

**Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Johannes A. Eble -**

**Untersuchung der Angiogenese im Maus-Retina-
Modell zum Einfluss von Rhodocetin, einer
Komponente aus dem Gift der Malaien-Mokassinotter
(*Calloselasma rhodostoma*), auf die Gefäßneubildung**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur
Erlangung des doctor medicinae
der Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Mittmann, Charlotte
aus Alfeld (Leine)
2020

Gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen
Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Frank Ulrich Müller

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Johannes A. Eble

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Peter Heiduschka

Tag der mündlichen Prüfung: 10.03.2020

**Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für physiologische Chemie und Pathobiochemie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Johannes A. Eble -
Referent: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Johannes A. Eble
Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. Peter Heiduschka**

ZUSAMMENFASSUNG

Untersuchung der Angiogenese im Maus-Retina-Modell zum Einfluss von Rhodocetin, einer Komponente aus dem Gift der Malaien-Mokassinotter (*Calloselasma rhodostoma*), auf die Gefäßneubildung

Mittmann, Charlotte

Niland *et al.* konnten zeigen, dass die $\alpha\beta$ -Untereinheit von Rhodocetin über die Assoziation von Neuropilin-1 mit cMet zu einer verstärkten Motilität von Endothelzellen *in vitro* führt. In dieser Arbeit sollte am sich bildenden superficialen Gefäßplexus der Retina der Signalweg von Rhodocetin $\alpha\beta$ über Neuropilin-1 und cMet *in vivo* untersucht werden. Dazu wurden Mäuse zwischen dem 4. und dem 7. Tag nach Geburt intravitreal injiziert sowie nachfolgend mittels Immunhistochemie sowie qPCR untersucht.

Es zeigte sich, dass die Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ zur Bildung von Gefäßausstülpungen führte. Die Ausstülpungen stellten sich verstärkt Neuropilin-1- sowie cMet-positiv dar, und ihre Ausbildung wurde durch die Injektion des cMet-Inhibitors SU11274 verhindert. Ebenfalls nahm die Anzahl an Filopodien im venösen Stromgebiet nach Rhodocetin $\alpha\beta$ -Injektion, die vaskularisierte Fläche und in der Peripherie die Anzahl an Verzweigungspunkten der Gefäße signifikant zu. In der qPCR zeigte sich eine verringerte mRNA-Menge der untersuchten Proteine an P4 bzw. an P5. Insgesamt konnten deutliche Hinweise für den von Niland *et al.* *in vitro* entdeckten Signalweg von Rhodocetin $\alpha\beta$ über die Assoziation von Neuropilin-1 mit cMet *in vivo* gezeigt werden. Daneben zeigte sich, dass sich der beobachtete Einfluss von Rhodocetin $\alpha\beta$ vor allem auf unreifere Gefäßnetzwerke beschränkte und Rhodocetin $\alpha\beta$ den Spitzenzellstatus zu fördern scheint und somit als pro-angiogenetisch einzuordnen ist.

Tag der mündlichen Prüfung: 10.03.2020

Tierversuchsgenehmigung: Bezirksregierung Münster, 24.04.2018, Aktenzeichen AZ
81-02.04.2017.A444

Eidesstattliche Erklärung:

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

Untersuchung der Angiogenese im Maus-Retina-Modell zum Einfluss von Rhodocetin, einer Komponente aus dem Gift der Malaien-Mokassinotter (Calloselasma rhodostoma), auf die Gefäßneubildung

Im Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie

Unter der Anleitung von Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Johannes A. Eble

1. selbstständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Münster, den 10.03.2020

Ort, Datum

Charlotte Mißmann

Unterschrift

Für meine Eltern und meinen Bruder

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
1.1	Das Auge	9
1.2	Die Angiogenese	13
1.2.1	Die aussprossende Angiogenese	14
1.2.2	Die Gefäß-Co-Option	17
1.2.3	Die intussuszeptive Angiogenese	17
1.2.4	Die glomeruloide Angiogenese	17
1.2.5	Das vaskuläre Mimikry	17
1.3	Proteine aus Schlangengiften	18
1.4	Rhodocetin	18
1.4.1	Die Struktur von Rhodocetin	19
1.4.2	Die bekannten Wirkungen von Rhodocetin	20
1.5	Neuropilin-1	24
1.6	cMet	27
1.7	Ziele der Arbeit	28
2	Material und Methoden	28
2.1	Versuchstiere	28
2.2	Intravitreale Injektion	29
2.2.1	Instrumente und Material	30
2.2.2	Anästhesie der zu injizierenden Jungtiere	30
2.2.3	Ablauf der Injektion	30
2.2.4	Wundversorgung und Markierung der injizierten Tiere	31
2.2.5	Tötung der Jungtiere und Entnahme der Augen	31
2.3	Immunhistochemie und Fluoreszenzmikroskopie	32
2.3.1	Geräte und Material	32
2.3.2	Immunhistochemie an Flatmounts	36
2.3.3	Immunhistochemie an Paraffinschnitten	38
2.3.4	Proliferationsmessung mittels EdU	39
2.4	qPCR	40
2.4.1	Geräte und Material	40

2.4.2	Probenverarbeitung	41
2.4.3	Probenmessung	42
2.5	Statistik	43
2.5.1	Auswertung der Anzahl an Filopodien	43
2.5.2	Auswertung der vaskularisierten Fläche	43
2.5.3	Auswertung der Anzahl an Ausstülpungen	44
2.5.4	Auswertung der Fläche der Ausstülpungen	44
2.5.5	Auswertung der Verzweigungspunkte	45
3	Ergebnisse	45
3.1	Mikroskopische Veränderungen der Retina nach Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$	45
3.1.1	Anzahl und Morphologie der entstehenden Ausstülpungen der retinalen Blutgefäße	45
3.1.2	Immunhistochemie von CD11b	53
3.1.3	Proliferationsanalyse mittels EdU-Kit	54
3.1.4	Auswertung der Angiogenese der Retina	55
3.1.5	Veränderungen der Gefäßarchitektur	59
3.2	Molekularer Wirkmechanismus von Rhodocetin $\alpha\beta$ an den Retinalblutgefäßen	63
3.3	Immunhistochemische Detektion verschiedener angiogenesespezifischer Proteine in der Retina	77
3.3.1	Neuropilin-1	77
3.3.2	cMet	81
3.3.3	Paxillin	85
3.3.4	Y31-Phosphopaxillin	88
3.4	Analyse verschiedener mRNAs mittels qPCR	91
3.4.1	Neuropilin-1	92
3.4.2	cMet	93
3.4.3	VEGF-Rezeptor 2	95
4	Diskussion	97
4.1	Rhodocetin $\alpha\beta$ bewirkt die Bildung von vaskulären Ausstülpungen	97
4.2	Signalweg über Neuropilin-1 und cMet in vivo wahrscheinlich	99

4.3 Rhodocetin $\alpha\beta$ verringert die mRNA-Menge von Neuropilin-1, cMet und VEGF-R2	101
4.4 Rhodocetin $\alpha\beta$ wirkt auf unreife Gefäßnetze	103
4.5 Rhodocetin $\alpha\beta$ beeinflusst die Art und Weise des Auswachsens des Gefäßplexus	107
5 Zusammenfassung	109
6 Literaturverzeichnis	110
7 Lebenslauf	115
8 Anhang	I
8.1 Abkürzungsverzeichnis	I
8.2 Genehmigung der Tierversuche	V

1 Einleitung

1.1 Das Auge

Das Auge ist ein wichtiges Sinnesorgan des Menschen und vieler Tiere, vermittelt es doch einen sehr wichtigen Aspekt der Umwelt: den Seheindruck (31). Das Licht fällt in das Auge ein und wird als elektrisches Signal an das Gehirn weitergeleitet. Im Detail fällt das Licht zuerst durch die Cornea, durchkreuzt die vordere Augenkammer, die Pupille und die Linse um dann durch den Glaskörper die Netzhaut, Retina genannt, zu erreichen (Abbildung 1). Von dort gelangt die Information über den Sehnerven in das Gehirn (31). Insgesamt beträgt dieser Weg durch die unterschiedlichen Schichten im menschlichen Auge gerade einmal circa 22 bis 27 mm (31). Neben der funktionellen Einteilung des Auges kann man sich dem Auge auch über seine Struktur nähern: Das menschliche Auge besteht aus drei verschiedenen Schichten mit jeweils unterschiedlichen Aufgaben. Die Sklera ist der äußerste Teil des Auges und besitzt vor allem die Funktion einer schützenden Schicht. Darunter liegt die Choroidea, in der die Gefäße verlaufen und die somit der Ernährung des Auges dient. Ganz im Inneren liegt die Retina, die sensorische Schicht des Auges (31, 38).

Die Retina ist die neurosensorische innere Schicht des Augapfels und besteht grob aus zwei Anteilen: dem inneren sensorischen Teil, bestehend aus Photorezeptoren sowie weiteren Zellen und dem dünnen äußeren Teil, dem retinalen Pigmentepithel (38)(Abbildung 2). Die innere sensorische Schicht der Retina lässt sich nach histologischen Gesichtspunkten noch weiter in verschiedene Schichten einteilen, dieser Aufbau entspricht einem fundamentalen Plan, der allen Netzhäuten von Wirbeltieren zu Grunde liegt (28).

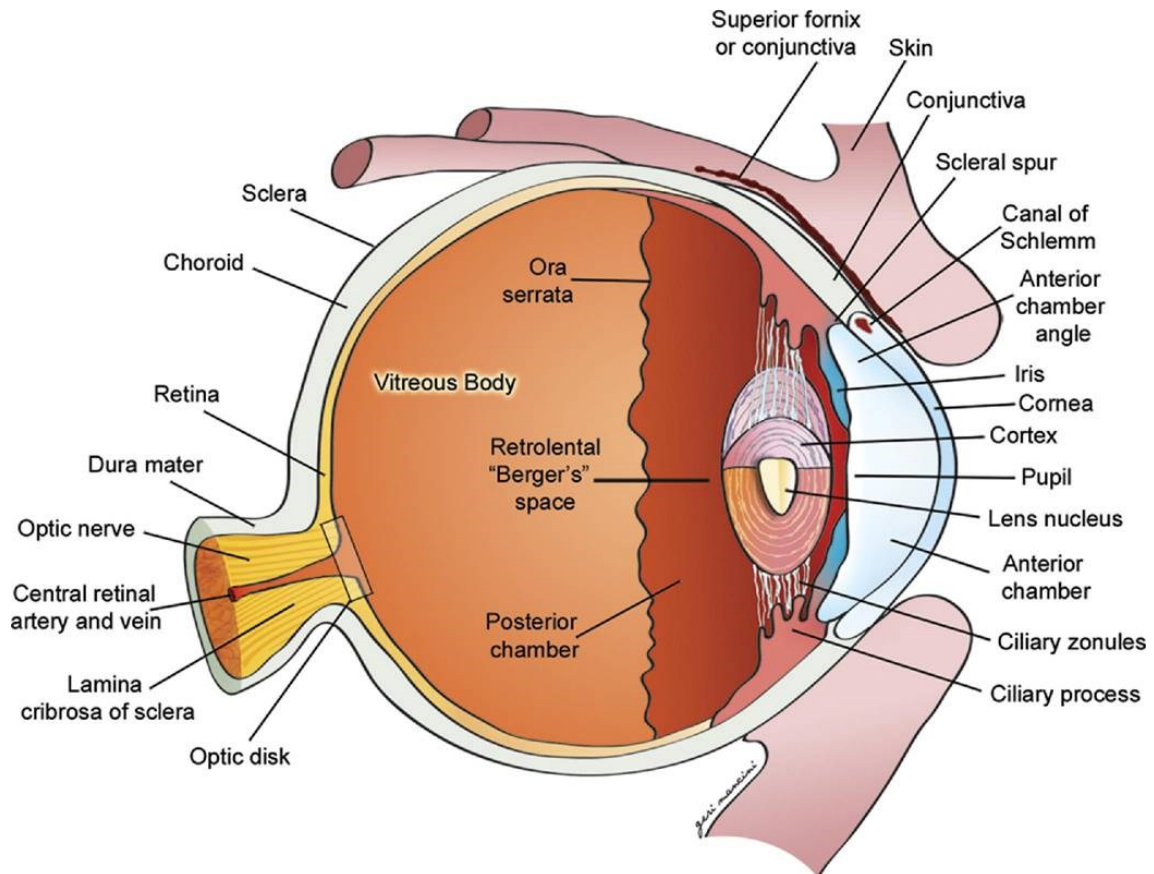


Abb. 1 Der Aufbau des menschlichen Auges. Dargestellt ist schematisch ein Schnitt in einer mittleren Ebene durch das menschliche Auge. Cornea = Kornea; anterior chamber = vordere Kammer; pupil = Pupille; lens nucleus, Cortex = Linse; vitreous body = Glaskörper; retina = Netzhaut; choroid = Choroidea; sclera = Sklera; optic nerve = Sehnerv (38).

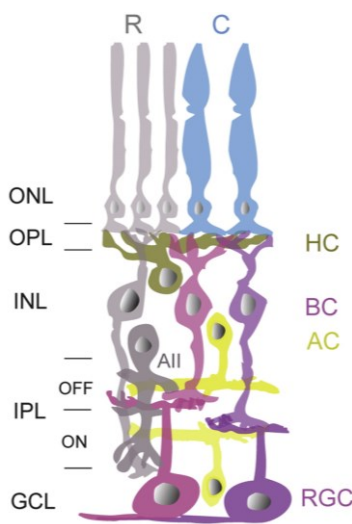


Abb. 2 Die Schichten der Retina. Schematisch dargestellt sind die einzelnen Zellen sowie die einzelnen histologischen Schichten der Retina. ONL = äußere Körnerschicht; OPL = äußere plexiforme Schicht; INL = innere Körnerschicht; IPL = innere plexiforme Schicht; GCL = Ganglienzellschicht; R = Photorezeptor,

Stäbchen; C = Photorezeptor, Zapfen; HC = Horizontalzelle; BC = Bipolarzelle; AC = Amakrine Zelle; RGC = retinale Ganglienzelle (28).

Die Retina wird über zwei unterschiedliche zuführende Blutsysteme mit Blut versorgt. Zum einen über die Choroidea, deren Kapillaren vor allem die Photorezeptoren versorgen, zum anderen über die Zentralarterie der Retina, die die inneren Schichten der Netzhaut versorgt (38). Die Blutversorgung durch die zentrale retinale Arterie erfolgt über ein System aus drei flachen Netzwerken aus Gefäßen, die horizontal zur Netzhaut angeordnet sind (26). Dabei lassen sich drei große Gefäßnetzwerke unterscheiden: der oberflächliche, der intermediäre und der tiefe Plexus (48). Innerhalb dieser Gefäßnetzwerke gibt es verschiedene Arten von Blutgefäßen, die wiederum verschiedene Funktionen erfüllen und daher auch mit unterschiedlichen Rezeptoren ausgestattet sind (44).

Anders als beim Menschen, bei dem sich das retinale Gefäßnetz zwischen der 15. Gestationswoche und der Geburt entwickelt, werden Mäuse mit einer avaskulären Retina geboren (63). In der Maus beginnt die Entwicklung der Gefäßnetzwerke der Retina am Tag der Geburt (P0) und ist abgeschlossen an Tag 21 nach der Geburt (P21) (22, 23). Die Angiogenese, die Entstehung neuer Blutgefäße, in der Entwicklung der Netzhaut folgt einem strikten Muster: die retinalen Gefäße wachsen radiär vom Eintrittsort des Sehnerven in die Netzhaut aus in die Peripherie (25, 34, 63). Dabei folgen die Gefäße einem Gradienten von vaskulärem endotheliale Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor, VEGF) (25). Die Expression von VEGF wird ausgelöst durch eine physiologische Hypoxie in der Netzhaut vor dem Auswachsen der Gefäße und stimuliert die Expression von VEGF (51). Die korrekte retinale Vaskularisation ist essentiell für die Augenfunktion, und ein Ungleichgewicht der verschiedenen Prozesse trägt zu verschiedenen Augenerkrankungen bei (6). Die Blutgefäße formen die oben genannten Plexus und innerhalb dieser ein hierarchisch organisiertes Netzwerk aus Arterien, Kapillaren und Venen. Diese entstehen durch eine Abfolge von Wachstum, Abbauen und Reifung (20).

Der oberflächliche Gefäßplexus entwickelt sich innerhalb der ersten Woche nach der Geburt (12) (Abbildung 3). Ausgehend vom Kopf des Sehnerven bilden sich die oberflächlich liegenden Gefäße strahlenförmig aus Richtung Peripherie, welche sie an

Tag 7 (P7) nach der Geburt erreichen (25, 48, 51, 63). Die Gefäße im zuerst unreifen Gefäßnetz werden in einem Prozess der Formänderung umgebaut von Tag 10 nach der Geburt (P10) an, infolgedessen die Verzweigungen der Gefäße abnehmen (20). An der Wachstumsfront des oberflächlichen Plexus gibt es eine hohe Proliferation der Endothelzellen während in den zentralen Arealen des Netzwerkes der Umbau bereits bestehender Gefäße dominiert (20, 51).

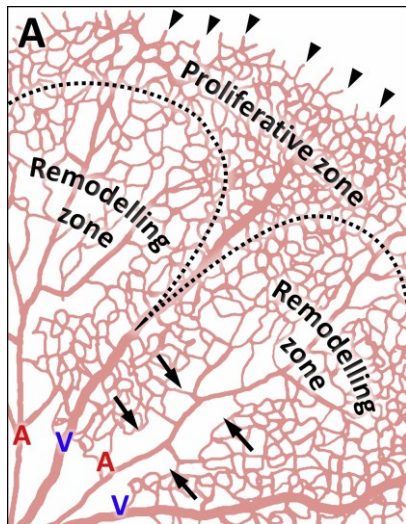


Abb. 3 Der oberflächliche Gefäßplexus. Schematisch dargestellt ist ein Ausschnitt des oberflächlichen Plexus der Retina. Das Zentrum der Retina befindet sich unten links und die Peripherie oben rechts. Die Dreiecke kennzeichnen sogenannte Spitzenzellen, die Pfeile zeigen auf kapillarfreie Zonen. A = Arterie; V = Vene; proliferative zone = Proliferationszone; remodelling zone = Umbauzone (51).

Bei Erreichen der Peripherie der Retina durch den oberflächlichen Gefäßplexus bilden sich angiogenetische Aussprossungen der bestehenden Gefäße und penetrieren die Netzhaut senkrecht zum oberflächlichen Plexus. Dadurch bildet sich ein zweites, tiefer gelegenes Gefäßnetzwerk, das den tiefen Plexus formt (6, 12, 48, 51). Der tiefe Gefäßplexus entwickelt sich zwischen dem 7. und dem 10. Tag nach der Geburt, und erreicht an P12 die retinale Peripherie (25). Daraufhin bildet sich der intermediäre Plexus zwischen Tag 12 und Tag 14 nach der Geburt (25, 48). Nach der Wachstumsphase der einzelnen Plexus beginnt ungefähr ab dem 10. Tag nach der Geburt die Phase des Umbaus und der Reifung der Gefäße in den einzelnen Netzwerken und dauert ungefähr zwei Wochen an (20, 62). Ein wichtiger Aspekt während der Umbauvorgänge ist die Reifung der Gefäße sowie die Differenzierung in Arterien, Kapillaren und Venen (51). Dies wird vor allem durch den Schlüsselregulator Notch

initiiert, der in erster Linie für den Umbau sowie die Reifung der Kapillaren und der Venen zuständig ist, während die Expression von VEGF nachlässt (20). Sehr ähnlich verläuft auch die Ausbildung der humanen retinalen Gefäße, jedoch beginnt dort der oberflächliche Plexus in der 15. Gestationswoche zu wachsen, und die Vaskularisation der Retina ist zwischen der 38. und der 40. Gestationswoche beendet (51).

Aufgrund der postnatalen Entwicklung des Gefäßsystems in der Maus hat es sich als Modell zu Forschungszwecken etabliert (20, 51). Ebenfalls ist das postnatale Auge einfach zugänglich für Injektionen oder hochauflösende Bildgebung (20, 51). Die Bildung des oberflächlichen Gefäßnetzwerks der Retina ist zusätzlich ein gutes Modellsystem um die Differenzierung der Gefäße, den Umbau sowie die Angiogenese zu studieren (48, 51).

1.2 Die Angiogenese

Als Angiogenese wird die Bildung von neuen Blutgefäßen aus bereits existierenden bezeichnet (9). Dieser Prozess wird stark reguliert sowie streng organisiert (20, 29). Die Angiogenese besteht aus einer Serie von Schritten, diese beinhalten die Proliferation, das Aussprossen, die Anastomosierung, den Abbau sowie den Umbau (20). Eine große Bedeutung kommt der Angiogenese sowohl in der Wundheilung als auch in der Tumorprogression zu (9, 20, 44). Daher kann die Erforschung und genaue Beschreibung der Bildung von neuen Blutgefäßen bei verschiedenen Erkrankungen wie beispielsweise der diabetischen Retinopathie, der altersbedingten Makuladegeneration, aber auch bei Atherosklerose, rheumatoider Arthritis und nicht zuletzt Tumorerkrankungen neue Therapiemöglichkeiten in Aussicht stellen (20, 44, 62). Eine wichtige Rolle spielen VEGF-A als Hauptantrieb der Angiogenese sowie Semaphorine und ihre Rezeptoren wie beispielsweise VEGF-Rezeptoren und ihre Co-Rezeptoren wie Neuropilin-1 (33, 45).

Es gibt unterschiedliche Formen der Angiogenese; vor allem an der Neovaskularisation von Tumoren lassen sich die verschiedenen Abläufe darstellen (44) (Abbildung 4).

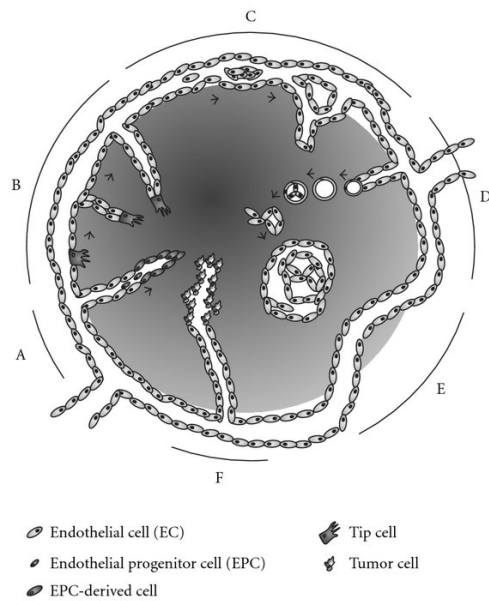


Abb. 4 Die verschiedenen Formen der Angiogenese. Die Neovaskularisation von Tumoren kann auf verschiedenen Arten der Angiogenese basieren. Dabei können einzelne Prozesse sowohl simultan ablaufen als auch ineinander übergehen. A: Neovaskularisation durch die Rekrutierung von Endothelvorläuferzellen aus dem Knochenmark. B: Aussprossende Angiogenese. C: Intussuszeptive Angiogenese. D: Glomeruläre Angiogenese. E: Gefäß-Co-Option. F: vaskuläres Mimikry. Endothelial cell = Endothelzelle; Endothelial progenitor cell = Endothelvorläuferzelle; Tip cell = Spitzenzelle, Tipzelle; Tumor cell = Tumorzelle (44).

Im Folgenden möchte ich die einzelnen Formen der Angiogenese erläutern.

1.2.1 Die aussprossende Angiogenese

Die aussprossende Angiogenese bezeichnet das Aussprossen von Endothelzellen sowie deren Proliferation zur Bildung eines ersten unreifen Gefäßnetzwerkes. Dieses wird nachfolgend in mehreren Schritten in ein reifes und stabiles Netzwerk umgebaut (62). Ausgelöst wird diese Form der Angiogenese beispielsweise durch bestehende Hypoxie und darauffolgend der Ausschüttung verschiedener angiogenetischer Faktoren, die daraufhin die aussprossende Angiogenese fördern (44). Diese Form der Angiogenese besteht aus einer Dynamik der Endothelzellform, -orientierung und -adhäsion und ähnelt somit dem Auswachsen von Axonen, sodass es nicht weiter verwunderlich ist, dass bei beiden Prozessen ähnliche Signalwege aktiviert werden (63).

Grundlegend wachsen neue Gefäße aus, angeführt von den aus bestehenden Gefäßen aussprossenden Spitzenzellen (Tipzellen), die von Stielzellen (Stalkzellen) gefolgt werden (34, 48). Die Spitzenzellen sind hoch migratorische Endothelzellen, von denen

Filopodien in die extrazelluläre Umgebung ausgehen (48). Dem VEGF-Gradienten folgend migrieren die Spitzenzellen in die extrazelluläre Matrix (45). Hinter ihnen beginnen die Stielzellen zu proliferieren und bilden strangförmige Strukturen, die sich nachfolgend zu endothelialen Röhren umbilden, welche nach und nach miteinander anastomosieren und so den Blutfluss ermöglichen (44). Eine Schlüsselrolle in der Regulation der entstehenden Aussprossungen mit den unterschiedlichen Zellen spielt der Notch-Signalweg mit dessen Liganden delta-like 4 (Dll4) und jagged 1 (Jag1) sowie dessen Rezeptoren (20). Die Expression von Dll4 in den Spitzenzellen führt zu einer Aktivierung von Notch in den angrenzenden Endothelzellen. Dies wiederum supprimiert den Spitzenzell-Phänotyp, reguliert die Expression der VEGF-Rezeptoren herunter und fördert den Stielzell-Phänotyp (1, 20, 51). Die Dll4-Expression supprimiert die Differenzierung zu Spitzenzellen wohingegen das von Stielzellen ausgeschüttete Jag1 pro-angiogenetische Aktivität besitzt, indem Jag1 in den angrenzenden Spitzenzellen Notch antagonisiert (1, 15, 51) (Abbildung 5).

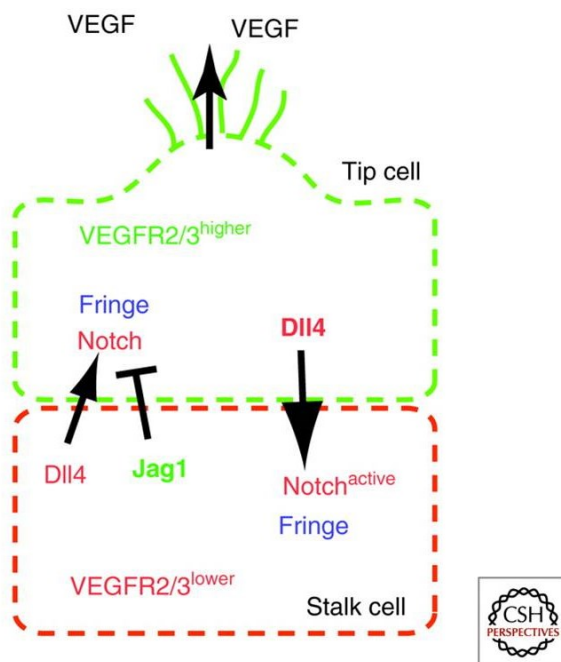


Abb. 5 Überblick über den Notch-Signalweg in den Spitzenzellen und Stielzellen. In den Spitzenzellen findet sich eine hohe Expression von Dll4, dieses aktiviert Notch in den angrenzenden Stielzellen. Jagged 1 wird daraufhin stark in den Stielzellen exprimiert und hemmt den Dll4-Notch-Signalweg in den Spitzenzellen. Da Notch die VEGF-Rezeptor Expression negativ reguliert ist konsekutiv die höchste zelluläre Antwort auf VEGF in den Spitzenzellen zu erwarten. Tip cell = Spitzenzelle; Stalk cell = Stielzelle; Notch^{active}= aktiviertes Notch; VEGFR2/3^{higher}=hohe Expression der VEGF-Rezeptoren 2 und 3; VEGFR2/3^{lower}= geringe Expression der VEGF-Rezeptoren 2 und 3 (1).

Neben dem Notch-Signalweg gibt es weitere Regulatoren, die in den Spitzenzellen und Stielzellen die Angiogenese beeinflussen (Abbildung 6). Die Bildung von Spitzenzellen wird durch die von VEGF oder TGF β 1 aktivierten Neuropilin-Rezeptoren gefördert (51, 63); wahrscheinlich über die Aktivierung des ERK- und des p38-Signalweges (48). Weiterer positiver Regulator des Spitzenzell-Status ist beispielsweise die Glykolyse, die vermehrt in den Spitzenzellen stattfindet, gefördert durch das Enzym Phosphofruktokinase-2/Fruktose-2,6-Bisphosphatase (51). Daneben gibt es einige den Spitzenzellstatus supprimierende Regulatoren. Mehrere Klasse 3 Semaphorine inhibieren die endotheliale Zellproliferation sowie den Spitzenzellstatus wie beispielsweise SEMA3A, welches signifikant die Anzahl und die Länge der Filopodien beeinflusst (45).

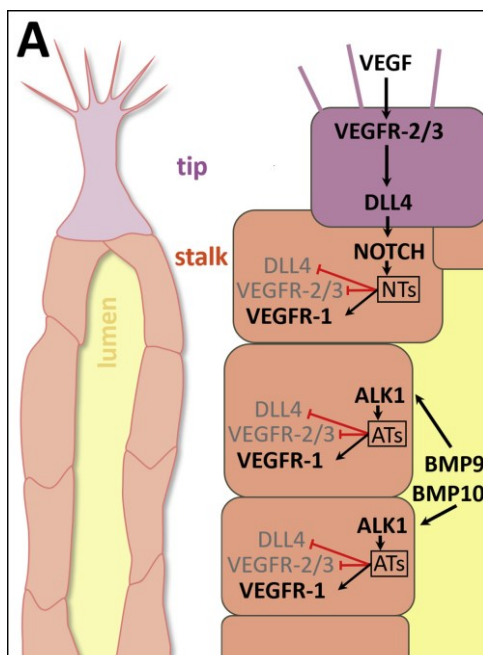


Abb. 6 Weitere Signalwege in der aussprossenden Angiogenese. Dargestellt werden weitere Signalwege, die den Phänotyp der Spitzenzelle bzw. Stielzelle beeinflussen. Wie bereits beschrieben wird durch die Expression von Dll4 in den Spitzenzellen Notch in den Stielzellen aktiviert, welches die VEGF-Rezeptoren 2/3 herunterreguliert sowie deren Antagonist VEGF-Rezeptor 1 hochreguliert. Weiter von der Spitze der Aussprossung entfernte Stielzellen werden von BMP9 und BMP10, die im Plasma zirkulieren, erreicht und aktivieren dort ALK1 mit einem ähnlichen Ergebnis wie der Notch-Signalweg. Tip= Spitzenzelle; Stalk= Stielzelle; lumen = Gefäßlumen; NTs = von Notch adressierte Transkriptionsfaktoren; ATs= von ALK1 adressierte Transkriptionsfaktoren (51).

Nachfolgend findet ein Umbau des unreifen Gefäßnetzes in ein hierarchisch strukturiertes Netzwerk sowie die Differenzierung in Arterien, Venen und Kapillaren statt (20, 24).

1.2.2 Die Gefäß-Co-Option

Wenn maligne Zellen initial in der Nähe und an den bereits existierenden Mikrogefäßen entlangwachsen und so das Gefäßsystem des Wirts zu ihrem eigenen Vorteil nutzen, nennt man dies Gefäß-Co-Option (44). Im Verlauf wird auch bei dieser Form der Angiogenese das Wachstum neuer Gefäße für den Tumor unterstützt (44).

1.2.3 Die intussuszeptive Angiogenese

Die intussuszeptive Angiogenese ist eine Form der Neovaskularisation, die kaum von der Proliferation oder der Migration von Endothelzellen abhängig ist. Dies macht die intussuszeptive Angiogenese ökonomischer sowie schneller als die aussprossende Angiogenese (44). Zuerst bilden sich innerhalb bestehender Gefäße kleine aus Endothelzellen bestehende Pfeiler ausgehend von der Gefäßwand. Diese Pfeiler breiten sich immer weiter aus bis sie das bestehende Gefäßlumen in zwei Lumina aufteilen. Anschließend findet der Umbau in ein strukturiertes, funktionelles Gefäßnetzwerk statt (37).

1.2.4 Die glomeruloide Angiogenese

Die glomeruloide Angiogenese findet sich gehäuft in sehr aggressiven Tumoren und stellt eher einen Umbauvorgang dar als eine richtige Form der Angiogenese. Dabei bilden sich komplexe vaskuläre Strukturen, die glomeruloide Körper genannt werden. Diese bestehen aus verschiedenen kleinen Gefäßen, die eingehüllt sind von einer Basalmembran. Die proliferierenden Tumorzellen leiten Kapillaren aus der Umgebung in den Tumorknoten und bilden so die sogenannten glomeruloiden Körper (14).

1.2.5 Das vaskuläre Mimikry

Das vaskuläre Mimikry ist vor allem bei aggressiven Melanomen bekannt. Dort bildet der Tumor flüssigkeitsgefüllte Kanäle, die Gefäßen ähneln, jedoch keine Wand aus Endothelzellen besitzen. Diese Kanäle erlauben eine von der Angiogenese unabhängige

Perfusion des Tumors (39). Es gibt zwei Formen des vaskulären Mimikry: den tubulären Typ und den gemusterten Typ (44).

1.3 Proteine aus Schlangengiften

Schlangengifte enthalten viele verschiedene Proteine mit teils sehr unterschiedlichen Effekten bei einer Vergiftung (3). Oft haben die enthaltenen Proteine Effekte auf die Thrombozytenaggregation und die Blutgerinnung (60). Daher kann eine Erforschung von Schlangengiften der Entwicklung von Medikamenten, die in die Blutgerinnung eingreifen, dienen (2, 58). Häufige Bestandteile der Gifte sind Disintegrine, Proteasen, VEGF ähnliche Proteine, sowie C-typ-lectinartige Proteine (17). Die in vielen Schlangengiften enthaltenden Disintegrine sind natürliche Inhibitoren der Interaktion von Integrinen mit ihren Liganden und haben ihr Ziel häufig in der Integrin-vermittelten Thrombozytenadhäsion an Fibrinogen und Kollagen in der Blutgerinnung (15). Die C-typ-lectinartigen Proteine (CLPs) gehören zu einer großen Superfamilie und wirken unter anderem auch als Integrin-Inhibitoren (3, 65). Die Mitglieder dieser CLP-Familie teilen sich eine charakteristische Struktur, bestehend aus zwei homologen Untereinheiten, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind (2, 17). Die CLPs aus Schlangengiften wirken auf verschiedene physiologische Signalwege in der Hämostase (2). Wichtige Ziele der CLPs sind Rezeptoren auf Thrombozyten wie die Glykoprotein Ib-Untereinheit (GPIb) des von Willebrand Faktor-Rezeptors (vWF-Rezeptor), Integrin $\alpha_2\beta_1$ oder das Glykoprotein VI (42).

1.4 Rhodocetin

Die Malaienmokasinotter (*Calloselasma rhodostoma*) ist eine bedeutende Giftschlange, die in Südostasien beheimatet ist (58). Ihr Gift ist sehr toxisch aber auch nutzbringend in der Entwicklung und Entdeckung neuer Medikamente (58). Die Zusammensetzung des Giftes von *Calloselasma rhodostoma* ist mittlerweile entschlüsselt, es enthält mehrere große Proteingruppen von denen die zweitgrößte die C-typ-lectinartigen Proteine darstellen. Von diesen gibt es zwei Proteine mit gegensätzlichen Wirkungen: den Thrombozytenaggregationsförderer Rhodocytin sowie den 1999 gleichzeitig von Wang *et al.* und Eble *et al.* isolierten Thrombozytenaggregationshemmer Rhodocetin (15, 53, 58, 60). Insgesamt macht Rhodocetin 18,61% des Giftes von *Calloselasma rhodostoma* aus (58).

1.4.1 Die Struktur von Rhodocetin

Zuerst wurde Rhodocetin als Heterodimer angesehen (2, 60), mittlerweile haben Eble *et al.* gezeigt, dass Rhodocetin aus vier homologen Untereinheiten $\alpha\beta\gamma\delta$ besteht, welche sich zu den zwei Heterodimeren $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ zusammenlagern (10, 17, 58). Die zwei Heterodimere $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ ordnen sich so an, dass insgesamt eine kreuzförmige Struktur des Tetramers Rhodocetin entsteht (16, 17) (Abbildung 7).

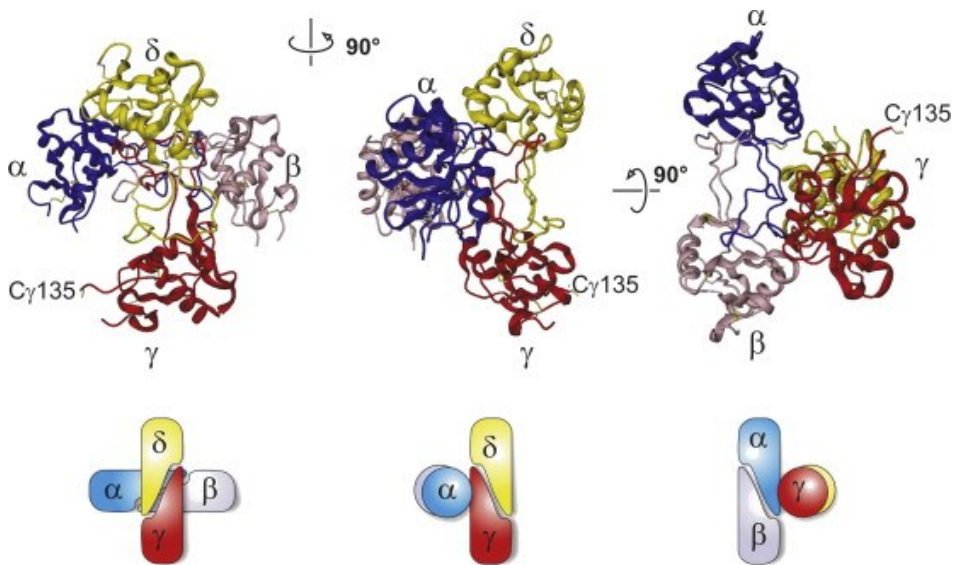


Abb. 7 Die kreuzförmige Struktur von Rhodocetin aus unterschiedlichen Blickwinkeln. Die vier Ketten α (blau), β (grau), γ (rot) und δ (gelb) bilden die beiden Untereinheiten $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$, welche sich kreuzförmig zum Tetramer zusammenlagern. Oben ist die Tertiärstruktur dargestellt, unten eine schematische Abbildung (17).

Die Bindungsstelle zwischen den beiden Untereinheiten $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ wird gebildet durch elektrostatische Interaktionen zwischen der α - und der γ -Kette (10, 17) welche durch sich gegenseitig austauschende Schleifen wie ineinandergreifende Finger zu Stande kommen (17). Rhodocetins native Konformation wird stabilisiert durch Disulfidbrücken, die wesentlich für die inhibitorische Aktivität verantwortlich sind (15). Neben Rhodocetin sind nur Agglucetin und Alboaggregin-A tetramere CLPs (17). Die Ligandenbindung an Rhodocetin verändert dessen quartäre Struktur: Durch die Bindung an Integrin $\alpha_2\beta_1$ wird die $\alpha\beta$ -Untereinheit freigegeben und kann daraufhin eigenständig agieren (10) (Abbildung 8). Nach der Dissoziation von Rhodocetin $\alpha\beta$ sind beide Heterodimere hydrophil, jedoch ist die $\alpha\beta$ -Untereinheit signifikant besser löslich als die $\gamma\delta$ -Untereinheit (16). Als Tetramer besitzt Rhodocetin einen ungepaarten Cysteinrest,

der es ermöglicht eine kovalente Bindung einzugehen, sodass ein supramolekularer Komplex aus zwei Molekülen entsteht (17).

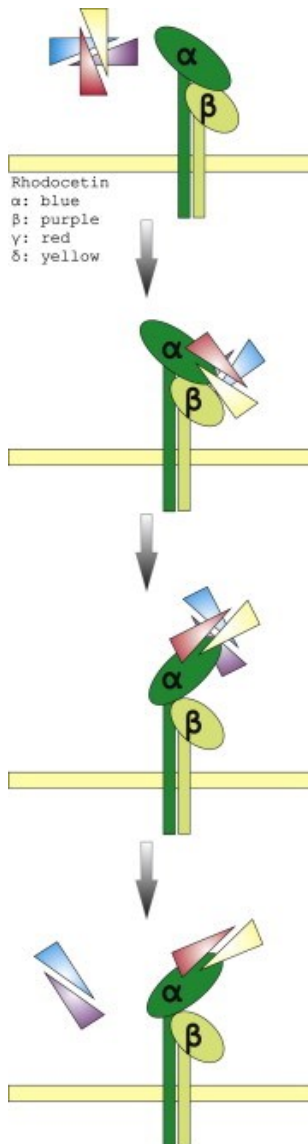


Abb. 8 Änderung der Quartärstruktur durch Ligandenbindung. Das Rhodocetin Tetramer bindet an das Integrin $\alpha_2\beta_1$ mit der $\gamma\delta$ -Untereinheit. Es kommt zu einer Konformationsänderung (16) und damit zur Dissoziation der $\alpha\beta$ -Untereinheit während die $\gamma\delta$ -Untereinheit weiterhin an das Integrin gebunden bleibt. Die α -Kette ist in blau, die β -Kette in lila, die γ -Kette in rot und die δ -Kette in gelb dargestellt (2).

1.4.2 Die bekannten Wirkungen von Rhodocetin

Da nach der Ligandenbindung an die $\gamma\delta$ -Untereinheit die $\alpha\beta$ -Untereinheit dissoziiert und eigene Signalkaskaden anstößt, sollen im Folgenden die Funktionen der beiden Heterodimere nacheinander beschrieben werden (43). Auch das Tetramer als Ganzes kann die gleichen Wirkungen auslösen, häufig jedoch in einer anderen Stärke als das isolierte Heterodimer (17, 42).

