycation end products increase, through a protein kinase C-dependent pathway, vascular endothelial growth factor expression in retinal endothelial cells. Inhibitory effect of gliclazide. *J Diabetes Complications* **16**(4): 284-293.
- Mandarino, L.J., Finlayson, J. and Hassell, J.R. (1994): High glucose downregulates glucose transport activity in retinal capillary pericytes but not endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **35**(3): 964-972.

- Mandriota, S.J. and Pepper, M.S. (1998): Regulation of angiopoietin-2 mRNA levels in bovine microvascular endothelial cells by cytokines and hypoxia. *Circ Res* **83**: 852-859.
- Manschot, W.A. and Lee, W.R. (1985): Development of retinal neovascularisation in vascular occlusive disease. *Trans Ophthalmol Soc U K* **104 (Pt 8)**: 880-886.
- Marini, H., Costa, C., Passaniti, M., Esposito, M., Campo, G.M., Ientile, R., Adamo, E.B., Marini, R., Calabresi, P., Altavilla, D., Minutoli, L., Pisani, F. and Squadrito, F. (2004): Levetiracetam protects against kainic acid-induced toxicity. *Life Sciences* **74**(10): 1253-1264.
- Marx, M., Perlmutter, R.A. and Madri, J.A. (1994): Modulation of platelet-derived growth factor receptor expression in microvascular endothelial cells during in vitro angiogenesis. *J Clin Invest* **93**(1): 131-139.
- Masaki, T. (1995): Possible role of endothelin in endothelial regulation of vascular tone. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **35**: 235-255.
- Matsumura, T., Hammes, H.-P., Thornalley, P.J., Edelstein, D. and Brownlee, M. (1999): Hyperglycemia increases Angiopoietin-2 expression in retinal Muller Cells through superoxide-induced overproduction of [alpha]-oxoaldehyde AGE precursors. *Diabetes* **48**(Suppl. 1; 59th Annual scientific sessions of the American Diabetes Association. San Diego, California, USA. June 19-22, 1999.): A419.
- Matsusaka, T. (1975): Tridimensional views of the relationship of pericytes to endothelial cells of capillaries in the human choroid and retina. *J Electron Microsc (Tokyo)* **24**(1): 13-18.
- Mayer_Davis, E.J., Bell, R.A., Reboussin, B.A., Rushing, J., Marshall, J.A. and Hamman, R.F. (1998): Antioxidant nutrient intake and diabetic retinopathy: the San Luis Valley Diabetes Study. *Ophthalmology* **105**(12): 2264-2270.
- Mckenna, D.J., Simpson, D.A., Feeney, S., Gardiner, T.A., Boyle, C., Nelson, J. and Stitt, A.W. (2001): Expression of the 67 kDa laminin receptor (67LR) during retinal development: correlations with angiogenesis. *Exp Eye Res* **73**(1): 81-92.
- Mcleod, D.S., Taomoto, M., Cao, J., Zhu, Z., Witte, L. and Luty, G.A. (2002): Localization of VEGF receptor-2 (KDR/Flk-1) and effects of blocking it in oxygen-induced retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**(2): 474-482.
- Meredith, J., Jr, Fazeli, B. and Schwartz, M. (1993): The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol Biol Cell* **4**(9): 953-961.
- Michaelson, I.C. (1954): *Retinal circulation in man and animals*. Springfield, IL, Thomas.
- Milton, R., Aiello, L., Davis, M., Sheet, M., Arora, V. and Vignati, L. (2003): Initial results of the Protein Kinase C Inhibitor Diabetic Retinopathy Study (PKC-DRS). *Diabetes; Abstract Book: 63rd Scientific Sessions*: 544-P.

- Mingeot_Leclercq, M.P., Lins, L., Bensliman, M., Thomas, A., Van_Bambeke, F., Peuvot, J., Schanck, A. and Brasseur, R. (2003): Piracetam inhibits the lipid-destabilising effect of the amyloid peptide Abeta C-terminal fragment. *Biochim Biophys Acta* **1609**(1): 28-38.
- Misko, T.P., Moore, W.M., Kasten, T.P., Nickols, G.A., Corbett, J.A., Tilton, R.G., Mcdaniel, M.L., Williamson, J.R. and Currie, M.G. (1993): Selective inhibition of the inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine. *Eur J Pharmacol* **233**(1): 119-125.
- Miwa, K., Nakamura, J., Hamada, Y., Naruse, K., Nakashima, E., Kato, K., Kasuya, Y., Yasuda, Y., Kamiya, H. and Hotta, N. (2003): The role of polyol pathway in glucose-induced apoptosis of cultured retinal pericytes. *Diabetes Research and Clinical Practice* **60**(1): 1-9.
- Miyamoto, K., Hiroshiba, N., Tsujikawa, A. and Ogura, Y. (1998): In vivo demonstration of increased leukocyte entrapment in retinal microcirculation of diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **39**(11): 2190-2194.
- Miyamoto, K., Ogura, Y., Kenmochi, S. and Honda, Y. (1997): Role of leukocytes in diabetic microcirculatory disturbances. *Microvasc Res* **54**(1): 43-48.
- Mizutani, M., Kern, T.S. and Lorenzi, M. (1996): Accelerated death of retinal microvascular cells in human and experimental diabetic retinopathy. *J Clin Invest* **97**(12): 2883-2890.
- Monnier, V.M., Kohn, R.R. and Cerami, A. (1984): Accelerated age-related browning of human collagen in diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**(2): 583-587.
- Morigi, M., Angioletti, S., Imberti, B., Donadelli, R., Micheletti, G., Figliuzzi, M., Remuzzi, A., Zoja, C. and Remuzzi, G. (1998): Leukocyte-endothelial interaction is augmented by high glucose concentrations and hyperglycemia in a NF-kB-dependent fashion. *J Clin Invest* **101**(9): 1905-1915.
- Mueckler, M. (1994): Facilitative glucose transporters. *Eur J Biochem* **219**(3): 713-725.
- Muller, W.E., Eckert, G.P. and Eckert, A. (1999): Piracetam: novelty in a unique mode of action. *Pharmacopsychiatry* **32 Suppl 1**: 2-9.
- Münch, G., Mayer, S., Michaelis, J., Hipkiss, A.R., Riederer, P., Muller, R., Neumann, A., Schinzel, R. and Cunningham, A.M. (1997a): Influence of advanced glycation end-products and AGE-inhibitors of nucleation-dependent polymerization of beta-amyloid peptide. *Biochim Biophys Acta* **1360**(1): 17-29.
- Münch, G., Mayer, S., Michaelis, J., Hipkiss, A.R., Riederer, P., Muller, R., Neumann, A., Schinzel, R. and Cunningham, A.M. (1997b): Influence of advanced glycation end-products and AGE-inhibitors on nucleation-dependent polymerization of beta-amyloid peptide. *Biochim Biophys Acta* **1360**(1): 17-29.
- Münch, G., Shepherd, C.E., Mccann, H., Brooks, W.S., Kwok, J.B., Arendt, T., Hallupp, M., Schofield, P.R., Martins, R.N. and Halliday, G.M. (2002): Intraneuronal

- advanced glycation endproducts in presenilin-1 Alzheimer's disease. *Neuroreport* **13**(5): 601-604.
- Münch, G., Taneli, Y., Schraven, E., Schindler, U., Schinzel, R., Palm, D. and Riederer, P. (1994): The cognition-enhancing drug tenilsetam is an inhibitor of protein crosslinking by advanced glycosylation. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect* **8**(3): 193-208.
- Münch, G., Thome, J., Foley, P., Schinzel, R. and Riederer, P. (1997c): Advanced glycation endproducts in ageing and Alzheimer's disease. *Brain Research Reviews* **23**: 134-143.
- Mylari, B.L., Armento, S.J., Beebe, D.A., Conn, E.L., Coutcher, J.B., Dina, M.S., O Gorman, M.T., Linhares, M.C., Martin, W.H., Oates, P.J., Tess, D.A., Withbroe, G.J. and Zembrowski, W.J. (2003): A highly selective, non-hydantoin, non-carboxylic acid inhibitor of aldose reductase with potent oral activity in diabetic rat models: 6-(5-chloro-3-methylbenzofuran- 2-sulfonyl)-2-H-pyridazin-3-one. *J Med Chem* **46**(12): 2283-2286.
- Nagpala, P.G., Malik, A.B., Vuong, P.T. and Lum, H. (1996): Protein kinase C beta 1 overexpression augments phorbol ester-induced increase in endothelial permeability. *J Cell Physiol* **166**(2): 249-255.
- Naruse, K. and King, G.L. (2000): Protein kinase C and myocardial biology and function. *Circ Res* **86**(11): 1104-1106.
- Nawroth, P.P., Bierhaus, A., Vogel, G.E., Hofmann, M.A., Zumbach, M., Wahl, P. and Ziegler, R. (1999): Nichtenzymatische Glykierung und oxidativer Streß bei chronischen Erkrankungen und Diabetes mellitus. *Medizinische Klinik* **94**: 29-38.
- Nehls, V., Denzer, K. and Drenckhahn, D. (1992): Pericyte involvement in capillary sprouting during angiogenesis in situ. *Cell Tissue Res* **270**(3): 469-474.
- Nehls, V. and Drenckhahn, D. (1991): Heterogeneity of microvascular pericytes for smooth muscle type alpha-actin. *J Cell Biol* **113**(1): 147-154.
- Nehls, V. and Drenckhahn, D. (1993): The versatility of microvascular pericytes: from mesenchyme to smooth muscle? *Histochemistry* **99**(1): 1-12.
- Nehls, V. and Drenckhahn, D. (1995a): A microcarrier-based cocultivation system for the investigation of factors and cells involved in angiogenesis in three-dimensional fibrin matrices in vitro. *Histochem Cell Biol* **104**(6): 459-466.
- Nehls, V. and Drenckhahn, D. (1995b): A novel, microcarrier-based in vitro assay for rapid and reliable quantification of three-dimensional cell migration and angiogenesis. *Microvasc Res* **50**(3): 311-322.
- Nishikawa, T., Edelstein, D. and Brownlee, M. (2000a): The missing link: a single unifying mechanism for diabetic complications. *Kidney Int Suppl* **77**: S26-30.

- Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X.L., Yamagishi, S., Matsumura, T., Kaneda, Y., Yorek, M.A., Beebe, D., Oates, P.J., Hammes, H.P., Giardino, I. and Brownlee, M. (2000b): Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* **404**(6779): 787-790.
- Nishishita, T. and Lin, P.C. (2004): Angiopoietin 1, PDGF-B, and TGF-beta gene regulation in endothelial cell and smooth muscle cell interaction. *J Cell Biochem* **91**(3): 584-593.
- Niu, X.L., Peters, K.G. and Kontos, C.D. (2002): Deletion of the Carboxyl Terminus of Tie2 Enhances Kinase Activity, Signaling, and Function. EVIDENCE FOR AN AUTOINHIBITORY MECHANISM. *J Biol Chem* **277**(35): 31768-31773.
- Niwa, T. (1999): 3-Deoxyglucosone: metabolism, analysis, biological activity, and clinical implication. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **731**(1): 23-36.
- Nozaki, M., Ogura, Y., Hirabayashi, Y., Saishin, Y. and Shimada, S. (2001): Enhanced expression of adhesion molecules of the retinal vascular endothelium in spontaneous diabetic rats. *Ophthalmic Res* **34**(3): 158-164.
- O'Reilly, M.S., Holmgren, L., Chen, C. and Folkman, J. (1996): Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nat Med* **2**(6): 689-692.
- Oates, P.J. and Mylari, B.L. (1999): Aldose reductase inhibitors: therapeutic implications for diabetic complications. *Exp Opin Invest Drugs* **8**: 1-25.
- Obrosova, I.G., Fathallah, L. and Lang, H.J. (1999): Interaction between osmotic and oxidative stress in diabetic precataractous lens: studies with a sorbitol dehydrogenase inhibitor. *Biochem Pharmacol* **58**(12): 1945-1954.
- Obrosova, I.G., Minchenko, A.G., Vasupuram, R., White, L., Abatan, O.I., Kumagai, A.K., Frank, R.N. and Stevens, M.J. (2003): Aldose reductase inhibitor fidarestat prevents retinal oxidative stress and vascular endothelial growth factor overexpression in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetes* **52**(3): 864-871.
- Oh, H., Takagi, H., Suzuma, K., Otani, A., Matsumura, M. and Honda, Y. (1999): Hypoxia and vascular endothelial growth factor selectively up-regulate angiopoietin-2 in bovine microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* **274**(22): 15732-15739.
- Oike, Y., Ito, Y., Hamada, K., Zhang, X.Q., Miyata, K., Arai, F., Inada, T., Araki, K., Nakagata, N., Takeya, M., Kisanuki, Y.Y., Yanagisawa, M., Gale, N.W. and Suda, T. (2002): Regulation of vasculogenesis and angiogenesis by EphB/ephrin-B2 signaling between endothelial cells and surrounding mesenchymal cells. *Blood* **100**(4): 1326-1333.
- Okamoto, T., Tanaka, S., Stan, A.C., Koike, T., Kase, M., Makita, Z., Sawa, H. and Nagashima, K. (2002a): Advanced glycation end products induce angiogenesis in vivo. *Microvasc Res* **63**(2): 186-195.
- Okamoto, T., Yamagishi, S., Inagaki, Y., Amano, S., Koga, K., Abe, R., Takeuchi, M., Ohno, S., Yoshimura, A. and Makita, Z. (2002b): Angiogenesis induced by