Die $\gamma\delta$ -Untereinheit von Rhodocetin kann an das Integrin $\alpha_2\beta_1$ spezifisch binden und dieses inhibieren (2, 16, 18, 42). Dabei kann das Heterodimer sowohl an die isolierte Bindungsstelle als auch an zellgebundenes Integrin $\alpha_2\beta_1$ binden und daraufhin die Dissoziation des Tetramers initiieren (10). Viele Disintegrine benötigen eine RGD-Sequenz um an Integrine binden zu können, Rhodocetin jedoch gehört zu der kleinen Gruppe der RGD-unabhängigen Disintegrine (15). Die $\gamma\delta$ -Untereinheit von Rhodocetin bindet über die Integrin α_2 A-Domäne an die inaktive Konformation des Integrins $\alpha_2\beta_1$ (2, 6). Daraufhin findet eine Konformationsänderung des Rhodocetin-Tetramers statt, wodurch die $\alpha\beta$ -Untereinheit freigesetzt wird und das $\gamma\delta$ -Heterodimer so an die α_2 A-Domäne gebunden bleibt, sodass das Integrin $\alpha_2\beta_1$ in der inaktiven Konformation bleibt und die Bindungsstelle von Kollagen blockiert ist (16). Interessanterweise bindet das Rhodocetintetramer schneller an die α_2 A-Domäne als die $\gamma\delta$ -Untereinheit allein. Die $\alpha\beta$ -Untereinheit beschleunigt die Bildung des Komplexes mit dem Integrin $\alpha_2\beta_1$, dissoziiert und lässt die $\gamma\delta$ -Untereinheit mit einer sehr geringen Dissoziationsgeschwindigkeit zurück, sodass eine fast irreversible Hemmung des Integrins $\alpha_2\beta_1$ erfolgt (10). Durch die Inhibierung von Integrin $\alpha_2\beta_1$ verhindert Rhodocetin die Integrin-vermittelte Zellmotilität auf Kollagen I (18, 19). Da Integrin $\alpha_2\beta_1$ der wesentliche Kollagenrezeptor auf Thrombozyten ist, ist die Inhibierung des Integrins durch die $\gamma\delta$ -Untereinheit von Rhodocetin verantwortlich für eine fehlende kollageninduzierte Thrombozytenaktivierung (15, 42). Auch andere Funktionen von dem Integrin $\alpha_2\beta_1$ werden durch Rhodocetin inhibiert wie beispielsweise die Zelladhäsion, die Migration auf Kollagen und die Kontraktion von Kollagengelen (18). So kann die Invasion von Fibrosarkomzellen in einer Matrix aus Kollagen I durch Rhodocetin effizient blockiert werden (18). Außerdem wird die Produktion der Matrixmetalloproteinase 1 (MMP-1) hochreguliert durch die $\gamma\delta$ -Untereinheit (18). Neben Rhodocetin ist auch von EMS 16 aus *Echis multisquamatus*, VP12 aus *Vipera palestina* und von Jararhagin aus *Bothrops jararaca* bekannt, dass sie an Integrin $\alpha_2\beta_1$ binden können (3, 10, 17, 19).

Die $\alpha\beta$ -Untereinheit von Rhodocetin kann zwar auch an das Integrin $\alpha_2\beta_1$ binden, jedoch viel schwächer als die $\gamma\delta$ -Untereinheit (17). Das $\alpha\beta$ -Heterodimer kann jedoch

auf einem anderen Weg die Blutgerinnung beeinflussen, indem es an das Glykoprotein Ib auf der Oberfläche von Thrombozyten bindet und so die Thrombozytenaggregation durch den von Willebrand Faktor (vWF) inhibiert (2, 42). Die Aktivierung der Thrombozyten über GPIb ist wichtig für die physiologische Hämostase und auch für die pathologische Thrombose, jedoch bis jetzt nicht vollständig verstanden. Da der vWF über mehrere Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche zur Aktivierung führen kann, sind selektive GPIb-Agonisten und auch selektive GPIb-Antagonisten, wie beispielsweise Rhodocetin $\alpha\beta$, wichtig um die Signalwege von GPIb zu studieren (42).

Neuropilin-1 als neues Ziel für Schlangengiftkomponenten wie Rhodocetin $\alpha\beta$ wurde 2013 von Niland *et. al* beschrieben (43). Von mehreren Wachstumsfaktoren ist bekannt, dass sie mit Neuropilin-1 interagieren können; Rhodocetin $\alpha\beta$ ist das erste Protein aus einem Schlangengift, das an Neuropilin-1 bindet (43). Neben Rhodocetin $\alpha\beta$ kann auch VEGF-A an Neuropilin-1 binden, das daraufhin als VEGF-R2 Co-Rezeptor agiert (43). Infolge der Bindung von Rhodocetin $\alpha\beta$ an Neuropilin-1 fungiert Rhodocetin $\alpha\beta$ als Vermittler und bringt Neuropilin-1 mit cMet in physischen Kontakt woraufhin Tyrosinreste von cMet phosphoryliert werden und auf diesem Wege die Aktivierung von cMet erfolgt. Dies ist eine bedeutende Entdeckung, da vorher HGF als einziger Ligand von cMet und cMet als einziger Rezeptor für HGF postuliert wurden (41). Es gibt verschiedene Integrin-abhängige Zell-Matrix-Kontakte, welche durch unterschiedlichen Aufbau und unterschiedliche Struktur diverse Funktionen der Zelle vermitteln wie beispielsweise die Zelladhäsion, die Migration oder auch den Umbau der extrazellulären Matrix (61). Dabei lassen sich die verschiedenen Fokaladhäsionen zum Beispiel durch das Clustern von Integrinen oder die Phosphorylierung von Bindungspartnern ineinander umwandeln (61). Paxillin befindet sich in linienförmigen Fokaladhäsionen, wird aber nach Phosphorylierung an Y31 umverteilt zu punktförmigen Fokalkontakten. Durch die von Rhodocetin $\alpha\beta$ initiierte Aktivierung von cMet wird Paxillin phosphoryliert und es entstehen punktförmige Fokalkontakte in der Zellperipherie. Weiterhin kommt es zu einem Abbau der Aktin-Stressfasern und es folgt die Bildung eines verzweigten kortikalen Netzwerks aus Aktin in neu gebildeten Lamellipodien. Somit induziert Rhodocetin $\alpha\beta$ über cMet, aber nicht über VEGF-R2, die Motilität von Endothelzellen (43) (Abbildung 9).

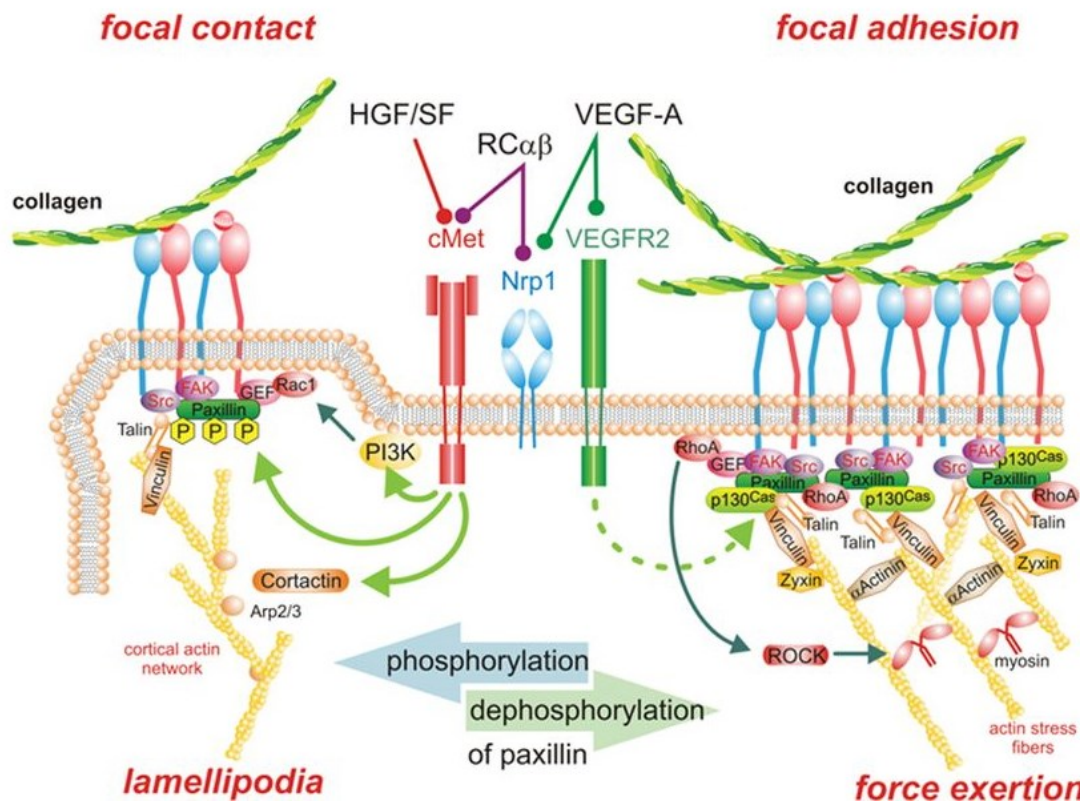


Abb. 9 Schematische Darstellung des von Rhodocetin $\alpha\beta$ aktivierten Signalweges über Neuropilin-1 und cMet. Rhodocetin $\alpha\beta$ sorgt für eine Assoziation der Rezeptoren Neuropilin-1 und cMet, woraufhin letzterer phosphoryliert und somit aktiviert wird. Es folgt die Phosphorylierung von Paxillin, welches zu einer Umstrukturierung der Zell-Matrix-Kontakte führt, indem Fokaladhäsionen abgebaut und dafür Fokalkontakte ausgebildet werden. Der cMet-Inhibitor SU11274 kann die Effekte von Rhodocetin $\alpha\beta$ im Zellmodell umkehren. Neuropilin-1 kann auch als Co-Rezeptor von VEGF-Rezeptor 2 fungieren, dies führt jedoch nicht zu einer Phosphorylierung von Paxillin. focal contact = Fokalkontakt; focal adhesion = Fokaladhäsion; collagen = Kollagen; $RC\alpha\beta$ = Rhodocetin $\alpha\beta$; VEGFR2 = VEGF-Rezeptor 2; Nrp1 = Neuropilin-1; phosphorylation = Phosphorylierung; dephosphorylation = Dephosphorylierung; cortical actin network = kortikales Aktin-Netzwerk; actin stress fibers = Aktin-Stressfasern; lamellipodia = Lamellipodien; force exertion = Kraftausübung (43).

Ausgehend von den verschiedenen bisher bekannten Wirkungen von Rhodocetin $\alpha\beta$ sind mehrere Einsatzmöglichkeiten derselben denkbar. Durch die Inhibition kollagenabhängiger Zelladhäsion sowie der Beeinflussung der Neovaskularisation könnte Rhodocetin eine Rolle in der Behandlung von Tumoren sowie deren Metastasen spielen (2, 9, 49). Ebenfalls könnten die Fibrose und das exzessive Zusammenziehen von Narben durch Medikamente, die anhand von Rhodocetin entwickelt werden, therapeutisch wertvoll sein (18). Durch die vielschichtige Beeinflussung der Blutgerinnung kann Rhodocetin außerdem ein Ausgangspunkt für die Entwicklung antithrombotischer Medikamente sein (2).

1.5 Neuropilin-1

Neuropilin-1 ist ein Transmembranrezeptor, der von Neuronen, Blutgefäßen, Immunzellen und vielen weiteren Zellen von Säugetieren exprimiert wird (12). Er bindet viele strukturell sowie funktionell unterschiedliche Liganden und moduliert damit die Organentwicklung und deren Funktionen (48). Eine wichtige Funktion von Neuropilin-1 ist die Steuerung des Auswachsens der Axone sowie der Blutgefäße vor allem im zentralen Nervensystem (ZNS) (23, 35).

Neuropilin-1 wird von vielen Zellen exprimiert, im Folgenden sollen einige exemplarisch erwähnt werden. In der Retina kommt Neuropilin-1 auf der Zelloberfläche von Mikroglia während der gesamten Entwicklung der Retina vor (12). Ebenfalls wird Neuropilin-1 innerhalb der Retina exprimiert, hier jedoch in der Entwicklung größtenteils innerhalb der inneren Körnerschicht und in der adulten Retina in den inneren Schichten der Retina (25, 33, 36). Darüber hinaus kommen sowohl Neuropilin-1 als auch der VEGF-Rezeptor 2 wahrscheinlich im retinalen Pigmentepithel vor (35). Zusammen mit VEGF-Rezeptoren wird Neuropilin-1 auch von den Endothelzellen der Blutgefäße exprimiert, beispielsweise auch innerhalb der Retina (35, 45). Innerhalb der Blutgefäße scheint die Expression von Neuropilin-1 vermehrt in den arteriellen Gefäßen sowie in den Filopodien der Spitzenzellen zu sein (12, 23, 34, 45). Auch bei Erkrankungen des Auges mit der Bildung von Neovaskularisationen sowie von manchen Tumoren, wie beispielsweise dem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom, wird Neuropilin-1 exprimiert und stellt damit einen möglichen Angriffspunkt zur Erprobung neuer Therapien dar (34). Neben dem zellgebundenen Neuropilin-1 Rezeptor gibt es auch lösliches Neuropilin-1, welches von Zellen der Leber und der Niere exprimiert wird (48).

Neuropilin-1 besteht aus einer großen extrazellulären Domäne, einer kurzen transmembranösen Domäne sowie einer intrazellulären Domäne (23) (Abbildung 10). Die zytoplasmatische Domäne von Neuropilin-1 rekrutiert die intrazellulären Proteine zur Signalvermittlung und ist ebenfalls zuständig für die Homo- bzw. Heterodimerisierung mit Neuropilin-2 (48). Die extrazelluläre Domäne von Neuropilin-1 ist unterteilt in die beiden Unterdomänen a1a2 und b1b2 (11, 34).

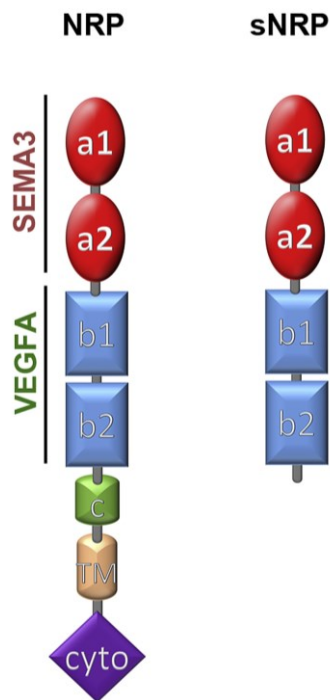


Abb. 10 Struktur von Neuropilin-1 sowie des löslichen Neuropilin-1-Rezeptors. Schematische Darstellung des Aufbaus von Neuropilin-1 sowie seiner löslichen Form. Die extrazelluläre Domäne besteht aus zwei Unterdomänen. An die a1a2 Unterdomäne können Semaphorine der Klasse 3 binden, an die b1b2 Unterdomäne VEGF-A. NRP = Neuropilin-1; sNRP = lösliches Neuropilin-1; c = MAM-Domäne; TM = transmembranöse Domäne; cyto = zytoplasmatische Domäne; SEMA 3 = Semaphorin Klasse 3 (48).

Die beiden Unterdomänen der extrazellulären Domäne vermitteln die Bindung diverser Liganden an Neuropilin-1 (22, 48). An die a1a2-Domäne binden Semaphorine der Klasse 3, die b1b2-Domäne bindet an den C-Terminus von VEGF-A (43, 48). Zusätzlich kann die b1b2-Domäne weitere Substrate binden wie HGF, den Fibroblasten Wachstumsfaktor (FGF), TGF β 1 sowie die, die Zelladhäsion vermitteln (12, 48, 52). Auch ist es möglich, dass SEMA3A und VEGF165 gleichzeitig an Neuropilin-1 binden (11). An die b1b2-Unterdomäne kann neben VEGF-A auch die $\alpha\beta$ -Untereinheit von Rhodocetin binden (43).

Aufgrund der Tatsache, dass an Neuropilin-1 eine Vielzahl unterschiedlicher Liganden binden können, können unterschiedliche Funktionen durch Neuropilin-1 vermittelt werden (48). Im Folgenden sollen nun einige wichtige Signalkaskaden benannt werden. Die an Neuropilin-1 bindenden Semaphorine der Klasse 3 induzieren die Assoziation von Neuropilin-1 mit einem Plexin-Rezeptor, woraufhin GTPasen aktiviert werden und das Zytoskelett der Zelle sowie die Zelladhäsion verändert werden (33, 48, 63). In

Neuronen werden über SEMA3A und Neuropilin-1 die neuronale Migration, das Auswachsen der Axone und die Entwicklung der Dendriten gesteuert (48). Durch die Aktivierung von Neuropilin-1 durch SEMA3A werden die endothelialen Schlussleisten (Tight junctions) gelöst mit der Folge eines vasogenen Ödems (11, 48). Dies ist beispielsweise relevant in frühen Stadien von Diabetes mellitus bei dem dadurch die innere Blut-Retina-Schranke zerstört wird (11, 34). Weiterhin vermittelt SEMA3A über Neuropilin-1 antiangiogene Effekte indem die Länge sowie die Anzahl der Filopodien verringert werden (45). Auch von SEMA3C sind starke antiangiogene Funktionen bekannt, SEMA3C inhibiert die Bildung von röhrenähnlichen Strukturen aus Endothelzellen sowie von neuen Aussprossungen (63).

Die Familie der Neuropiline, zu der auch Neuropilin-1 zählt, sind Rezeptoren für VEGF und können auch als Co-Rezeptoren für VEGF-Rezeptoren fungieren (25). Dadurch und durch die verschiedenen Isoformen von VEGF kann eine hohe Komplexität und Vielseitigkeit der VEGF-Signalwege erreicht werden (48). VEGF induziert die Bildung eines Komplexes durch die Bindung an Neuropilin-1 und VEGF-R2 (34). Durch die Bindung von VEGF-A₁₆₅ an Neuropilin-1 wird die Affinität von VEGF-A₁₆₅ zum VEGF-Rezeptor 2 gesteigert (11, 22, 35). Über diesen Komplex kann VEGF viele Funktionen vermitteln, wie beispielsweise in der (pathologischen) Angiogenese (22, 48).

Auch mit den TGF β -Rezeptoren 1 und 2 kann Neuropilin-1 einen Komplex bilden, dies sogar unabhängig von TGF β 1. In Studien mit Brustkrebszellen konnte gezeigt werden, dass Neuropilin-1 die TGF β -abhängige Phosphorylierung von SMAD2 reduzieren kann und so das Signal von TGF β positiv regulieren kann (48). Demgegenüber supprimiert Neuropilin-1 in Endothelzellen die Signale von TGF β und führt so in der Angiogenese zu einer Förderung der Bildung von Spitzenzellen (48).

Wie unter 1.5.1 bereits ausführlich dargestellt, zeigten Niland *et al.* eine Beteiligung von Neuropilin-1 im Signalweg von HGF und cMet, infolge derer die Zelladhäsion beeinflusst wird (43).

Neben den genannten Signalwegen, in denen Neuropilin-1 eine Rolle spielt, ist Neuropilin-1 für weitere Funktionen zuständig, auf die nicht weiter eingegangen werden soll (48).

Die Erkenntnisse über Neuropilin-1 und seine Funktionen könnten eine Rolle in der Therapie von Tumorerkrankungen spielen. Beispielsweise konnte von Pan *et al.* gezeigt werden, dass Antikörper, die gegen Neuropilin-1 gerichtet sind, die Therapie von Tumoren mit VEGF-Antikörpern deutlich verbessern können (22, 46). Ein weiterer wichtiger zukünftiger Einsatzbereich sind Erkrankungen des Auges mit auftretender Neovaskularisation wie bei der proliferativen diabetischen Retinopathie, der altersabhängigen Makuladegeneration und der Frühgeborenenretinopathie (12, 35).

1.6 cMet

Der von Epithelzellen exprimierte Rezeptor cMet bindet den Wachstumsfaktor HGF, welcher invasives Wachstum induzieren kann (59). Während der Gewebereparatur oder auch der Krebsinvasion wird über verschiedene Zytokine die Expression von HGF in Fibroblasten und Makrophagen sowie die Expression von cMet in Epithelzellen gefördert (59). Durch die Interaktion von cMet mit verschiedenen signalmodifizierenden Proteinen können sehr unterschiedliche Wirkungen durch cMet erreicht werden (59). Ausgehend von cMet kann durch HGF sowohl die MAPK-Signalkaskade, die PI3K-Akt-Signalkaskade, der STAT-Signalweg sowie die I κ B α -NF κ B-Komplex-Kaskade aktiviert werden (21, 47, 54, 66). Durch diese unterschiedlichen Signalkaskaden vermittelt HGF wichtige Funktionen wie beispielsweise den Gewebeumbau, die Wundheilung, die Organhomöostase, die Metastasierung von Krebs, die Entwicklung der Leber und die Regeneration von geschädigten Nieren (59).

1.7 Ziele der Arbeit

Seit einiger Zeit ist bekannt, dass die Schlangengiftkomponente Rhodocetin unterschiedliche Wirkungen über seine beiden Untereinheiten $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ entfaltet, wobei letztere zunächst im Fokus des Interesses stand. Kürzlich wurde jedoch von Niland *et al. in vitro* ein Signalweg der $\alpha\beta$ -Untereinheit über Neuropilin-1 und cMet nachgewiesen (43). Neuropilin-1 erfüllt vielfältige Funktionen im Bereich Angiogenese – in physiologischer wie pathologischer, im Auge wie in Tumoren (34). Ein *in vivo*-Nachweis des Signalwegs stand zum Beginn dieser Arbeit noch aus. An einem etablierten Modell für Angiogenese (20, 27, 51) sollte im Rahmen dieser Arbeit Rhodocetin intravitreal injiziert und die Auswirkungen auf die Bildung der Gefäßschichten gezeigt werden.

In Abhängigkeit von den entstehenden Auswirkungen von Rhodocetin $\alpha\beta$ auf die Angiogenese der Retina sollten die Veränderungen charakterisiert und beschrieben werden. Nachfolgend sollten mögliche Auswirkungen der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ auf die Gefäßarchitektur anhand der Anzahl an Verzweigungspunkten und der durch das Gefäßsystem bedeckten Fläche geprüft werden. Auch sollte die Angiogenese der Retina anhand der Anzahl an Filopodien sowie der Geschwindigkeit des Auswachsens der angiogenetischen Front untersucht werden. Daneben sollte der von Niland *et al. in vitro* entdeckte Signalweg von Rhodocetin $\alpha\beta$ über Neuropilin-1 und cMet mittels des cMet-Inhibitors SU11274 *in vivo* bestätigt werden, oder aber der davon abweichende Signalweg von Rhodocetin $\alpha\beta$ in der Angiogenese der Retina bestimmt werden. Dies sollte durch Immunhistochemie der vermutlich beteiligten Proteine (Neuropilin-1, cMet, Paxillin, Y31-Phosphopaxillin) sowie quantitative PCR (Neuropilin-1, cMet, VEGF-R2) erreicht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden Mäuse der Linie C57 Black 6 J genommen, die im Tierstall des Forschungslabors der Klinik für Augenheilkunde am Universitätsklinikum Münster gehalten wurden. Die Tiere entstammen entweder der Zucht von der Firma Charles River oder aus der Zucht des Tierstalls der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung

des Universitätsklinikums Münster. Die Mäuse wurden tiergerecht in individuell ventilerten Käfigen (Tecniplast SmartFlow) gehalten zu maximal vier ausgewachsenen Tieren pro Käfig. Die Raumtemperatur betrug 20 Grad Celsius und es gab einen Dunkel-Hell-Rhythmus von 12 Stunden.

Die Fütterung erfolgte selbstständig durch die Tiere. Das Futtermittel (Haltungsdiät für Ratten/Mäuse, Altromin Spezialfutter GmbH) wurde regelmäßig kontrolliert, in jedem Käfig aufgefüllt und war jederzeit für die Tiere durch ein Gitter zu erreichen. Ebenso erfolgte die Versorgung der Tiere mit vorgereinigtem Wasser, welches für die Mäuse durch eine Tränke jederzeit erreichbar war.

Zur Verpaarung der Tiere wurden zwei Weibchen mit einem Männchen in einem separaten Käfig gehalten, wobei nach fünf Tagen das Männchen von den Weibchen getrennt wurde. Wöchentlich wurde bei den Weibchen das Gewicht gemessen; bei einer Zunahme von mindestens einem Gramm in der ersten Woche konnte von einer erfolgreichen Verpaarung ausgegangen werden und das Weibchen wurde fortan in einem Einzelkäfig gehalten. Stellte sich keine Gewichtszunahme dar wurde das Weibchen zurück in seinen Standardkäfig gesetzt. Nach 21 Tagen nach der erfolgreichen Verpaarung konnte mit einem Wurf von zwei bis zwölf Jungtieren gerechnet werden. Die Jungtiere wurden nur zur intravitrealen Injektion von dem Muttertier getrennt. Nach der Tötung der Jungtiere wurde das Muttertier zurück in seinen Standardkäfig gesetzt.

Die Versuche wurden unter der Verantwortung von Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Peter Heiduschka entsprechend der Gesetzgebung durchgeführt und protokolliert und durch das Regierungspräsidium Münster genehmigt (siehe Anhang).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden 162 Tiere zur Injektion benötigt.

2.2 Intravitreale Injektion

Die intravitreale Injektion wurde nach Narkotisierung der Jungtiere durchgeführt. Injiziert wurden insgesamt 253 nl mit einer Konzentration von 24,8 µg/ml der αβ-Untereinheit von Rhodocetin bei einem ungefähren Glaskörpervolumen von Jungtieren an P5 von 1 µl und einer erwünschten Konzentration von 6,2 µg/ml nach der Injektion

im Glaskörper. Zur Überprüfung des vermuteten Signalweges wurde der cMet-Inhibitor SU11274 (Selleckchem) in einer Konzentration von 1 nM in Kombination mit Rhodocetin und als Negativkontrolle ohne Rhodocetin injiziert.

2.2.1 Instrumente und Material

Zur Injektion wurde der Nanoject II (Drummond Scientific) in Verbindung mit gezogenen Glaskapillaren verwendet. Die Glaskapillaren wurden zunächst mittels einer 1ml fassenden Omnifix-Spritze (Braun) mit Mineralöl (Sigma-Aldrich) vollständig gefüllt. Nach fast vollständiger Entleerung konnte die zu injizierende Substanz aufgezogen werden und war bereit zur Injektion. Die Injektion wurde unter Zuhilfenahme des Mikroskops Leica M165C (Leica Microsystems) bei einer zweifachen Vergrößerung durchgeführt. Da die Lider bei Jungtieren vor P11 noch nicht geöffnet sind (32), wurde zur Präparation eine Skalpellklinge Nr. 11 (Feather) sowie feines Präparierbesteck, bestehend aus Pinzetten (Inox - Electronic) und einer Kanüle mit 30G (BD Microlance 3) verwendet.

2.2.2 Anästhesie der zu injizierenden Jungtiere

Mithilfe des Fluovac Systems für Mäuse (Harvard Apparatus) wurden die Tiere mit 3% Isofluran (Forene 100%, AbbVie) in reinem Sauerstoff (Westfalen AG) bei 1l/min O₂ über eine Anästhesiemaske für Mäuse (Harvard Apparatus) anästhesiert. Als Lokalanästhetikum wurden Proparacain-POS 0,5% Augentropfen (Ursapharma) verwendet. Die Tiere wurden nach der Anästhesie und vor der Injektion, sowie nach der Injektion bis zum Nachlassen der Anästhesie auf der Wärmeplatte Eco 4 Silver (Lauda) bei 37 Grad Celsius vor dem Auskühlen geschützt. Während des Eingriffes wurden die Jungtiere auf der ThermoLux-Wärmeunterlage (Witte + Sutor GmbH) bei 35-40 Grad Celsius unter dem Mikroskop warmgehalten.

2.2.3 Ablauf der Injektion

Nach der Anästhesie der Versuchstiere sowie der Vorbereitung des Nanoject II wurde die Glaskapillare durch die Funktion „empty“ fast vollständig entleert und daraufhin mit der Injektionslösung aufgefüllt.

Dem Jungtier wurde, auf der ThermoLux-Wärmematte und unter dem Mikroskop liegend, nach Sicherstellung einer ausreichenden Anästhesie mit einer Skalpellklinge die noch geschlossene Lidspalte geöffnet. Mit den Pinzetten wurden die beiden Lider ekstropioniert und das Auge luxiert. Durch die Kanüle wurde die Einstichstelle für die Glaskapillare geschaffen, indem temporal der Cornea in den Glaskörper gestochen wurde. Anschließend wurde die Glaskapillare in den Glaskörper eingeführt und die Injektionslösung injiziert. Nach der Injektion wurde die Glaskapillare für ca. 5 sec im Glaskörper belassen, um den Reflux an Injektionslösung nach Entfernen der Kapillare möglichst gering halten zu können. Das Auge wurde wieder in seine Ausgangslage gebracht und die Lidränder wurden adaptiert. Im Anschluss folgte die Injektion am anderen Auge.

2.2.4 Wundversorgung und Markierung der injizierten Tiere

Nach erfolgter intravitrealer Injektion wurden die Lidränder mit einem Tropfen Gent-Ophtal Augentropfen 5mg/ml (Dr. Winzer Pharma) benetzt und die injizierte Maus wurde durch ein Abschneiden der distalen 2 mm des Schwanzes markiert, da die Ohren sich noch nicht für eine sichere Ohrmarkierung eigneten. Dies geschah mit einer feinen Präparierschere (Hermle). Nach dem Abklingen der Anästhesie wurden die Jungtiere zurück zu ihrer Mutter gesetzt.

2.2.5 Tötung der Jungtiere und Entnahme der Augen

24 Stunden nach der Injektion wurden die markierten Jungtiere sowie die nicht markierten Kontrolltiere getötet durch Dekapitation mit einer groben Präparierschere (Hermle).

Mittels einer feinen Präparierschere (Hermle) wurden zwei Schnitte in der Verlängerung der Lidfalte zu beiden Seiten gesetzt. Die Haut über dem Lid wurde gerafft und die dadurch entstehenden Falten abgeschnitten. Das Auge konnte nun luxiert werden und mit einer gebogenen Präparierschere (Hermle) vorsichtig herausgetrennt und je nach nachfolgendem Protokoll in das jeweilige Konservierungsmedium überführt werden.

2.3 Immunhistochemie und Fluoreszenzmikroskopie

Durch die Immunhistochemie und Fluoreszenzmikroskopie können spezifische Proteine von Zellen dargestellt werden. Dazu wurde ein Primärantikörper, der gegen eine Sequenz des spezifischen Proteins gerichtet ist, mit einem Sekundärantikörper gekoppelt, der gegen die Spezies des Primärantikörpers gerichtet ist und seinerseits an einen fluoreszierenden Farbstoff gebunden ist.

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden zwei unterschiedliche Mikroskope verwendet, das Konfokale Mikroskop für die Detailaufnahmen jeweils um die Arterien und Venen sowie in der Peripherie und das Standardmikroskop für die Übersichtsaufnahmen. Erstere wurden als Stack aufgenommen in 25facher Vergrößerung. Letztere wurden in 4facher Vergrößerung und bei 60ms Belichtungszeit aufgenommen und mittels der Software GIMP2.8.16 zu einem Übersichtsbild zusammengefügt.

2.3.1 Geräte und Material

Konfokales Mikroskop LSM 700 Imager M2 (Zeiss)

Mikroskop Augenklinik EVOS fl AMG (Thermo Fisher Scientific)

Präpariermikroskop Leica M165C (Leica Microsystems)

Pipetten Research Plus (Eppendorf)

Pipettenspitzen (Sarstedt AG)

2ml und 1,5ml fassende Safe Lock Tubes (Eppendorf)

Accu-jet pro Pipettierhelfer (Brand)

Schütteltisch Skyline Shaker DRS 12 (Elmi Ltd.)

Einweg-Pasteurpipetten 3ml (ratiolab)

Feine Präparierpinzetten (Hermle)

Feine Präparierschere (Hermle)

Gelbe Kanüle 30G (Braun)

Petrischalen (633181, Greiner Bio-One)

Objektträger Starfrost Advanced Adhesive (Engelbrecht)

Deckgläser 24x50mm (AutomatStar)

Fluoromount-G (SouthernBiotech)

10fach PBS:

80g NaCl (Sigma-Aldrich)

2g KCl (Sigma-Aldrich)

14,4g Na₂HPO₄ (Sigma-Aldrich)

2,4g KH₂PO₄ (Carl Roth GmbH)

In 1 Liter destilliertem Wasser, pH=6,8

10fach TBS:

250mM Trizma-hydrochlorid (Sigma-Aldrich)

1,25M NaCl (Sigma-Aldrich), pH=7,6

4%iges PFA:

5g Paraformaldehyd (Carl Roth)

125ml PBS

50µl 5M NaOH (Sigma-Aldrich)

18,75µl 37% HCl (Sigma-Aldrich)

Blocking buffer:

1% BSA (Sigma LifeScience)

0,3% des 10%igen Triton X 100 (AppliChem)

gelöst in PBS

Pblec:

0,1 % 1M MgCl₂ (Carl Roth GmbH)

0,1% 1M CaCl₂ (Carl Roth GmbH)

0,01% 1M MnCl₂ (Carl Roth GmbH)

4% 10%iges Triton X 100 (AppliChem)

gelöst in PBS

verwendete Antikörper:

Zielprotein	Antikörper	Verdünnung	
		Flachpräparat	Paraffinschnitte
Isolektin-B4	Biotinylated GSL1, Vector Laboratories (B-1205)	1:50	1:25
DAPI	Sigma-Aldrich	1:300	1:300
Neuropilin-1	C-19, goat polyclonal, Santa Cruz (Sc-7239)	1:50	1:25
cMet	C-28, rabbit polyclonal, Santa Cruz (Sc-161)	1:50	1:25
Paxillin	K-20, goat polyclonal, Santa Cruz (Sc-31008)	1:100	
Y31- Phosphopaxillin	Rabbit polyclonal, Santa Cruz (Sc- 14035-R)	1:100	
CD11b	Rat monoclonal, Bio-Rad (MCA711)	1:50	
Streptavidin-Cy 3	Sigma	1:100	1:100

Conjugate			
Anti-rabbit-Cy 3 (goat)	Life technologies	1:200	1:200
Anti-goat-AlexaFluor488 (Donkey)	Life technologies	1:200	1:200
Streptavidin-AlexaFluor488	Life technologies	1:100	1:100

Zusätzliche Materialien für die Paraffinschnitte:

Glas-Färbekasten mit Deckel (Wheaton)

Glas-Einsatz für die Objektträger (Wheaton)

Glas-Färbeküvette Stehküvette (Wheaton)

Färbesystem für Objektträger, StainTray (Simport)

Dampfgarer (Braun)

Microtom Microm HM 355S (Thermo Fisher Scientific)

Microm EC 350 (Thermo Fisher Scientific)

Roti Histol (Carl Roth GmbH)

Ethanol absolute UN 1170 (AppliChem)

Paraffin 46-48 (Sigma-Aldrich)

Xylol (Carl Roth)

Formaldehydlösung 37% (Carl Roth)

Universal Blocking Reagent 10X (BioGenex)

Dako Pen (Dako)

Shandon Immu-Mount (Thermo Fisher Scientific)

0,1 M Citronensäure:

5,25 g Citratmonohydrat (Merck) in 250 ml destilliertem Wasser

0,1 M Natriumcitrat:

7,35 g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (Merck) in 250 ml destilliertem Wasser

2.3.2 Immunhistochemie an Flatmounts

Das Färbeprotokoll für die Immunhistochemie an Flatmounts teilte sich auf zwei aufeinanderfolgende Tage auf.

Am ersten Tag wurden die entnommenen Augen direkt nach ihrer Entnahme in 4%igem PFA für 30 min auf Eis fixiert. Anschließend wurden die Augen zweimal jeweils 5 min mit PBS gewaschen und dabei auf einem Rotortisch gelagert. Die Augen wurden nun in einer mit PBS gefüllten Petrischale unter dem Mikroskop bei zweifacher Vergrößerung präpariert. Dazu wurde mit einer gelben Kanüle (30G) vorsichtig die Cornea mittig durchstoßen. Da die Augen der Jungtiere noch flexibel sind, konnten die Sklera sowie die Choroidea in einem Schritt von der Retina getrennt werden nur durch das vorsichtige Reißen mit den Pinzetten. Sowohl die Sklera als auch die Choroidea wurden verworfen. Die Iris wurde mit dem Ziliarmuskel von der Retina abgetrennt, mit der Linse entnommen und verworfen. Mit der Pinzette wurden anschließend, falls beim Entnehmen der Linse nicht geschehen, die embryonalen Versorgungsgefäße der Linse entnommen und verworfen. Die Retina wurde nun mit der feinen Präparierschere mit vier radial verlaufenden, gleichlangen Schnitten versehen, die die halbkugelförmige Retina in eine flache Scheibe mit vier gleichgroßen, peripher voneinander getrennten Kreisstücken verwandelten (Abbildung 11). Nach der Präparation wurde die Retina mit einer Einwegpipette in ein mit PBS gefülltes Eppendorfgefäß umgefüllt und anschließend 90 min bei Raumtemperatur mit Blocking buffer auf dem Laborschüttler permeabilisiert. Es folgte dreimaliges Waschen mit Pblec bei Raumtemperatur für jeweils 10 min. Daran schloss sich die Färbung mit den Primärantikörpern an, die in Pblec angesetzt wurden und bei 4 Grad Celsius über Nacht inkubierten.

Am zweiten Tag wurde zunächst viermal jeweils 20 min mit PBS bei Raumtemperatur gewaschen, bevor die Sekundärantikörper in 50%igem Blocking buffer zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Darauffolgend wurde einmalig mit 50%igem Blocking buffer für 20 min gewaschen, danach dreimal zu jeweils 20 min mit PBS. Zuletzt wurden die Netzhäute unter dem Mikroskop auf einen Objektträger gebracht, mit feinen Präparierpinzetten ausgerichtet und mit fusselfreien Tüchern wurde möglichst viel Flüssigkeit vom Objektträger genommen. Mit einem Tropfen Fluoromount-G wurde das Deckglas aufgelegt und somit die Retina konserviert. Anschließend wurden die Objektträger lichtgeschützt für mindestens 24h bei 4 Grad Celsius aufbewahrt um eine Aushärtung zu garantieren. Soweit nicht explizit angegeben wurde jedes Präparat unabhängig von den eingesetzten Primär- und Sekundärantikörpern mit Isolektin-B4 und Streptavidin-Cy3 gefärbt.

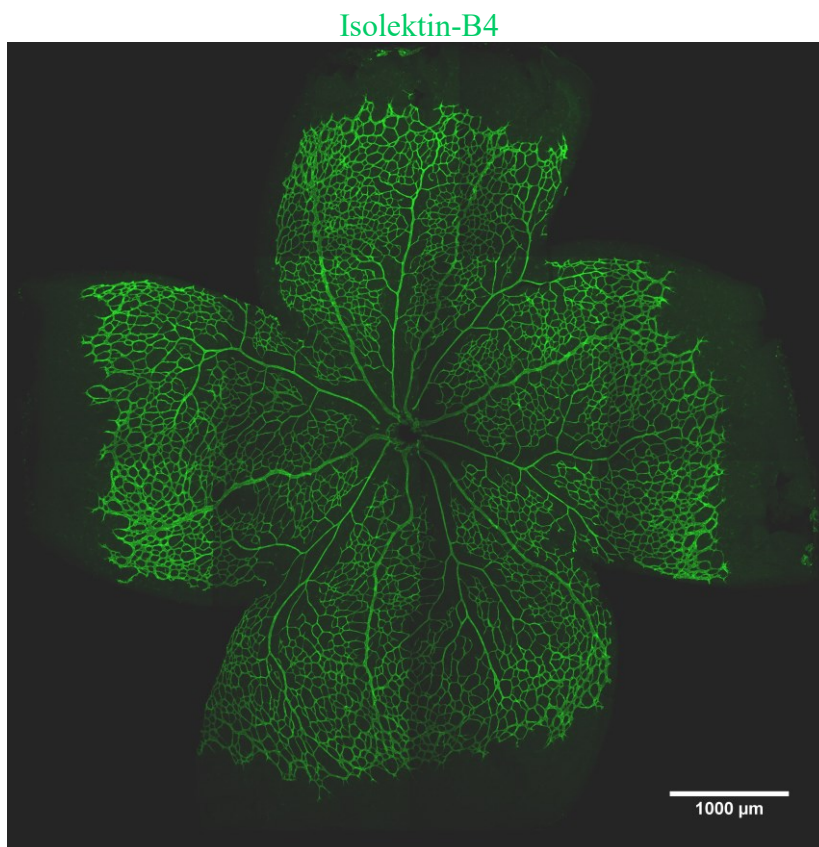


Abb. 11 Aufnahme einer Retina in 4-facher Vergrößerung, die anhand des Protokolls präpariert, gefärbt mit Isolektin-B4 und fixiert wurde. Durch das radiäre Einscheiden entstand ein Flachpräparat mit vier Blättern. In der Mitte der Retina liegt die Austrittsstelle des Nervus opticus.

Abweichend wurde die Färbung nach CD11b durchgeführt, da eine Fixierung mit PFA dieser Färbung nicht zuträglich war. Die Netzhäute wurden abweichend vom oben genannten Protokoll unfixiert präpariert und in 100%igem Methanol (Fluka Methanol, Honeywell) für 10 Minuten bei -20° Celsius fixiert. Anschließend wurde das obige Protokoll beginnend mit der Permeabilisierung durch den Blocking Buffer fortgesetzt.

2.3.3 Immunhistochemie an Paraffinschnitten

Das Protokoll für die Immunhistochemie an Paraffinschnitten teilte sich auf mehrere Tage auf. Zunächst mussten die Augen eingebettet sowie geschnitten werden. Daran schloss sich die Färbung über zwei Tage an.

Direkt an die Entnahme der Augen schloss sich die Fixierung der Augen für mindestens einen Tag in 4%iger Formaldehydlösung (Carl Roth) an. Folgend wurden die fixierten Augen in 70%igem Ethanol für einen Tag belassen bei zweimaligem Wechsel des Ethanols. Am zweiten Tag der Einbettung folgte die Inkubation in einer aufsteigenden Alkoholreihe, in der die fixierten Augen jeweils 30 min lang in den unterschiedlichen Konzentrationen verweilten. Von einmalig 70%igem Ethanol über viermalig 80%igen Ethanol, zweimalig 90%igen Ethanol sowie zweimaligen 96% Ethanol bis zu viermalig 100%igem Ethanol. Zuletzt verblieben die Präparate über Nacht in 100%igem Ethanol. Am darauffolgenden Tag wurden die Präparate jeweils ein bis zwei Stunden in Xylol (Carl Roth) dreimal aufeinanderfolgend inkubiert und darauf über Nacht in Paraffin (Sigma-Aldrich). Am vierten Tag des Einbettungsprotokolls erfolgte eine erneute Inkubation in Paraffin über zwei bis drei Stunden und anschließend die endgültige Einbettung im Einbettungsautomat (Microm EC 350, Thermo Fisher Scientific). Abschließend erfolgte das Schneiden der in Paraffin eingebetteten Augen mit dem Mikrotom (Thermo Fisher Scientific) mit einer Dicke der Schnitte von 4 µm sowie das Aufziehen auf Objektträger.

Am ersten Tag des Färbeprotokolls wurden die Paraffinschnitte mittels Glasfärbekästen und Einsatz zweimal für jeweils fünf Minuten in Roti-Histol belassen. Daran schloss sich eine absteigende Alkoholreihe an, beginnend mit zweimal 100%igem Ethanol, gefolgt von 96%, 90%, 80% und 70%. In diesen Lösungen wurden die Objektträger jeweils für fünf Minuten inkubiert. Es folgten fünf Minuten unter fließendem

Leitungswasser sowie eine Minute in destilliertem Wasser. Für den Citratpuffer wurden 2,25ml Zitronensäure mit 10,25ml Natriumcitrat und mit 112,5ml destilliertem Wasser gemischt. Der Dampfgarer wurde mit destilliertem Wasser befüllt und die Objektträger in einen kochfesten Glasfärbekasten mit Citratpuffer gestellt. Anschließend erhitze der Dampfgarer den Citratpuffer für 40 Minuten. Daraufhin wurden die Objektträger in einer Stehküvette dreimal für jeweils fünf Minuten mit PBS gewaschen bevor mit dem Dako Pen jeder Schnitt einzeln umkreist wurde. Die Objektträger wurden nun in eine Feuchtkammer (StainTray) gelegt und der Boden mit destilliertem Wasser bedeckt. Jeweils 50µl des mit destilliertem Wasser auf 1:10 verdünnten Power Blocks wurden pro Schnitt aufgebracht. Nach Ablauf von 6 Minuten wurden die Schnitte kurz mit destilliertem Wasser gesäubert und dann dreimal jeweils 5 Minuten lang in der Stehküvette mit PBS gewaschen. Der Erstantikörper wurde nun in 1%igem BSA angesetzt und jeweils 50µl pro Schnitt auf die Objektträger im StainTray gegeben. Eine Negativkontrolle wurde markiert und nur mit 1%igem BSA ohne Erstantikörper inkubiert. Der Erstantikörper wurde über Nacht bei 4°Celsius auf den Schnitten belassen.

Am zweiten Tag wurden die Objektträger mit destilliertem Wasser gespült sowie darauffolgend dreimal für je 5 Minuten mit PBS in der Stehküvette. Anschließend folgte die Inkubation des Zweitantikörpers für 2 Stunden bei Raumtemperatur in 1%igem BSA in der Feuchtkammer. Nach wiederum dreimaligem Waschen für jeweils 5 Minuten mit PBS in der Stehküvette folgte die Inkubation mit DAPI in destilliertem Wasser für 8 Minuten. Anschließend wurden die Objektträger wieder dreimal zu je 5 Minuten mit PBS gewaschen und von größeren verbleibenden Tropfen vorsichtig befreit. Je ein Tropfen Immu-Mount pro Schnitt wurde auf den Objektträger gegeben und mit einem Deckglas bedeckt. Um die Schnitte endgültig zu konservieren wurden die Objektträger lichtgeschützt für mindestens 24 Stunden bei 4 Grad Celsius aufbewahrt.

2.3.4 Proliferationsmessung mittels EdU

Zur Darstellung der Proliferation in dem Gefäßnetz der Retina wurde das EdU (5-Ethynyl-2'-Desoxyuridin) Click-iT AlexaFluor488 Imaging Kit (Thermo Fisher Scientific) eingesetzt. Nach der intravitrealen Injektion wurden die Jungtiere für 20 Stunden zu ihrer Mutter zurückgesetzt. Vier Stunden vor der Tötung wurde den Tieren

400µg EdU in 200µl PBS intraperitoneal injiziert. Anschließend wurden die Jungtiere die verbleibenden vier Stunden auf der Wärmeplatte bei 37°C gehalten bevor dann wie unter 2.2.5 beschrieben die Tiere getötet wurden. Das Färbeprotokoll für Flatmounts fand unverändert statt wie unter 2.3.2 beschrieben. Nach dem Inkubieren des Zweitantikörpers und vor dem Aufbringen auf den Objektträger wurde das EdU detektiert. Die Detektion wurde dem Protokoll des EdU Click-iT AlexaFluor488 Kit folgend ausgeführt.

2.4 qPCR

Mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) können spezifisch ausgewählte DNA-Abschnitte vervielfältigt werden. Dazu werden den Proben spezifische Primer, eine Polymerase und Nukleotide hinzugefügt, die durch mehrfach sich wiederholende Zyklen der Denaturierung, Anlagerung (Annealing) und Elongation dazu führen, dass selbst kleinste Mengen an DNA vervielfältigt werden um sie sicher zu detektieren.

Eine Besonderheit stellt die quantitative PCR (oder auch real-time PCR) dar, bei der nicht nur das bloße Vorliegen eines DNA-Abschnittes, sondern auch schon während der Reaktion die Menge der DNA zuverlässig bestimmt werden kann. Dazu können TaqMan-Sonden benutzt werden, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind und zwischen den ausgewählten Primern hybridisieren. Durch die Polymerase wird der Farbstoff abgekoppelt und lässt sich detektieren, dies ist proportional zu der Menge an amplifizierter DNA. Für die Auswertung werden Housekeeping-Gene mitgemessen, welche in den jeweiligen Zellen ubiquitär synthetisiert und konstant exprimiert werden. In dieser Arbeit wurden GAPDH und Actin Beta (Actb) dafür verwendet. Zur Auswertung kam die Δ -C_t-Methode zum Einsatz, bei der der C_t-Wert (Cycle of Threshold, Zyklus, in dem sich das Fluoreszenzsignal gerade von der Hintergrundstrahlung abhebt) des zu untersuchenden DNA-Abschnittes in Relation zu dem C_t-Wert der Housekeeping-Gene gesetzt wurde.

2.4.1 Geräte und Material

RNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH)

QIAShredder (Quiagen GmbH)

Polytron PT 1200E Manual Disperser (Kinematica)

2-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich)

RNase-free DNase Set (Qiagen)

Iscrip cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad)

Zentrifuge 5417R (Eppendorf)

Nano-Drop 2000c UV-Vis Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific)

Thermocycler peqSTAR 2X Universal (vwr Peqlab)

Biosphere Filter Tips 0,1-20µl; 2-100µl; 100-1000µl (Sarstedt AG & Co)

Pipetten Research Plus (Eppendorf)

0,2 ml PCR-Gefäße (Brand)

0,5 ml Safe-Lock Tubes (Eppendorf AG)

TaqMan Gene Expression Mix (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific)

AirDrone PCR-400 (Safelab Systems)

Hard Shell PCR-Plates, 96 wells, thin-wall (Bio-Rad)

CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

TaqMan-Sonde	Bestellnummer	Hersteller
Neuropilin-1 (Nrp-1)	Mm00435379_m1	Thermo Fisher Scientific
VEGF-Rezeptor 2 (Kdr)	Mm01222419_m1	Thermo Fisher Scientific
Actb	Mm02619580_g1	Thermo Fisher Scientific
GAPDH	Mm99999915_g1	Thermo Fisher Scientific

2.4.2 Probenverarbeitung

Zur Verwendung der Retina für die qPCR wurden die Tiere wie unter 2.2 beschrieben intravitreal injiziert und nach 24 Stunden wurden die Augen entnommen, in PBS auf Eis

zwischengelagert und unfixiert unter dem Mikroskop Leica M165C bei 2,5-facher Vergrößerung präpariert. Die isolierte Retina wurde, anders als bei der Präparation für die Immunhistochemie, nicht eingeschnitten sondern in ihrer Gesamtheit dem Lysepuffer zugeführt. Dieser bestand aus 350µl Buffer RLT (Quiagen RNeasy Mini Kit) und 3,5µl 6-Mercaptoethanol pro Ansatz. Zur besseren Verwendbarkeit der Proben wurden zwei gleichbehandelte Netzhäute in einem Ansatz weiterverarbeitet. Wurde die Weiterverarbeitung auf einen anderen Tag als den Entnahmetag der Augen verschoben, so wurden die Proben im Lysepuffer bei -80° Celsius aufbewahrt.

Die Proben wurden nach dem Protokoll des RNeasy Mini Kit von Qiagen GmbH und dem Lyseprotokoll des QIAshredder (Quiagen GmbH) unter Verwendung von 2-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich) verarbeitet.

Die Verunreinigung durch beispielsweise Proteine sowie die RNA-Konzentration wurden mittels Nano Drop 2000 anhand des Verhältnisses der Absorption bei 260nm zu 280nm ermittelt. Die Herstellung der cDNA erfolgte mit dem iscript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad). Als Sonden wurden TaqMan-Sonden von Thermo Fisher Scientific eingesetzt für die Erkennung von Neuropilin-1, cMet und VEGF-Rezeptor 2. Die Proben, sowie eine Positiv- und eine Negativkontrolle, wurden mindestens zweifach bestimmt auf 96-Wells im CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

2.4.3 Probenmessung

Die Proben wurden im CFX96 Real-Time PCR Detection System nach folgendem Programm bearbeitet und vermessen:

Zeit	Temperatur	Wiederholungen
2 min	50° C	1
10 min	95° C	1
15 sec	95° C	40
1 min	60° C	40

2.5 Statistik

Die Auswertung der Aufnahmen des konfokalen Mikroskops wurde mithilfe der Software ImageJ sowie der ZEN-Imaging Software black edition (Zeiss) vorgenommen. Zur statistischen Auswertung fand das Programm Prism 7 (Graph Pad) Verwendung. Die Berechnung des p-Wertes fand durch Prism 7 statt. Wenn nicht explizit angegeben wurde der p-Wert mittels t-Test bzw. einfaktorieller ANOVA berechnet. Die in dieser Arbeit verwendeten Diagramme zeigen den Mittelwert an. Die Standardabweichung wird mittels des Fehlerbalkens dargestellt. Als Signifikanzniveau wurde 7% angenommen.

2.5.1 Auswertung der Anzahl an Filopodien

Zur Auswertung der Anzahl an Filopodien wurden am konfokalen Mikroskop Aufnahmen von mit Isolektin-B4 gefärbten, 90min in 4%igem PFA fixierten Netzhäuten in 40facher Vergrößerung erstellt. Pro Retina wurden Aufnahmen in der Peripherie eines venösen Stromgebietes sowie in der Peripherie eines arteriellen Stromgebietes gemacht. Mit ImageJ wurden die sichtbaren Filopodien in jeder Aufnahme gezählt und in den von Prism 7 erstellten Diagrammen als Anzahl von Filopodien pro Fläche ausgegeben.

2.5.2 Auswertung der vaskularisierten Fläche

Die vaskularisierte Fläche einer Retina wurde auf zwei unterschiedliche Arten bestimmt. Zum einen über die Entfernung der angiogenetischen Front zum Zentrum der Retina und zum anderen über eine Flächenberechnung in den einzelnen Aufnahmen des konfokalen Mikroskops.

Für die Berechnung der vaskularisierten Fläche anhand der angiogenetischen Front wurde in den erstellten Übersichtsaufnahmen bei 4facher Vergrößerung mittels ImageJ die Entfernung der mit Isolektin-B4 und Streptavidin-Cy3 angefärbten angiogenetischen Front zum Zentrum sowie der Radius der Retina gemessen. Da jede Retina im Zuge der Präparation radiäre Einschnitte erhalten hatte um sie flach auf einen Objektträger zu bringen, entstanden dadurch Blätter in der Peripherie der Retina. Es entstanden vier Blätter, in seltenen Ausnahmefällen bei durch die Injektion vorgeschädigten Netzhäuten

auch weniger als vier dieser Blätter. In die Berechnung flossen keine Netzhäute ein, bei denen das Gefäßnetz umgeklappt oder großflächig verschoben war, sodass eine genaue Messung nicht möglich war. Für jedes einzelne Blatt der Retina wurde die weiteste Entfernung der angiogenetischen Front zum Mittelpunkt der Retina gemessen sowie die weiteste Entfernung der gesamten Retina zum Mittelpunkt. Daraus wurde der Quotient gebildet und in Prism 7 übertragen.

Für die Berechnung der vaskularisierten Fläche in den Detailaufnahmen diente die Isolektin-B4 Färbung. Verwendet wurden die Detailaufnahmen in 25facher Vergrößerung, die jeweils um eine Vene, um eine Arterie und in der Peripherie aufgenommen wurden. Mittels ImageJ wurde der Schwellenwert (Threshold) automatisch gesetzt und die Fläche der über dem Threshold liegenden angefärbten Strukturen wurde berechnet. Manuell wurden nachträglich fälschlicherweise über dem Threshold liegende Strukturen aus der Flächenberechnung entfernt. Als solche Strukturen galten Konglomerate von Sekundärantikörpern sowie Zelltrümmer der Retina, die keine Verbindung zum Gefäßnetz in der Detailaufnahme aufwiesen. Die Fläche wurde in Quadratmikrometern angegeben und in Prism 7 übertragen.

2.5.3 Auswertung der Anzahl an Ausstülpungen

In jeder Detailaufnahme des konfokalen Mikroskops um eine Vene, um eine Arterie und in der Peripherie wurden mittels ImageJ die in der Isolektin-B4 gefärbten Retina vorhandenen Ausstülpungen gezählt und als ganze Zahl pro Detailaufnahme in Prism 7 übertragen. Als Ausstülpung galt ein blind endendes Konglomerat aus mit Isolektin-B4 angefärbten Zellen, welches eine ununterbrochene Verbindung zum restlichen Gefäßsystem besaß. Ausgenommen waren blind endende Gefäße, die durch ein Abreißen des Gefäßes in der Aufnahme zustande kamen.

2.5.4 Auswertung der Fläche der Ausstülpungen

Ebenso wie bei der Auswertung der vaskularisierten Fläche in den Detailaufnahmen wurde auch die Fläche der Ausstülpungen ermittelt. In Detailaufnahmen in 25facher Vergrößerung wurde durch die automatische Berechnung von ImageJ ein Threshold für die mit Isolektin-B4 gefärbten Netzhäute berechnet. Alle über dem Threshold liegenden Strukturen wurden in einem Ausschnitt, der nur die Ausstülpung beinhaltete, gezählt

und für die Flächenberechnung verwendet. Das Ergebnis wurde als Fläche in Quadratmikrometer angegeben und in Prism 7 übertragen. Anders als bei der allgemeinen Flächenberechnung wurde nicht die ganze Fläche der Ausstülpungen pro Detailaufnahme gezählt, sondern die Fläche jeder einzelnen Ausstülpung. Zur Berechnung der annähernd ellipsenförmigen Fläche wurde π mit den beiden Halbachsen der Ellipse multipliziert.

2.5.5 Auswertung der Verzweigungspunkte

Zur Auswertung der Verzweigungspunkte (Branching points) wurden die Detailaufnahmen um eine Vene, eine Arterie und in der Peripherie bei 25facher Vergrößerung verwendet. Bei den mit Isolektin-B4 gefärbten Netzhäuten wurden in ImageJ die Verzweigungspunkte markiert und gezählt. Als Verzweigungspunkt im Gefäßnetz galten Verzweigungen, von dessen Mittelpunkt sich Gefäße in mindestens drei unterschiedliche Richtungen aufteilten. Ausgenommen waren Verzweigungspunkte, die durch die Überlagerung zweier Gefäße zustande kamen, die sich aber kein Lumen teilten. Die Anzahl der Branching points wurde pro Detailaufnahme ermittelt und zur Berechnung in Prism 7 übertragen.

3 Ergebnisse

3.1 Mikroskopische Veränderungen der Retina nach Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$

3.1.1 Anzahl und Morphologie der entstehenden Ausstülpungen der retinalen Blutgefäße

Rhodocetin $\alpha\beta$ wurde in den Glaskörper junger Mäuse injiziert um die Auswirkungen auf die sich in der Entwicklung befindlichen Retinalblutgefäße zu beobachten. Nach 24 Stunden wurden die Augen präpariert und auf Veränderungen untersucht. Zum einen wurden Detailaufnahmen erstellt um die Veränderungen genau beschreiben und quantifizieren zu können, zum anderen aber auch Aufnahmen der gesamten Retina (Übersichtsaufnahmen) um eine mögliche Verteilung der Veränderungen zu zeigen. In Abbildung 12 sind zwei exemplarische Übersichtsaufnahmen der Retina gezeigt, welche sechs Tage nach der Geburt mit Rhodocetin $\alpha\beta$ oder als Kontrolle mit PBS injiziert wurden.

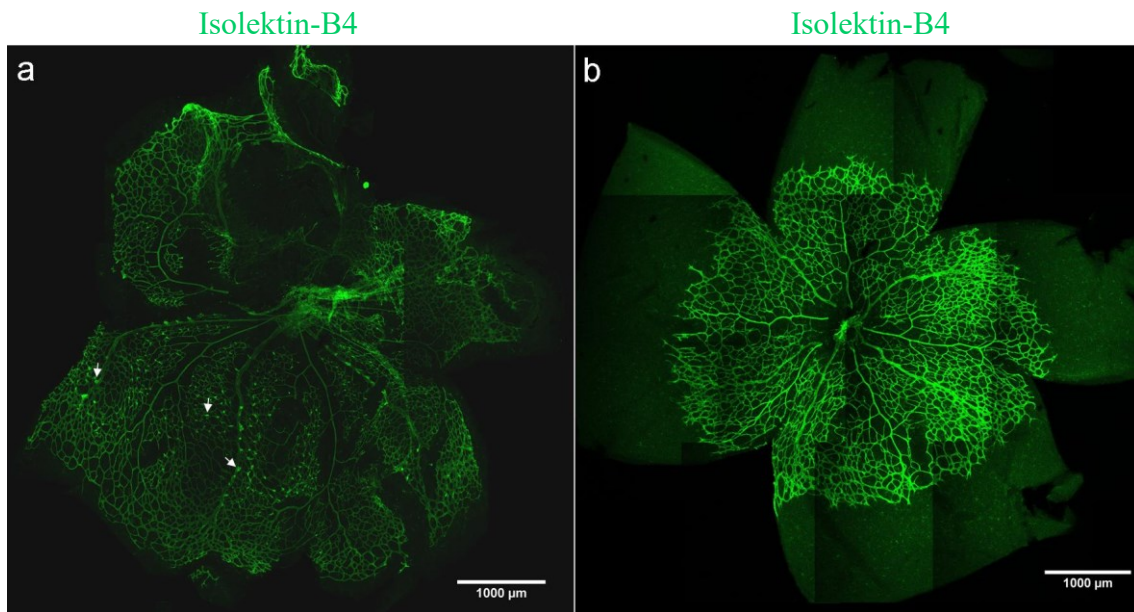


Abb. 12 Auffällige Gefäßformationen nach der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$. Gezeigt werden die mit Isolektin-B4 gefärbten Übersichtsaufnahmen von Netzhäuten in 4-facher Vergrößerung. Die einzelnen Aufnahmen wurden mittels GIMP 2 zu einer Übersichtsaufnahme zusammengefügt. Beide Netzhäute wurden an P6 injiziert und an P7 als Flatmount präpariert. Unterschiedliche Maßstäbe ergeben sich aus der unterschiedlichen Form und Größe der Netzhäute. **a** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$. Die weißen Pfeile zeigen exemplarisch auf einige Ausstülpungen. **b** Kontrollgruppe: Injektion von PBS.

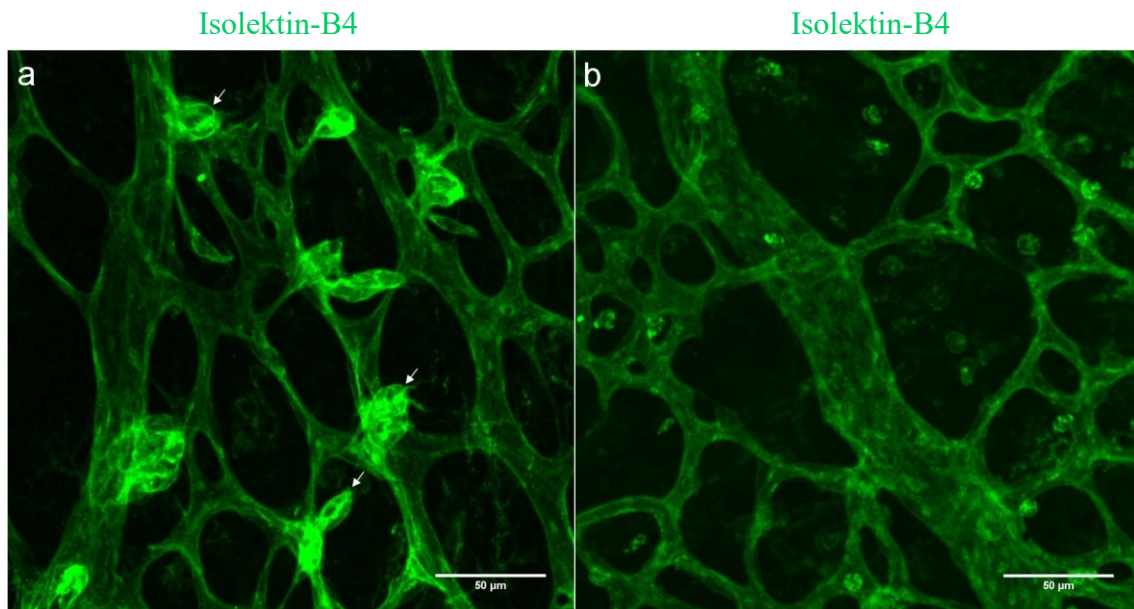


Abb. 13 Nach der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ bildeten sich Ausstülpungen der venösen Gefäße. Detailaufnahmen in 25-facher Vergrößerung im venösen Stromgebiet. Isolektin-B4-Färbung der Netzhäute. **a** Rhodocetin $\alpha\beta$ -Injektion an P5 und Präparation an P6. Die weißen Pfeile zeigen exemplarisch auf einige Ausstülpungen. **b** Injektion von PBS an P6. Die Präparation erfolgte an P7.

In vielen Aufnahmen der mit Rhodocetin $\alpha\beta$ behandelten Netzhäute zeigten sich multipel auftretende auffällige Formationen der Retinalblutgefäße. In der Kontrollgruppe fehlten diese Formationen fast gänzlich. Diese auffälligen Gefäßformationen erweckten den Eindruck von Ausstülpungen der retinalen Blutgefäße und werden im Folgenden als Ausstülpungen bezeichnet. Die Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ in den Glaskörper junger Mäuse bewirkte die Bildung von Ausstülpungen der Blutgefäße der Retina.

Es stellte sich die Frage ob diese Ausstülpungen aus jedem retinalen Blutgefäß entstehen können oder ob eine Assoziation zu gewissen Blutgefäßtypen, ein gruppiertes Auftreten oder Ähnliches besteht. Daher wurden Detailaufnahmen in 25-facher Vergrößerung in verschiedenen Bereichen der Netzhäute erstellt und untersucht. Daraus ergaben sich jeweils drei Detailaufnahmen pro behandelter Netzhaut. Eine Aufnahme wurde um eine Arterie herum erstellt um das arterielle Stromgebiet abzubilden, eine Aufnahme wurde um eine Vene herum erstellt um das venöse Stromgebiet darzustellen und eine Aufnahme wurde in der peripheren Zone des auswachsenden oberflächlichen Gefäßplexus der Retina aufgenommen.

Vor allem im venösen Stromgebiet zeigten sich oft gehäuft auftretende Ausstülpungen der Retinalblutgefäße nach der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$, die nicht in der Kontrollgruppe beobachtet werden konnten (Abbildung 13).

Im Gegensatz dazu fielen im arteriellen Stromgebiet kaum Ausstülpungen in den retinalen Blutgefäßen auf (Abbildung 14). Selten fanden sich in der unmittelbaren Umgebung einer Arterie nach der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ Ausstülpungen, in den Kontrollen fanden sich vereinzelt Ausstülpungen im arteriellen Stromgebiet. Demnach hatte Rhodocetin $\alpha\beta$ in der Retina einen größeren Einfluss auf das venöse als auf das arterielle Stromgebiet. Ebenso wurden auch Detailaufnahmen in der Peripherie des oberflächlichen Gefäßplexus der Retina erstellt um Veränderungen von sich im Auswachsen befindenden Gefäßen zu zeigen. Dabei ergaben sich auch an der auswachsenden Gefäßfront vermehrt auftretende Ausstülpungen nach der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$, die nicht in den Kontrollen auftraten (Abbildung 15).

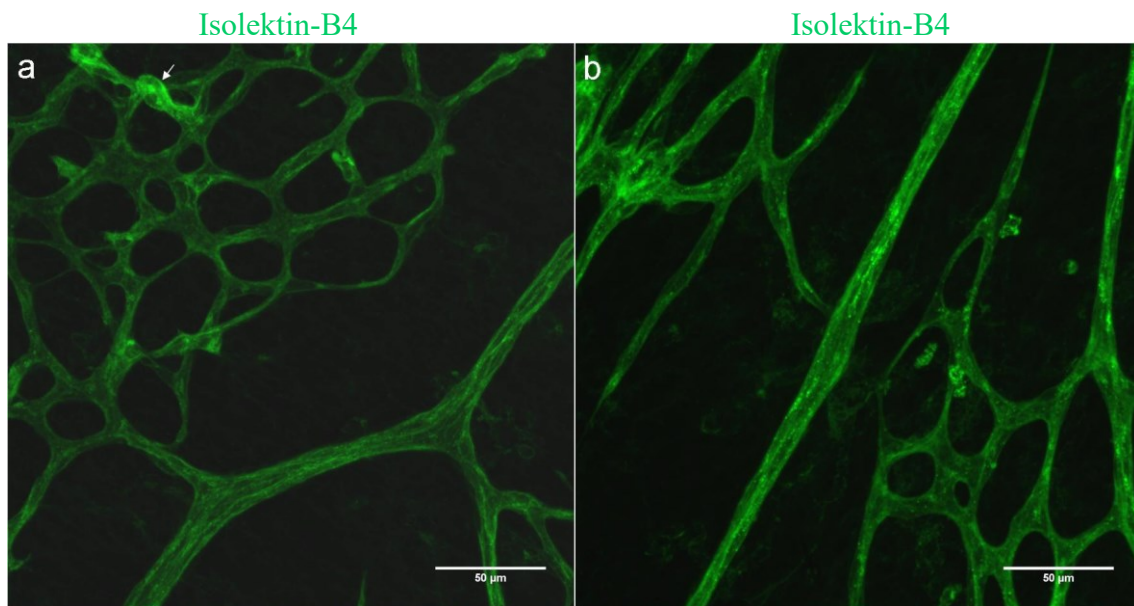


Abb. 14 Kaum Ausstülpungen nach der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ im arteriellen Stromgebiet. Detailaufnahmen in 25-facher Vergrößerung im arteriellen Stromgebiet. Isolektin-B4-Färbung der Netzhäute. **a** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ an P5, sowie Präparation als Flatmount an P6. Der weiße Pfeil zeigt exemplarisch auf eine Ausstülpung. **b** Injektion von PBS an P6, Präparation als Flatmount an P7.

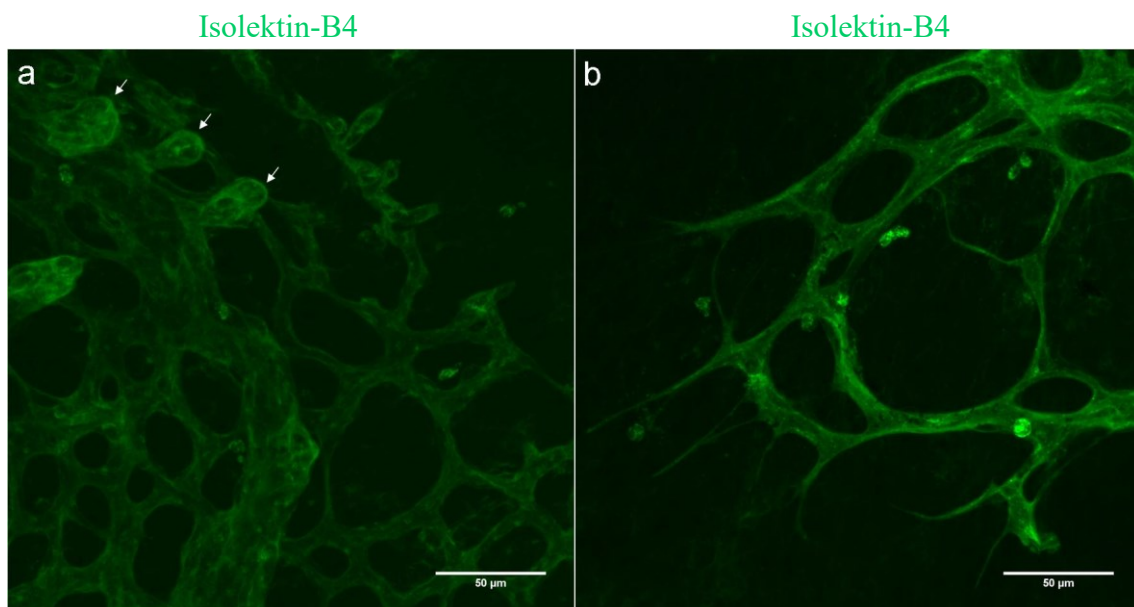


Abb. 15 Auffällige Gefäßformationen nach der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ in der Peripherie. Detailaufnahmen in 25-facher Vergrößerung in der Peripherie. Die Netzhäute wurden mit Isolektin-B4 gefärbt. **a** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ an P6 und Präparation an P7. Die weißen Pfeile zeigen exemplarisch auf einige Ausstülpungen. **b** Injektion von PBS an P5 sowie Präparation an P6.

Rhodocetin $\alpha\beta$ bewirkte eine signifikante Bildung von Ausstülpungen der Retinalblutgefäße im venösen Stromgebiet sowie auch in der Peripherie. Solche Ausstülpungen traten in Netzhäuten der Kontrollgruppe äußerst selten bis gar nicht auf. Im arteriellen Stromgebiet wurde keine signifikante Anzahl an Ausstülpungen durch Rhodocetin gebildet (Abbildung 16).

Die Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ schien zum Zeitpunkt des Auswachsens des oberflächlichen Gefäßplexus der Retina den größten Effekt zu haben da orientierend durchgeführte Injektionen zu späteren Zeitpunkten (Tag 12 und Tag 15 nach Geburt) keinerlei Ausstülpungen zeigten und daher nicht weiter in dieser Arbeit verfolgt wurden.

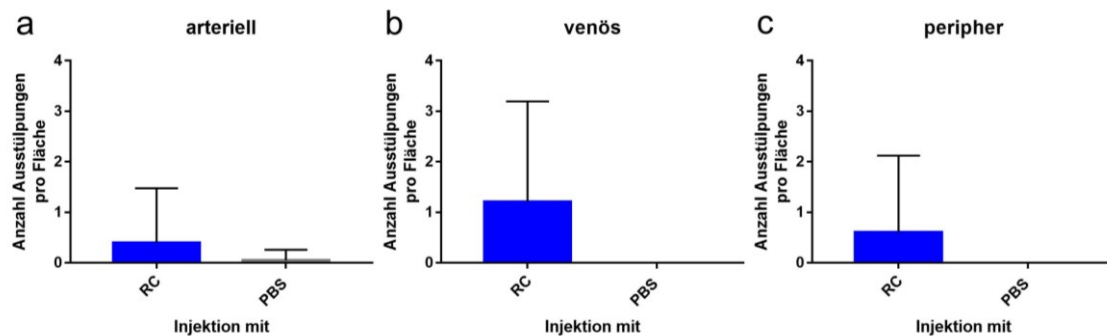


Abb. 16 Die Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ bewirkte die meisten Ausstülpungen im venösen Stromgebiet. Dargestellt ist die Anzahl an Ausstülpungen der Gefäße pro Fläche an den Injektionstagen P5 und P6. Als Fläche wurde eine Region of Interest definiert als die Fläche einer in 25-facher Vergrößerung aufgenommenen Detailaufnahme des jeweiligen Stromgebietes mit einer errechneten Fläche von insgesamt 65571,601 μm^2 . **a** Anzahl der Ausstülpungen im arteriellen Stromgebiet um eine Arterie herum. p-Wert = 0,1366 (t-Test), n(RC)=53, n(PBS)=23. **b** Anzahl der Ausstülpungen im venösen Stromgebiet um eine Vene herum. p-Wert = 0,0061 (t-Test), n(RC)=49, n(PBS)=23. **c** Anzahl der Ausstülpungen in der Peripherie der Retina. p-Wert = 0,0297 (t-Test), n(RC)=68, n(PBS)=32.

Im Folgenden soll das Augenmerk zunächst auf die genaue Beschreibung der Morphologie der Ausstülpungen gelegt werden.

Die nach der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ aufgetretenen, auffälligen und mit Isolektin-B4 anfärbaren Formationen in der Retina hatten eine direkte Verbindung zum Gefäßsystem (Abbildung 17). Die Ausstülpungen endeten blind und erschienen keulenförmig, das heißt mit einem schlanken Hals direkt vom Ursprungsgefäß ausgehend und in ein kugelförmiges Ende mit größerem Durchmesser übergehend.

Isolektin-B4

Isolektin-B4

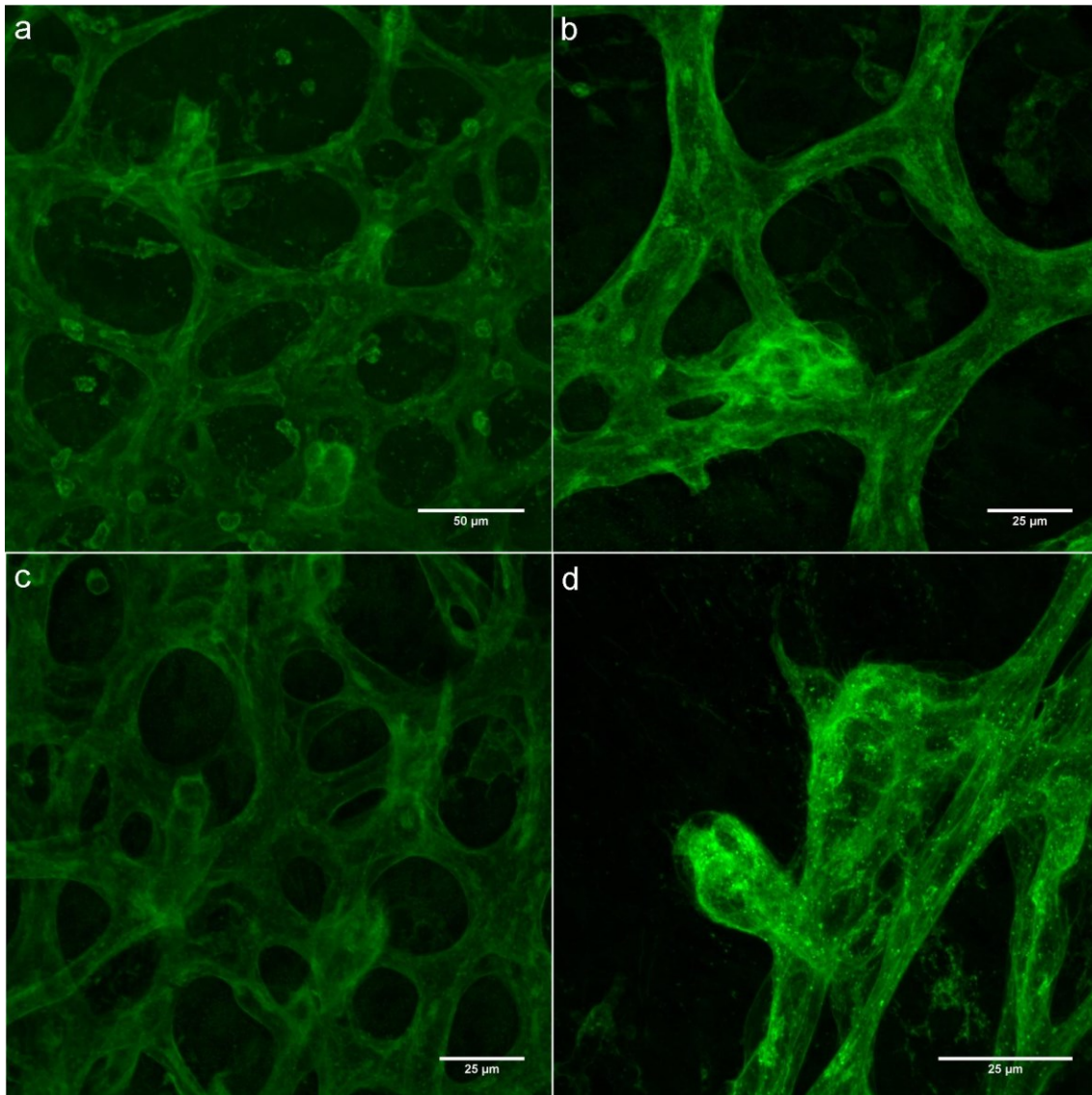


Abb. 17 Die Ausstülpungen hatten eine direkte Verbindung zum Gefäßsystem. Die Netzhäute wurden mit Isolektin-B4 gefärbt. Es wurden Bilderserien in unterschiedlichen Höhen mittels des konfokalen Mikroskops aufgenommen. Die gezeigten Bilder sind die zweidimensionale Projektion dieser Bilderstapel, erstellt durch Projizieren der maximalen Intensität eines Bildpunktes in eine Ebene. **a** Aufnahme in 25-facher Vergrößerung in der Peripherie. Die Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ erfolgte an P5, die Präparation an P6. **b** Aufnahme in 40-facher Vergrößerung in der Peripherie. Die Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ erfolgte an P5, die Präparation an P6. **c** Aufnahme in 40-facher Vergrößerung in der Peripherie. Die Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ erfolgte an P5, die Präparation an P6. **d** Aufnahme in 63-facher Vergrößerung in der Peripherie nach der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ an P5 und Präparation an P6.

Durch das konfokale Mikroskop können Aufnahmen in verschiedenen Höhen auf der z-Achse innerhalb des Präparates erstellt werden. Zur genaueren Beschreibung der

Morphologie der Ausstülpungen wurden diese durch die verschiedenen Ebenen verfolgt und aufgenommen (Abbildung 18). Es zeigte sich, dass die durch Rhodocetin $\alpha\beta$ entstehenden Ausstülpungen nicht vollständig in der gleichen Ebene lagen wie der oberflächliche Gefäßplexus. Vielmehr entsprangen die Ausstülpungen in der gleichen Ebene wie die regulären Gefäße der Retina, das keulenförmige Ende ragte aber aus der Ebene der Retina heraus und hin zum Glaskörper. Rhodocetin $\alpha\beta$ bewirkte somit die Bildung von Ausstülpungen der retinalen Blutgefäße, die den oberflächlichen Gefäßplexus verließen und sich zum Glaskörper hin orientierten.

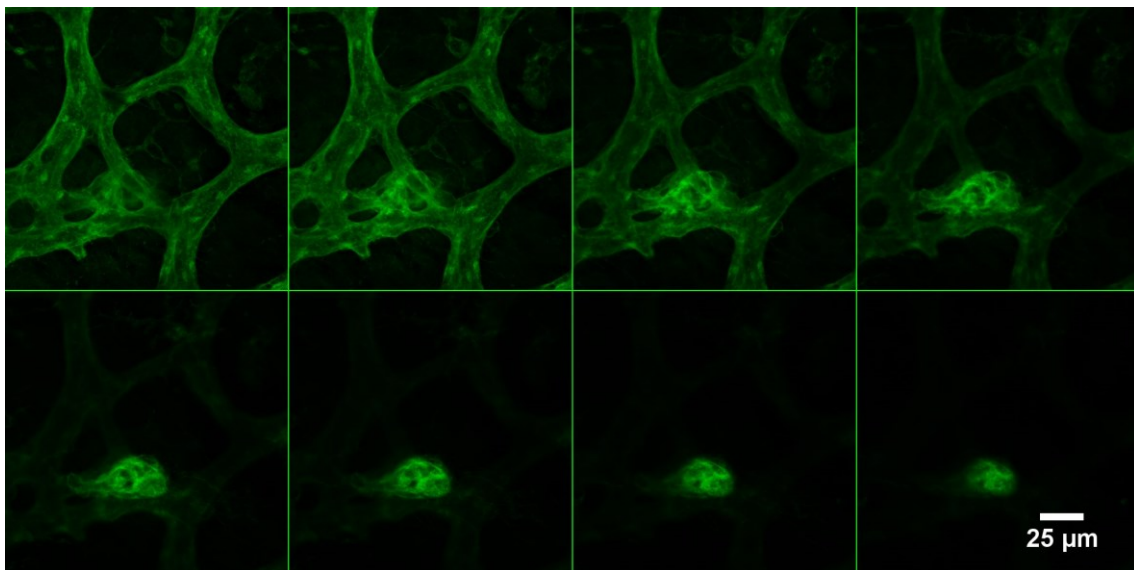


Abb. 18 Bilderserie in 40-facher Vergrößerung nach Rhodocetin $\alpha\beta$ -Injektion. Die Aufnahme wurde in der Peripherie erstellt nach Injektion an P5 und Präparation an P6. Die Retina wurde mit Isolektin-B4 gefärbt und im Abstand von $1\mu\text{m}$ wurden Aufnahmen gefertigt.