- advanced glycation end products and its prevention by cerivastatin. *FASEB J* **16**(14): 1928-1930.
- Onorato, J.M., Jenkins, A.J., Thorpe, S.R. and Baynes, J.W. (2000): Pyridoxamine, an inhibitor of advanced glycation reactions, also inhibits advanced lipoxidation reactions. *J Biol Chem* **275**(28): 21177-21184.
- Orlidge, A. and D_Amore, P.A. (1987): Inhibition of capillary endothelial cell growth by pericytes and smooth muscle cells. *J Cell Biol* **105**(3): 1455-1462.
- Ozaki, H., Seo, M.S., Ozaki, K., Yamada, H., Yamada, E., Okamoto, N., Hofmann, F., Wood, J.M. and Campochiaro, P.A. (2000): Blockade of vascular endothelial cell growth factor receptor signaling is sufficient to completely prevent retinal neovascularization. *Am J Pathol* **156**(2): 697-707.
- Ozerdem, U., Grako, K.A., Dahlin_Huppe, K., Monosov, E. and Stallcup, W.B. (2001): NG2 proteoglycan is expressed exclusively by mural cells during vascular morphogenesis. *Dev Dyn* **222**(2): 218-227.
- Papapetropoulos, A., Garcia_Cardenas, G., Dengler, T.J., Maisonpierre, P.C., Yancopoulos, G.D. and Sessa, W.C. (1999): Direct actions of angiopoietin-1 on human endothelium: evidence for network stabilization, cell survival, and interaction with other angiogenic growth factors. *Lab Invest* **79**(2): 213-223.
- Parenti, A., Brogelli, L., Filippi, S., Donnini, S. and Ledda, F. (2002): Effect of hypoxia and endothelial loss on vascular smooth muscle cell responsiveness to VEGF-A: role of flt-1/VEGF-receptor-1. *Cardiovasc Res* **55**(1): 201-212.
- Park, J.Y., Takahara, N., Gabriele, A., Chou, E., Naruse, K., Suzuma, K., Yamauchi, T., Ha, S.W., Meier, M., Rhodes, C.J. and King, G.L. (2000): Induction of endothelin-1 expression by glucose: an effect of protein kinase C activation. *Diabetes* **49**(7): 1239-1248.
- Patan, S. (1998): TIE1 and TIE2 receptor tyrosine kinases inversely regulate embryonic angiogenesis by the mechanism of intussusceptive microvascular growth. *Microvasc Res* **56**(1): 1-21.
- Patz, A. (1982): Clinical and experimental studies on retinal neovascularization. XXXIX Edward Jackson Memorial Lecture. *Am J Ophthalmol* **94**(6): 715-743.
- Pe_Er, J., Shweiki, D., Itin, A., Hemo, I., Gnessin, H. and Keshet, E. (1995): Hypoxia-induced expression of vascular endothelial growth factor by retinal cells is a common factor in neovascularizing ocular diseases. *Lab Invest* **72**(6): 638-645.
- Pepeu, G. and Spignoli, G. (1989): Nootropic drugs and brain cholinergic mechanisms. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **13 Suppl**: S77-88.
- Pichiule, P., Chavez, J.C. and Lamanna, J.C. (2004): Hypoxic regulation of angiopoietin-2 expression in endothelial cells. *J Biol Chem* **279**(13): 12171-12180.

- Podesta, F., Romeo, G., Liu, W.H., Krajewski, S., Reed, J.C., Gerhardinger, C. and Lorenzi, M. (2000): Bax is increased in the retina of diabetic subjects and is associated with pericyte apoptosis in vivo and in vitro. *Am J Pathol* **156**(3): 1025-1032.
- Price, D.L., Rhett, P.M., Thorpe, S.R. and Baynes, J.W. (2001): Chelating activity of advanced glycation end-product inhibitors. *J Biol Chem* **276**(52): 48967-48972.
- Raines, E.W. and Ross, R. (1992): Compartmentalization of PDGF on extracellular binding sites dependent on exon-6-encoded sequences. *J Cell Biol* **116**(2): 533-543.
- Rashid, M.H. and Ueda, H. (2002): Nonopioid and neuropathy-specific analgesic action of the nootropic drug nefiracetam in mice. *J Pharmacol Exp Ther* **303**(1): 226-231.
- Reynolds, J.D. (2001): The management of retinopathy of prematurity. *Paediatr Drugs* **3**(4): 263-272.
- Rhee, J.-S., Black, M., Schubert, U., Fischer, S., Morgenstern, E., Hammes, H.-P. and Preissner, K.T. (2004): The functional role of blood platelet components in angiogenesis. *Thromb Haemost* **92**(Status: eingereicht und akzeptiert).
- Rhodin, J.A. (1968): Ultrastructure of mammalian venous capillaries, venules, and small collecting veins. *J Ultrastruct Res* **25**(5): 452-500.
- Rhodin, J.A. and Fujita, H. (1989): Capillary growth in the mesentery of normal young rats. Intravital video and electron microscope analyses. *J Submicrosc Cytol Pathol* **21**(1): 1-34.
- Riecke, B., Chavakis, E., Bretzel, R.G., Linn, T., Preissner, K.T., Brownlee, M. and Hammes, H.P. (2001): Topical application of integrin antagonists inhibits proliferative retinopathy. *Horm Metab Res* **33**(5): 307-311.
- Romeo, G., Liu, W.H., Asnaghi, V., Kern, T.S. and 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.
- Rösen, P. (1999): Physiologische Glukoseregulation. *Kompodium Diabetologie*. Nawroth, Pp. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag.
- Ross, R., Raines, E.W. and Bowen_Pope, D.F. (1986): The biology of platelet-derived growth factor. *Cell* **46**(2): 155-169.
- Ruhrberg, C., Gerhardt, H., Golding, M., Watson, R., Ioannidou, S., Fujisawa, H., Betsholtz, C. and Shima, D.T. (2002): Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis. *Genes Dev* **16**(20): 2684-2698.
- Sakata, N., Meng, J., Jimi, S. and Takebayashi, S. (1995): Nonenzymatic glycation and extractability of collagen in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* **116**(1): 63-75.

- Salcedo, R., Resau, J.H., Halverson, D., Hudson, E.A., Dambach, M., Powell, D., Wasserman, K. and Oppenheim, J.J. (2000): Differential expression and responsiveness of chemokine receptors (CXCR1-3) by human microvascular endothelial cells and umbilical vein endothelial cells. *FASEB J* **14**(13): 2055-2064.
- Saletu, B., Grunberger, J. and Andere, P. (1987): Proof of antihypoxidotic properties of tenilsetam in man by EEG and psychometric analysis under an experimental hypoxic hypoxidosis. *Drug Dev Res* **10**: 133-155.
- Saletu, B., Grunberger, J. and Cepho, H. (1986): Pharmacokinetic and -dynamic studies in elderlies with a potential antihypoxidotic/nootropic drug tenilsetam utilizing pharmaco-EEG and psychometry. *Drug Dev Res* **9**: 95-113.
- Saletu, B., Semlitsch, H.V., Anderer, P., Resch, F., Presslich, O. and Schuster, P. (1989): Psychophysiological research in psychiatry and neuropsychopharmacology. II. The investigation of antihypoxidotic/nootropic drugs (tenilsetam and co-dergocrinemesylate) in elderlies with the Viennese Psychophysiological Test-System (VPTS). *Methods Find Exp Clin Pharmacol* **11**(1): 43-55.
- Sanchez_Mateos, P., Cabanas, C. and Sanchez_Madrid, F. (1996): Regulation of integrin function. *Semin Cancer Biol* **7**(3): 99-109.
- Sarges, R. and Oates, P.J. (1993): Aldose reductase inhibitors: recent developments. *Prog Drug Res* **40**: 99-161.
- Sato, S., Secchi, E.F., Lizak, M.J., Fukase, S., Ohta, N., Murata, M., Tsai, J.Y. and Kador, P.F. (1999): Polyol formation and NADPH-dependent reductases in dog retinal capillary pericytes and endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**(3): 697-704.
- Sato, T.N., Tozawa, Y., Deutsch, U., Wolburg_Buchholz, K., Fujiwara, Y., Gendron_Maguire, M., Gridley, T., Wolburg, H., Risau, W. and Qin, Y. (1995): Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature* **376**(6535): 70-74.
- Sato, Y. and Rifkin, D.B. (1989): Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells: activation of a latent transforming growth factor-beta 1-like molecule by plasmin during co-culture. *J Cell Biol* **109**(1): 309-315.
- Schenk, G., Duggleby, R.G. and Nixon, P.F. (1998): Properties and functions of the thiamin diphosphate dependent enzyme transketolase. *Int J Biochem Cell Biol* **30**(12): 1297-1318.
- Scheuer, K., Rostock, A., Bartsch, R. and Muller, W.E. (1999): Piracetam improves cognitive performance by restoring neurochemical deficits of the aged rat brain. *Pharmacopsychiatry* **32 Suppl 1**: 10-16.
- Schindler, U., Rush, D.K. and Fielding, S. (1994): Animal models for studying effects on cognition. *Drug Dev Res* **4**: 567-576.