Da die Lokalisation der entstehenden Ausstülpungen innerhalb des oberflächlichen Gefäßplexus nicht rein zufällig war, stellte sich die Frage ob Unterschiede in der Ausprägung der Ausstülpungen bestanden je nachdem, ob sie ihren Ursprung im venösen oder im arteriellen Stromgebiet sowie in der Peripherie hatten. Dazu wurden die Flächen der Ausstülpungen in den Detailaufnahmen vermessen und miteinander verglichen (Abbildung 19). Die durch Rhodocetin $\alpha\beta$ induzierten Ausstülpungen der retinalen Blutgefäße in den verschiedenen Stromgebieten unterschieden sich nicht voneinander in ihrer Fläche.

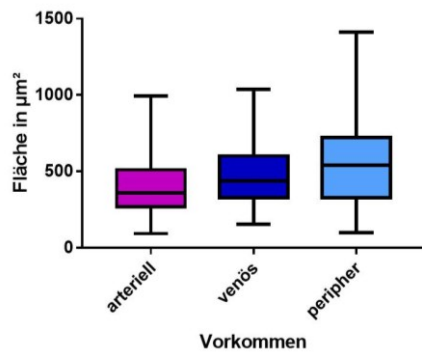


Abb. 19 Die Fläche der Ausstülpungen unterschied sich nicht. Dargestellt ist die gemessene Fläche der Ausstülpungen nach der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$, da die anderen Injektionsgruppen zu geringe Zahlen an Ausstülpungen aufwiesen und somit nicht vergleichbar waren. p-Wert = 0,1859 (ANOVA), n(arteriell)=19, n(venös)=54, n(peripher)=37.

Da die Ausstülpungen keulenförmig erschienen, lag es nahe die Ausstülpungen näherungsweise als eine Ellipse zu beschreiben. Um zu zeigen, ob diese Ausstülpungen als Ellipse bezeichnet werden konnten, wurde die vermessene Fläche der retinalen Ausstülpungen mit der errechneten Fläche einer Ellipse mit denselben Diagonalen verglichen (Abbildung 20).

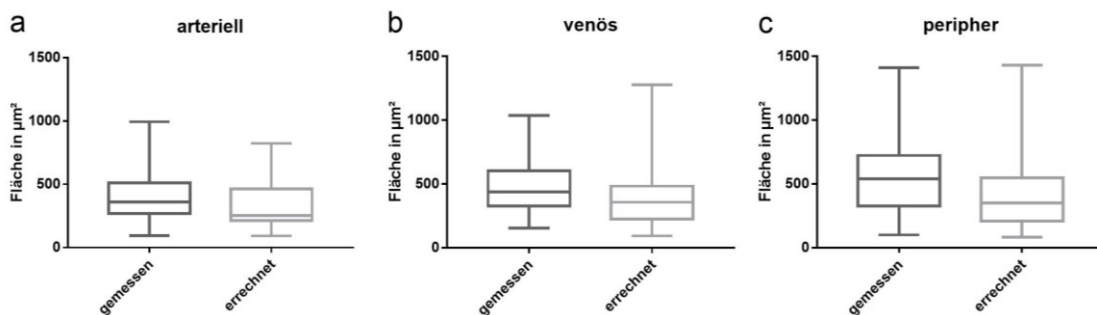


Abb. 20 Die gemessene Fläche im Vergleich mit der errechneten Fläche der Ausstülpungen. Dargestellt werden die Flächen der Ausstülpungen nach der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ an P5 oder P6. Die Fläche wurde zum einen in den Aufnahmen vermessen und zum anderen näherungsweise berechnet als Ellipse. **a** Fläche der Ausstülpungen im arteriellen Stromgebiet. p-Wert = 0,1658 (t-Test), n(gemessen)=19, n(errechnet)=20. **b** Fläche der Ausstülpungen im venösen Stromgebiet. p-Wert = 0,0311 (t-Test), n(gemessen)=54, n(errechnet)=51. **c** Fläche der Ausstülpungen in der Peripherie. p-Wert = 0,0482 (t-Test), n(gemessen)=37, n(errechnet)=39.

In erster Näherung erschienen die Ausstülpungen im arteriellen Stromgebiet ellipsoid, im zweidimensionalen Bild als Ellipse. Dagegen wichen die Ausstülpungen im venösen Stromgebiet und in der Peripherie von der ellipsoiden Annäherung deutlich ab ($p < 0,05$),

vermutlich aufgrund ihrer keulenförmigen Form mit einem dünneren Stiel und einem dickeren Kopfstück.

Infolge der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ in die Retina von jungen Mäusen bildeten sich keulenförmige Ausstülpungen der retinalen Blutgefäße aus. Es stellte sich die Frage wie diese Ausstülpungen zustande kamen. Als Ansatz wäre eine ungerichtete Proliferation der Endothelzellen denkbar, ebenso aber auch eine zufällige Zusammenlagerung von Mikroglia oder aberranten Spitzenzellen. Im Folgenden soll der Ursprung dieser Ausstülpungen näher beleuchtet werden.

3.1.2 Immunhistochemie von CD11b

Isolektin-B4 färbt sowohl die retinalen Blutgefäße als auch Mikroglia an. Daher könnten die Ausstülpungen auch durch eine Häufung von Mikroglia entstanden sein. Die Immunhistochemie von CD11b ermöglicht die ausschließliche Darstellung von Mikroglia. In den Färbungen von CD11b konnten keine den Ausstülpungen auch nur ähnlichen Formationen gefunden werden (Abbildungen 21 und 22).

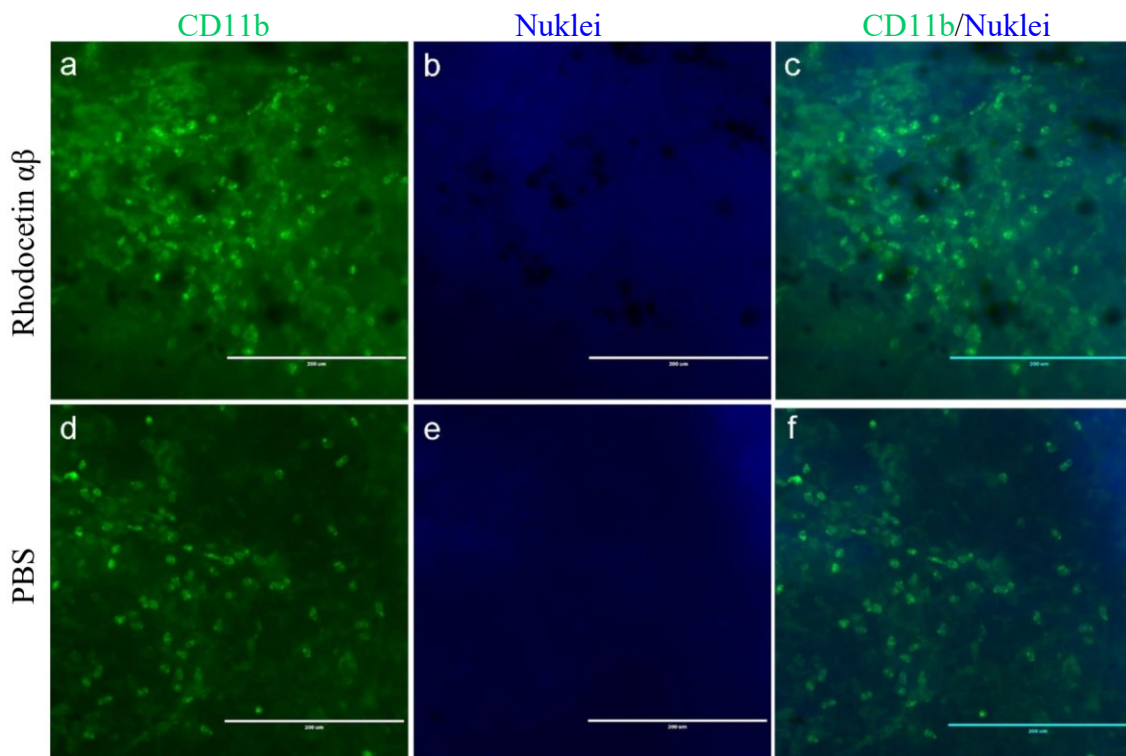


Abb. 21 Keine CD11b-positiven Ausstülpungen nach Rhodocetin $\alpha\beta$ -Injektion. Dargestellt sind Detailaufnahmen in 20facher Vergrößerung. Die Netzhäute wurden an P5 injiziert und an P6 als Flatmounts präpariert. In der rechten Spalte ist die Doppelfärbung dargestellt, in den beiden linken Spalten jeweils die einzelnen Farbkanäle der Doppelfärbung. **a** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$, gefärbt nach CD11b. **b** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$. Die Färbung

erfolgte mit DAPI. **c** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$. **d** Injektion von PBS, gefärbt nach CD11b. **e** Injektion von PBS und mit DAPI gefärbt. **f** Injektion von PBS.

Ebenso stellten sich Mikroglia-Zellen in den Netzhäuten der jungen Mäuse kleiner als die Ausstülpungen dar.

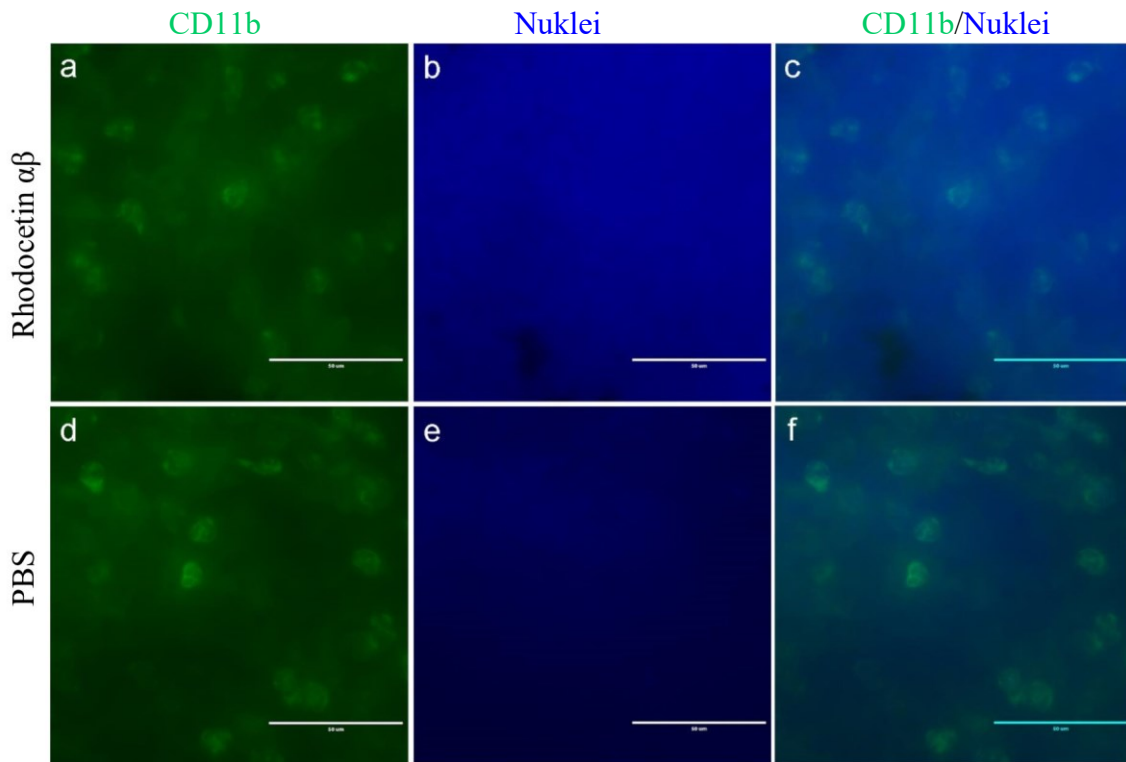


Abb. 22 Keine CD11b-positiven Ausstülpungen nach Rhodocetin $\alpha\beta$ -Injektion. Dargestellt sind Detailaufnahmen in 60facher Vergrößerung. Die Injektion erfolgte an P5, die Präparation als Flatmounts an P6. In der rechten Spalte ist die Doppelfärbung dargestellt, in den beiden linken Spalten sind die einzelnen Farbkanäle der Doppelfärbung abgebildet. **a** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$, gefärbt nach CD11b. **b** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$. Die Färbung erfolgte mit DAPI. **c** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$. **d** Injektion von PBS und gefärbt nach CD11b. **e** Injektion von PBS, gefärbt mit DAPI. **f** Injektion von PBS.

Die Ausstülpungen, die nach der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ in der Retina entstanden sind, schienen somit nicht aus einer Zusammenlagerung von Mikroglia zu bestehen, sondern waren Endothelzellen, die aus den bestehenden Blutgefäßen herausprossen.

3.1.3 Proliferationsanalyse mittels EdU-Kit

Des Weiteren sollte untersucht werden ob die entstehenden Ausstülpungen ein Zeichen einer insgesamt erhöhten Proliferation im Gefäßsystem waren. Auf die Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ folgte die Injektion von EdU, mit dem die Proliferation sichtbar gemacht werden konnte. Es zeigte sich keine erhöhte Proliferation der retinalen Blutgefäße in der

Versuchsgruppe mit der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ (Abbildung 23). Die durch die Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ entstehenden Ausstülpungen entstanden nicht durch eine erhöhte Proliferation der Endothelzellen im retinalen Gefäßsystem. Die Anfärbung mittels EdU schien vor allem mit den Isolektin-B4 positiven Mikrogliazellen zu kolokalisieren. Diese Kolokalisation schien nach der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ verringert im Vergleich zur Kontrollgruppe.

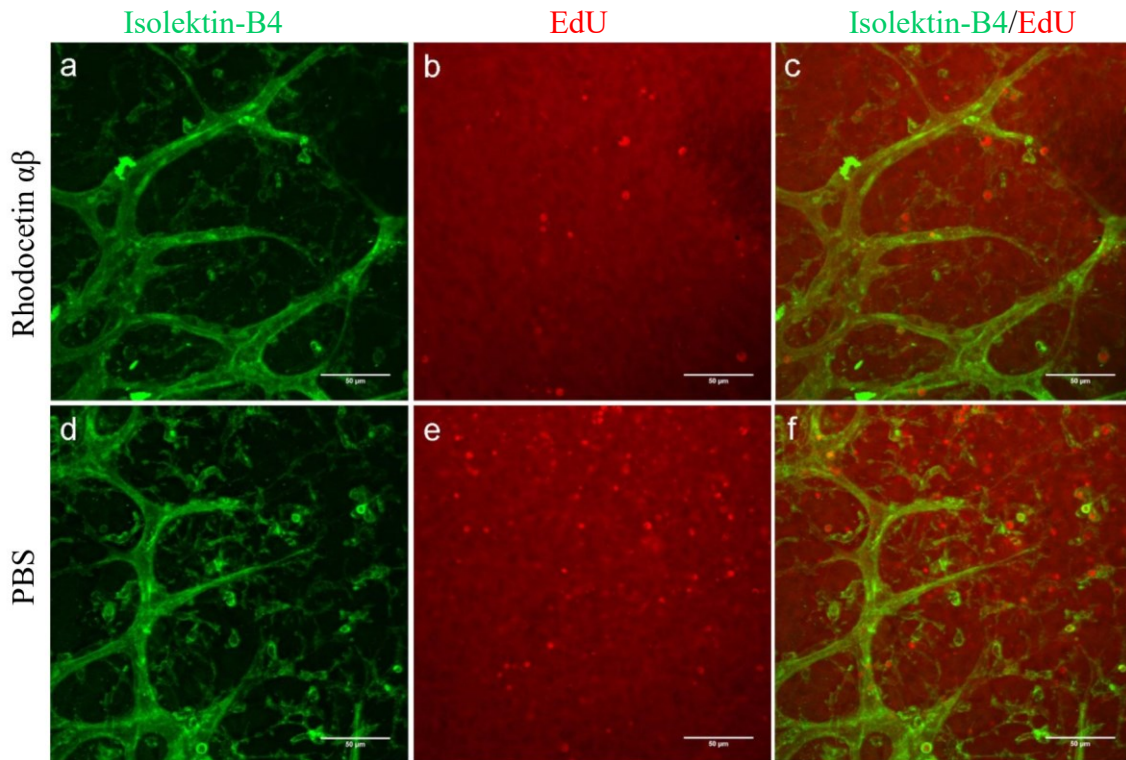


Abb. 23 Keine erhöhte Proliferation der retinalen Blutgefäße nach Rhodocetin $\alpha\beta$ -Injektion. Dargestellt sind Aufnahmen in 25-facher Vergrößerung in der Peripherie. Die Netzhäute wurden an P5 injiziert, an P6 wurde das EdU injiziert sowie die Netzhäute als Flatmounts präpariert. In der rechten Spalte ist die Doppelfärbung dargestellt, in den beiden linken Spalten jeweils die einzelnen Farbkanäle. **a** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$, gefärbt mit Isolektin-B4. **b** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$. Die Färbung erfolgte mit dem EdU-Kit. **c** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$. **d** Injektion von PBS und Färbung mit Isolektin-B4. **e** Injektion von PBS, gefärbt mit dem EdU-Kit. **f** Injektion von PBS.

3.1.4 Auswertung der Angiogenese der Retina

Rhodocetin $\alpha\beta$ könnte die stattfindende Angiogenese in der Retina beeinflusst haben durch die vermehrte Bildung von Ausstülpungen. Daher wurden im Folgenden verschiedene Parameter untersucht, die auf eine in zunehmenden Maße stattfindende Angiogenese hindeuten.

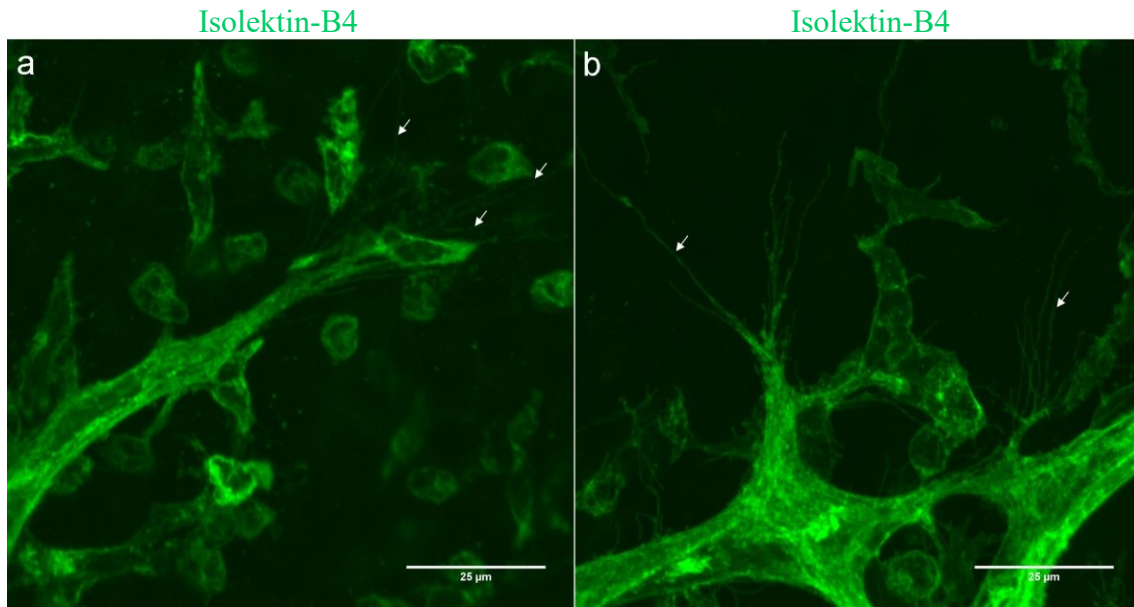


Abb. 24 Kein Einfluss von Rhodocetin $\alpha\beta$ auf die Filopodienanzahl im arteriellen Stromgebiet. Dargestellt werden in 63-facher Vergrößerung aufgenommene Detailaufnahmen im Endstromgebiet von arteriellen Gefäßen. Die Injektion mit Rhodocetin $\alpha\beta$ oder PBS erfolgte an P5, die Präparation und Färbung mit Isolektin-B4 an P6. Die Pfeile zeigen exemplarisch auf einige Filopodien. **a** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$. **b** Injektion von PBS.

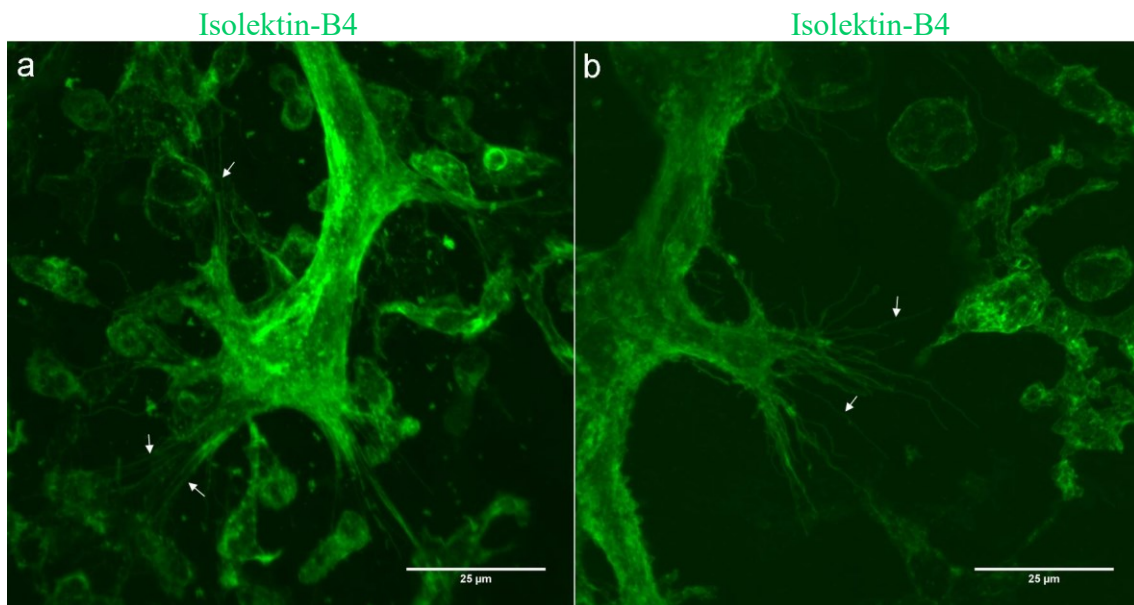


Abb. 25 Vermehrte Ausbildung von Filopodien im venösen Stromgebiet nach Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$. Die Injektion mit Rhodocetin $\alpha\beta$ oder PBS erfolgte an P5, die Präparation und Färbung mit Isolektin-B4 an P6. Die Aufnahme der Isolektin-B4 gefärbten Retinae erfolgte in 63-facher Vergrößerung in den Endstromgebieten von venösen Gefäßen. Die Pfeile zeigen exemplarisch auf einige Filopodien. **a** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$. **b** Injektion von PBS.

Auch wenn die Ausstülpungen nicht durch eine erhöhte Proliferation bedingt waren, so konnten sie trotzdem Ausdruck von aberranten Spitzenzellen sein. Daher wurde die Zahl der Filopodien nach der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ mit der Zahl der Filopodien der Kontrollgruppe verglichen. Dazu wurden die Spitzenzellen in der Peripherie des arteriellen und des venösen Stromgebietes getrennt voneinander betrachtet (Abbildungen 24 und 25).

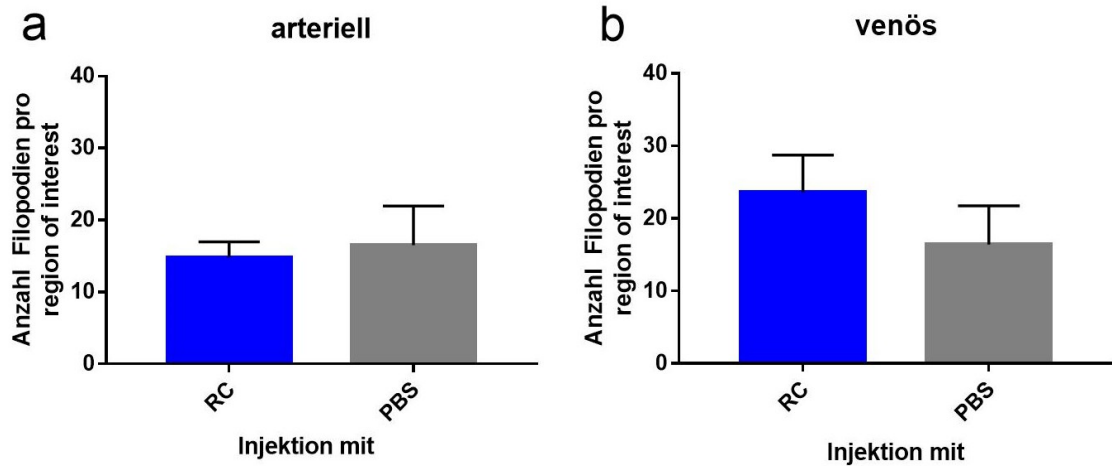


Abb. 26 Der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ folgte eine vermehrte Anzahl von Filopodien der venösen Gefäße. Dargestellt ist die Anzahl an Filopodien pro Detailaufnahme in 63-facher Vergrößerung. Die Netzhäute wurden an P5 injiziert sowie an P6 präpariert und mit Isolektin-B4 gefärbt. **a** Anzahl an Filopodien im arteriellen Stromgebiet nach Injektionsgruppe. p-Wert = 0,539 (t-Test). n(RC)=5, n(PBS)=4. **b** Anzahl an Filopodien im venösen Stromgebiet. p-Wert = 0,0112 (t-Test). n(RC)=11, n(PBS)=7.

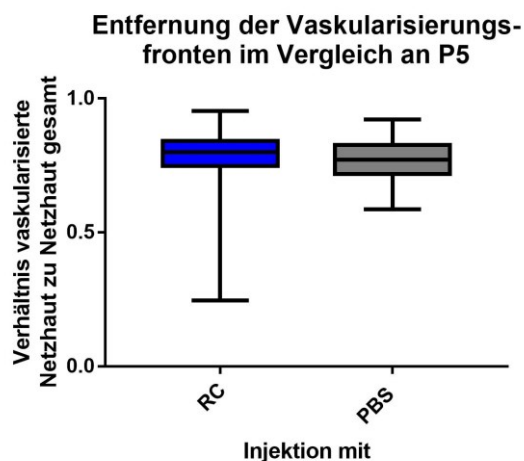


Abb. 27 Kein Einfluss von Rhodocetin $\alpha\beta$ auf die Geschwindigkeit des Auswachsens des oberflächlichen Plexus. Darstellung der Vaskularisierungsfront der mit Isolektin-B4 gefärbten Übersichtsaufnahmen. Gezeigt wird

das Verhältnis der Entfernung der Vaskularisierungsfront zum Mittelpunkt der Retina zur Entfernung des Randes der Netzhaut zum Mittelpunkt. Dieses Verhältnis wurde pro Blatt des Flatmounts berechnet. Die Injektion erfolgte an P5, die Präparation an P6. p-Wert = 0,1221 (t-Test). n(RC)=274, n(PBS)=98.

Durch die Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ bildeten sich vermehrt Filopodien an den Spitzenzellen. Rhodocetin $\alpha\beta$ schien somit die Spitzenzellen zu fördern und bedingte dadurch eine höhere Anzahl an Filopodien. Dieser Effekt betraf nur das venöse Stromgebiet (Abbildung 26). Im arteriellen Stromgebiet bewirkte Rhodocetin $\alpha\beta$ keine Förderung des Spitzenzell-Phänotyps und damit der Anzahl an Filopodien. Da Rhodocetin $\alpha\beta$ die Spitzenzellen im venösen Stromgebiet zu fördern schien lag die Vermutung nahe, dass Rhodocetin $\alpha\beta$ auch einen Einfluss auf die generell stattfindende Angiogenese der Retina haben könnte.

Durch die vermehrte Anzahl an Filopodien und die Bildung von Ausstülpungen könnte die Vaskularisation der Retina durch den oberflächlichen Gefäßplexus schneller erfolgt sein als üblich. Um diesen Effekt messen und beurteilen zu können wurde der Abstand der Front der auswachsenden Gefäße des oberflächlichen Gefäßplexus zum Mittelpunkt der Retina hin vermessen und im Verhältnis zum gesamten Radius der Retina betrachtet.

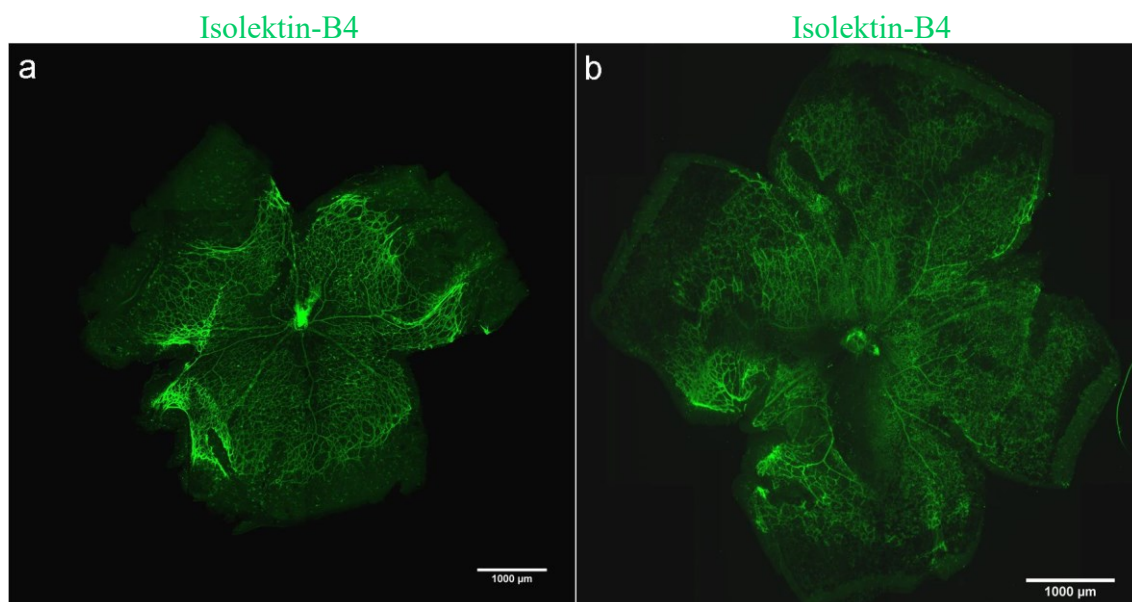


Abb. 28 Entfernung der Vaskularisierungsfronten vom Zentrum der Retina im Vergleich. Dargestellt sind zwei repräsentative Netzhäute, die an P5 injiziert sowie an P6 präpariert wurden. Gefärbt wurden die Retinae mit Isolektin-B4. Die Übersichtsaufnahmen bestehen aus Aufnahmen in 4-facher Vergrößerung. Diese wurden zu einer Aufnahme

zusammengefügt. Unterschiedliche Maßstäbe ergeben sich aus der unterschiedlichen Form und Größe der Netzhäute. **a** Injektion mit Rhodocetin $\alpha\beta$. **b** Injektion von PBS.

Durch die Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ wuchs der oberflächliche Gefäßplexus nicht schneller aus als in der Kontrollgruppe. Es zeigte sich, dass Rhodocetin $\alpha\beta$ an Tag 5 nach der Geburt der Jungtiere nicht zu einer schnelleren Vaskularisation der Retina beitrug (Abbildungen 27 und 28).

3.1.5 Veränderungen der Gefäßarchitektur

Nachdem die Ausstülpungen, die durch Rhodocetin $\alpha\beta$ hervorgerufen wurden, genauer untersucht worden sind, sollte der Fokus auf eventuell bestehende weitere durch Rhodocetin $\alpha\beta$ bedingte Veränderungen der retinalen Gefäße gelegt werden.

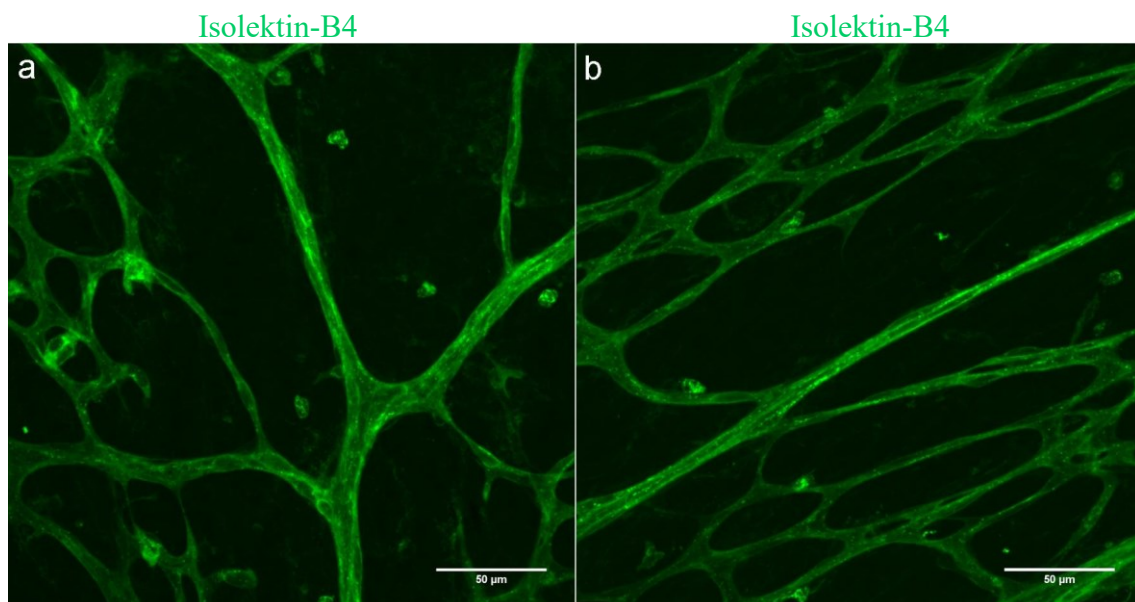


Abb. 29 Kein Unterschied in der Anzahl der Verzweigungspunkte im arteriellen Stromgebiet. Dargestellt werden Detailaufnahmen im arteriellen Stromgebiet in 25-facher Vergrößerung nach der Injektion an P5 und der Präparation an P6. Die Netzhäute wurden mit Isolektin-B4 gefärbt und als Flatmount präpariert. **a** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$. **b** Injektion von PBS.

Um untersuchen zu können, ob Rhodocetin $\alpha\beta$ auch einen Einfluss auf die Gefäßarchitektur der oberflächlichen Gefäßschicht hatte, wurde die Anzahl an Verzweigungspunkte der Gefäße ausgezählt und mit der Kontrollgruppe verglichen (Abbildungen 29-31).

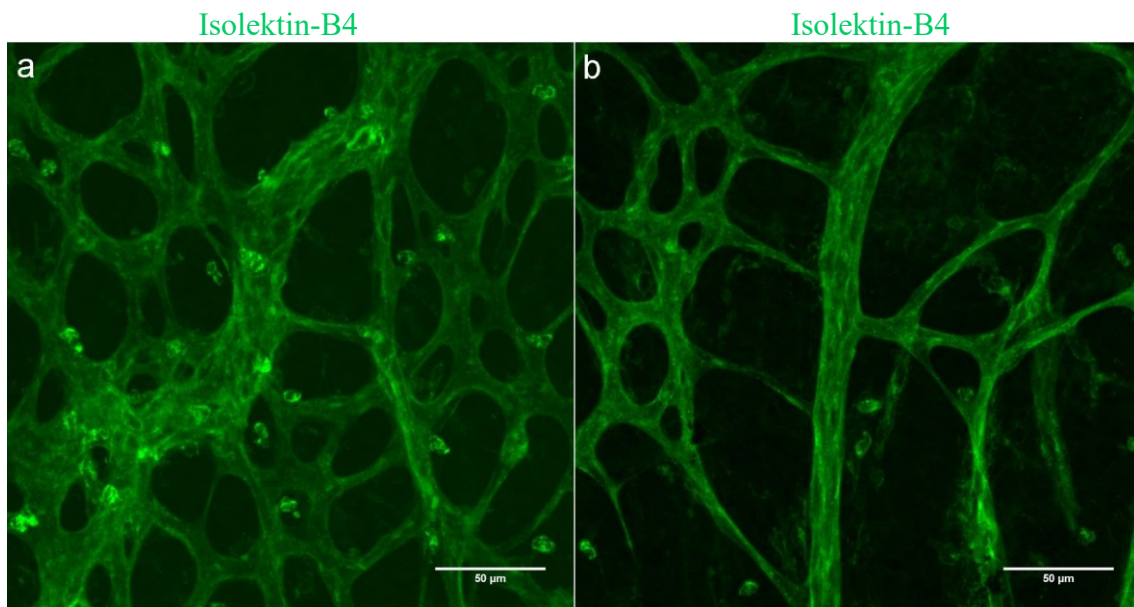


Abb. 30 Vermehrte Verzweigungspunkte nach Rhodocetin $\alpha\beta$ -Injektion im venösen Stromgebiet. Dargestellt werden Detailaufnahmen im venösen Stromgebiet in 25-facher Vergrößerung nach der Injektion an P5 und der Präparation an P6. Die Netzhäute wurden mit Isolektin-B4 gefärbt und als Flatmount präpariert. **a** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$. **b** Injektion von PBS.

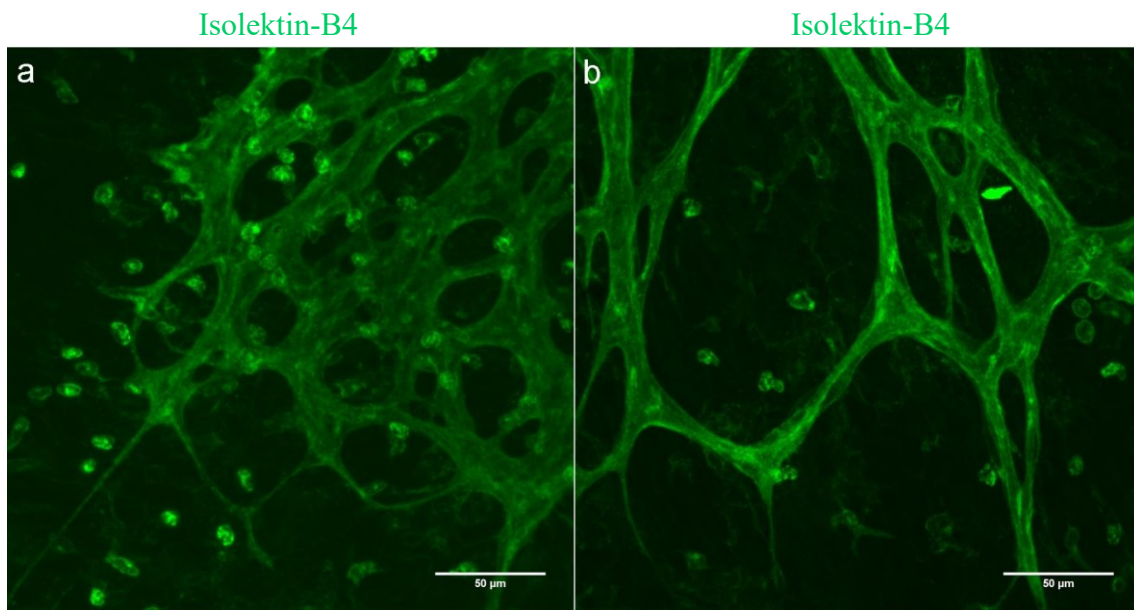


Abb. 31 Ebenfalls vermehrte Verzweigungspunkte nach der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ in der Peripherie. Dargestellt werden Detailaufnahmen der Peripherie in 25-facher Vergrößerung nach der Injektion an P5 und der Präparation an P6. Die Netzhäute wurden mit Isolektin-B4 gefärbt und als Flatmount präpariert. **a** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$. **b** Injektion von PBS.

Im arteriellen sowie im venösen Stromgebiet ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe mit der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$. In der Peripherie bewirkte Rhodocetin $\alpha\beta$ die vermehrte Bildung von Verzweigungsstellen (Branching points) des oberflächlichen Gefäßplexus (Abbildung 32).

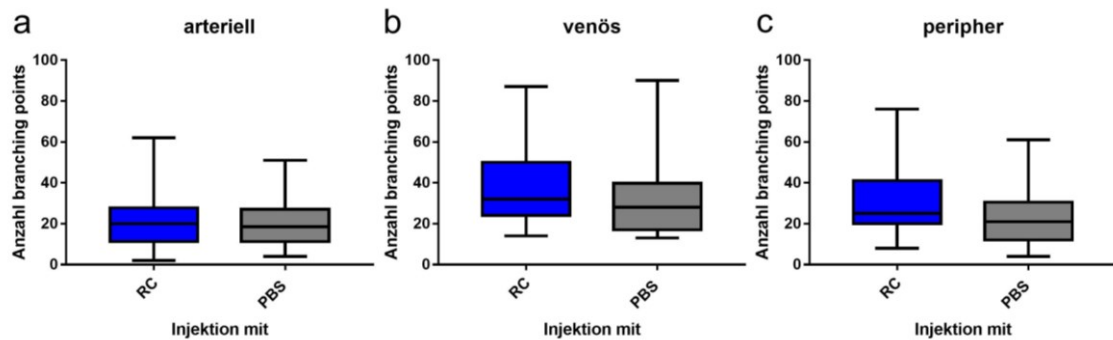


Abb. 32 Anzahl der Verzweigungspunkte der Gefäße nach Stromgebiet. Dargestellt werden die einzelnen Stromgebiete mit den jeweiligen Injektionsgruppen. Ausgewertet wurde die Anzahl der Branching points einer Detailaufnahme des konfokalen Mikroskops in 25-facher Vergrößerung und der Färbung mit Isolektin-B4. Gewertet wurden Aufnahmen nach der Injektion an P5 oder P6 sowie der Präparation 24 Stunden nach der Injektion. **a** Anzahl der Branching points im arteriellen Stromgebiet. p-Wert = 0,8118 (t-Test). n(RC)=52, n(PBS)=24. **b** Anzahl an Verzweigungspunkte der Gefäße im venösen Stromgebiet. p-Wert = 0,1722 (t-Test). n(RC)=47, n(PBS)=24. **c** Anzahl an Verzweigungspunkten in der Peripherie. p-Wert = 0,0323 (t-Test). n(RC)=68, n(PBS)=33.

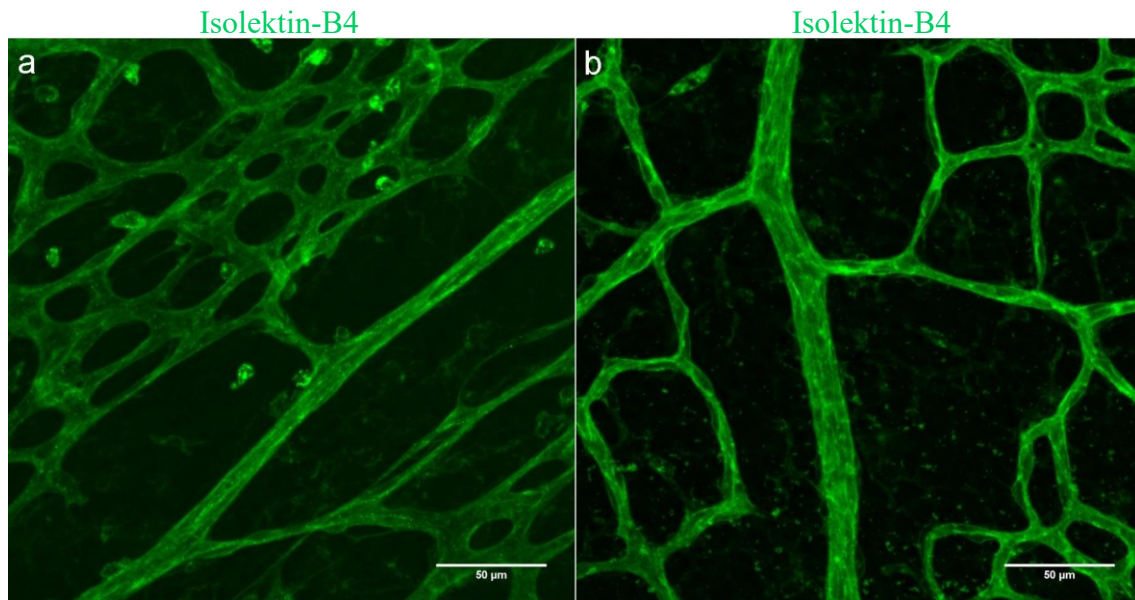


Abb. 33 Kein signifikanter Unterschied der vaskularisierten Fläche nach der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$. Dargestellt werden Detailaufnahmen im arteriellen Stromgebiet in 25-facher Vergrößerung nach der Injektion an P5 und der Präparation an P6. Die Netzhäute wurden mit Isolektin-B4 gefärbt und als Flatmount präpariert. **a** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$. **b** Injektion von PBS.

Neben der Anzahl an Verzweigungspunkten wurde auch die Fläche gemessen, die vom retinalen Gefäßnetz in einer Detailaufnahme bedeckt wurde (Abbildungen 33-35).

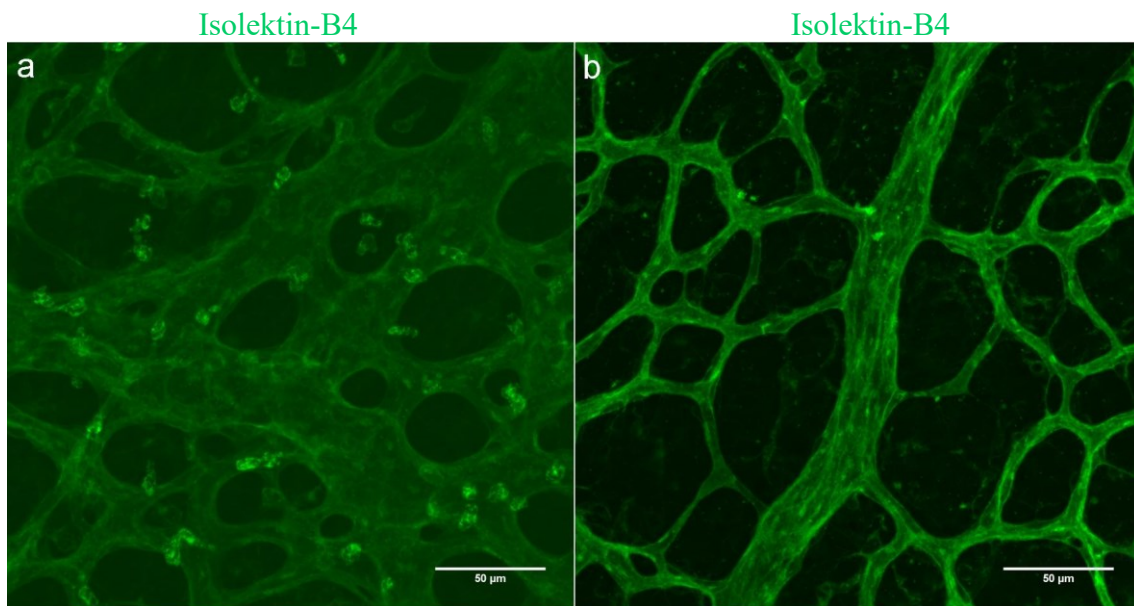


Abb. 34 Vermehrt vaskularisierte Fläche im venösen Stromgebiet nach der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$. Dargestellt werden Detailaufnahmen im venösen Stromgebiet in 25-facher Vergrößerung nach der Injektion an P5 und der Präparation an P6. Die Netzhäute wurden mit Isolektin-B4 gefärbt und als Flatmount präpariert. **a** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$. **b** Injektion von PBS.

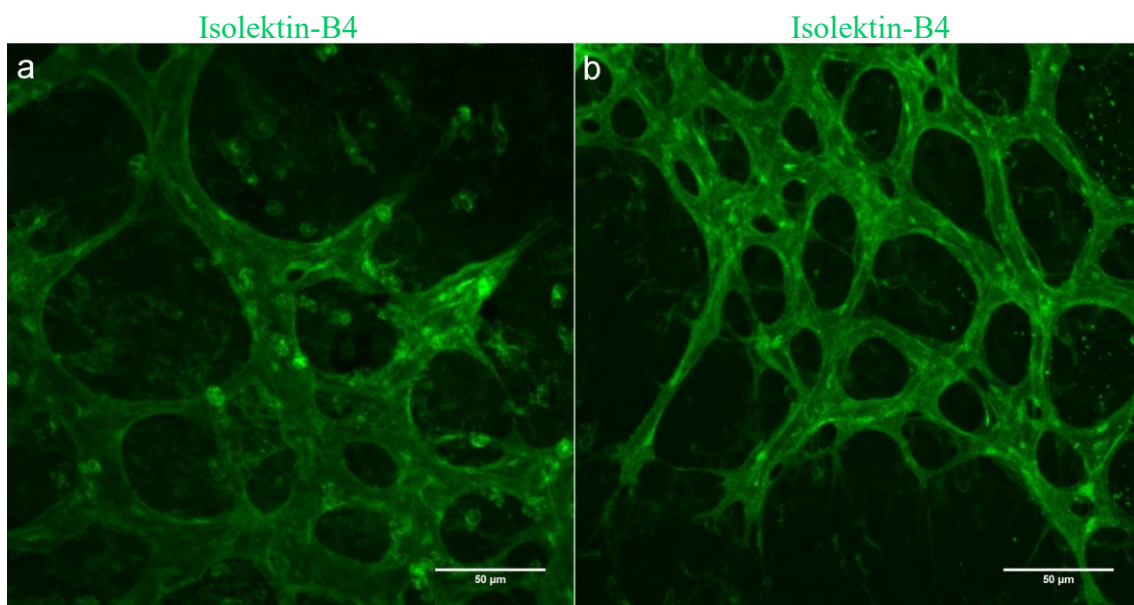


Abb. 35 Deutlich vermehrt vaskularisierte Fläche in der Peripherie nach Rhodocetin $\alpha\beta$ -Injektion. Dargestellt werden Detailaufnahmen der Peripherie in 25-facher Vergrößerung nach der Injektion an P5 und der Präparation an P6. Die Netzhäute wurden mit Isolektin-B4 gefärbt und als Flatmount präpariert. **a** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$. **b** Injektion von PBS.

Im arteriellen Stromgebiet zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe mit der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ und der Kontrollgruppe. Im venösen Stromgebiet bedeckte das retinale Gefäßnetz eine größere Fläche nach der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ (Abbildung 34). Dies ließ zusammen mit den Ergebnissen der Verzweigungspunkte darauf schließen, dass unter Rhodocetin $\alpha\beta$ die Durchmesser der venösen Gefäße zunahm, da die Anzahl an Verzweigungen nicht signifikant zunahm. Nach der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ nahm die von den Gefäßen bedeckte Fläche in der Peripherie signifikant zu. Dies mag zum einen an der erhöhten Anzahl an Branching Points gelegen haben und zum anderen auch an dem erhöhten Gefäßdurchmesser. Insgesamt bewirkte Rhodocetin $\alpha\beta$ ein im venösen Stromgebiet und in der Peripherie dichter werdendes Gefäßnetz (Abbildung 36).

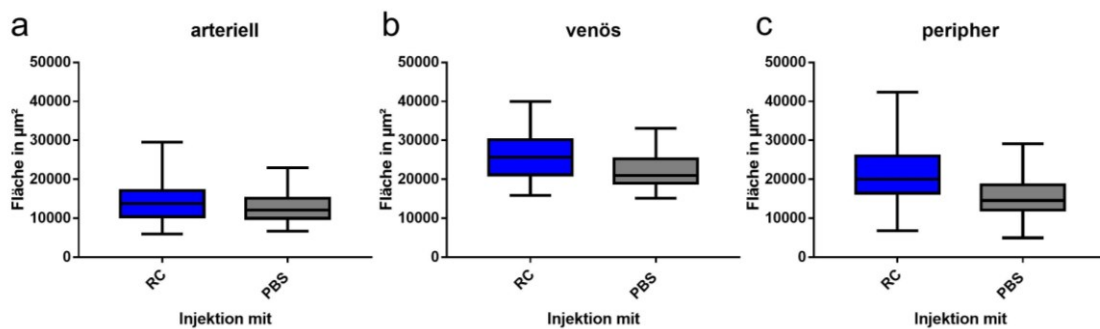


Abb. 36 Die Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ hatte einen Einfluss auf die vaskularisierte Fläche in der Peripherie und im venösen Stromgebiet. Dargestellt wird die Fläche, die von den Gefäßen in einer 25-fachen Vergrößerung bedeckt wurde. Zu Grunde gelegt wurden die Isolektin-B4 gefärbten Netzhäute der jeweiligen Injektionsgruppen. Die Injektion fand an P5 oder P6 statt, die Präparation an P6 bzw. P7. **a** Aufnahme im arteriellen Stromgebiet. p-Wert = 0,5734 (t-Test). n(RC)=49, n(PBS)=21. **b** Aufnahmen im venösen Stromgebiet. p-Wert = 0,0102 (t-Test). n(RC)=44, n(PBS)=17. **c** Aufnahmen in der Peripherie. p-Wert <0,0001 (t-Test). n(RC)=62, n(PBS)=29.

Rhodocetin $\alpha\beta$ induzierte so ein unreiferes Gefäßnetz der Retina. Außerdem zeigte sich sowohl in der Lokalisation der beobachteten Ausstülpungen, der Anzahl an Filopodien und an Verzweigungspunkten sowie der Größe der vaskularisierten Fläche, dass Rhodocetin $\alpha\beta$ einen größeren Effekt auf die venösen Gefäße und die Gefäße in der Peripherie der Retina besaß als auf arterielle Gefäße.

3.2 Molekularer Wirkmechanismus von Rhodocetin $\alpha\beta$ an den Retinalblutgefäßen

Die beobachteten Veränderungen der retinalen Gefäße nach der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ erschienen nicht gegensätzlich und könnten durch einen durch

Rhodocetin $\alpha\beta$ möglicherweise beeinflussten Signalweg entstanden sein. Daher wurde der cMet-Inhibitor SU11274 verwendet um den Signalweg zu bestätigen.

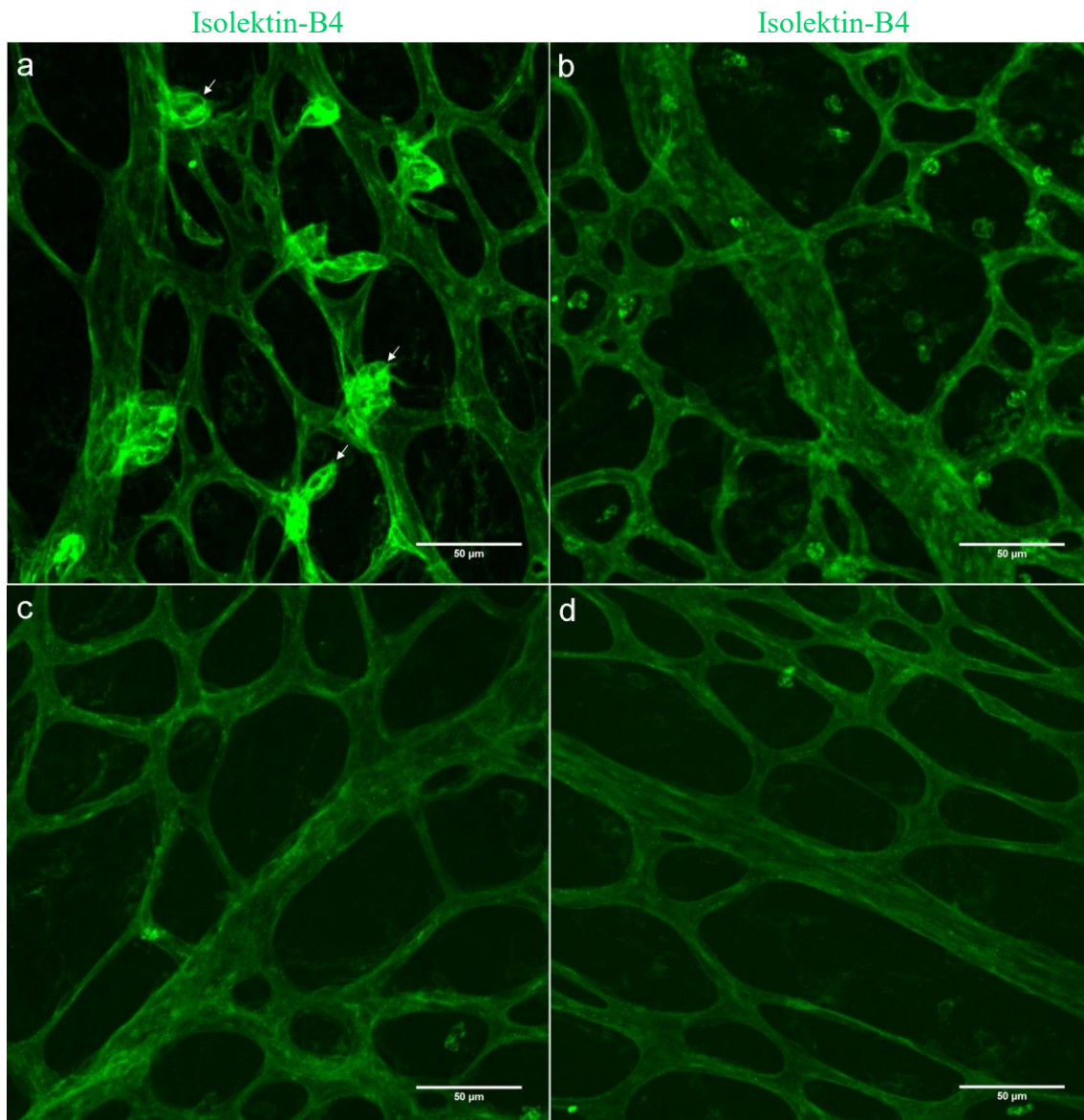


Abb. 37 Keine vermehrten Ausstülpungen nach Injektion des cMet-Inhibitors SU11274 im venösen Stromgebiet. Detailaufnahmen in 25-facher Vergrößerung. Isolektin-B4-Färbung der Netzhäute. **a** Rhodocetin $\alpha\beta$ - Injektion an P5 und Präparation an P6. Die weißen Pfeile zeigen exemplarisch auf einige Ausstülpungen. **b** Injektion von PBS an P6. Die Präparation erfolgte an P7. **c** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ und dem cMet-Inhibitor an P6 sowie Präparation an P7. **d** Injektion von PBS und dem cMet-Inhibitor an P6. Präparation als Flatmount an P7.

Um eine unabhängig von Rhodocetin $\alpha\beta$ vermittelte Wirkung von dem cMet-Inhibitor ausschließen zu können wurde eine Kontrollgruppe nur mit dem cMet-Inhibitor und ohne Rhodocetin $\alpha\beta$ injiziert. Durch die Injektion des Inhibitors von cMet konnte der

Bildung von Ausstülpungen durch Rhodocetin $\alpha\beta$ im venösen Stromgebiet entgegengewirkt werden (Abbildung 37).

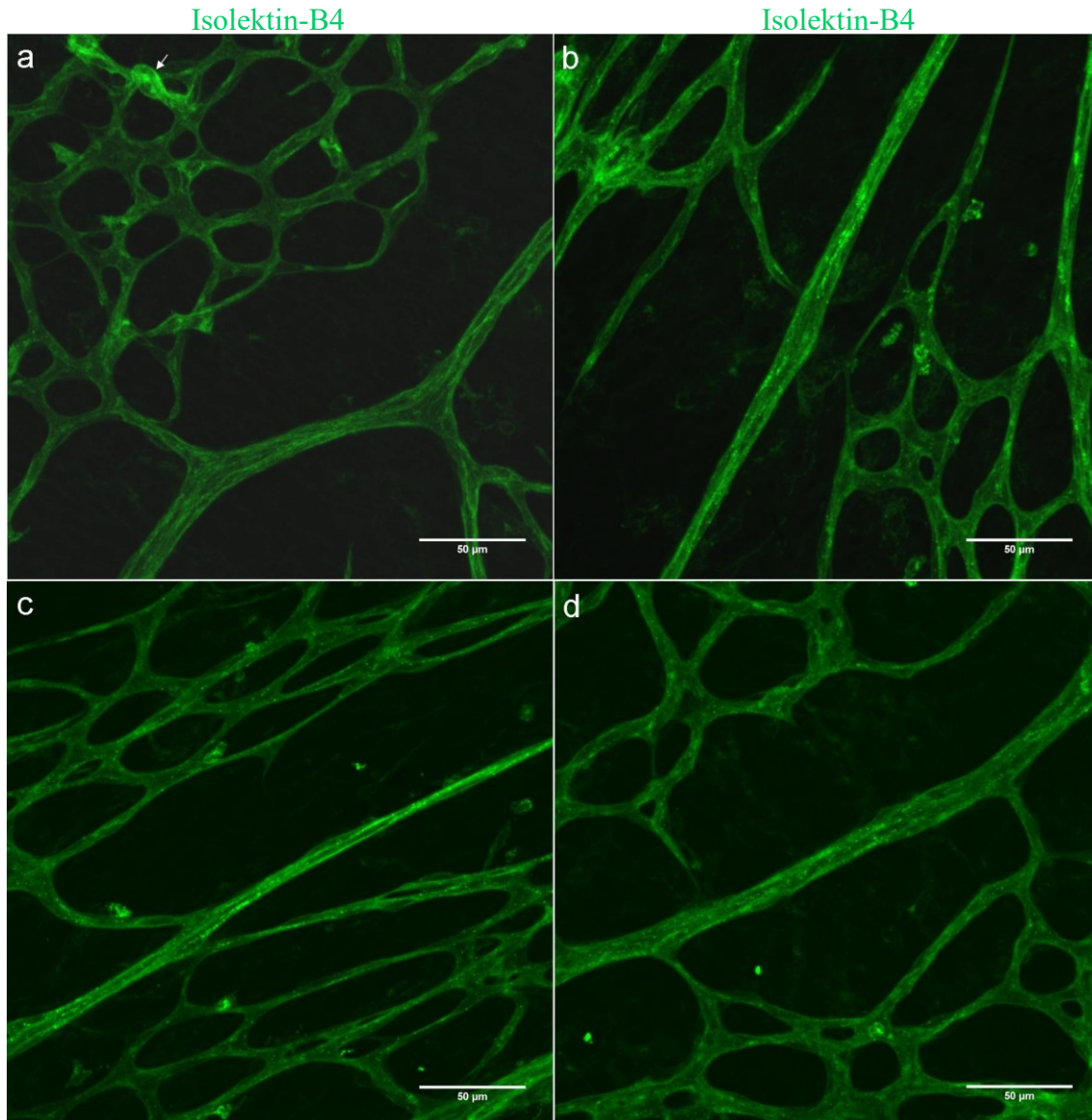


Abb. 38 Keine erhöhte Bildung von Ausstülpungen im arteriellen Stromgebiet. Detailaufnahmen in 25-facher Vergrößerung. Isolektin-B4-Färbung der Netzhäute. **a** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ an P5, sowie Präparation als Flatmount an P6. Der weiße Pfeil zeigt exemplarisch auf eine Ausstülpung. **b** Injektion von PBS an P6, Präparation als Flatmount an P7. **c** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ mit dem cMet-Inhibitor an P6. Die Präparation erfolgte an P7. **d** Injektion von PBS und dem cMet-Inhibitor an P6, sowie Präparation an P7.

Im arteriellen Stromgebiet war kein Unterschied zwischen den Injektionsgruppen mit Rhodocetin $\alpha\beta$ und dem cMet-Inhibitor nachweisbar (Abbildung 38).

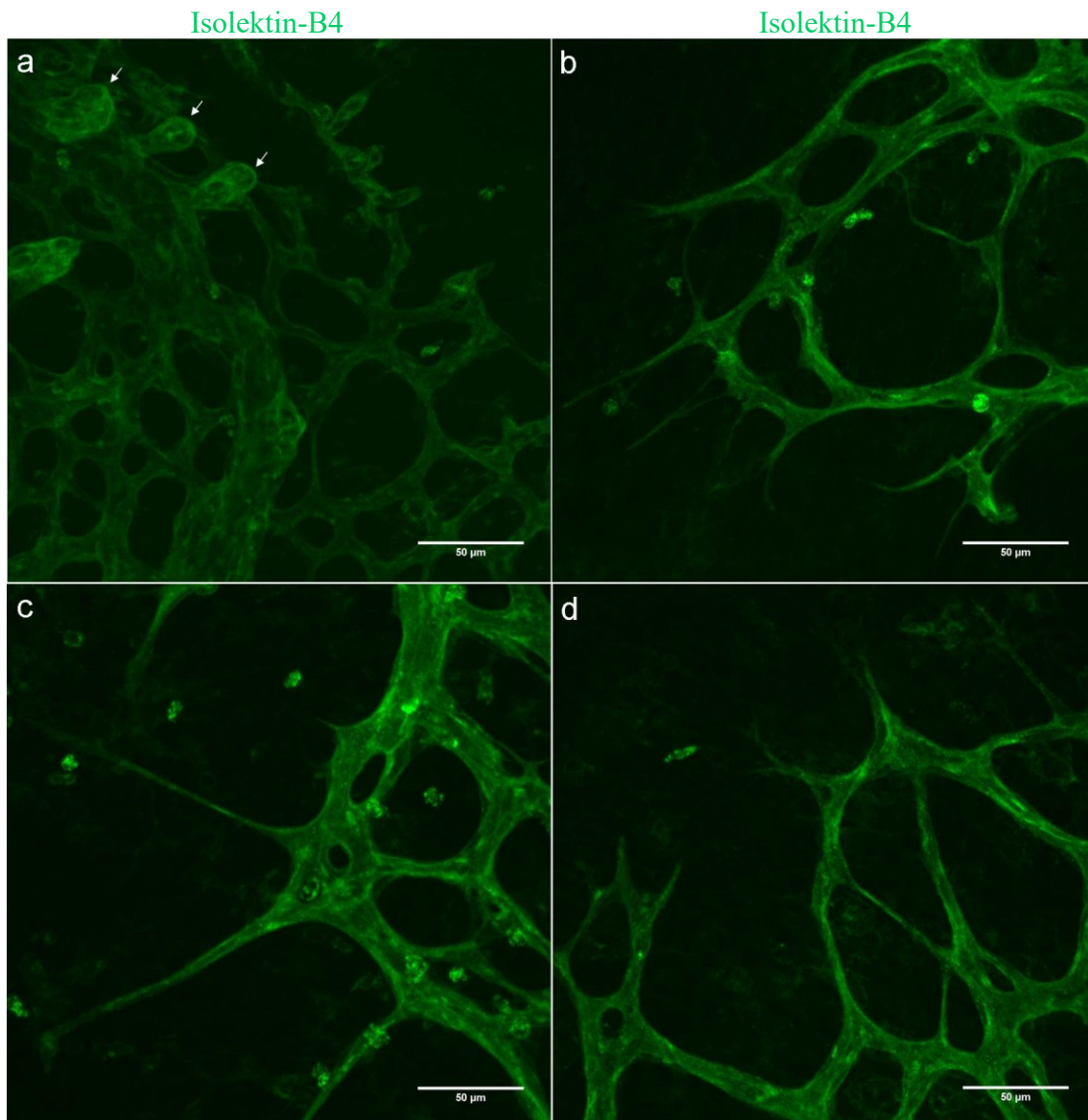


Abb. 39 Nach Rhodocetin $\alpha\beta$ -Injektion konnten Ausstülpungen beobachtet werden, nach der Injektion des cMet-Inhibitors konnten keine dargestellt werden. Detailaufnahmen in 25-facher Vergrößerung in der Peripherie. Die Netzhäute wurden mit Isolektin-B4 gefärbt. **a** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ an P6 und Präparation an P7. Die weißen Pfeile zeigen exemplarisch auf einige Ausstülpungen. **b** Injektion von PBS an P5 sowie Präparation an P6. **c** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ zusammen mit dem cMet-Inhibitor an P5. Die Präparation erfolgte an P6. **d** Injektion von PBS und dem cMet-Inhibitor an P5 und Präparation an P6.

Auch in der Peripherie traten die Ausstülpungen nicht auf, wenn Rhodocetin $\alpha\beta$ zusammen mit dem Inhibitor von cMet injiziert wurde (Abbildung 39). Es zeigte sich also, dass Rhodocetin $\alpha\beta$ die Bildung von Ausstülpungen vor allem im venösen Stromgebiet sowie in der Peripherie bewirkte. Auf das arterielle Stromgebiet hatte Rhodocetin $\alpha\beta$ kaum Einfluss.

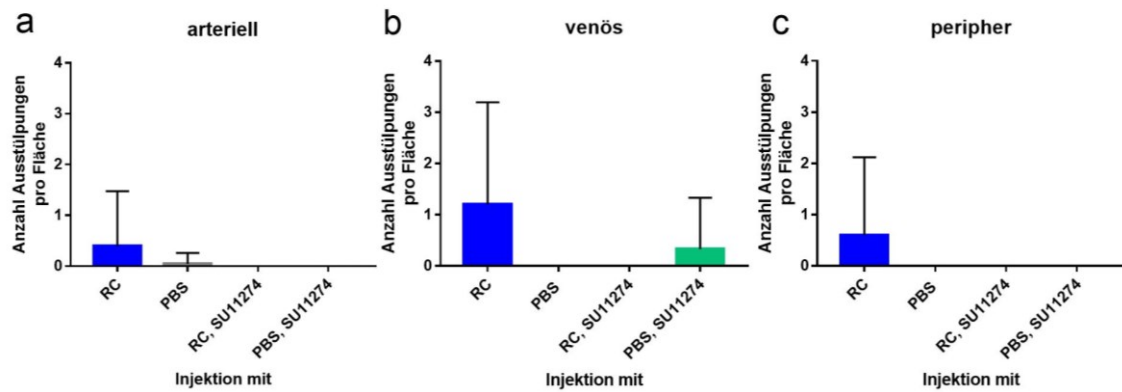


Abb. 40 Die Injektion des cMet-Inhibitors verhinderte die durch Rhodocetin $\alpha\beta$ entstehenden Ausstülpungen in der Peripherie und im venösen Stromgebiet. Dargestellt werden die Anzahl an Ausstülpungen der Gefäße pro Fläche an den Injektionstagen P5 und P6. Die Fläche einer in 25-facher Vergrößerung aufgenommenen Detailaufnahme des jeweiligen Stromgebietes betrug insgesamt 65571,601 μm^2 . **a** Aufnahme im arteriellen Stromgebiet. p-Wert = 0,2143 (ANOVA), n(RC)=53, n(PBS)=23, n(RC, SU11274)=9, n(PBS, SU11274)=9. **b** Aufnahme im venösen Stromgebiet. p-Wert = 0,0149 (ANOVA), n(RC)=49, n(PBS)=23, n(RC, SU11274)=9, n(PBS, SU11274)=9. **c** Aufnahme in der Peripherie der Retina. p-Wert = 0,06358 (ANOVA), n(RC)=68, n(PBS)=32, n(RC, SU11274)=10, n(PBS, SU11274)=9.

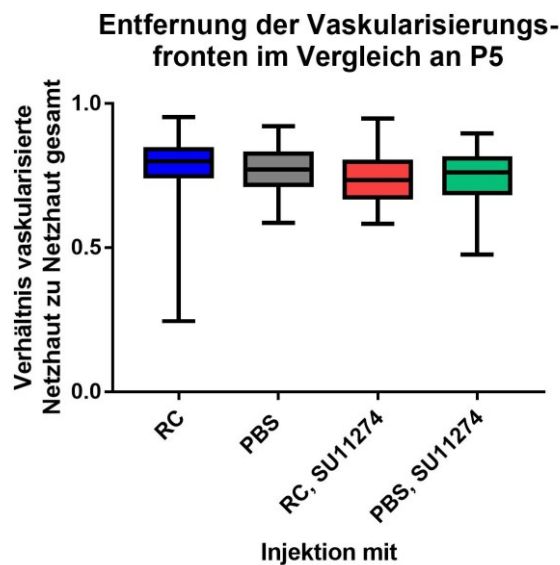


Abb. 41 Größe des vaskularisierten Areals im Vergleich bei Injektion an P5. Gezeigt wird das Verhältnis der Entfernung der Vaskularisierungsfront zum Mittelpunkt der Retina zur Entfernung des Randes der Netzhaut zum Mittelpunkt. Dieses Verhältnis wurde in den mit Isolektin-B4 gefärbten Übersichtsaufnahmen bestimmt und pro Blatt des Flatmounts berechnet. Die Injektion erfolgte an P5, die Präparation an P6. p-Wert = 0,006 (ANOVA). n(RC)=274, n(PBS)=98, n(RC, SU11274)=58, n(PBS, SU11274)=38.

Der Inhibitor von cMet allein unterdrückte in 8 von 9 Fällen die Bildung von Ausstülpungen, die in der Gegenwart von Rhodocetin $\alpha\beta$ gebildet wurden (Abbildung

40). Als Vermutung für den molekularen Wirkmechanismus von Rhodocetin $\alpha\beta$ ergab sich so die Aktivierung von cMet und infolgedessen die Bildung von Ausstülpungen in venösen sowie peripheren Retinalblutgefäßen. Wenn die Entstehung der Ausstülpungen durch Rhodocetin $\alpha\beta$ über die Aktivierung des cMet-Rezeptors vermittelt wurde so lag es auch nahe, die anderen beobachteten Veränderungen der Gefäßarchitektur unter dem Einfluss des cMet-Inhibitors zu beobachten.

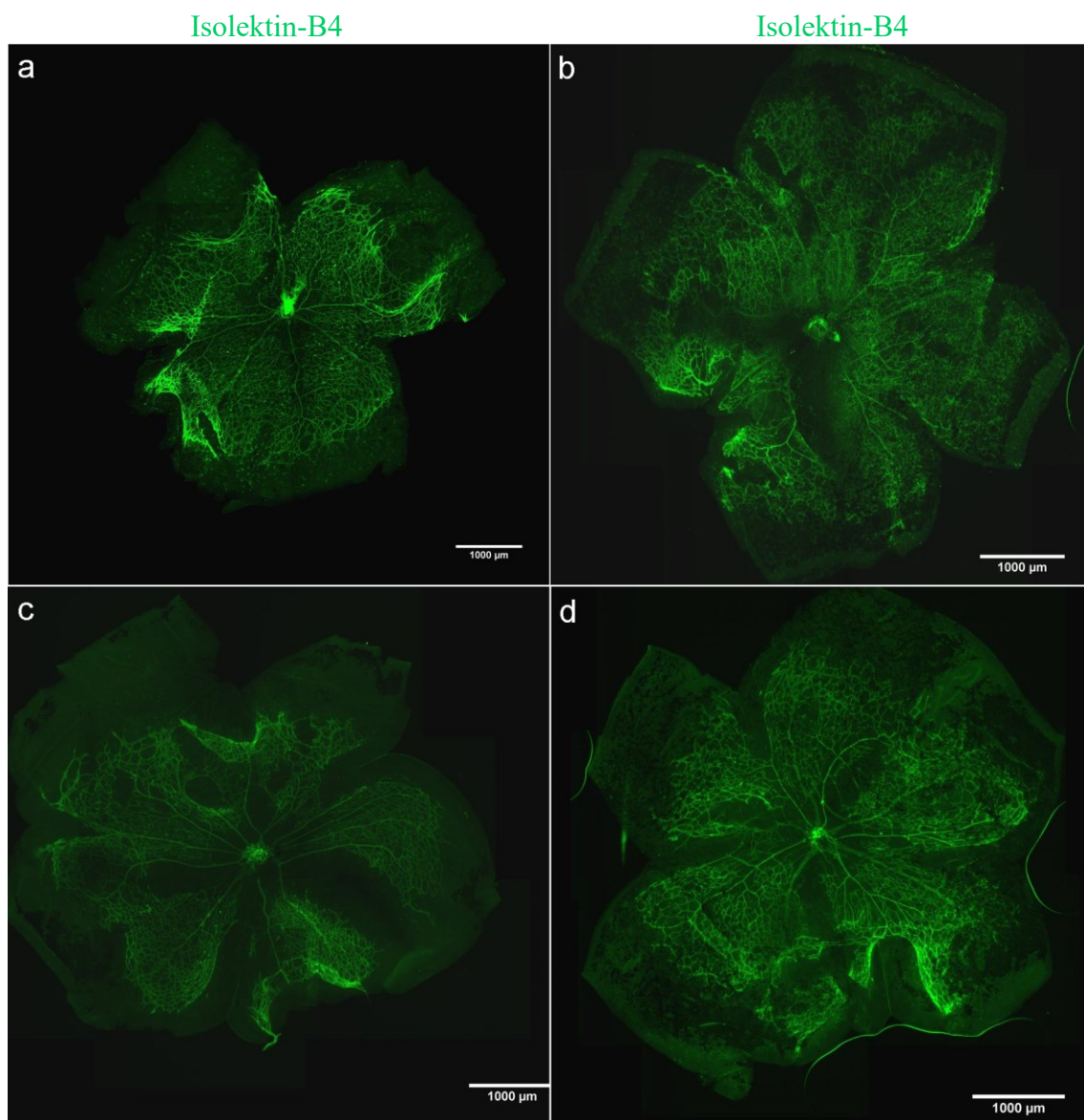


Abb. 42 Kein Unterschied in der Entfernung der Vaskularisierungsfronten. Gezeigt sind vier repräsentative Netzhäute, die an P5 injiziert sowie an P6 präpariert wurden. Gefärbt wurden die Retinae mit Isolektin-B4. Die Übersichtsaufnahmen bestehen aus Aufnahmen in 4-facher Vergrößerung. Diese wurden zu einer Aufnahme zusammengesetzt. Unterschiedliche Maßstäbe ergeben sich aus der unterschiedlichen Form und Größe der Netzhäute.

a Injektion mit Rhodocetin $\alpha\beta$. **b** Injektion von PBS. **c** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ mit dem c-Met-Inhibitor. **d** Injektion von PBS und dem cMet-Inhibitor.

Im Vergleich der relativen Entfernung der angiogenetischen Front des oberflächlichen Gefäßplexus der Retina an Tag 5 nach der Geburt der Jungtiere zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Tieren der Injektionsgruppe mit Rhodocetin $\alpha\beta$ und den unbehandelten Tieren der Kontrollgruppe.

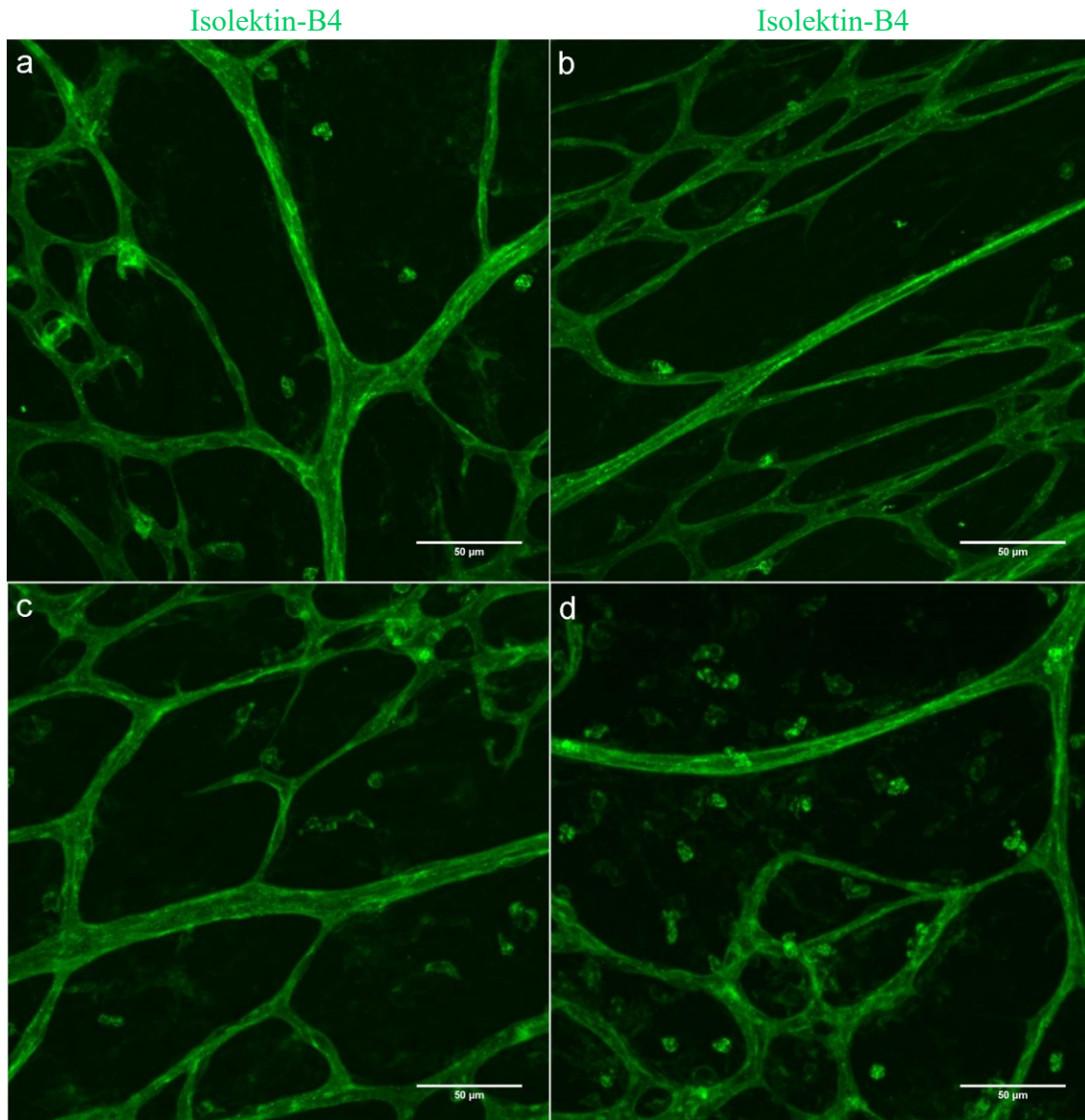


Abb. 43 Keine Veränderung der Verzweigungspunkte im arteriellen Stromgebiet nach Injektion des cMet-Inhibitors. Gezeigt werden Detailaufnahmen im arteriellen Stromgebiet in 25-facher Vergrößerung nach der Injektion an P5 und der Präparation an P6. Die Netzhäute wurden mit Isolektin-B4 gefärbt und als Flatmount präpariert. **a** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$. **b** Injektion von PBS. **c** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ und dem cMet-Inhibitor. **d** Injektion von PBS und dem cMet-Inhibitor.

Wurden die Gruppen mit dem cMet-Inhibitor hinzugefügt so ergab sich ein auf Signifikanz hinweisender p-Wert. Dies kam allerdings durch die Gruppe mit der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ und dem cMet-Inhibitor zustande aufgrund der verlangsamten Ausbreitung der angiogenetischen Front dieser Injektionsgruppe. Es schien, dass der cMet-Inhibitor auch über andere Wege die Vaskularisation der Retina beeinflussen konnte (Abbildung 41). Auch in den exemplarischen Übersichtsaufnahmen der Retina erschien die angiogenetische Front innerhalb einer Retina variabel. Diese Variabilität trug so zu dem beobachteten Ergebnis bei (Abbildung 42). Rhodocetin $\alpha\beta$ hatte keinen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Angiogenese des oberflächlichen Gefäßnetzes der Retina. Durch die Injektion wuchs der oberflächliche Gefäßplexus nicht schneller aus. Der cMet-Inhibitor SU11274 behinderte das Auswachsen nach der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ oder PBS.