- Schlingemann, R.O., Oosterwijk, E., Wesseling, P., Rietveld, F.J. and Ruiten, D.J. (1996): Aminopeptidase a is a constituent of activated pericytes in angiogenesis. *J Pathol* **179**(4): 436-442.
- Schmidt, A.M., Hori, O., Brett, J., Yan, S.D., Wautier, J.L. and Stern, D. (1994): Cellular receptors for advanced glycation end products. Implications for induction of oxidant stress and cellular dysfunction in the pathogenesis of vascular lesions. *Arterioscler Thromb* **14**(10): 1521-1528.
- Schmidt, A.M., Hori, O., Chen, J.X., Li, J.F., Crandall, J., Zhang, J., Cao, R., Yan, S.D., Brett, J. and Stern, D. (1995): Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice. A potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes. *J Clin Invest* **96**(3): 1395-1403.
- Schor, A.M. and 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. *Microvasc Res* **32**: 21-38.
- Sell, D.R. and Monnier, V.M. (1990): End-stage renal disease and diabetes catalyze the formation of a pentose-derived crosslink from aging human collagen. *J Clin Invest* **85**(2): 380-384.
- Seo, M.S., Okamoto, N., Viores, M.A., Viores, S.A., Hackett, S.F., Yamada, H., Yamada, E., Derevjani, N.L., Laroche, W., Zack, D.J. and Campochiaro, P.A. (2000): Photoreceptor-specific expression of platelet-derived growth factor-B results in traction retinal detachment. *Am J Pathol* **157**(3): 995-1005.
- Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T.P., Gertsenstein, M., Wu, X.F., Breitman, M.L. and Schuh, A.C. (1995): Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* **376**(6535): 62-66.
- Shih, S.C., Ju, M., Liu, N., Mo, J.R., Ney, J.J. and Smith, L.E. (2003): Transforming growth factor beta1 induction of vascular endothelial growth factor receptor 1: mechanism of pericyte-induced vascular survival in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**(26): 15859-15864.
- Shin, D., Garcia-Cardena, G., Hayashi, S., Gerety, S., Asahara, T., Stavrakis, G., Isner, J., Folkman, J., Gimbrone, M.A. and Anderson, D.J. (2001): Expression of ephrinB2 identifies a stable genetic difference between arterial and venous vascular smooth muscle as well as endothelial cells, and marks subsets of microvessels at sites of adult neovascularization. *Dev Biol* **230**(2): 139-150.
- Shipanova, I.N., Glomb, M.A. and Nagaraj, R.H. (1997): Protein modification by methylglyoxal: chemical nature and synthetic mechanism of a major fluorescent adduct. *Arch Biochem Biophys* **344**(1): 29-36.
- Shoda, H., Miyata, S., Liu, B.-F., Yamada, H., Ohara, T., Suzuki, K., Oimomi, M. and Kasuga, M. (1997): Inhibitory effects of tenilsetam on the maillard reaction. *Endocrinology* **138**(5): 1886-1892.

- Shojaee, N., Patton, W.F., Hechtman, H.B. and Shepro, D. (1999): Myosin translocation in retinal pericytes during free-radical induced apoptosis. *J Cell Biochem* **75**(1): 118-129.
- Sholley, M.M., Ferguson, G.P., Seibel, H.R., Montour, J.L. and Wilson, J.D. (1984): Mechanisms of neovascularization. Vascular sprouting can occur without proliferation of endothelial cells. *Lab Invest* **51**(6): 624-634.
- Shorvon, S. (2001): Pyrrolidone derivatives. *Lancet* **358**(9296): 1885-1892.
- Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D. and Keshet, E. (1992): Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* **359**(6398): 843-845.
- Shyu, K.G., Chang, C.C., Wang, B.W., Kuan, P. and Chang, H. (2003): Increased expression of angiopoietin-2 and Tie2 receptor in a rat model of myocardial ischaemia/reperfusion. *Clin Sci (Lond)* **105**(3): 287-294.
- Simionescu, M., Simionescu, N. and Palade, G.E. (1975): Segmental differentiations of cell junctions in the vascular endothelium. The microvasculature. *J Cell Biol* **67**(3): 863-885.
- Sims, D.E. (1986): The pericyte--a review. *Tissue Cell* **18**(2): 153-174.
- Sims, D.E. (1991): Recent advances in pericyte biology--implications for health and disease. *Can J Cardiol* **7**(10): 431-443.
- Sims, D.E. (2000): Diversity within pericytes. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **27**(10): 842-846.
- Sims, D.E. and Westfall, J.A. (1983): Analysis of relationships between pericytes and gas exchange capillaries in neonatal and mature bovine lungs. *Microvasc Res* **25**(3): 333-342.
- Skalli, O., Pelte, M.F., Pecelet, M.C., Gabbiani, G., Gugliotta, P., Bussolati, G., Ravazzola, M. and Orci, L. (1989): Alpha-smooth muscle actin, a differentiation marker of smooth muscle cells, is present in microfilamentous bundles of pericytes. *J Histochem Cytochem* **37**(3): 315-321.
- Smith, L.E.H., Wesolowski, E., Mcllellan, A., Kostyk, S.K., D'amato, R., Sullivan, R. and D'amore, P.A. (1994): Oxygen-induced retinopathy in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **35**(1): 101-111.
- Smits, A., Hermansson, M., Nister, M., Karnushina, I., Heldin, C.H., Westermark, B. and Funai, K. (1989): Rat brain capillary endothelial cells express functional PDGF B-type receptors. *Growth Factors* **2**(1): 1-8.
- Sone, H., Deo, B.K. and Kumagai, A.K. (2000): Enhancement of glucose transport by vascular endothelial growth factor in retinal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**(7): 1876-1884.