Ähnlich sah es bei der Anzahl der Verzweigungspunkte (Branching Points) in den Detailaufnahmen aus. Auch hier hatte Rhodocetin $\alpha\beta$ keinen Einfluss auf die Anzahl der Branching Points im arteriellen Stromgebiet und die Injektion des cMet-Inhibitors blieb ohne sichtbare Folgen (Abbildung 43). Abbildung 44 zeigt, dass die Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ allein oder zusammen mit dem cMet-Inhibitor SU11274 die Verzweigung des Kapillarnetzes im venösen Stromgebiet nicht beeinflusste. Einzig die peripheren Retinalgefäße reagierten auf Rhodocetin $\alpha\beta$ mit einer vermehrten Verzweigung, welche durch die Injektion mit dem cMet-Inhibitor rückgängig war (Abbildung 45).

Die statistische Auswertung bestätigte: Die Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ bewirkte keine vermehrten Verzweigungen der Gefäße im arteriellen und im venösen Stromgebiet. In der Peripherie fanden sich mehr Verzweigungen nach der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$. Der cMet-Inhibitor bewirkte im arteriellen und im venösen Stromgebiet keine Veränderung, lediglich in der Peripherie konnte der cMet-Inhibitor die Anzahl der Verzweigungspunkte nach der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ gering halten (Abbildung 46).

Isolektin-B4

Isolektin-B4

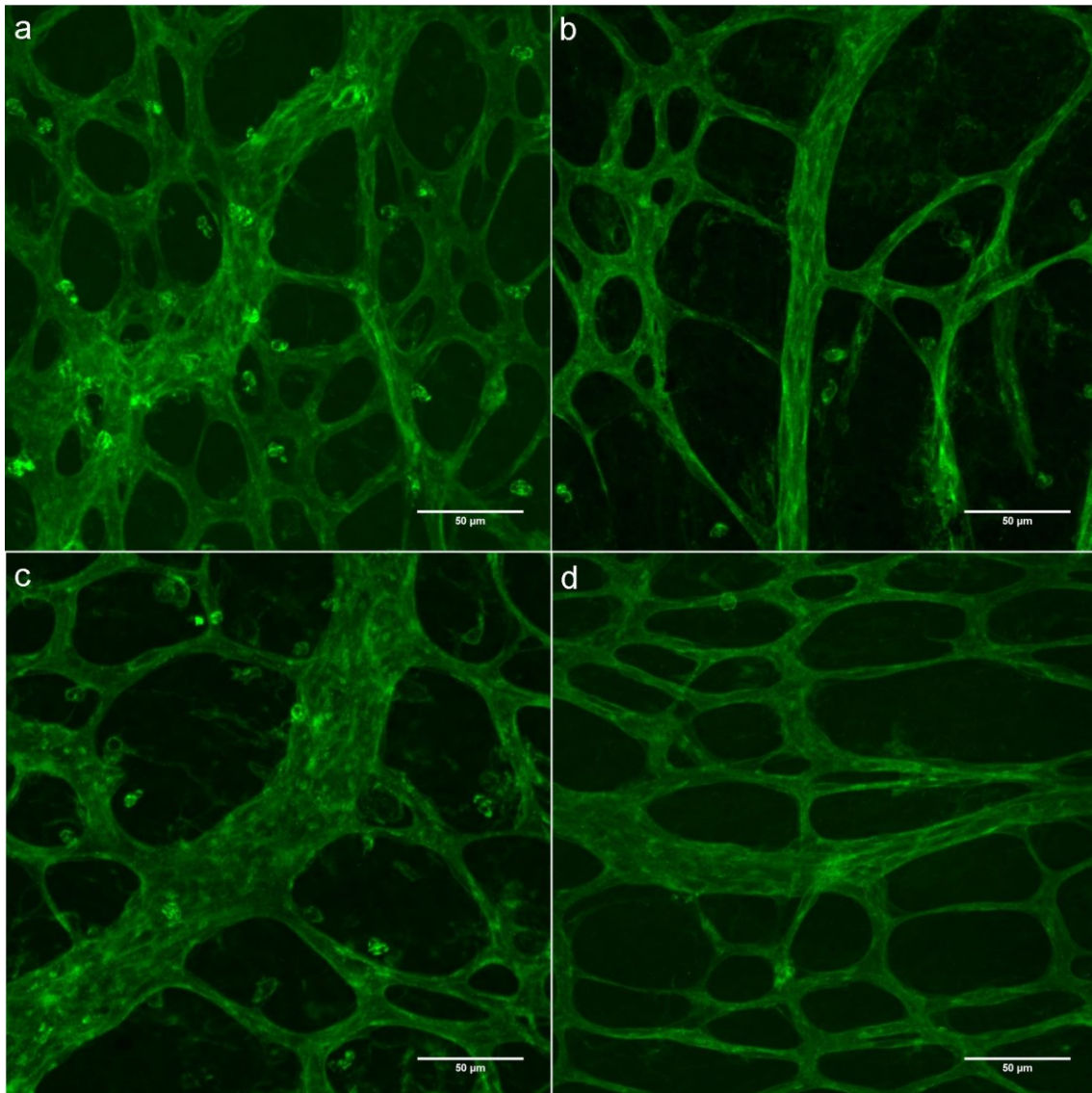


Abb. 44 Normwertige Anzahl an Verzweigungspunkten im venösen Stromgebiet. Gezeigt werden Detailaufnahmen im venösen Stromgebiet in 25-facher Vergrößerung nach der Injektion an P5 und der Präparation an P6. Die Netzhäute wurden mit Isolektin-B4 gefärbt und als Flatmount präpariert. **a** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$. **b** Injektion von PBS. **c** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ und dem cMet-Inhibitor. **d** Injektion von PBS und dem cMet-Inhibitor.

Auch die vaskularisierte Fläche der Retina wurde durch die Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ gesteigert. Daher wurde auch hier der cMet-Inhibitor eingesetzt, zum einen mit der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ und zum anderen die alleinige Injektion des cMet-Inhibitors. Im arteriellen Stromgebiet zeigte sich eine gleichbleibend von Gefäßen bedeckte Fläche in den Detailaufnahmen (Abbildung 47).

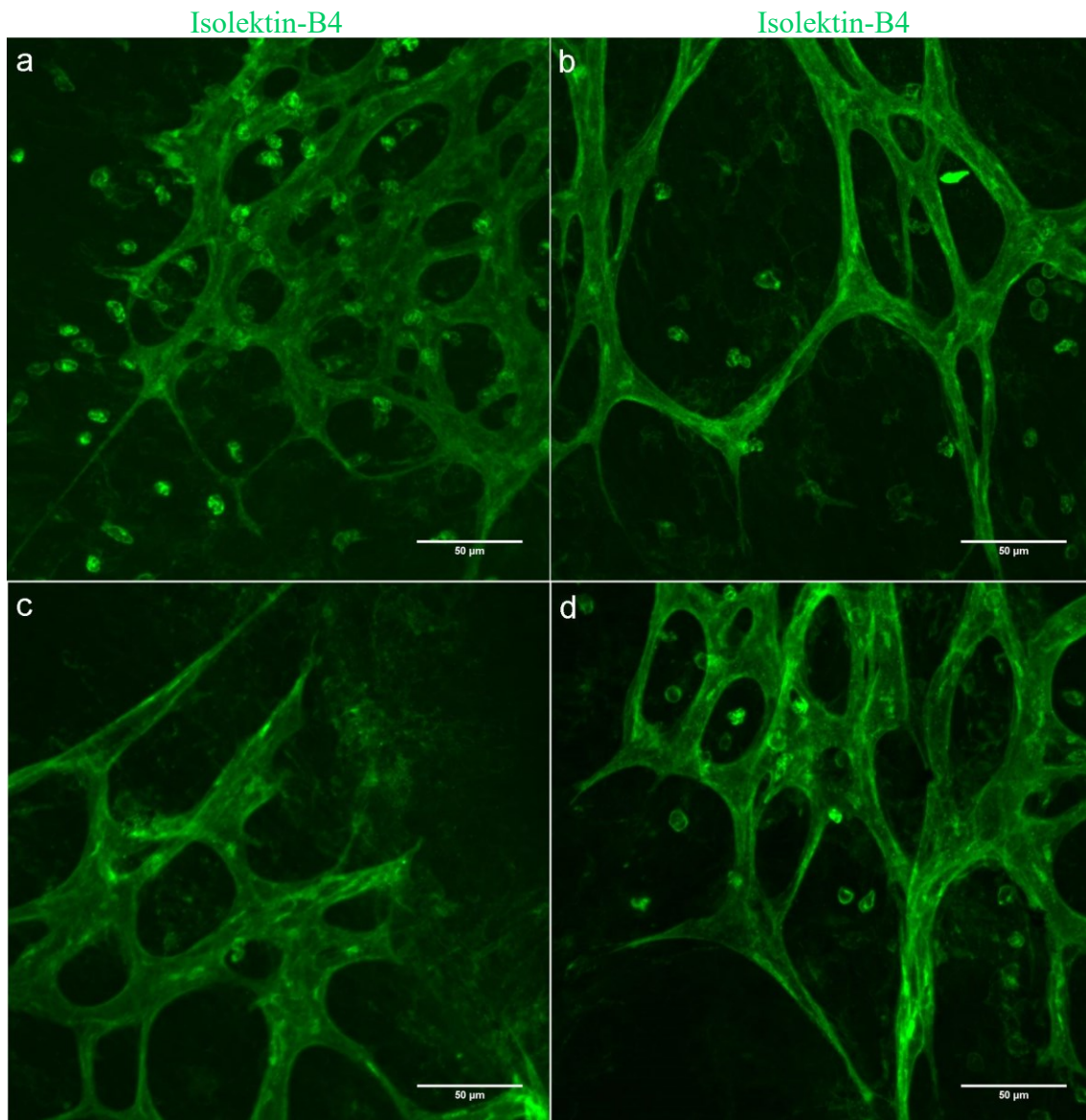


Abb. 45 Normalisierung der vermehrten Verzweigungspunkte in der Peripherie nach Injektion des cMet-Inhibitors. Gezeigt werden Detailaufnahmen der Peripherie in 25-facher Vergrößerung nach der Injektion an P5 und der Präparation an P6. Die Netzhäute wurden mit Isolektin-B4 gefärbt und als Flatmount präpariert. **a** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$. **b** Injektion von PBS. **c** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ und dem cMet-Inhibitor. **d** Injektion von PBS und dem cMet-Inhibitor.

Im Gegensatz dazu stand das venöse Stromgebiet in dem durch die Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ die Gefäße eine größere Fläche in den Detailaufnahmen bedeckten als in der Kontrollgruppe. Nach der Injektion des c-Met Inhibitors normalisierte sich die vaskularisierte Fläche (Abbildung 48). Auch in der Peripherie der Retina wurde die

vermehrte vaskularisierte Fläche durch die Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ verhindert durch die Injektion mit dem cMet-Inhibitor SU11274 (Abbildung 49).

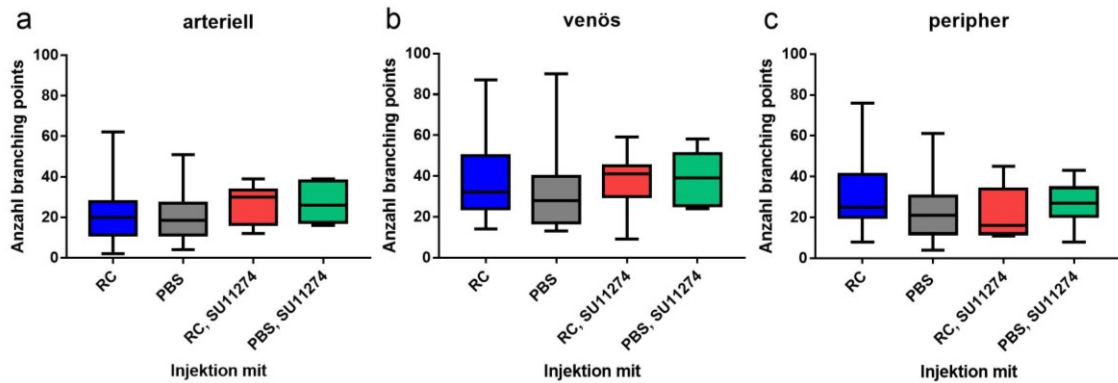


Abb. 46 Anzahl der Verzweigungspunkte der Gefäße nach Stromgebiet. Dargestellt werden die einzelnen Stromgebiete mit den jeweiligen Injektionsgruppen. Ausgewertet wurde die Anzahl der Branching points einer Detailaufnahme des konfokalen Mikroskops in 25-facher Vergrößerung und der Färbung mit Isolektin-B4. Gewertet wurden Aufnahmen nach der Injektion an P5 oder P6 sowie der Präparation 24 Stunden nach der Injektion. **a** Anzahl der Branching points im arteriellen Stromgebiet. p-Wert = 0,2065 (ANOVA). n(RC)=52, n(PBS)=24, n(RC, SU11274)=9, n(PBS, SU11274)=9. **b** Anzahl an Verzweigungspunkte im venösen Stromgebiet. Der p-Wert = 0,4435 (ANOVA). n(RC)=47, n(PBS)=24, n(RC, SU11274)=9, n(PBS, SU11274)=9. **c** Anzahl an Verzweigungspunkten in der Peripherie. p-Wert = 0,0615 (ANOVA). n(RC)=68, n(PBS)=33, n(RC, SU11274)=11, n(PBS, SU11274)=9.

Abbildung 50 zeigt, dass durch die intravitreale Rhodocetin $\alpha\beta$ -Injektion die Gefäßnetze insgesamt dichter wurden im venösen Stromgebiet sowie in der Peripherie. Dieser Effekt war in der Peripherie weitaus ausgeprägter als im venösen Stromgebiet. Der cMet-Inhibitor verhinderte diese Veränderungen durch Rhodocetin $\alpha\beta$.

Durch die zwei Behandlungsgruppen mit dem c-Met Inhibitor konnte gezeigt werden, dass die Art des Gefäßes einen Einfluss darauf hatte, ob Rhodocetin $\alpha\beta$ zu Veränderungen führen konnte bzw. der cMet-Inhibitor diese Veränderungen verhinderte.

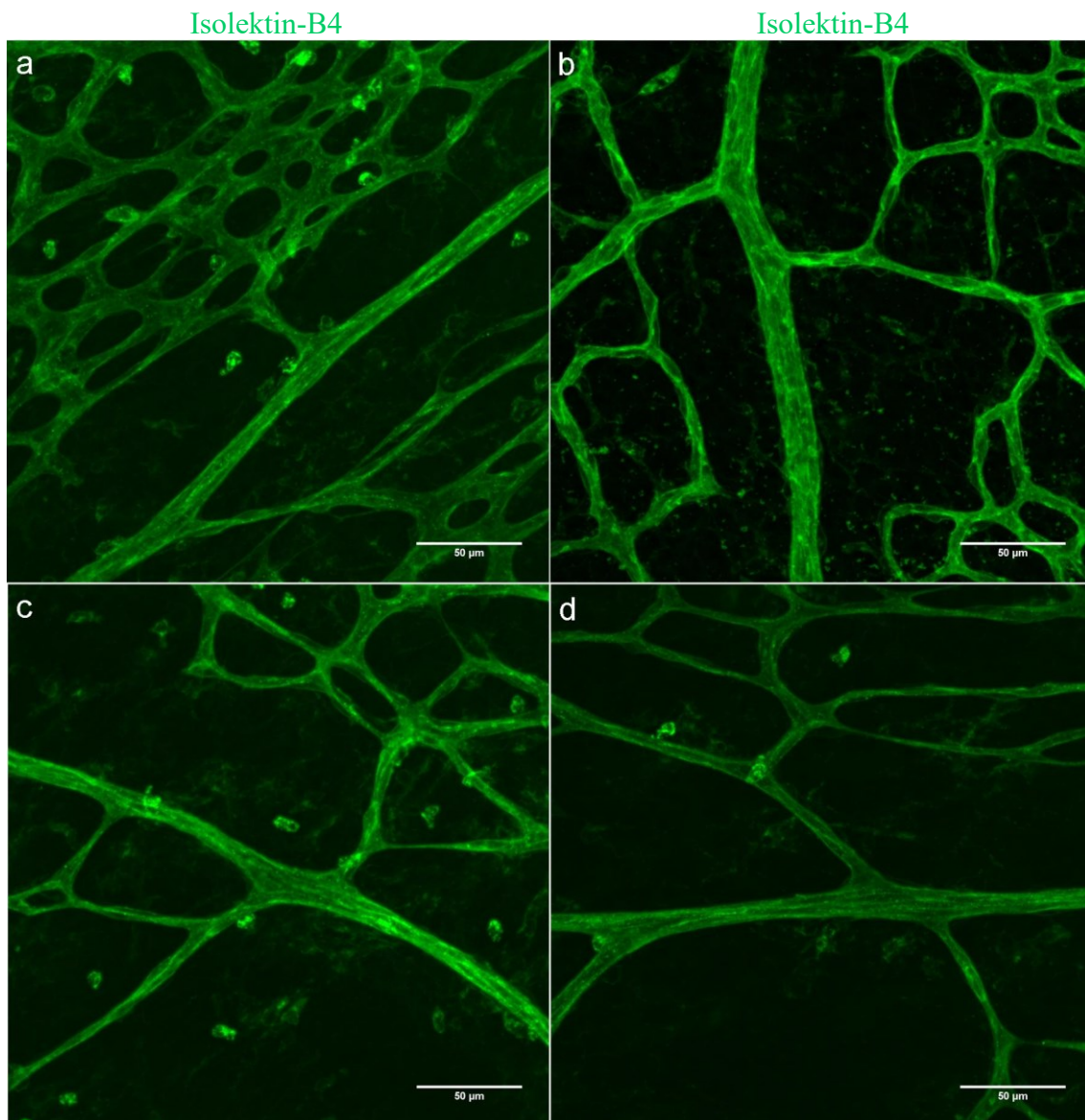


Abb. 47 Keine Veränderungen der vaskularisierten Fläche im arteriellen Stromgebiet. Dargestellt sind Detailaufnahmen des arteriellen Stromgebiets in 25-facher Vergrößerung nach der Injektion an P5 und der Präparation an P6. Die Netzhäute wurden mit Isolektin-B4 gefärbt und als Flatmount präpariert. **a** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$. **b** Injektion von PBS. **c** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ und dem cMet-Inhibitor. **d** Injektion von PBS und dem cMet-Inhibitor.

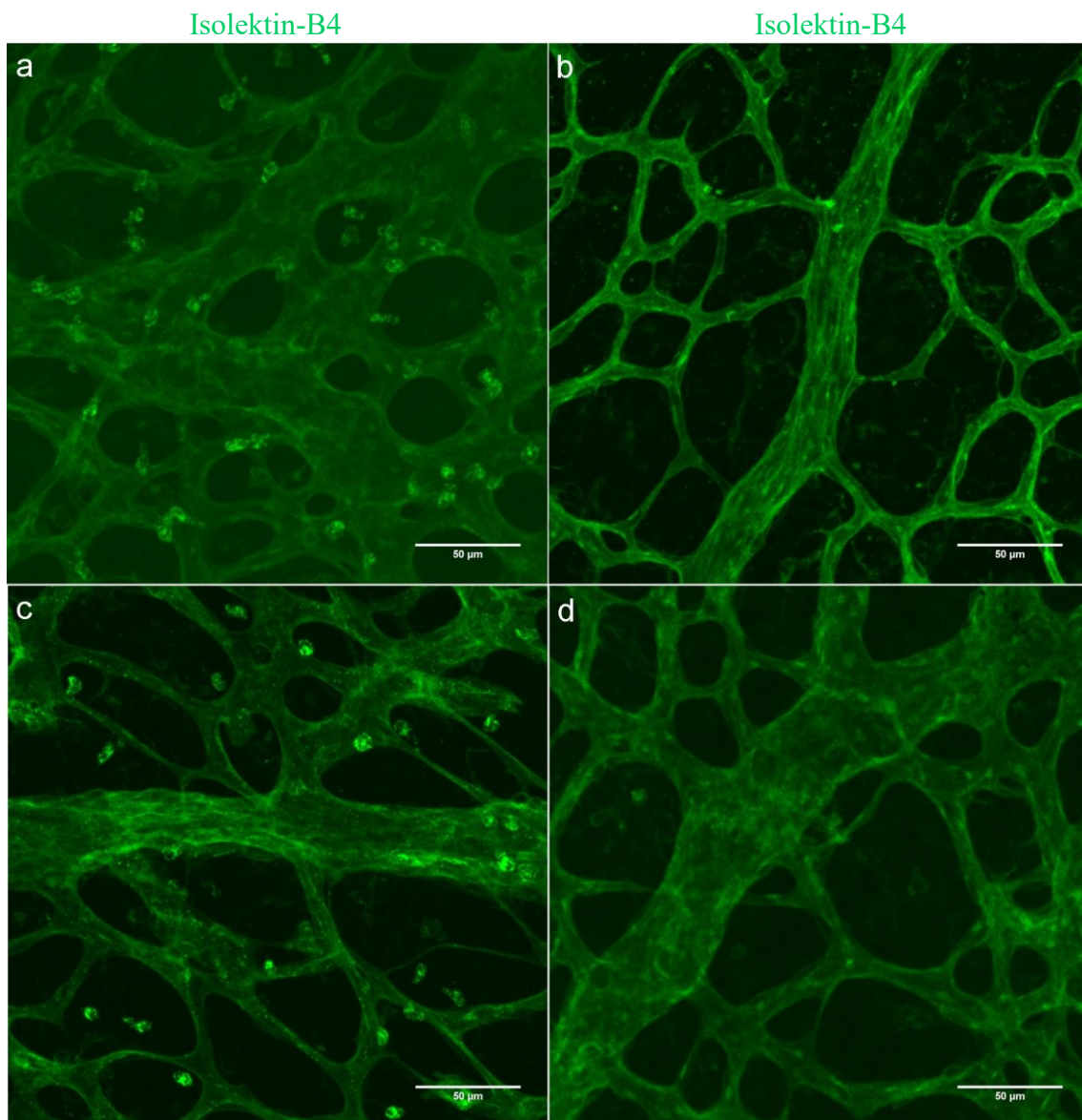


Abb. 48 Normalisierung der nach Rhodocetin $\alpha\beta$ vermehrt vaskularisierten Fläche durch Injektion des cMet-Inhibitors im venösen Stromgebiet. Gezeigt werden Detailaufnahmen des venösen Stromgebiets in 25-facher Vergrößerung nach der Injektion an P5 und der Präparation an P6. Die Netzhäute wurden mit Isolektin-B4 gefärbt und als Flatmount präpariert. **a** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$. **b** Injektion von PBS. **c** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ und dem cMet-Inhibitor. **d** Injektion von PBS und dem cMet-Inhibitor.

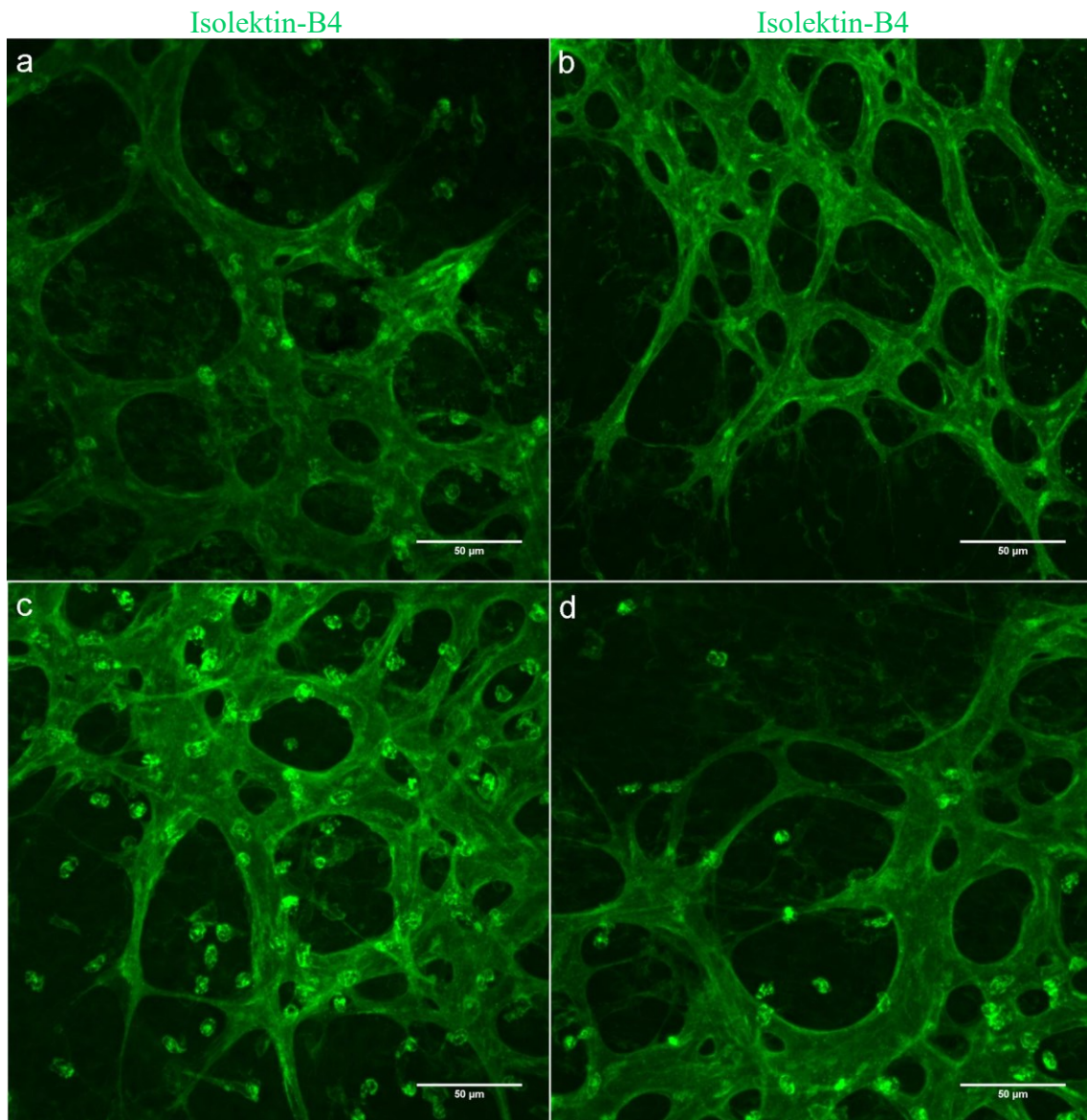


Abb. 49 Vermehrt vaskularisierte Fläche in der Peripherie nach Rhodocetin $\alpha\beta$ -Injektion. Gezeigt werden Detailaufnahmen der Peripherie in 25-facher Vergrößerung nach der Injektion an P5 und der Präparation an P6. Die Netzhäute wurden mit Isolektin-B4 gefärbt und als Flatmount präpariert. **a** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$. **b** Injektion von PBS. **c** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ und dem cMet-Inhibitor. **d** Injektion von PBS und dem cMet-Inhibitor.

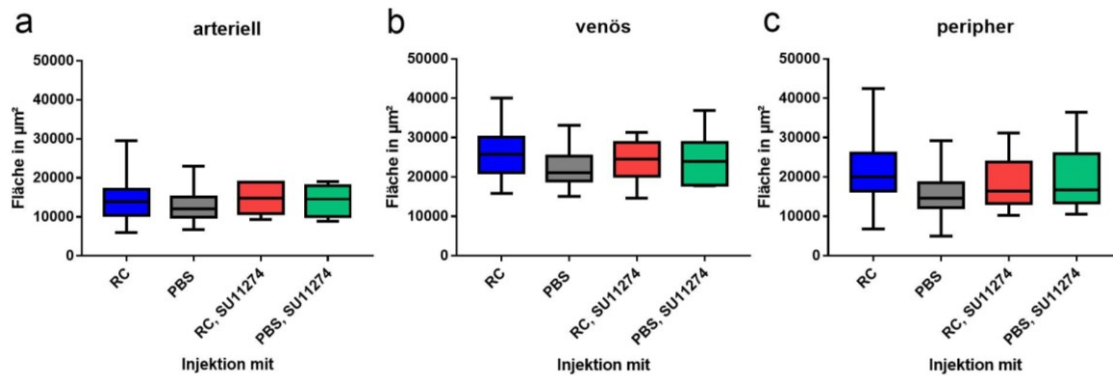


Abb. 50 Die Größe der vaskularisierten Fläche nach Stromgebiet. Dargestellt wird die von Gefäßen bedeckte Fläche in 25-facher Vergrößerung. Zu Grunde gelegt wurden die mit Isolektin-B4 gefärbten Netzhäute der jeweiligen Injektionsgruppen. Die Injektion fand an P5 oder P6 statt, die Präparation an P6 bzw. P7. **a** Aufnahme im arteriellen Stromgebiet. p-Wert = 0,8626 (ANOVA). n(RC)=49, n(PBS)=21, n(RC, SU11274)=9, n(PBS, SU11274)=8. **b** Aufnahmen im venösen Stromgebiet. p-Wert = 0,0647 (ANOVA). n(RC)=44, n(PBS)=17, n(RC, SU11274)=9, n(PBS, SU11274)=8. **c** Aufnahmen in der Peripherie. p-Wert = 0,0012 (ANOVA). n(RC)=62, n(PBS)=29, n(RC, SU11274)=10, n(PBS, SU11274)=8.

3.3 Immunhistochemische Detektion verschiedener angiogenesespezifischer Proteine in der Retina

Da die Wirkung von Rhodocetin $\alpha\beta$ wahrscheinlich über cMet vermittelt wurde, wie mit dem cMet-Inhibitor SU11274 in 3.2 gezeigt werden konnte, sollten im Folgenden verschiedene Proteine der Retina mittels Immunhistochemie nachgewiesen werden. Dabei wurden einzelne Proteine untersucht, die vermutlich mit der durch Rhodocetin $\alpha\beta$ aktivierten Signalkaskade über cMet in enger Verbindung stehen.

3.3.1 Neuropilin-1

Die vermutete molekulare Signalkaskade von Rhodocetin $\alpha\beta$ in der Retina von Jungtieren schloss neben cMet auch Neuropilin-1 ein. Daher wurden Detailaufnahmen im arteriellen, im venösen und im peripheren Stromgebiet sowohl nach Neuropilin-1 als auch mit Isolektin-B4 gefärbt. In der immunhistochemischen Detektion von Neuropilin-1 und Isolektin-B4 im arteriellen Stromgebiet zeigte sich eine fast ubiquitäre Anwesenheit von Neuropilin-1 in der Retina der Jungtiere an Tag fünf nach der Geburt. Es lag eine leichte Kolo-kalisation von den mit Isolektin-B4 gefärbten Blutgefäßen und Neuropilin-1 vor. Im Gegensatz zu den mit Rhodocetin $\alpha\beta$ injizierten Tieren erschien die Anfärbung von Neuropilin-1 in der Kontrollgruppe strukturierter. Es zeigten sich in der Kontrollgruppe flächenhafte, rundliche Verdichtungen, die sich nicht überlappten und ein positives Neuropilin-1-Signal zeigten.

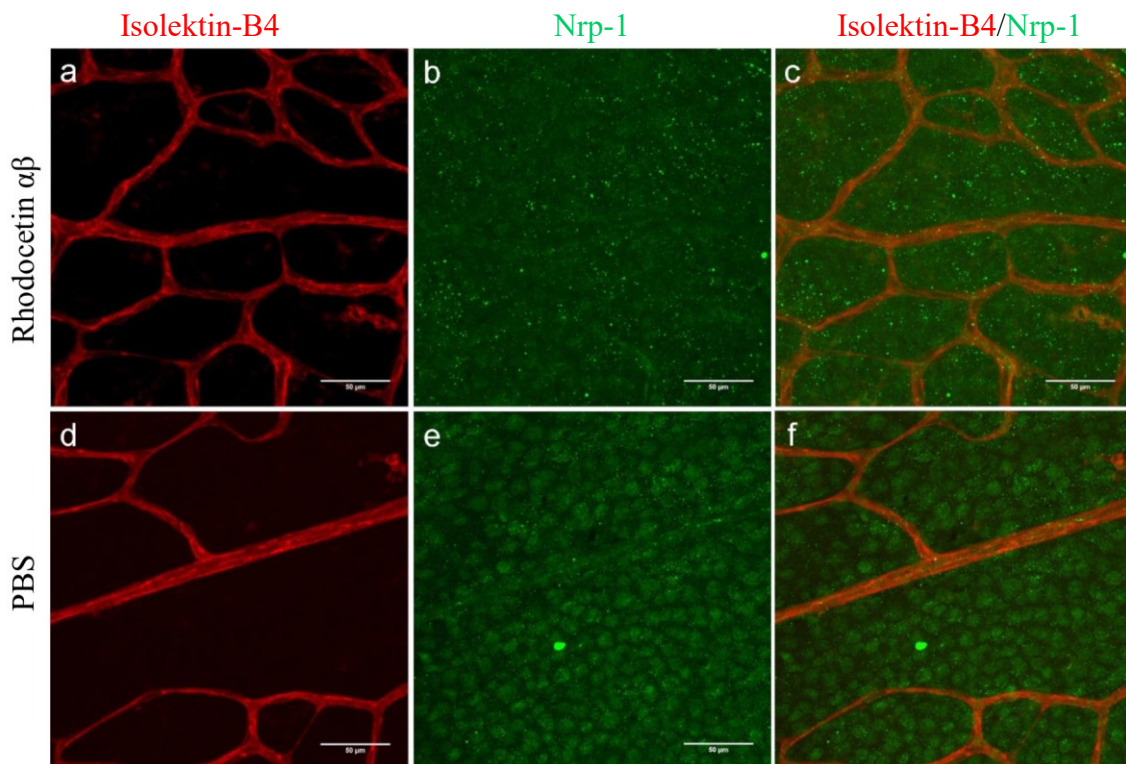


Abb. 51 Doppelfärbung von Isolektin-B4 und Neuropilin-1 im arteriellen Stromgebiet. Die Aufnahmen wurden in 25-facher Vergrößerung im arteriellen Stromgebiet aufgenommen. Die Netzhäute wurden an P5 injiziert und an P6 als Flatmounts präpariert. In der rechten Spalte ist die Doppelfärbung dargestellt, in den beiden linken Spalten jeweils die einzelnen Farbkanäle. **a** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$, gefärbt mit Isolektin-B4. **b** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$, gefärbt nach Neuropilin-1. **c** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$. **d** Injektion von PBS. Färbung mit Isolektin-B4. **e** Injektion von PBS, gefärbt nach Neuropilin-1. **f** Injektion von PBS.

In den Netzhäuten der mit Rhodocetin $\alpha\beta$ injizierten Mäuse zeigte sich eine dichte, jedoch eher zufällig erscheinende Verteilung der Neuropilin-1-positiven Strukturen. Insgesamt ergab sich im arteriellen Stromgebiet kein Unterschied weder in der Anfärbung nach Neuropilin-1 noch in der mit Isolektin-B4 gleichzeitig gefärbten Strukturen (Abbildung 51).

In der Peripherie zeigte sich ein ähnliches Bild. Auch hier zeigte sich eine Kolo-kalisation der von Isolektin-B4 gefärbten und der nach Neuropilin-1 gefärbten Strukturen. Diese Kolo-kalisation erschien etwas stärker in der Gruppe der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ als in der Kontrollgruppe. Die Färbung nach Neuropilin-1 war in der Kontrollgruppe in den gleichartigen rundlichen Verdichtungen flächenhaft organisiert während nach der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ diese auffällige Struktur sich leicht auflöste (Abbildung 52).

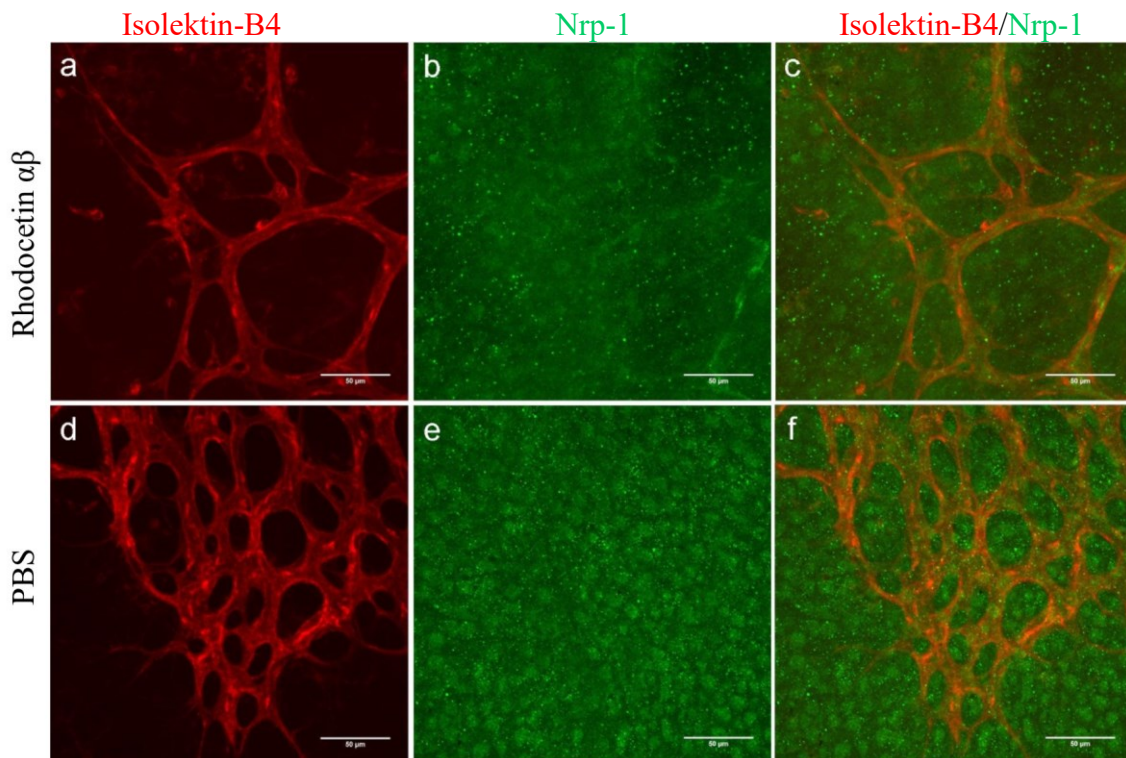


Abb. 52 Doppelfärbung von Isolektin-B4 und Neuropilin-1 in der Peripherie. Die Aufnahmen wurden in 25-facher Vergrößerung in der Peripherie aufgenommen. Die Netzhäute wurden an P5 injiziert und an P6 als Flatmounts präpariert. In der rechten Spalte ist die Doppelfärbung dargestellt, in den beiden linken Spalten jeweils die einzelnen Farbkanäle. **a** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$, gefärbt mit Isolektin-B4. **b** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$, gefärbt nach Neuropilin-1. **c** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$. **d** Injektion von PBS. Färbung mit Isolektin-B4. **e** Injektion von PBS, gefärbt nach Neuropilin-1. **f** Injektion von PBS.

In den Detailaufnahmen in dem venösen Stromgebiet waren einzelne Ausstülpungen nach der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ vorhanden. Hier ergab sich eine leicht verstärkte Anfärbung nach Neuropilin-1 im Bereich der Ausstülpungen. Ansonsten zeigten sich keine Veränderungen der Neuropilin-1-positiven Strukturen im Vergleich zum arteriellen und peripheren Stromgebiet (Abbildung 53).

Zusammenfassend ergibt sich das Bild, dass die Neuropilin-1-Färbung der Blutgefäße auch nach Rhodocetin $\alpha\beta$ -Gabe konstant blieb. Da die Anfärbung nach Neuropilin-1 in der Injektionsgruppe von Rhodocetin $\alpha\beta$ eher flächig und unzusammenhängend erschien und in der Kontrollgruppe in rundlichen Verdichtungen auftrat, stellte sich die Frage ob die beobachtete Kolo-kalisation zwischen Neuropilin-1 und den Isolektin-B4 gefärbten Blutgefäßen nur ein Produkt der zweidimensionalen Aufnahmen war.

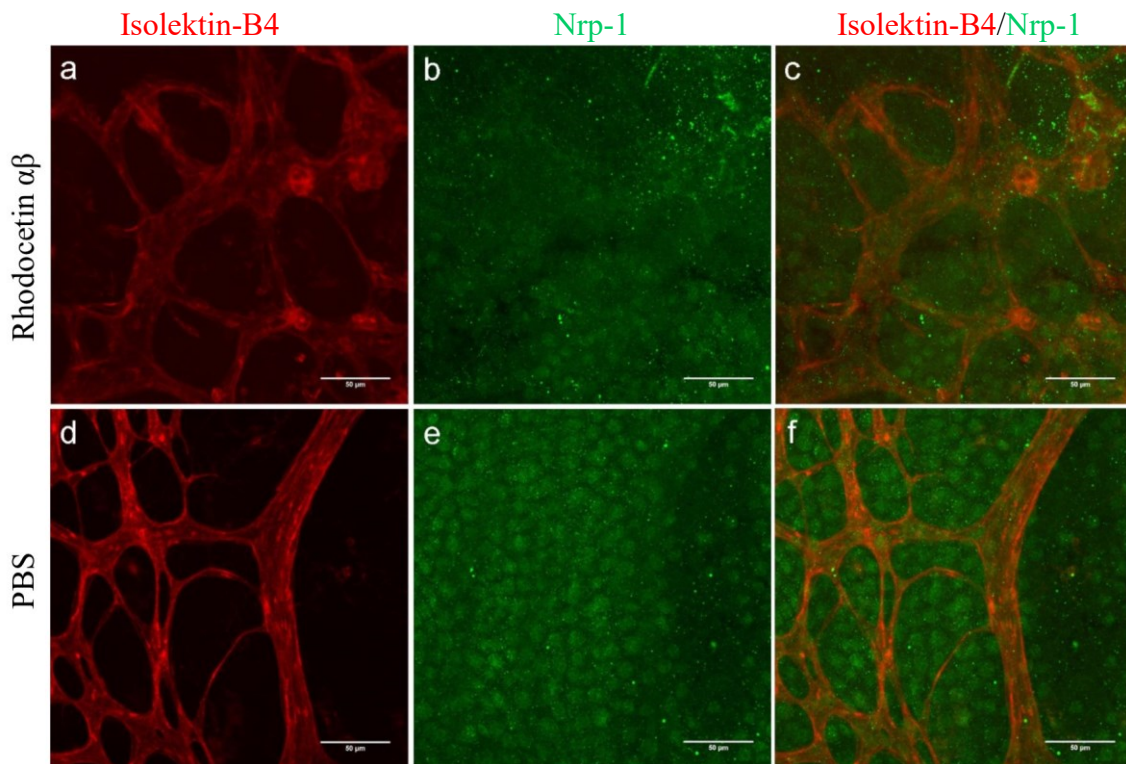


Abb. 53 Vermehrt Neuropilin-1-positive Ausstülpungen im venösen Stromgebiet. Die Aufnahmen wurden in 25-facher Vergrößerung im venösen Stromgebiet aufgenommen. Die Netzhäute wurden an P5 injiziert und an P6 als Flatmounts präpariert. In der rechten Spalte ist die Doppelfärbung dargestellt, in den beiden linken Spalten jeweils die einzelnen Farbkanäle. **a** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$, gefärbt mit Isolektin-B4. **b** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$, gefärbt nach Neuropilin-1. **c** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$. **d** Injektion von PBS. Färbung mit Isolektin-B4. **e** Injektion von PBS, gefärbt nach Neuropilin-1. **f** Injektion von PBS.

Um nachzuweisen, dass Neuropilin-1 von den Endothelzellen der retinalen Blutgefäße exprimiert wurde und die beobachtete Kolokalisation kein Zufallsbefund war, wurden in Paraffin eingebettete Schnitte der Netzhäute gefärbt.

In den Paraffinschnitten zeigte sich, dass Neuropilin-1 in den Netzhäuten der Jungtiere über die gesamte Tiefe der Retina vorkam. So ließ sich auch die flächige Färbung nach Neuropilin-1 in den Flatmounts erklären. Neuropilin-1 schien innerhalb der unterschiedlichen Schichten der jungen Retina der Mäuse unterschiedlich stark exprimiert zu werden. Zusammen mit der Färbung von Isolektin-B4 ließ sich jedoch zweifelsfrei das Vorhandensein von Neuropilin-1 in retinalen Blutgefäßen belegen (Abbildung 54). Im Muster der Färbung nach Neuropilin-1 ergaben sich keine Unterschiede zwischen den Tieren mit Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ und denen mit Injektion von PBS. Mit letzter Sicherheit konnten keine durch Rhodocetin $\alpha\beta$

induzierten Ausstülpungen der Retinalblutgefäße in den Paraffinschnitten identifiziert werden. Daher konnte zu einer möglichen verstärkten Präsenz von Neuropilin-1 an den Ausstülpungen nach der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ keine verwendbare Aussage in den Paraffinschnitten getroffen werden.

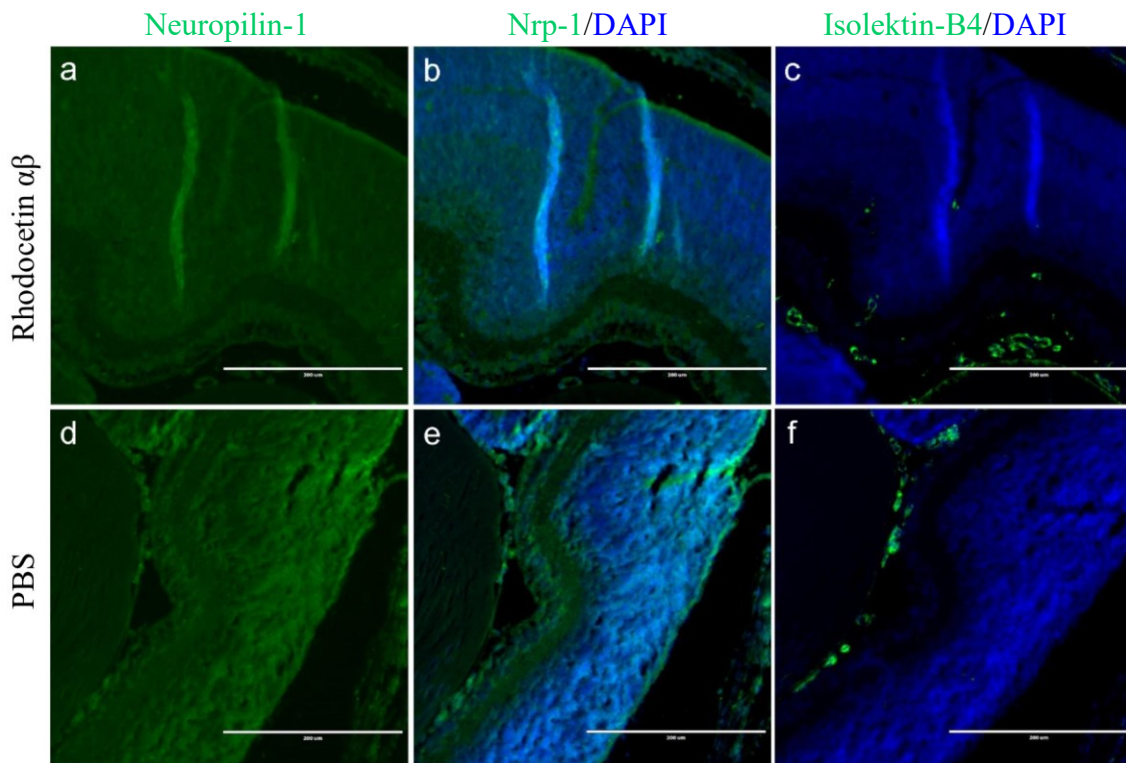


Abb. 54 Neuropilin-1- sowie Isolektin-B4-positive retinale Blutgefäße. Die Aufnahmen wurden in 20-facher Vergrößerung aufgenommen nach Injektion der Tiere an P5. **a** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$, gefärbt nach Neuropilin-1. **b** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$, gefärbt nach Neuropilin-1 in grün und mit DAPI in blau. Gezeigt ist der gleiche Ausschnitt wie in a. **c** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$. Doppelfärbung mit Isolektin-B4 in grün sowie DAPI in blau im gleichen Ausschnitt wie a und b im direkt daran angrenzenden Schnitt. **d** Injektion von PBS. Färbung nach Neuropilin-1. **e** Injektion von PBS, gefärbt nach Neuropilin-1 in grün und mit DAPI in blau. Gezeigt ist der gleiche Ausschnitt wie in d. **f** Injektion von PBS. Doppelfärbung mit Isolektin-B4 in grün sowie DAPI in blau im gleichen Ausschnitt wie d und e im direkt daran angrenzenden Schnitt.

3.3.2 cMet

In der Immunhistochemie von cMet zeigten sich im arteriellen Stromgebiet einzelne strichförmige Verdichtungen, die alle in die gleiche Richtung wiesen und so ein geordnetes Muster ergaben. Wie auch in der Färbung nach Neuropilin-1 schien cMet großflächig in der Retina verteilt zu sein, da sich cMet im gesamten Bereich der Detailaufnahme flächig anfärben ließ. Die Doppelfärbung von Isolektin-B4 und cMet

ergab eine deutliche Kolokalisation der Isolektin-B4- und der cMet-positiven Strukturen. cMet kam somit in den Gefäßwänden der arteriellen Gefäße vor. Zwischen den cMet-positiven Strukturen ließen sich deutlich die Gefäße erkennen als Fehlen des ansonsten charakteristischen Musters. Auch zeigte sich, dass die durch Rhodocetin $\alpha\beta$ induzierten Ausstülpungen der retinalen Gefäße deutlich stärker cMet-positiv waren als die restlichen Gefäße. Ansonsten ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Anfärbung nach cMet zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe mit der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ (Abbildung 55).

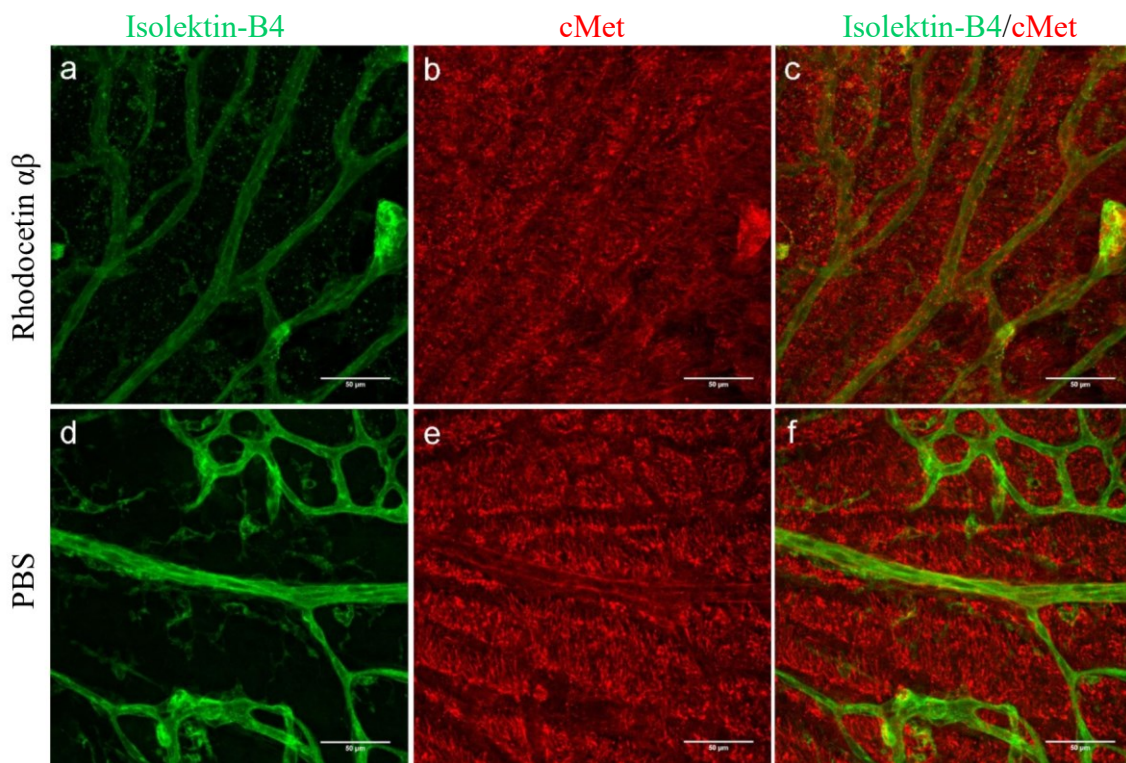


Abb. 55 Doppelfärbung von Isolektin-B4 und cMet im arteriellen Stromgebiet. Die Aufnahmen wurden in 25-facher Vergrößerung im arteriellen Stromgebiet aufgenommen. Die Netzhäute wurden an P5 injiziert und an P6 als Flatmounts präpariert. In der rechten Spalte ist die Doppelfärbung dargestellt, in den beiden linken Spalten jeweils die einzelnen Farbkanäle. **a** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$, gefärbt mit Isolektin-B4. **b** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$, gefärbt nach cMet. **c** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$. **d** Injektion von PBS. Färbung mit Isolektin-B4. **e** Injektion von PBS, gefärbt nach cMet. **f** Injektion von PBS.

Ähnlich fiel auch das Ergebnis der Färbung nach cMet in der Peripherie aus (Abbildung 56). In der Färbung nach cMet ergab sich das Bild von fadenförmiger, flächiger Anfärbung mit einer Unterbrechung im Muster an den Stellen, an denen die retinalen Gefäße verlaufen. Auch in der Peripherie existierte eine deutliche Kolokalisation der Isolektin-B4- sowie der cMet-positiven Strukturen. Durch Rhodocetin $\alpha\beta$

hervorgerufene Ausstülpungen der Blutgefäße zeigten eine verstärkte Anfärbbarkeit nach cMet. Abgesehen davon zeigten sich auch in der Peripherie keine Unterschiede zwischen den Gruppen mit der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ und denen mit PBS.

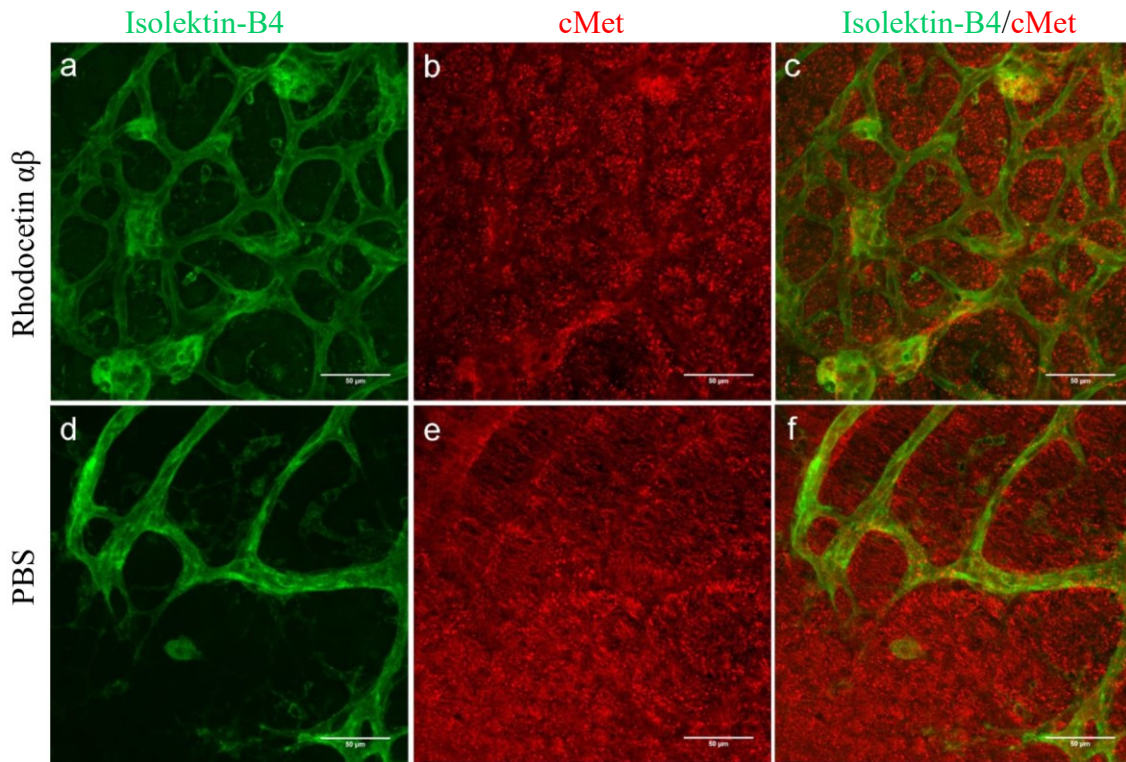


Abb. 56 Vermehrte Anfärbbarkeit der cMet-positiven Ausstülpungen in der Peripherie. Die Aufnahmen wurden in 25-facher Vergrößerung in der Peripherie aufgenommen. Die Netzhäute wurden an P5 injiziert und an P6 als Flatmounts präpariert. In der rechten Spalte ist die Doppelfärbung dargestellt, in den beiden linken Spalten jeweils die einzelnen Farbkanäle. **a** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$, gefärbt mit Isolektin-B4. **b** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$, gefärbt nach cMet. **c** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$. **d** Injektion von PBS. Färbung mit Isolektin-B4. **e** Injektion von PBS, gefärbt nach cMet. **f** Injektion von PBS.

Im venösen Stromgebiet ergab sich ein ähnliches Bild in der Färbung nach cMet. Wie auch schon im arteriellen und im peripheren Stromgebiet erschien cMet als fadenförmige, flächig verteilte und in eine Richtung zeigende Struktur. Durch die Anfärbbarkeit von cMet an Stellen, an denen auch Isolektin-B4 färbte, ließ sich das Auftreten von cMet in der Gefäßwand der venösen Gefäße der Retina belegen. Die Ausstülpungen, die in der Injektionsgruppe von Rhodocetin $\alpha\beta$ entstanden, zeigten eine deutlich vermehrte Färbung nach cMet in der unmittelbaren Umgebung. Abgesehen von der verstärkten Kolokalisation in den Ausstülpungen schien es auch im venösen

Stromgebiet keinen Unterschied in der Färbung nach cMet zwischen der Kontrollgruppe und der Injektionsgruppe von Rhodocetin $\alpha\beta$ zu geben (Abbildung 57).

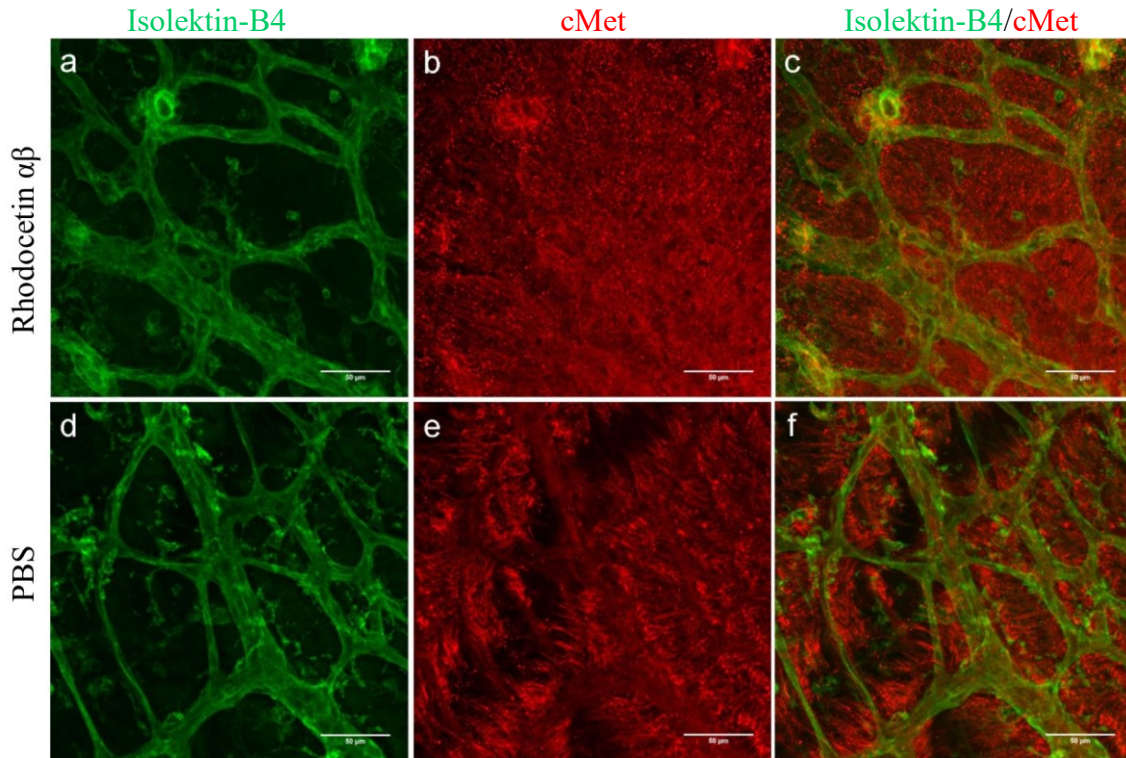


Abb. 57 Vermehrte Anfärbbarkeit der cMet-positiven Ausstülpungen im venösen Stromgebiet. Die Aufnahmen wurden in 25-facher Vergrößerung im venösen Stromgebiet aufgenommen. Die Netzhäute wurden an P5 injiziert und an P6 als Flatmounts präpariert. In der rechten Spalte ist die Doppelfärbung dargestellt, in den beiden linken Spalten jeweils die einzelnen Farbkanäle. **a** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$, gefärbt mit Isolektin-B4. **b** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$, gefärbt nach cMet. **c** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$. **d** Injektion von PBS. Färbung mit Isolektin-B4. **e** Injektion von PBS, gefärbt nach cMet. **f** Injektion von PBS.

Zusammenfassend ließ sich sagen, dass es einen Unterschied in der Anfärbung von cMet nach der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ im Vergleich zur Kontrollgruppe gab im Hinblick auf die verstärkt cMet-positiven Ausstülpungen. Abgesehen davon ergab sich kein großer Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Injektionsgruppe von Rhodocetin $\alpha\beta$ in der Färbung nach cMet.

Aufgrund der flächigen Darstellung der cMet-positiven Strukturen in der gesamten Retina stellte sich die Frage ob die cMet-Positivität der Gefäßwände nur ein Artefakt war. Um dies auszuschließen wurden in Paraffin eingebettete Schnitte der Retina nach cMet sowie mit Isolektin-B4 gefärbt. Hier zeigte sich deutlich, dass cMet in der

gesamten Retina vorkam, jedoch unterschiedlich stark in den verschiedenen Schichten der Retina vertreten war. Jedoch zeigte sich auch eine klare Anfärbarkeit nach cMet in den Isolektin-B4-positiven Gefäßwänden im Schnitt (Abbildung 58). Wie auch in der Färbung der Schnitte nach Neuropilin-1 konnten auch hier Ausstülpungen nicht sicher identifiziert werden. Der Rezeptor cMet war somit in den retinalen Gefäßwänden vorhanden.

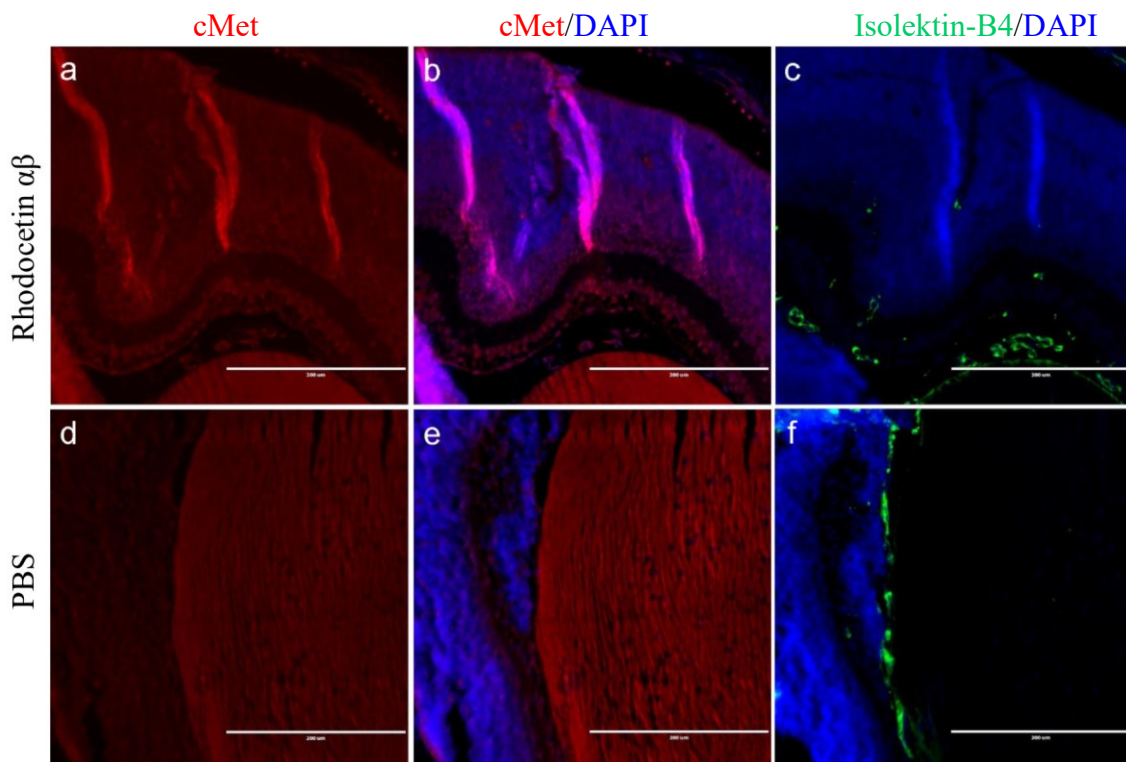


Abb. 58 Darstellung der cMet- sowie Isolektin-B4-Färbung am Paraffinschnitt. Die Aufnahmen wurden in 20-facher Vergrößerung aufgenommen nach Injektion der Tiere an P5. **a** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$, gefärbt nach cMet. **b** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$, gefärbt nach cMet und mit DAPI. Gezeigt ist der gleiche Ausschnitt wie in a. **c** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$. Doppelfärbung mit Isolektin-B4 sowie DAPI im gleichen Ausschnitt wie a und b im direkt daran angrenzenden Schnitt. **d** Injektion von PBS. Färbung nach cMet. **e** Injektion von PBS, gefärbt nach cMet und mit DAPI. Gezeigt ist der gleiche Ausschnitt wie in d. **f** Injektion von PBS. Doppelfärbung mit Isolektin-B4 sowie DAPI im gleichen Ausschnitt wie d und e im direkt daran angrenzenden Schnitt.

3.3.3 Paxillin

Der Signalweg über Neuropilin-1 und cMet mündet in einer vermehrten Phosphorylierung von Paxillin. Dies warf die Frage auf ob immunhistochemisch eine eventuell bestehende vermehrte Phosphorylierung von Paxillin nach der Injektion von

Rhodocetin $\alpha\beta$ sichtbar gemacht werden konnte. Dazu wurde zum einen Paxillin, zum anderen Y31-Phosphopaxillin in Flatmounts immunhistochemisch angefärbt.

Im arteriellen Stromgebiet zeigte sich eine flächige Anfärbung nach Paxillin in der gesamten Detailaufnahme. Dabei ergab sich jedoch ein charakteristisches Muster, sodass nicht von einer unspezifischen Bindung der Antikörper ausgegangen werden konnte. Eine Kolo-kalisation mit den Isolektin-B4 positiven Gefäßwänden schien aufgrund der Aufnahmen wahrscheinlich. Insgesamt ließ sich aber immunhistochemisch kein Unterschied in der Anfärbung nach Paxillin nach der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellen (Abbildung 59).

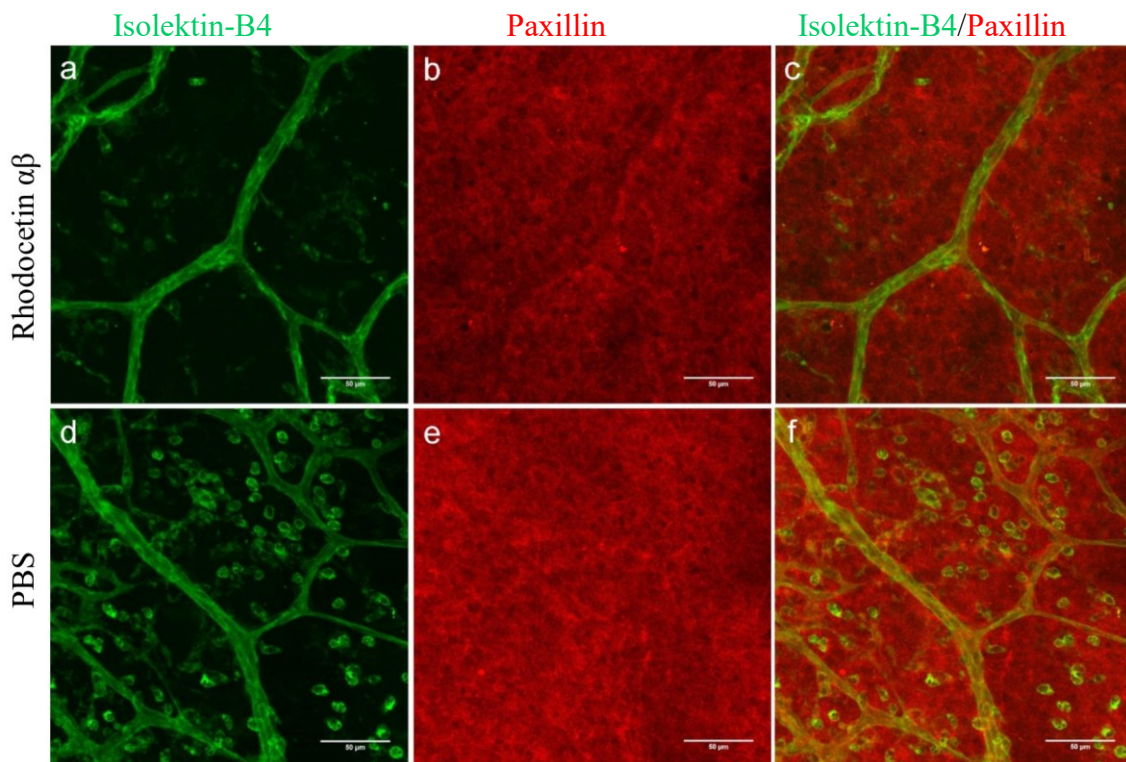


Abb. 59 Doppelfärbung von Isolektin-B4 und Paxillin im arteriellen Stromgebiet. Die Aufnahmen wurden in 25-facher Vergrößerung im arteriellen Stromgebiet aufgenommen. Die Netzhäute wurden an P5 injiziert und an P6 als Flatmounts präpariert. In der rechten Spalte ist die Doppelfärbung dargestellt, in den beiden linken Spalten jeweils die einzelnen Farbkanäle. **a** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$, gefärbt mit Isolektin-B4. **b** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$, gefärbt nach Paxillin. **c** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$. **d** Injektion von PBS. Färbung mit Isolektin-B4. **e** Injektion von PBS, gefärbt nach Paxillin. **f** Injektion von PBS.

In der Peripherie des oberflächlichen Gefäßplexus der Retina bot die Färbung nach Paxillin ein ganz ähnliches Bild. Paxillin stellte sich in diffusen Verdichtungen in der

gesamten Detailaufnahme dar. Die durch die Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ entstandenen Ausstülpungen der Retinalblutgefäße zeigten keine verstärkte Anfärbung von Paxillin. Es ergaben sich keine immunhistochemischen Hinweise für eine veränderte Anfärbung von Paxillin zwischen der Injektionsgruppe von Rhodocetin $\alpha\beta$ und der Kontrollgruppe (Abbildung 60).

Die Anfärbung von Paxillin im venösen Stromgebiet zeigte die gleiche diffuse Verteilung, die auch im arteriellen und im peripheren Stromgebiet beobachtet wurde. Auch die Ausstülpungen, die nach der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ entstanden sind zeigten keine vermehrte Kolo-kalisation mit den Paxillin-positiven Strukturen (Abbildung 61). Wie auch im arteriellen Stromgebiet und der Peripherie zeigte sich auch im venösen Stromgebiet kein Unterschied in der Immunhistochemie von Paxillin zwischen der Injektionsgruppe von Rhodocetin $\alpha\beta$ und der Kontrollgruppe.

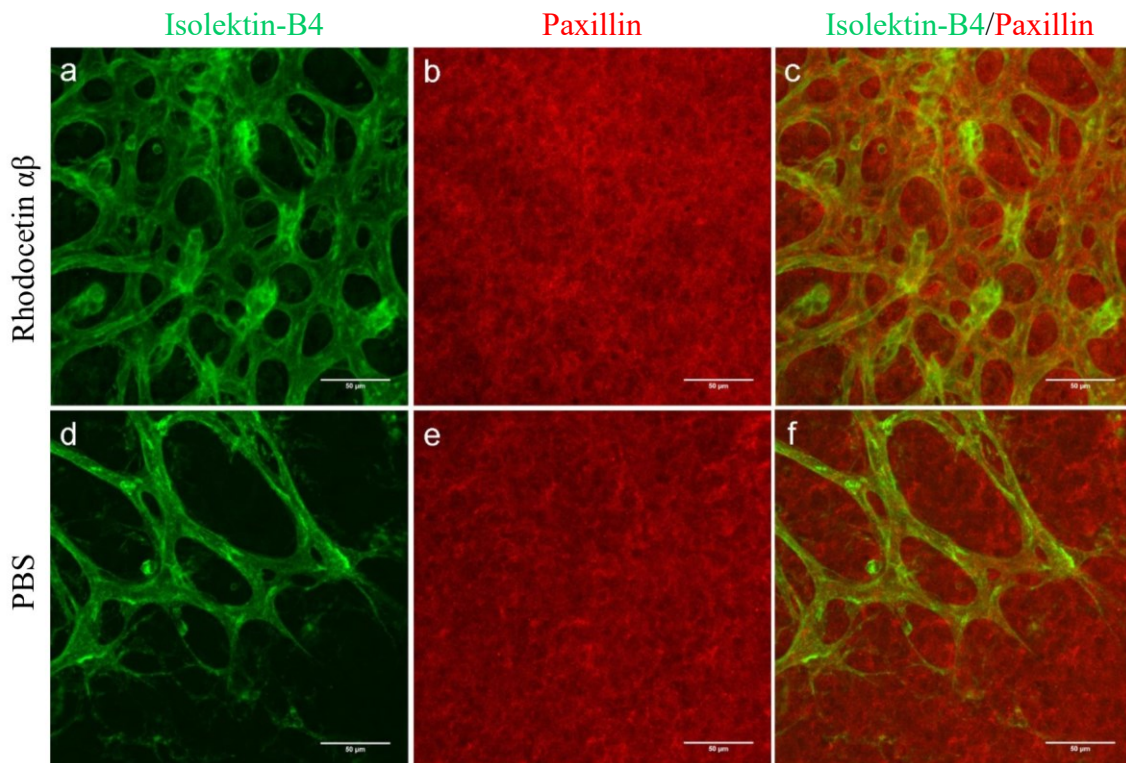


Abb. 60 Ausstülpungen waren nicht vermehrt Paxillin-positiv in der Peripherie. Die Aufnahmen wurden in 25-facher Vergrößerung in der Peripherie aufgenommen. Die Netzhäute wurden an P5 injiziert und an P6 als Flatmounts präpariert. In der rechten Spalte ist die Doppelfärbung dargestellt, in den beiden linken Spalten jeweils die einzelnen Farbkanäle. **a** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$, gefärbt mit Isolektin-B4. **b** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$, gefärbt nach Paxillin. **c** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$. **d** Injektion von PBS. Färbung mit Isolektin-B4. **e** Injektion von PBS, gefärbt nach Paxillin. **f** Injektion von PBS.

Es ließ sich immunhistochemisch kein Einfluss von Rhodocetin $\alpha\beta$ auf das Vorkommen von Paxillin in der Retina nachweisen und auch die Ausstülpungen beinhalteten nicht vermehrt oder deutlich vermindert Paxillin.

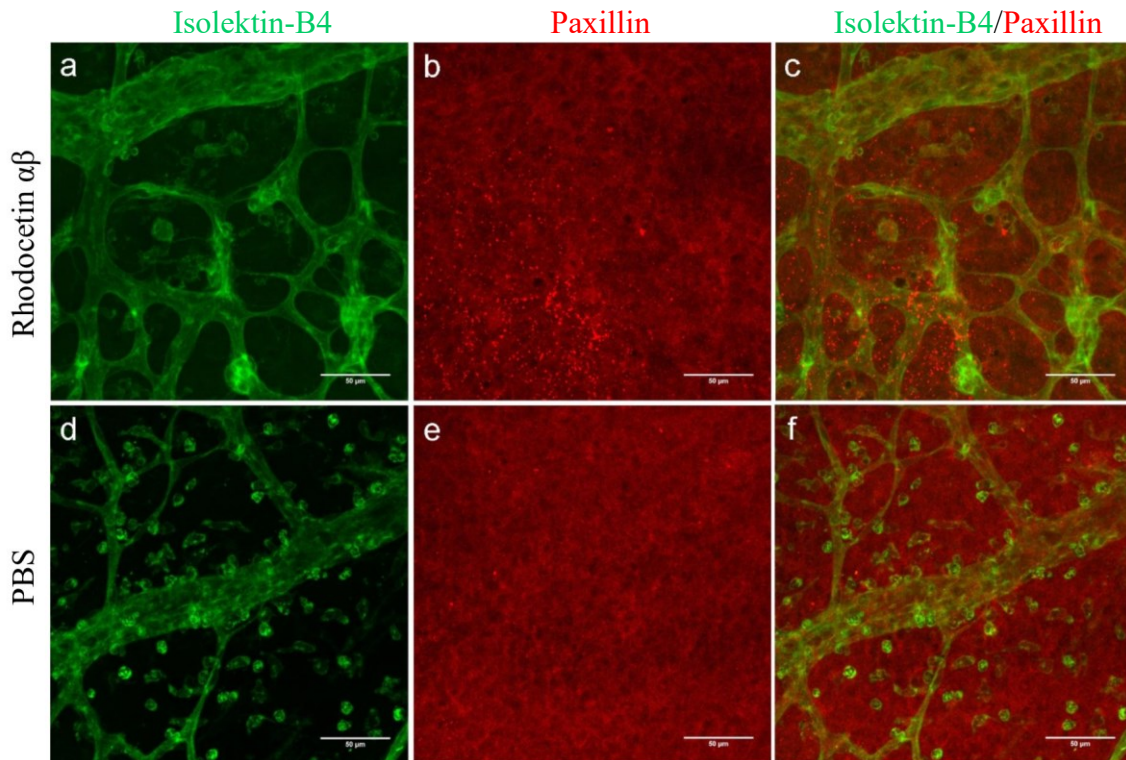


Abb. 61 Doppelfärbung von Isolektin-B4 und Paxillin im venösen Stromgebiet. Die Aufnahmen wurden in 25-facher Vergrößerung im venösen Stromgebiet aufgenommen. Die Netzhäute wurden an P5 injiziert und an P6 als Flatmounts präpariert. In der rechten Spalte ist die Doppelfärbung dargestellt, in den beiden linken Spalten jeweils die einzelnen Farbkanäle. **a** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$, gefärbt mit Isolektin-B4. **b** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$, gefärbt nach Paxillin. **c** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$. **d** Injektion von PBS. Färbung mit Isolektin-B4. **e** Injektion von PBS, gefärbt nach Paxillin. **f** Injektion von PBS.

3.3.4 Y31-Phosphopaxillin

Ebenso wurden immunhistochemische Färbungen von Y31-Phosphopaxillin angefertigt um eine eventuell vermehrte Phosphorylierung von Paxillin nach der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ zeigen zu können.

In den Detailaufnahmen im arteriellen Stromgebiet stellte sich die Färbung nach Y31-Phosphopaxillin als diffuse Verdichtung von großen Teilen der Retina dar. Ebenfalls zeigte sich eine Kolokalisation mit den Isolektin-B4-positiven retinalen Gefäßen. Jedoch ließ sich immunhistochemisch keine vermehrte Anfärbung nach Y31-

Phosphopaxillin nach der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ im Vergleich zur Kontrollgruppe belegen (Abbildung 62).

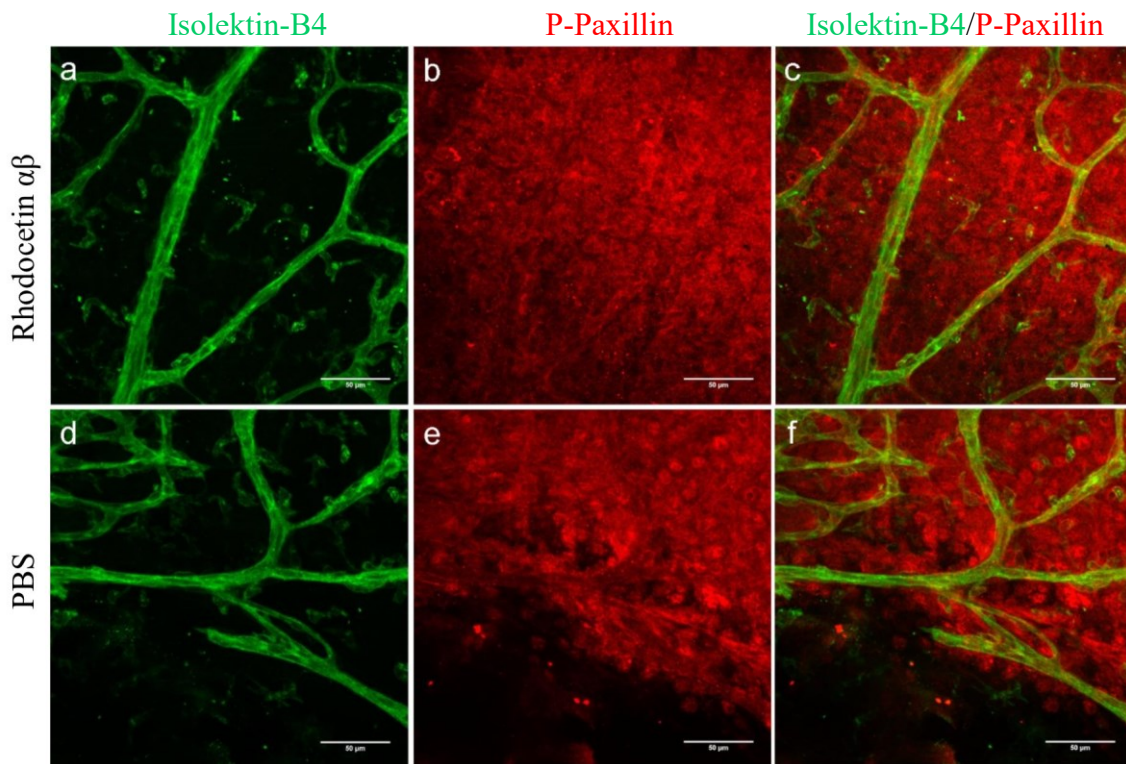


Abb. 62 Doppelfärbung von Isolektin-B4 und Y31-Phosphopaxillin im arteriellen Stromgebiet. Die Aufnahmen wurden in 25-facher Vergrößerung im arteriellen Stromgebiet aufgenommen. Die Netzhäute wurden an P5 injiziert und an P6 als Flatmounts präpariert. In der rechten Spalte ist die Doppelfärbung dargestellt, in den beiden linken Spalten jeweils die einzelnen Farbkanäle. **a** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$, gefärbt mit Isolektin-B4. **b** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$, gefärbt nach Y31-Phosphopaxillin. **c** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$. **d** Injektion von PBS. Färbung mit Isolektin-B4. **e** Injektion von PBS, gefärbt nach Y31-Phosphopaxillin. **f** Injektion von PBS.