- Sone, H., Kawakami, Y., Okuda, Y., Sekine, Y., Honmura, S., Matsuo, K., Segawa, T., Suzuki, H. and Yamashita, K. (1997): Ocular vascular endothelial growth factor levels in diabetic rats are elevated before observable retinal proliferative changes. *Diabetologia* **40**(6): 726-730.
- Soriano, P. (1994): Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF beta-receptor mutant mice. *Genes Dev* **8**(16): 1888-1896.
- Spranger, J., Osterhoff, M., Reimann, M., Mohlig, M., Ristow, M., Francis, M.K., Cristofalo, V., Hammes, H.P., Smith, G., Boulton, M. and Pfeiffer, A.F. (2001): Loss of the antiangiogenic pigment epithelium-derived factor in patients with angiogenic eye disease. *Diabetes* **50**(12): 2641-2645.
- Spurbeck, W.W., Ng, C.Y., Strom, T.S., Vanin, E.F. and Davidoff, A.M. (2002): Enforced expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-3 affects functional capillary morphogenesis and inhibits tumor growth in a murine tumor model. *Blood* **100**(9): 3361-3368.
- Stalmans, I., Ng, Y.S., Rohan, R., Fruttiger, M., Bouche, A., Yuce, A., Fujisawa, H., Hermans, B., Shani, M., Jansen, S., Hicklin, D., Anderson, D.J., Gardiner, T., Hammes, H.P., Moons, L., Dewerchin, M., Collen, D., Carmeliet, P. and D'Amore, P.A. (2002): Arteriolar and venular patterning in retinas of mice selectively expressing VEGF isoforms. *J Clin Invest* **109**(3): 327-336.
- Standl, E. and Maurer, D. (1997): Neuerblindungen bei Diabetikern 1995 in Oberbayern. *Diabetes und Stoffwechsel* **6**(Suppl. 1): 16.
- Stellmach, V., Crawford, S.E., Zhou, W. and Bouck, N. (2001): Prevention of ischemia-induced retinopathy by the natural ocular antiangiogenic agent pigment epithelium-derived factor. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**(5): 2593-2597.
- Stewart, M., Thiel, M. and Hogg, N. (1995): Leukocyte integrins. *Curr Opin Cell Biol* **7**(5): 690-696.
- Stitt, A., Gardiner, T.A., Alderson, N.L., Canning, P., Frizzell, N., Duffy, N., Boyle, C., Januszewski, A.S., Chachich, M., Baynes, J.W., Thorpe, S.R. and Anderson, N.L. (2002): The AGE inhibitor pyridoxamine inhibits development of retinopathy in experimental diabetes. *Diabetes* **51**(9): 2826-2832.
- Stockmans, F., Deberdt, W., Nystrom, A., Nystrom, E., Stassen, J.M., Vermeylen, J. and Deckmyn, H. (1998): Inhibitory effect of piracetam on platelet-rich thrombus formation in an animal model. *Thromb Haemost* **79**(1): 222-227.
- Stolz, D.B. and Jacobson, B.S. (1991): Macro- and microvascular endothelial cells in vitro: maintenance of biochemical heterogeneity despite loss of ultrastructural characteristics. *In Vitro Cell Dev Biol* **27A**(2): 169-182.
- Stone, J. and Dreher, Z. (1987): Relationship between astrocytes, ganglion cells and vasculature of the retina. *J Comp Neurol* **255**(1): 35-49.

- 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) expression by neuroglia. *J Neurosci* **15**(7 Pt 1): 4738-4747.
- Stratmann, A., Risau, W. and Plate, K.H. (1998): Cell type-specific expression of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 suggests a role in glioblastoma angiogenesis. *Am J Pathol* **153**(5): 1459-1466.
- Stribling, D. (1990): Clinical trials with aldose reductase inhibitors. *Exp Eye Res* **50**(6): 621-624.
- Studer, R.K., Craven, P.A. and Derubertis, F.R. (1997): Antioxidant inhibition of protein kinase C-signaled increases in transforming growth factor-beta in mesangial cells. *Metabolism: Clinical and Experimental* **46**(8): 918-925.
- Sundberg, C., Kowanetz, M., Brown, L.F., Detmar, M. and Dvorak, H.F. (2002): Stable expression of angiopoietin-1 and other markers by cultured pericytes: phenotypic similarities to a subpopulation of cells in maturing vessels during later stages of angiogenesis in vivo. *Lab Invest* **82**(4): 387-401.
- Suri, C., Jones, P.F., Patan, S., Bartunkova, S., Maisonpierre, P.C., Davis, S., Sato, T.N. and Yancopoulos, G.D. (1996): Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* **87**(7): 1171-1180.
- Suri, C., McClain, J., Thurston, G., McDonald, D.M., Zhou, H., Oldmixon, E.H., Sato, T.N. and Yancopoulos, G.D. (1998): Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1. *Science* **282**: 468-471.
- Suzuma, K., Naruse, K., Suzuma, I., Takahara, N., Ueki, K., Aiello, L.P. and King, G.L. (2000): Vascular endothelial growth factor induces expression of connective tissue growth factor via KDR, Flt1, and phosphatidylinositol 3-kinase-akt-dependent pathways in retinal vascular cells. *J Biol Chem* **275**(52): 40725-40731.
- Taher, M.M., Garcia, J.G. and Natarajan, V. (1993): Hydroperoxide-induced diacylglycerol formation and protein kinase C activation in vascular endothelial cells. *Arch Biochem Biophys* **303**(2): 260-266.
- Takagi, H., King, G.L. and Aiello, L.P. (1998): Hypoxia upregulates glucose transport activity through an adenosine-mediated increase of GLUT1 expression in retinal capillary endothelial cells. *Diabetes* **47**(9): 1480-1488.
- Takagi, H., Koyama, S., Seike, H., Oh, H., Otani, A., Matsumura, M. and Honda, Y. (2003): Potential role of the angiopoietin/tie2 system in ischemia-induced retinal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**(1): 393-402.
- Takahashi, K., Brooks, R.A., Kanse, S.M., Ghatei, M.A., Kohner, E.M. and Bloom, S.R. (1989): Production of endothelin 1 by cultured bovine retinal endothelial cells and presence of endothelin receptors on associated pericytes. *Diabetes* **38**(9): 1200-1202.

- Takahashi, Y., Imanaka, T. and Takano, T. (1996): Spatial and temporal pattern of smooth muscle cell differentiation during development of the vascular system in the mouse embryo. *Anat Embryol (Berl)* **194**(5): 515-526.
- Takami, S., Yamashita, S., Kihara, S., Kameda_Takemura, K. and Matsuzawa, Y. (1998): High concentration of glucose induces the expression of intercellular adhesion molecule-1 in human umbilical vein endothelial cells. *Atherosclerosis* **138**(1): 35-41.
- Takata, K., Hirano, H. and Kasahara, M. (1997): Transport of glucose across the blood-tissue barriers. *Int Rev Cytol* **172**: 1-53.
- Takata, K., Kasahara, T., Kasahara, M., Ezaki, O. and Hirano, H. (1990): Erythrocyte/HepG2-type glucose transporter is concentrated in cells of blood-tissue barriers. *Biochem Biophys Res Commun* **173**(1): 67-73.
- Takata, K., Kasahara, T., Kasahara, M., Ezaki, O. and Hirano, H. (1992): Ultracytochemical localization of the erythrocyte/HepG2-type glucose transporter (GLUT1) in cells of the blood-retinal barrier in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **33**(2): 377-383.
- Tang, J., Mohr, S., Du, Y.D. and Kern, T.S. (2003): Non-uniform distribution of lesions and biochemical abnormalities within the retina of diabetic humans. *Curr Eye Res* **27**(1): 7-13.
- Tang, J., Zhu, X.W., Lust, W.D. and Kern, T.S. (2000): Retina accumulates more glucose than does the embryologically similar cerebral cortex in diabetic rats. *Diabetologia* **43**(11): 1417-1423.
- Thommen, R., Humar, R., Misevic, G., Pepper, M.S., Hahn, A.W., John, M. and Battegay, E.J. (1997): PDGF-BB increases endothelial migration on cord movements during angiogenesis in vitro. *J Cell Biochem* **64**(3): 403-413.
- Thornalley, P.J., Langborg, A. and Minhas, H.S. (1999): Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem J* **344 Pt 1**: 109-116.
- Thurston, G., Rudge, J.S., Ioffe, E., Zhou, H., Ross, L., Croll, S.D., Glazer, N., Holash, J., McDonald, D.M. and Yancopoulos, G.D. (2000): Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nat Med* **6**(4): 460-463.
- Thurston, G., Suri, C., Smith, K., McClain, J., Sato, T.N., Yancopoulos, G.D. and McDonald, D.M. (1999): Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science* **286**: 2511-2514.
- Thyberg, J., Ostman, A., Backstrom, G., Westermark, B. and Heldin, C.H. (1990): Localization of platelet-derived growth factor (PDGF) in CHO cells transfected with PDGF A- or B-chain cDNA: retention of PDGF-BB in the endoplasmic reticulum and Golgi complex. *J Cell Sci* **97 (Pt 2)**: 219-229.

- Tidhar, A., Reichenstein, M., Cohen, D., Faerman, A., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A. and Shani, M. (2001): A novel transgenic marker for migrating limb muscle precursors and for vascular smooth muscle cells. *Dev Dyn* **220**: 60-73.
- Tilton, R.G. (1991): Capillary pericytes: perspectives and future trends. *J Electron Microsc Tech* **19**(3): 327-344.
- Tilton, R.G. (2002): Diabetic vascular dysfunction: Links to glucose-induced reductive stress and VEGF. *Microsc Res Tech* **57**(5): 390-407.
- Tilton, R.G., Chang, K., Weigel, C., Eades, D., Sherman, W.R., Kilo, C. and Williamson, J.R. (1988): Increased ocular blood flow and ¹²⁵I-albumin permeation in galactose-fed rats: inhibition by sorbinil. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **29**(6): 861-868.
- Tilton, R.G., Kawamura, T., Chang, K.C., Ido, Y., Bjerkke, R.J., Stephan, C.C., Brock, T.A. and Williamson, J.R. (1997): Vascular dysfunction induced by elevated glucose levels in rats is mediated by vascular endothelial growth factor. *J Clin Invest* **99**(9): 2192-2202.
- Tilton, R.G., Kilo, C. and Williamson, J.R. (1979): Pericyte-endothelial relationships in cardiac and skeletal muscle capillaries. *Microvasc Res* **18**(3): 325-335.
- Tilton, R.G., Miller, E.J., Kilo, C. and Williamson, J.R. (1985): Pericyte form and distribution in rat retinal and uveal capillaries. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **26**(1): 68-73.
- Timimi, F.K., Ting, H.H., Haley, E.A., Roddy, M.A., Ganz, P. and Creager, M.A. (1998): Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* **31**(3): 552-557.
- Ting, H.H., Timimi, F.K., Boles, K.S., Creager, S.J., Ganz, P. and Creager, M.A. (1996): Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* **97**(1): 22-28.
- Trautner, C., Icks, A., Haastert, B., Plum, F. and Berger, M. (1997): Incidence of blindness in relation to diabetes. A population-based study. *Diabetes Care* **20**(7): 1147-1153.
- Tromp, A., Hooymans, J.M., Barendsen, B.C. and Van_Doormaal, J.J. (1991): The effects of an aldose reductase inhibitor on the progression of diabetic retinopathy. *Doc Ophthalmol* **78**(3-4): 153-159.
- Turrens, J.F. (1997): Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep* **17**(1): 3-8.
- Turrens, J.F., Alexandre, A. and Lehninger, A.L. (1985): Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* **237**(2): 408-414.
- Turrens, J.F. and Boveris, A. (1980): Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *The Biochemical Journal* **191**(2): 421-427.

- Uemura, A., Ogawa, M., Hirashima, M., Fujiwara, T., Koyama, S., Takagi, H., Honda, Y., Wiegand, S.J., Yancopoulos, G.D. and Nishikawa, S. (2002): Recombinant angiopoietin-1 restores higher-order architecture of growing blood vessels in mice in the absence of mural cells. *J Clin Invest* **110**(11): 1619-1628.
- Ukpbs (1998a): Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet* **352**(9131): 837-853.
- Ukpbs (1998b): Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38. UK Prospective Diabetes Study Group. *BMJ* **317**(7160): 703-713.
- Umeda, N., Ozaki, H., Hayashi, H., Miyajima_Uchida, H. and Oshima, K. (2003): Colocalization of Tie2, angiopoietin 2 and vascular endothelial growth factor in fibrovascular membrane from patients with retinopathy of prematurity. *Ophthalmic Res* **35**(4): 217-223.
- Van_Gerven, J.M., Boot, J.P., Lemkes, H.H. and Van_Best, J.A. (1994): Effects of aldose reductase inhibition with tolrestat on diabetic retinopathy in a six months double blind trial. *Doc Ophthalmol* **87**(4): 355-365.
- Vestweber, D. (2000): Molecular mechanisms that control endothelial cell contacts. *J Pathol* **190**(3): 281-291.
- Vinores, S.A., Chan, C.C., Vinores, M.A., Matteson, D.M., Chen, Y.S., Klein, D.A., Shi, A., Ozaki, H. and Campochiaro, P.A. (1998): Increased vascular endothelial growth factor (VEGF) and transforming growth factor beta (TGFbeta) in experimental autoimmune uveoretinitis: upregulation of VEGF without neovascularization. *J Neuroimmunol* **89**(1-2): 43-50.
- Vinores, S.A., Seo, M.S., Derevjani, N.L. and Campochiaro, P.A. (2003): Photoreceptor-specific overexpression of platelet-derived growth factor induces proliferation of endothelial cells, pericytes, and glial cells and aberrant vascular development: an ultrastructural and immunocytochemical study. *Brain Res Dev Brain Res* **140**(2): 169-183.
- Vinores, S.A., Van_Niel, E., Swerdloff, J.L. and Campochiaro, P.A. (1993): Electron microscopic immunocytochemical demonstration of blood-retinal barrier breakdown in human diabetics and its association with aldose reductase in retinal vascular endothelium and retinal pigment epithelium. *Histochem J* **25**(9): 648-663.
- Vinores, S.A., Youssri, A.I., Luna, J.D., Chen, Y.S., Bhargava, S., Vinores, M.A., Schoenfeld, C.L., Peng, B., Chan, C.C., Larochelle, W., Green, W.R. and Campochiaro, P.A. (1997): Upregulation of vascular endothelial growth factor in ischemic and non-ischemic human and experimental retinal disease. *Histol Histopathol* **12**(1): 99-109.

- Vitek, M.P., Bhattacharya, K., Glendening, J.M., Stopa, E., Vlassara, H., Bucala, R., Manogue, K. and Cerami, A. (1994): Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**(11): 4766-4770.
- Vlassara, H. (1996a): Advanced glycation end-products and atherosclerosis. *Ann Med* **28**(5): 419-426.
- Vlassara, H. (1996b): Protein glycation in the kidney: role in diabetes and aging. *Kidney Int* **49**(6): 1795-1804.
- Vlassara, H., Fuh, H., Donnelly, T. and Cybulsky, M. (1995): Advanced glycation endproducts promote adhesion molecule (VCAM-1, ICAM-1) expression and atheroma formation in normal rabbits. *Mol Med* **1**: 447-456.
- Wakisaka, M., Yoshinari, M., Nakamura, S., Asano, T., Sonoki, K., Shi, A., Iwase, M., Takata, Y. and Fujishima, M. (1999): Suppression of sodium-dependent glucose uptake by captopril improves high-glucose-induced morphological and functional changes of cultured bovine retinal pericytes. *Microvasc Res* **58**(3): 215-223.
- Wakisaka, M., Yoshinari, M., Yamamoto, M., Nakamura, S., Asano, T., Himeno, T., Ichikawa, K., Doi, Y. and Fujishima, M. (1997): Na⁺-dependent glucose uptake and collagen synthesis by cultured bovine retinal pericytes. *Biochim Biophys Acta* **1362**(1): 87-96.
- Wakui, S., Furusato, M., Hasumura, M., Hori, M., Takahashi, H., Kano, Y. and Ushigome, S. (1989): Two- and three-dimensional ultrastructure of endothelium and pericyte interdigitations in capillary of human granulation tissue. *J Electron Microsc (Tokyo)* **38**(2): 136-142.
- Wakui, S., Furusato, M., Muto, T., Ohshige, H., Takahashi, H. and Ushigome, S. (1997): Transforming growth factor-beta and urokinase plasminogen activator presents at endothelial cell-pericyte interdigitation in human granulation tissue. *Microvasc Res* **54**(3): 262-269.
- Wallace, D.C. (1992): Diseases of the mitochondrial DNA. *Annu Rev Biochem* **61**: 1175-1212.
- Wang, H.U., Chen, Z.F. and 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**(5): 741-753.
- Wen, Y., Skidmore, J.C., Porter_Turner, M.M., Rea, C.A., Khokher, M.A. and Singh, B.M. (2002): Relationship of glycation, antioxidant status and oxidative stress to vascular endothelial damage in diabetes. *Diabetes Obes Metab* **4**(5): 305-308.
- Wesseling, P., Schlingemann, R.O., Rietveld, F.J., Link, M., Burger, P.C. and Ruiters, D.J. (1995): Early and extensive contribution of pericytes/vascular smooth muscle cells to microvascular proliferation in glioblastoma multiforme: an immuno-light and immuno-electron microscopic study. *J Neuropathol Exp Neurol* **54**(3): 304-310.

- Williams, B., Gallacher, B., Patel, H. and Orme, C. (1997): Glucose-induced protein kinase C activation regulates vascular permeability factor mRNA expression and peptide production by human vascular smooth muscle cells in vitro. *Diabetes* **46**(9): 1497-1503.
- Wong, T.Y., Hubbard, L.D., Klein, R., Marino, E.K., Kronmal, R., Sharrett, A.R., Siscovick, D.S., Burke, G. and Tielsch, J.M. (2002): Retinal microvascular abnormalities and blood pressure in older people: the Cardiovascular Health Study. *Br J Ophthalmol* **86**(9): 1007-1013.
- Wood, W. and Martin, P. (2002): Structures in focus--filopodia. *Int J Biochem Cell Biol* **34**(7): 726-730.
- Xia, P., Aiello, L.P., Ishii, H., Jiang, Z.Y., Park, D.J., Robinson, G.S., Takagi, H., Newsome, W.P., Jirousek, M.R. and King, G.L. (1996): Characterization of vascular endothelial growth factor's effect on the activation of protein kinase C, its isoforms, and endothelial cell growth. *J Clin Invest* **98**(9): 2018-2026.
- Xia, P., Inoguchi, T., Kern, T.S., Engerman, R.L., Oates, P.J. and King, G.L. (1994): Characterization of the mechanism for the chronic activation of diacylglycerol-protein kinase C pathway in diabetes and hypergalactosemia. *Diabetes* **43**(9): 1122-1129.
- Xiong, J.P., Stehle, T., Diefenbach, B., Zhang, R., Dunker, R., Scott, D.L., Joachimiak, A., Goodman, S.L. and Arnaout, M.A. (2001): Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3. *Science* **294**(5541): 339-345.
- Yamada, K.M. and Geiger, B. (1997): Molecular interactions in cell adhesion complexes. *Curr Opin Cell Biol* **9**(1): 76-85.
- Yamagishi, S., Amano, S., Inagaki, Y., Okamoto, T., Koga, K., Sasaki, N., Yamamoto, H., Takeuchi, M. and Makita, Z. (2002a): Advanced glycation end products-induced apoptosis and overexpression of vascular endothelial growth factor in bovine retinal pericytes. *Biochem Biophys Res Commun* **290**(3): 973-978.
- Yamagishi, S., Fujimori, H., Yonekura, H., Tanaka, N. and Yamamoto, H. (1999a): Advanced glycation endproducts accelerate calcification in microvascular pericytes. *Biochem Biophys Res Commun* **258**(2): 353-357.
- Yamagishi, S., Inagaki, Y., Amano, S., Okamoto, T., Takeuchi, M. and Makita, Z. (2002b): Pigment epithelium-derived factor protects cultured retinal pericytes from advanced glycation end product-induced injury through its antioxidative properties. *Biochem Biophys Res Commun* **296**(4): 877.
- Yamagishi, S., Okamoto, T., Amano, S., Inagaki, Y., Koga, K., Koga, M., Choei, H., Sasaki, N., Kikuchi, S., Takeuchi, M. and Makita, Z. (2002c): Palmitate-induced apoptosis of microvascular endothelial cells and pericytes. *Mol Med* **8**(4): 179-184.
- Yamagishi, S. and Takeuchi, M. (2004): Inhibition of protein kinase C might be harmful to diabetic retinopathy. *Med Hypotheses* **63**(1): 135-137.

- Yamagishi, S., Yonekura, H., Yamamoto, Y., Fujimori, H., Sakurai, S., Tanaka, N. and Yamamoto, H. (1999b): Vascular endothelial growth factor acts as a pericyte mitogen under hypoxic conditions. *Lab Invest* **79**(4): 501-509.
- Yamagishi, S., Yonekura, H., Yamamoto, Y., Katsuno, K., Sato, F., Mita, I., Ooka, H., Satozawa, N., Kawakami, T., Nomura, M. and Yamamoto, H. (1997): Advanced glycation end products-driven angiogenesis *in vitro*. Induction of the growth and tube formation of human microvascular endothelial cells through autocrine vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* **272**(13): 8723-8730.
- Yan, S.D., Chen, X., Fu, J., Chen, M., Zhu, H., Roher, A., Slattery, T., Zhao, L., Nagashima, M., Morser, J., Migheli, A., Nawroth, P., Stern, D. and Schmidt, A.M. (1996): RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* **382**: 685-691.
- Yancopoulos, G.D., Davis, S., Gale, N.W., Rudge, J.S., Wiegand, S.J. and Holash, J. (2000): Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* **407**(6801): 242-248.
- Yonekura, H., Yamamoto, Y., Sakurai, S., Petrova, R.G., Abedin, M.J., Li, H., Yasui, K., Takeuchi, M., Makita, Z., Takasawa, S., Okamoto, H., Watanabe, T. and Yamamoto, H. (2003): Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury. *The Biochemical Journal* **370**(Pt 3): 1097-1109.
- Yuan, H.T., Yang, S.P. and Woolf, A.S. (2000): Hypoxia up-regulates angiopoietin-2, a Tie-2 ligand, in mouse mesangial cells. *Kidney Int* **58**(5): 1912-1919.
- Zagzag, D., Amirnovin, R., Greco, M.A., Yee, H., Holash, J., Wiegand, S.J., Zabski, S., Yancopoulos, G.D. and Grumet, M. (2000): Vascular apoptosis and involution in gliomas precede neovascularization: a novel concept for glioma growth and angiogenesis. *Lab Invest* **80**(6): 837-849.
- Zalba, G., Beaumont, J., San_Jose, G., Fortuno, A., Fortuno, M.A. and Diez, J. (2000): Vascular oxidant stress: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol Biochem* **56**(1): 57-64.
- Zhang, L., Yang, N., Park, J.W., Katsaros, D., Fracchioli, S., Cao, G., O_Brien_Jenkins, A., Randall, T.C., Rubin, S.C. and 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**(12): 3403-3412.
- Zhang, Y., Porat, R.M., Alon, T., Keshet, E. and Stone, J. (1999): Tissue oxygen levels control astrocyte movement and differentiation in developing retina. *Brain Res Dev Brain Res* **118**(1-2): 135-145.

Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

Hoffmann J, Alt A, Lin J, Lochnit G, Schubert U, Schleicher E, Preissner KT, Chavakis T, Brownlee M, Van der Woude FJ, Hammes H-P. Tenilsetam prevents early diabetic retinopathy without correcting pericyte loss. (Veröffentlichung, eingereicht bei Diabetologia)

Hoffmann J, Feng Y, vom Hagen, Hillenbrand A, Lin J, Erber R, Vajkoczy P, Waldmann H, Giannis A, Wolburg H, Shani M, Jaeger V, Weich HA, Preissner KT, Hoffmann S, Deutsch U, Hammes H-P. Endothelial survival factors and spatial completion, but not pericyte coverage of retinal capillaries determine vessel plasticity. (Veröffentlichung, eingereicht beim FASEB Journal, akzeptiert am 5.7.05)

Hoffmann J, Hillenbrand A, Feng Y, Deutsch U, Shani M, Lin J, Hammes HP. Perizyten bei physiologischer und pathologischer Angiogenese – Bedeutung für die diabetische Retinopathie. 38. Jahrestagung der Deutschen Diabetes Gesellschaft. Bremen, 28. – 31.5. 2003 (Poster)

Hoffmann J, Deutsch U., Betsholtz C, Shani M, Lin J, Hammes HP. Beziehung zwischen Perizyten und Angiogenese im Modell der Sauerstoff-induzierten proliferativen Retinopathie. 37. Jahrestagung der Deutschen Diabetes Gesellschaft. Dresden, 08. – 11.5. 2002 (Vortrag und Poster)

Hammes HP, **Hoffmann J**, Lin J, Alt A, Lochnit G, Bretzel RG, Brownlee M. Tenilsetam, a new AGE inhibitor, prevents early retinopathy in experimental diabetes. Angiogenesis. Molecular Mechanisms and Functional Interactions. Kloster Seeon, 1. – 4.10.2000 (Poster)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hans-Peter Hammes für die Überlassung dieses interessanten Themas und die Betreuung der Arbeit sowie Herrn Prof. Dr. Clemens Kunz für die Begutachtung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Klaus T. Preissner danke ich für die freundliche Aufnahme im Labor des Biochemischen Instituts, wo ich meine – in der Poliklinik begonnenen Experimente – nach dem Umzug von Prof. Hammes nach Mannheim, unter optimalen Bedingungen beenden konnte.

Weiterhin möchte ich Prof. Dr. Dr. Piper für die Aufnahme in das Graduiertenkolleg 534 sowie der DFG für die Förderung der Promotion danken. Die regen Diskussionen mit den Betreuern und Teilnehmern des Graduiertenkollegs haben mir gerade in der Anfangszeit der Arbeit sehr geholfen.

Frau Marion Mann und Herrn Wolfgang Pabst vom Hochschulrechenzentrum danke ich für die unermüdliche Hilfe, die sie mir bei der statistischen Auswertung der Arbeit haben zukommen lassen.

Danken möchte ich auch allen Mitarbeitern und Mitdoktoranden der Poliklinik und des Biochemischen Instituts:

Frau Doris Erb, die mir insbesondere sehr bei der Überwachung des ROP-Modells und bei der Betreuung der Tiere geholfen hat und Frau Regine Bergfeld, die mir als Tierärztin viele Tipps für den richtigen Umgang mit Mäusen geben konnte. Sehr dankbar bin ich auch Herrn Uwe Schubert, Frau Susanne Tannert-Otto und Herrn Thomas Schmidt-Wöll für die gründliche Einarbeitung in die Methoden der Zellkultur und die Hilfe am FACS-Gerät.

Nicht vergessen möchte ich Jihong Lin, Kerstin Schneider, André Kidzun, Ali Yüce, Joong-Sup Rhee, Fumie Nakazawa, Aya Shibamiya, Christian Kannemeier, Triantafyllos Chavakis und Karin Hersemeyer, die ebenfalls maßgeblich dazu beigetragen haben, dass ich an viele schöne und lustige Zeiten im Labor zurückdenken kann.

Weiterhin möchte ich Frau Petra Bugert aus Mannheim dafür danken, dass sie mir die "fehlenden" XlacZ-Mausaugen so ordentlich nummeriert und optimal verpackt nach Gießen gesendet hat.

Unendlich dankbar bin ich meinem Freund Sascha und meinen Mitbewohnern Anja, Matze und Fabian, ohne deren Geduld, geistige Unterstützung und endlose Gespräche ich ganz sicher nicht bis zum Ende durchgehalten hätte! Auch Nicole Farrag möchte ich ganz ausdrücklich danken, da sie meine Arbeit Korrektur gelesen hat.

Zum Schluss gilt mein ganz besonderer Dank meinen Eltern, die mich während der vergangenen Jahre unerschütterlich aufgebaut und mental unterstützt haben sowie meinen Geschwistern Nils und Christine, die mir immer wieder Mut gemacht haben.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende
Dissertationsarbeit selbstständig durchgeführt und nur unter
Verwendung der zitierten Literatur verfasst habe. Diese
Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner
Prüfungsbehörde vorgelegen.