Auch in der Peripherie der Retina zeigten sich diffuse Verdichtungen des immunhistochemisch angefärbten Y31-Phosphopaxillins. Diese waren über die gesamte Detailaufnahme verteilt. Die Gefäße zeigten sich sowohl in der Färbung von Isolektin-B4 also auch in der Färbung nach Y31-Phosphopaxillin angefärbt. Eine vermehrte Anfärbung der nach der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ entstehenden Ausstülpungen in der Färbung nach Y31-Phosphopaxillin ließ sich in den Detailaufnahmen der peripheren retinalen Gefäßen nicht durch die durchgeführte Immunhistochemie beweisen. Insgesamt stellte sich kein Unterschied zwischen den Netzhäuten nach der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ und denen nach der Injektion von PBS in der Immunhistochemie von Y31-Phosphopaxillin dar (Abbildung 63).

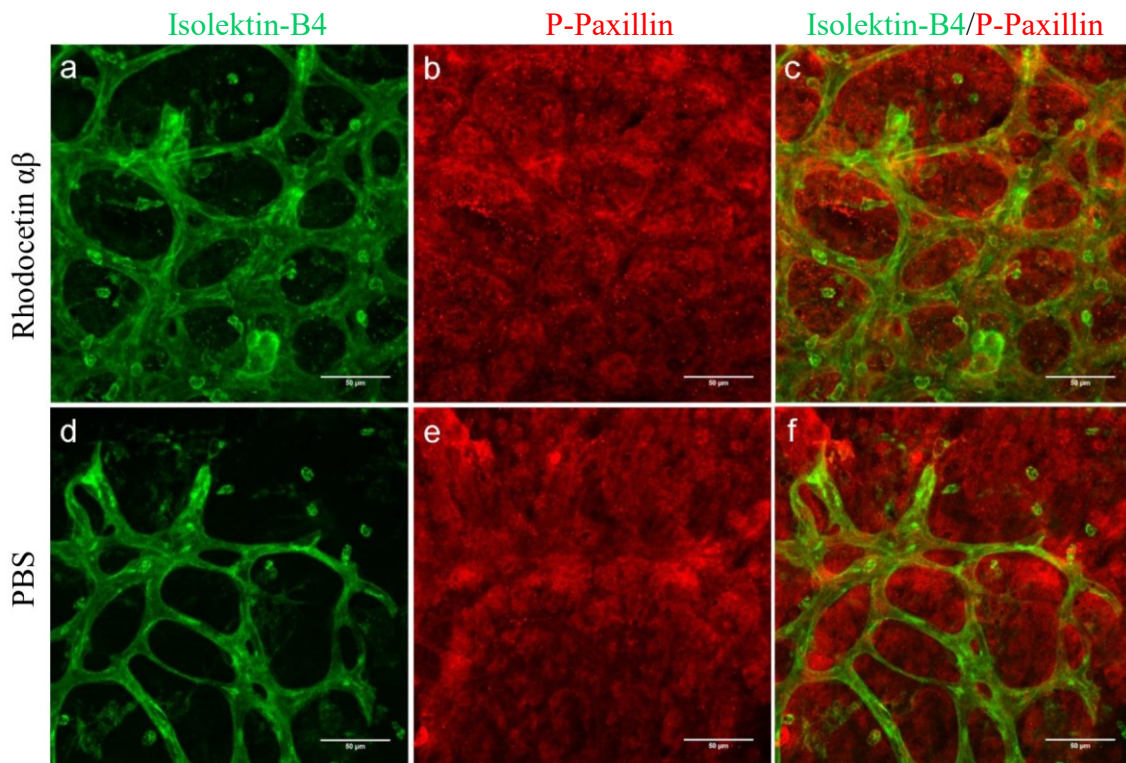


Abb. 63 Die durch Rhodocetin $\alpha\beta$ -Injektion entstandenen Ausfüllungen zeigen sich nicht vermehrt Y31-Phosphopaxillin-positiv in der Peripherie. Die Aufnahmen wurden in 25-facher Vergrößerung in der Peripherie aufgenommen. Die Netzhäute wurden an P5 injiziert und an P6 als Flatmounts präpariert. In der rechten Spalte ist die Doppelfärbung dargestellt, in den beiden linken Spalten jeweils die einzelnen Farbkanäle. **a** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$, gefärbt mit Isolektin-B4. **b** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$, gefärbt nach Y31-Phosphopaxillin. **c** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$. **d** Injektion von PBS. Färbung mit Isolektin-B4. **e** Injektion von PBS, gefärbt nach Y31-Phosphopaxillin. **f** Injektion von PBS.

Ganz ähnlich präsentierten sich die Detailaufnahmen im venösen Stromgebiet. Auch hier zeigte die Färbung nach Y31-Phosphopaxillin eine flächige Anfärbung verteilt über die gesamte Aufnahme in 25-facher Vergrößerung und diffuse Verdichtungen. Ebenfalls erschienen die Isolektin-B4-positiven retinalen Gefäßwände auch in der Färbung nach Y31-Phosphopaxillin gut dargestellt, sodass von einer Kolo-kalisation auszugehen war. Trotzdem ließ sich kein signifikanter und immunhistochemisch darstellbarer Unterschied zwischen den Aufnahmen nach der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ und der Kontrollgruppe im venösen Stromgebiet in der Anfärbung nach Y31-Phosphopaxillin feststellen (Abbildung 64).

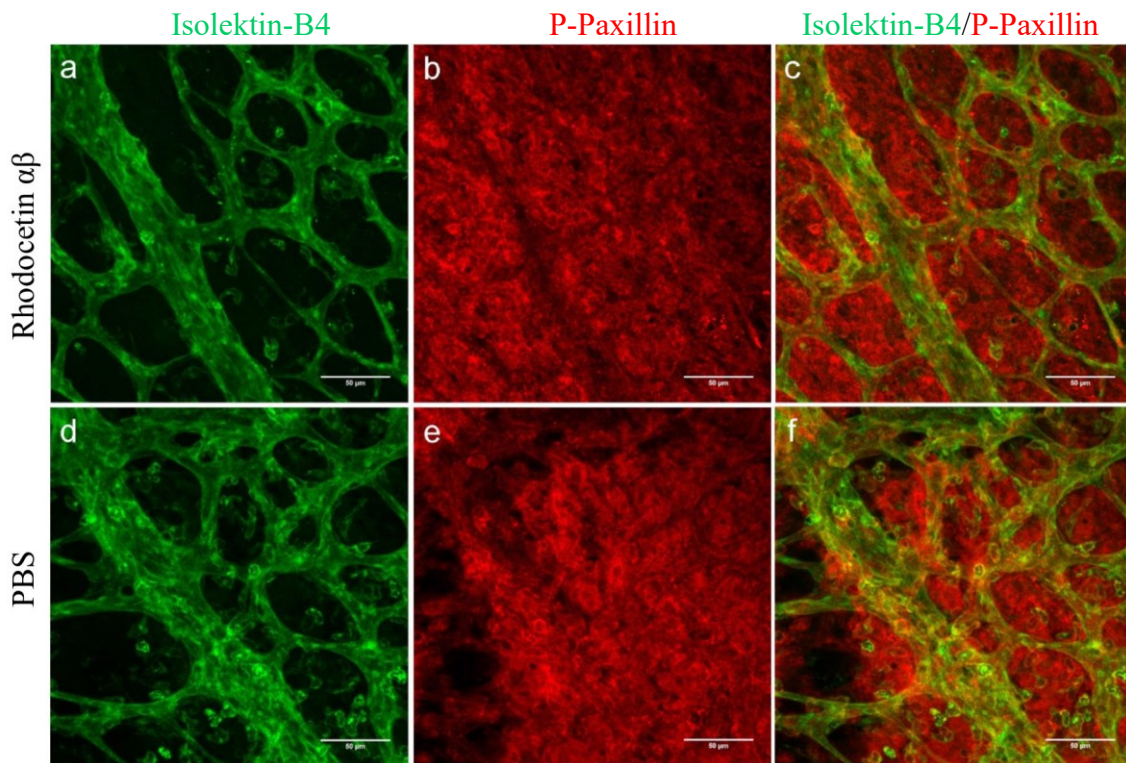


Abb. 64 Doppelfärbung mit Isolektin-B4 und Y31-Phosphopaxillin im venösen Stromgebiet. Die Aufnahmen wurden in 25-facher Vergrößerung im venösen Stromgebiet aufgenommen. Die Netzhäute wurden an P5 injiziert und an P6 als Flatmounts präpariert. In der rechten Spalte ist die Doppelfärbung dargestellt, in den beiden linken Spalten jeweils die einzelnen Farbkanäle. **a** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$, gefärbt mit Isolektin-B4. **b** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$, gefärbt nach Y31-Phosphopaxillin. **c** Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$. **d** Injektion von PBS. Färbung mit Isolektin-B4. **e** Injektion von PBS, gefärbt nach Y31-Phosphopaxillin. **f** Injektion von PBS.

Insgesamt ließ sich in der Immunhistochemie kein vermehrtes Vorkommen von phosphoryliertem Paxillin in den Gefäßwänden der Retina nach der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ nachweisen, weder im arteriellen, noch im venösen oder im peripheren Stromgebiet.

3.4 Analyse verschiedener mRNAs mittels qPCR

Neben der Immunhistochemie sollte auch in einer weiteren Technik der durch den cMet-Inhibitor erhärtete Signalweg von Rhodocetin $\alpha\beta$ untersucht werden. Mittels der quantitativen PCR lässt sich in den Zellen eine verstärkte oder verminderte Bildung von mRNA für verschiedene Proteine zeigen. Hier sollte nun dargestellt werden, inwieweit Rhodocetin $\alpha\beta$ die Transkriptionsebene der am Signalweg beteiligten Akteure beeinflusst.

3.4.1 Neuropilin-1

Die Transkription von Neuropilin-1 wurde an den Tagen 4,5 und 7 nach der Geburt untersucht um eine eventuell bestehende sensible Zeitphase, in der Rhodocetin $\alpha\beta$ wirkt, eingrenzen zu können. An Tag vier nach der Geburt zeigte sich eine signifikant verringerte Menge an mRNA von Neuropilin-1 nach der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ im Vergleich zur Kontrollgruppe (p-Wert im t-Test = 0,0299). Der cMet-Inhibitor SU11274 änderte gegenüber der Kontrollgruppe die Transkription von Neuropilin-1 nicht signifikant. Insgesamt verringerte die Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ an Tag 4 nach der Geburt der Jungtiere die Menge an mRNA von Neuropilin-1. Dieser Effekt konnte durch den cMet-Inhibitor unterbunden werden (Abbildung 65a). Bei einer Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ an Tag 5 nach der Geburt ergab sich eine signifikante Verringerung an mRNA-Menge von Neuropilin-1, welches durch den cMet-Inhibitor verhindert werden konnte (Abbildung 65b). Wurden nur die Versuchsgruppe mit der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ und die Kontrollgruppe miteinander an Tag 5 verglichen so fiel der p-Wert im t-Test sogar auf 0,0408. An Tag 7 nach der Geburt der Jungtiere war der Einfluss von Rhodocetin $\alpha\beta$ nicht mehr vorhanden: die Menge an mRNA von Neuropilin-1 war in allen Versuchsgruppen vergleichbar hoch (Abbildung 65c).

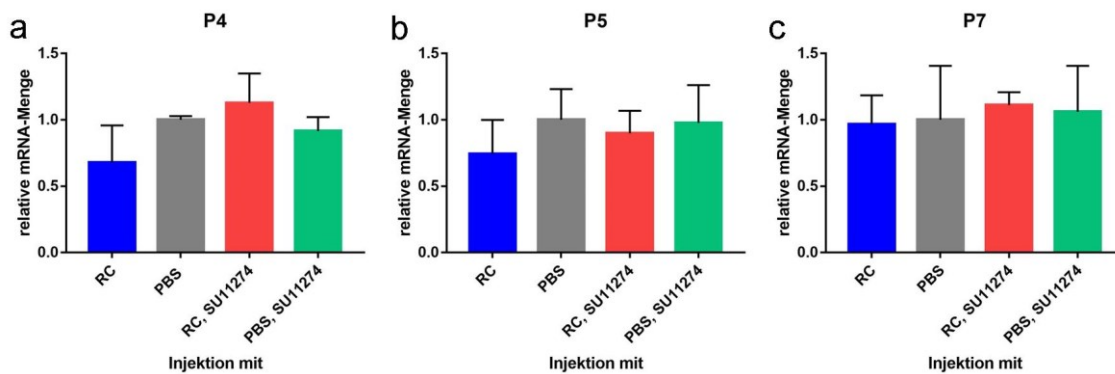


Abb. 65 Grafische Darstellung der relativen mRNA-Menge von Neuropilin-1 zu verschiedenen Zeitpunkten. Die relative Menge an mRNA von Neuropilin-1 bezieht sich jeweils auf den Mittelwert der Injektionsgruppe von PBS. Dargestellt wird der Mittelwert mit Standardabweichung. Auf der x-Achse befinden sich die jeweiligen Versuchsgruppen. **a** Die Injektion erfolgte an P4 sowie Präparation an P5. p-Wert = 0,0074 (ANOVA). n(RC)=7, n(PBS)=5, n(RC, SU11274)=5, n(PBS, SU11274)=5. **b** Die Injektion erfolgte an P5 und die Präparation an P6. p-Wert = 0,0602 (ANOVA). n(RC)=13, n(PBS)=7, n(RC, SU11274)=13, n(PBS, SU11274)=13. **c** Injektion an P7 und Präparation an P8. p-Wert = 0,8373 (ANOVA). n(RC)=7, n(PBS)=5, n(RC, SU11274)=5, n(PBS, SU11274)=5.

Es zeigte sich also, dass an den Tagen 4 und 5 die Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ eine Verringerung der Menge an mRNA von Neuropilin-1 bewirkte. Der cMet-Inhibitor verhinderte diesen Effekt von Rhodocetin $\alpha\beta$.

Im direkten Vergleich der mRNA-Menge von Neuropilin-1 nach der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ und der Kontrollgruppe zeigte sich ein Unterschied zwischen den Injektionstagen: Während an P4 und P5 die Menge an mRNA von Neuropilin-1 nach der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ signifikant geringer ausfiel als in der Kontrollgruppe mit PBS, fiel die Menge an mRNA von Neuropilin-1 an P7 gleich aus (Abbildung 66).

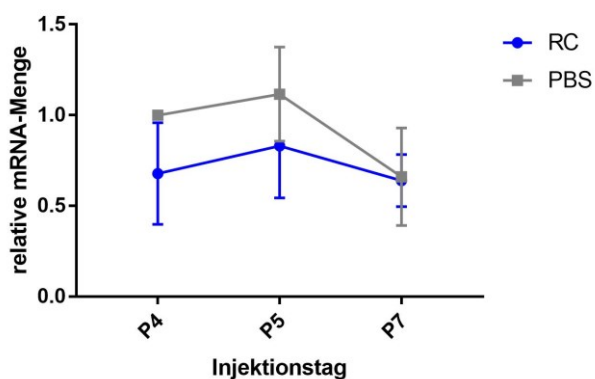


Abb. 66 Grafische Darstellung der relativen Menge an mRNA von Neuropilin-1 im Verlauf. Gezeigt werden die relativen mRNA-Mengen von Neuropilin-1 an den unterschiedlichen Injektionstagen. Der Mittelwert der absoluten Werte der Injektionsgruppe PBS an P4 ist der Referenzwert für die relative Darstellung. Die Balken zeigen die Standardabweichung an, ist diese kleiner als die Höhe der Symbole fehlt der Fehlerbalken.

Rhodocetin $\alpha\beta$ hatte den größten Effekt auf die retinalen Gefäße und die mRNA-Menge von Neuropilin-1 an P4. An P7 hatte Rhodocetin $\alpha\beta$ keinen Effekt mehr auf die mRNA-Menge von Neuropilin-1.

3.4.2 cMet

Auch die mRNA Menge von cMet wurde an den Tagen 4, 5 und 7 nach der Geburt der Jungtiere untersucht um den immunhistochemisch durch den cMet-Inhibitor SU11274 erhärteten Signalweg auch auf mRNA-Ebene beschreiben zu können. An Tag vier nach der Geburt zeigte sich eine signifikante Verringerung der mRNA-Menge von cMet nach der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ im Vergleich zu PBS (p-Wert im t-Test = 0,032) und zu den Injektionsgruppen mit dem cMet Inhibitor SU11274. Die Messungen an Tag fünf nach der Geburt zeigte ein verändertes Bild: die Menge an mRNA von cMet war in der Injektionsgruppe von Rhodocetin $\alpha\beta$ vergleichbar hoch wie in der Kontrolle mit der

Injektion von PBS. Die Injektionsgruppen mit dem cMet-Inhibitor zeigten eine leicht vermehrte Menge an mRNA von cMet bei einem insgesamt jedoch nicht signifikanten Ergebnis. Dieser an Tag fünf angedeutete Trend zeigte sich an Tag sieben nach der Geburt der Jungtiere ganz deutlich. Die mRNA-Menge von cMet der Injektionsgruppen mit Rhodocetin $\alpha\beta$ bzw. PBS unterschieden sich nicht wesentlich (p-Wert im t-Test = 0,3401). Die Menge an mRNA von cMet der Injektionsgruppen mit dem cMet-Inhibitor war signifikant erhöht im Gegensatz zu der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ oder der Kontrollgruppe (Abbildung 67).

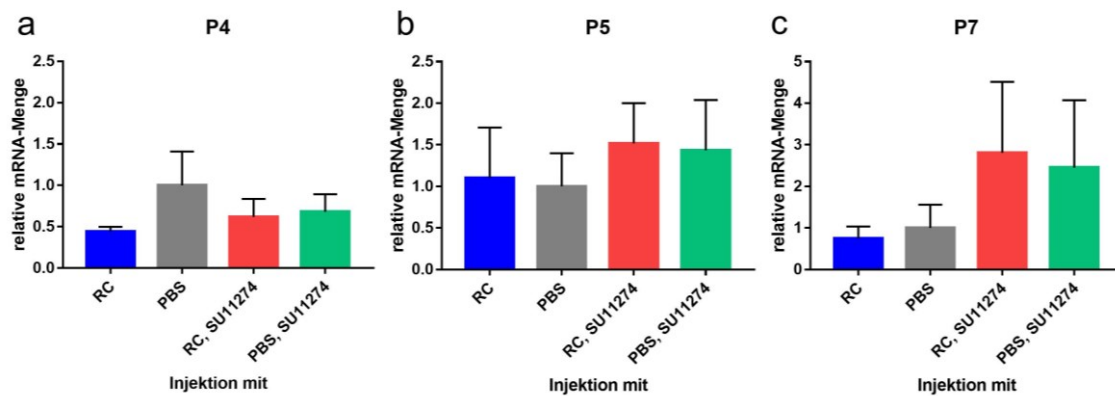


Abb. 67 Grafische Darstellung der relativen mRNA-Menge von cMet zu verschiedenen Zeitpunkten. Gezeigt wird die grafische Auswertung der qPCR-Ergebnisse. Die relative Menge an mRNA von cMet bezieht sich jeweils auf den Mittelwert der Injektionsgruppe von PBS. Der Mittelwert mit Standardabweichung wird abgebildet. Auf der x-Achse werden die jeweiligen Injektionsgruppen gezeigt. **a** Die Injektion erfolgte an P4 sowie Präparation an P5. p-Wert = 0,0394 (ANOVA). n(RC)=4, n(PBS)=5, n(RC, SU11274)=5, n(PBS, SU11274)=5. **b** Die Injektion erfolgte an P5 und die Präparation an P6. p-Wert = 0,099 (ANOVA). n(RC)=13, n(PBS)=7, n(RC, SU11274)=13, n(PBS, SU11274)=13. **c** Injektion an P7 und Präparation an P8. p-Wert = 0,0228 (ANOVA). n(RC)=7, n(PBS)=4, n(RC, SU11274)=5, n(PBS, SU11274)=5.

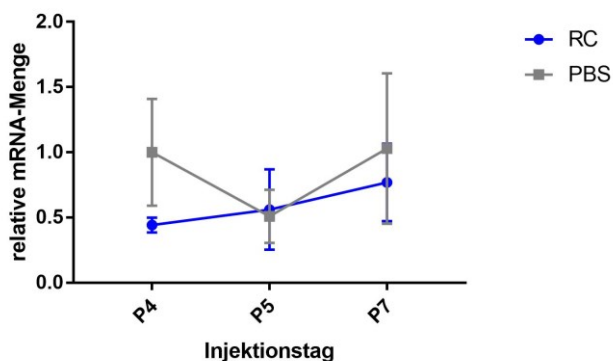


Abb. 68 Grafische Darstellung der relativen Menge an mRNA von cMet im Verlauf. Gezeigt werden die relativen mRNA-Mengen von cMet an den unterschiedlichen Injektionstagen. Der Mittelwert der absoluten Werte der

Injektionsgruppe PBS an P4 ist der Referenzwert für die relative Darstellung. Die Balken zeigen die Standardabweichung an, ist diese kleiner als die Höhe der Symbole fehlt der Fehlerbalken.

Im zeitlichen Verlauf der mRNA-Menge von cMet der Injektionsgruppe von Rhodocetin $\alpha\beta$ im Vergleich zur Kontrollgruppe mit der Injektion von PBS ergab sich das Bild einer insgesamt ansteigenden Menge an mRNA von cMet nach der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$. In der Kontrollgruppe fiel die verminderte Menge an mRNA von cMet an P5 auf während die Werte an P4 und P7 ähnlich erschienen (Abbildung 68).

3.4.3 VEGF-Rezeptor 2

Neben den bisher untersuchten Proteinen Neuropilin-1, cMet, Paxillin und Y31-Phosphopaxillin spielt auch der VEGF-Rezeptor 2 eine Rolle in der Angiogenese der Retina. Darüber hinaus kann Neuropilin-1 als Co-Rezeptor für VEGF-A mit dem VEGF-Rezeptor 2 interagieren. Im Folgenden sollte aus diesem Grund auch die mRNA-Menge von VEGF-Rezeptor 2 nach der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ näher beobachtet werden um einen möglichen Einfluss von Rhodocetin $\alpha\beta$ auf VEGF-R2 beschreiben zu können.

An Tag vier nach der Geburt der Jungtiere verringerte die Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ signifikant die Transkription des VEGF-Rezeptor 2, ein Effekt, der durch den cMet-Inhibitor SU11274 verhindert werden konnte (Abbildung 69a). An P5 zeigte sich kein Einfluss von Rhodocetin $\alpha\beta$ auf die Transkription von VEGF-Rezeptor 2 (Abbildung 69b). An P7 ergab sich kein signifikanter Unterschied in der mRNA-Menge vom VEGF-Rezeptor 2 im Vergleich zu der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ und der Injektion von PBS (p-Wert im t-Test = 0,6456). Jedoch ergab sich ein signifikanter Anstieg der Transkription von VEGF-Rezeptor 2 durch die Injektion des Inhibitors von cMet sowohl in Kombination mit als auch ohne Rhodocetin $\alpha\beta$ (Abbildung 69c). Rhodocetin $\alpha\beta$ hatte demnach nur an P4 einen die mRNA-Menge verringernden Einfluss auf den VEGF-Rezeptor 2.

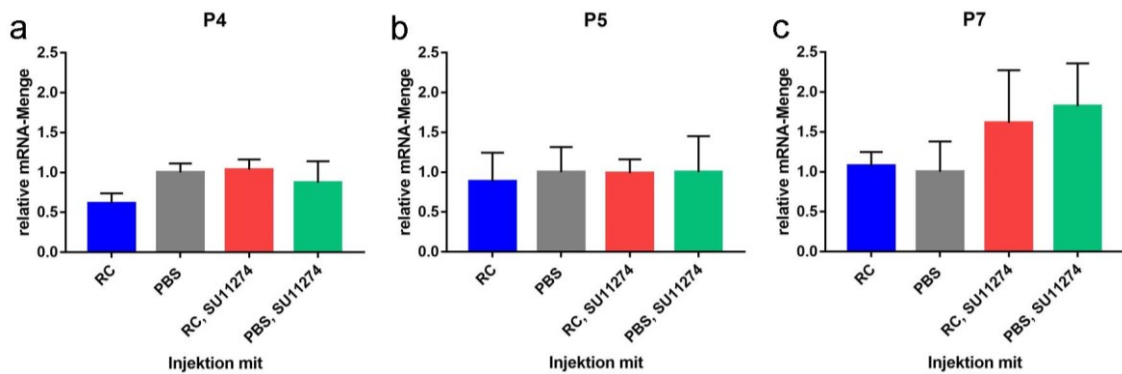


Abb. 69 Grafische Darstellung der relativen mRNA-Menge von VEGF-Rezeptor 2 zu verschiedenen Zeitpunkten. Gezeigt wird die grafische Auswertung der qPCR-Ergebnisse. Die relative Menge an mRNA von VEGF-R2 bezieht sich jeweils auf den Mittelwert der Injektionsgruppe von PBS. Der Mittelwert mit Standardabweichung wird abgebildet. Auf der x-Achse befinden sich die jeweiligen Injektionsgruppen. **a** Die Injektion erfolgte an P4 sowie Präparation an P5. p-Wert = 0,0012 (ANOVA). n(RC)=7, n(PBS)=5, n(RC, SU11274)=5, n(PBS, SU11274)=5. **b** Die Injektion erfolgte an P5 und die Präparation an P6. p-Wert = 0,7982 (ANOVA). n(RC)=13, n(PBS)=7, n(RC, SU11274)=13, n(PBS, SU11274)=13. **c** Injektion an P7 und Präparation an P8. p-Wert = 0,0189 (ANOVA). n(RC)=7, n(PBS)=5, n(RC, SU11274)=5, n(PBS, SU11274)=5.

Dies zeigte sich auch in der Auftragung der mRNA-Menge des VEGF-Rezeptor 2 nach der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ und PBS an den Tagen 4, 5 und 7 (Abbildung 70). An P4 besaß Rhodocetin $\alpha\beta$ noch einen Einfluss auf die Transkription des VEGF-Rezeptor 2, an P5 und P7 besaß Rhodocetin $\alpha\beta$ keinen Einfluss mehr darauf.

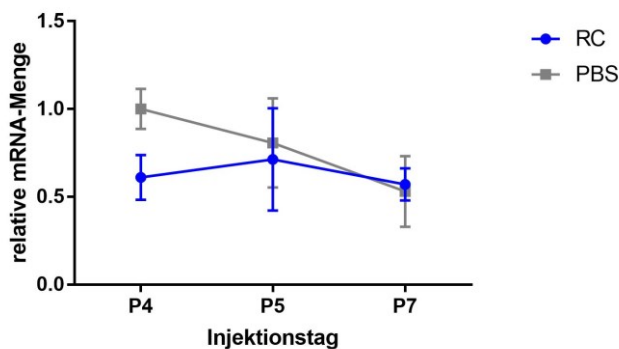


Abb. 70 Grafische Darstellung der relativen Menge an mRNA von VEGF-Rezeptor 2 im Verlauf. Gezeigt werden die relativen mRNA-Mengen von VEGF-R2 an den unterschiedlichen Injektionstagen. Der Mittelwert der absoluten Werte der Injektionsgruppe PBS an P4 ist der Referenzwert für die relative Darstellung. Die Balken zeigen die Standardabweichung an, ist diese kleiner als die Höhe der Symbole fehlt der Fehlerbalken.

4 Diskussion

4.1 Rhodocetin $\alpha\beta$ bewirkt die Bildung von vaskulären Ausstülpungen

Bisher war von der $\alpha\beta$ -Untereinheit von Rhodocetin bekannt, dass sie an das Glykoprotein Ib auf der Oberfläche von Thrombozyten binden kann und damit die Aggregation der Plättchen inhibiert (2, 42). Daneben zeigten Niland *et. al in vitro*, dass Rhodocetin $\alpha\beta$ über die Aktivierung von Neuropilin-1 die Motilität von Endothelzellen steigert (43). Die Abbildungen 13-16 zeigen, dass eine neue Wirkung von Rhodocetin $\alpha\beta$ die Bildung von Ausstülpungen der Kapillaren nach der Injektion in den Glaskörper von jungen Mäusen ist. Das Rhodocetin-Heterodimer induziert die Bildung aufgetriebener Ausstülpungen, die mit dem Gefäßsystem verbunden sind (Abb. 17). Diese Aussprossungen erscheinen keulenförmig und die morphologische Ausprägung unterscheidet sich nicht zwischen den unterschiedlichen Stromgebieten (Abb. 19 und 20). Bei diesen Ausstülpungen handelt es sich nicht um eine zufällige Anhäufung von Mikroglia, die ebenfalls Isolektin-B4-positiv sind und dann als Ausstülpung erscheinen könnten, da in der Immunfluoreszenz kein CD11b nachgewiesen werden konnte (Abb. 21 und 22).

Eine ähnliche Morphologie zeigen auch Ausstülpungen, die beim Norrie-Syndrom im superficialen Plexus der Retina auftreten (6). Das Norrie-Syndrom wird durch Mutationen des NDP-Gens (Norrie disease pseudoglioma) hervorgerufen (7). Dies führt zu mentaler Retardierung, fortschreitender Taubheit sowie kongenitaler Blindheit aufgrund von Mikroaneurysmata sowie der Bildung von Membranen des Glaskörpers (6). Jedoch gibt es einige wesentliche Unterschiede zwischen den Gefäßmalformationen nach der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ sowie denen des Norrie-Syndroms. Während die nach Rhodocetin $\alpha\beta$ -Injektion entstandenen Ausstülpungen vor allem im venösen Stromgebiet sowie in der Peripherie entstanden (Abb. 16), treten beim Norrie-Syndrom Gefäßanomalien bevorzugt in zentralen Retina-Arealen und dort überwiegend im arteriellen Stromgebiet auf (6). Daneben bestehen weitere Auffälligkeiten der retinalen Gefäße bei dem Norrie-Syndrom, wie beispielsweise eine avaskuläre retinale Peripherie, die nach Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ nicht beobachtet werden konnten (6). Somit erscheint es sehr unwahrscheinlich, dass Rhodocetin $\alpha\beta$ über den gleichen

Signalweg wie das Norrie-Syndrom, zum Beispiel der Wnt-Signalkaskade, zur Bildung der Ausstülpungen führt (51).

Neben dem Norrie-Syndrom treten verdickte Ausstülpungen sowie eine Verminderung der Verzweigungen an der angiogenetischen Front auch bei Neuropilin-1, TGFRB2, ITGAV und ITGB8 Knock-out Mäusen auf (51). Ein möglicher Erklärungsansatz für die verdickten Aussprossungen der Neuropilin-1-defizienten Endothelzellen in Knock-out Mäusen ist die Supprimierung des Spitzenzellstatus, den Neuropilin-1 normalerweise fördert (48, 51). Angiogenetische Aussprossungen werden durch Stielzellen (engl. stalk cells) vorangetrieben, die deshalb verdickt sind (51). Dagegen zeigt sich eine vermehrte Anzahl an Filopodien im venösen Stromgebiet nach der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ (Abb. 26). Vor allem die Spitzenzellen (engl. tip cells) entwickeln während der aussprossenden Angiogenese (engl. sprouting angiogenesis) Filopodien, mithilfe deren sie einem VEGF-Gradienten folgen (48). Für eine Unterstützung des Spitzenzellstatus durch die Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ spricht auch die verstärkte Motilität der Endothelzellen über den Neuropilin-1 und cMet-Signalweg, welche *in vitro* gezeigt werden konnte (43). Zusammen mit den Ergebnissen des cMet-Inhibitors SU11274 scheint insgesamt eine Festigung des Spitzenzellstatus durch die Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ am wahrscheinlichsten (Abbildungen 40 und 50). Aufgrund der keulenähnlichen Morphologie der entstehenden Ausstülpungen mit einem schlanken Hals und einem großen Kopf kommt es nach der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ mutmaßlich zu einer Begünstigung des Spitzenzellstatus und damit zur vermehrten Anzahl an Spitzenzellen im Kopfbereich der Ausstülpungen (Abbildungen 17 und 18). Daher kann Rhodocetin $\alpha\beta$ als pro-angiogenetischer Faktor angesehen werden.

Okuläre Neovaskularisationen treten nicht nur bei seltenen Genmutationen wie dem Norrie-Syndrom auf, sondern auch bei weit verbreiteten Erkrankungen des Auges wie der Frühgeborenenretinopathie, der proliferativen diabetischen Retinopathie sowie der exsudativen altersbedingten Makuladegeneration, die zu einem Verlust des Visus führen können (48). Die Pathogenese dieser Erkrankungen ist unterschiedlich, jedoch ist allen gemeinsam eine Dysbalance zwischen Angiogenese-Stimulatoren und -Inhibitoren (35). Ein genaueres Verständnis der Angiogenese im Auge sowie deren Signalkaskaden ist

essentiell für die Behandlung der oben genannten Augenerkrankungen, vor allem unter dem Aspekt, dass beispielsweise die Anti-VEGF-Monotherapie bei exsudativer altersbedingter Makuladegeneration eine limitierte Effektivität besitzt und Alternativen zur Behandlung gefunden werden müssen (48). Auch in der Erforschung der Frühgeborenenretinopathie liegt ein Fokus auf der Entwicklung neuer Medikamente zur Behandlung (51). Da Neuropilin-1 in den neovaskulären Arealen von Mäusen mit Frühgeborenenretinopathie nachgewiesen werden konnte, scheint eine weitere Erforschung von Rhodocetin $\alpha\beta$ und des cMet-Inhibitors SU11274 im Modell für Frühgeborenenretinopathie sinnvoll (35).

Eine verstärkte oder verminderte Angiogenese ist Ursache oder Folge vieler pathologischer Prozesse wie beispielsweise der Wundheilung, dem Tumorwachstum und der Atherosklerose (44). Neben Rhodocetin $\alpha\beta$ haben noch andere Schlangengifte einen Einfluss auf die Angiogenese *in vivo* gezeigt (8). Aus dem Gift der *Bothrops*-Schlangen zeigten Serinproteinasen eine Aktivierung des PI3/Akt-Signalweges und induzierten damit eine signifikant erhöhte Bildung sowie Länge von Aussprossungen (8). Ein dem VEGF ähnliches Protein konnte im Gift von *Trimeresurus flavoviridis* isoliert werden und Alternagin-C aus *B. alternatus* zeigten eine pro-angiogenetische Aktivität (8). Ebenfalls aus *Calloselasma rhodostoma* entstammt Aggretin, welches die VEGF-Expression verstärkt und somit zu einer gesteigerten Angiogenese führt (8).

4.2 Signalweg über Neuropilin-1 und cMet *in vivo* wahrscheinlich

Niland *et al.* konnten zeigen, dass Rhodocetin $\alpha\beta$ *in vitro* die Motilität von Endothelzellen über Aktivierung von Neuropilin-1 und dessen Assoziation mit cMet steigert (43). Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche legen eine Bestätigung dieses Signalweges nun auch *in vivo* nahe, da der cMet-Inhibitor SU11274 die nach Rhodocetin $\alpha\beta$ -Injektion aufgetretenen Wirkungen unterdrückte. So entstanden nach der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ Ausstülpungen, die mit gleichzeitiger Injektion des cMet-Inhibitors nicht auftraten. Zusätzlich zeigte der cMet-Inhibitor nach alleiniger Injektion keine Veränderung der Anzahl an Ausstülpungen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 40). Auch die durch die Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ erhöhte vaskularisierte Fläche in der Peripherie wurde durch den gleichzeitigen Einsatz des cMet-Inhibitors auf

annähernd das Maß der Kontrollgruppe verringert (Abb. 50). Signifikant erhöhte Rhodocetin $\alpha\beta$ die Anzahl an Verzweigungspunkten in der Peripherie der Retina; ein Effekt, der durch die gleichzeitige Injektion des cMet-Inhibitors verhindert werden konnte (Abb. 46). Ebenfalls normalisierte sich die Menge an mRNA von Neuropilin-1 nach der Injektion des cMet-Inhibitors SU11274 im Gegensatz zur verringerten mRNA-Menge nach Rhodocetin $\alpha\beta$ -Injektion an P4 sowie an P5 (Abb. 65 a und b). Ähnliches zeichnete sich auch bei der mRNA-Menge von cMet an P4 ab; auch hier verringerte Rhodocetin $\alpha\beta$ die mRNA-Menge während der Effekt nach Injektion des cMet-Inhibitors deutlich rückläufig war (Abb. 67a).

Die Immunhistochemie lieferte zusätzliche Hinweise auf den Signalweg über die Assoziation von Neuropilin-1 mit cMet. Paraffinschnitte zeigten, dass Endothelzellen Neuropilin-1-positiv sowie auch cMet-positiv sind (Abb. 54 und 58). Darüber hinaus ließen sich keine weiteren Schlüsse auf eine verstärkte Anfärbbarkeit der Ausstülpungen im Paraffinschnitt ziehen, da Ausstülpungen im Schnitt nicht sicher von angeschnittenen Gefäßen identifiziert werden konnten (Abb. 54 und 58). In Flatmounts zeigten sich die nach Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ entstandenen Ausstülpungen verstärkt Neuropilin-1- und cMet-positiv. Dies lässt auf eine vermehrte Expression von Neuropilin-1 und cMet in den Ausstülpungen schließen (Abb. 53, 55-57). Sowohl die Antikörper zur Anfärbung von Neuropilin-1, cMet, Paxillin als auch Y31-Phosphopaxillin haben spezifisch gebunden, jedoch zusätzlich zu Endothelzellen auch weitere Strukturen der Retina angefärbt (Abb. 51-53, 55-57, 59-64). Dieser Verdacht ließ sich für Neuropilin-1 und cMet in den Paraffinschnitten bestätigen (Abb. 54 und 58). Neben Endothelzellen exprimieren noch weitere Zellen in der Retina Neuropilin-1, wie beispielsweise Makrophagen und retinale Ganglienzellen (12, 25, 48). Auch cMet wird außer von Endothelzellen der Retina zum Beispiel auch von Ganglienzellen der Retina exprimiert (56, 59). Dies erklärt sehr wahrscheinlich die beobachtete Färbung zusätzlich zu den Isolektin-B4-positiven Endothelzellen. Eine Veränderung dieses Musters nach der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ könnte auf eine Wirkung von Rhodocetin $\alpha\beta$ auf die Ganglienzellen oder weitere Zellen der Retina außer den Endothelzellen zurückzuführen sein (Abb. 51-53). Eine weitere Analyse der Wirkungen

nach Rhodocetin $\alpha\beta$ -Injektion an anderen Zellverbunden der Retina erscheint daher sinnvoll.

Nach dem *in vitro* Nachweis des Signalweges von Rhodocetin $\alpha\beta$ über Neuropilin-1 und cMet konnten nun weitere Indizien für den genannte Signalweg *in vivo* gezeigt werden (43). Nach wie vor ist damit Rhodocetin $\alpha\beta$ das einzige bekannte Protein aus einem Schlangengift, welches mit Neuropilin-1 interagiert (43).

Eine verstärkte oder verminderte Expression von Neuropilin-1 ist assoziiert mit verschiedenen Krankheiten, wie beispielsweise der diabetischen Retinopathie (35). Auch in der Wundheilung spielt Neuropilin-1 eine kritische Rolle, da sowohl pro-angiogenetische als auch anti-angiogenetische Wirkungen existieren (34, 35, 48). Auch wird Neuropilin-1 von vielen humanen Tumoren exprimiert, wie beispielsweise dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom, Brustkrebs und dem kolorektalen Karzinom (30). Pan *et al.* konnten bereits zeigen, dass Antikörper, die die Bindung von VEGF an Neuropilin-1 verhinderten, die Lungenkarzinome von Mäusen signifikant verkleinern konnten (22). Weiterhin befinden sich Antikörper zur Blockade von Neuropilin-1 bereits in klinischen Tests (30).

Daneben besitzt die Therapie einer Vergiftung durch *Calloselasma rhodostoma* ebenfalls eine klinische Bedeutung, da diese Schlange in die Kategorie 1 der medizinisch bedeutsamen Giftschlangen von Südostasien fällt (58). Da das Gift aus mehreren Komponenten mit teils gegensätzlichen Wirkungen zusammengesetzt ist, ist ein genaues Verständnis der Wirkungen der einzelnen Bestandteile wichtig um es neutralisieren zu können (10, 58).

4.3 Rhodocetin $\alpha\beta$ verringert die mRNA-Menge von Neuropilin-1, cMet und VEGF-R2

Wie bereits unter 4.2 ausgeführt wurde, wirkt Rhodocetin $\alpha\beta$ sehr wahrscheinlich über Neuropilin-1 und cMet nach intravitrealer Injektion im Auge der Mäuse. Auch auf Ebene der Transkription zu mRNA konnten Effekte durch die Rhodocetin $\alpha\beta$ -Injektion nachgewiesen werden. Die Menge von Neuropilin-1-mRNA war nach der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ an P4 signifikant verringert im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 65a). Ebenfalls zeigte sich eine signifikante Verringerung der Neuropilin-1-mRNA-Menge

nach Rhodocetin $\alpha\beta$ -Injektion an P5 (Abb. 65b). Diese Verringerung an mRNA von Neuropilin-1 bei nachgewiesener Aktivierung von Neuropilin-1 erscheint zunächst widersprüchlich (siehe 4.2). Eine Erklärung dafür könnte eine negative Rückkopplung sein. Aufgrund der vermehrten Aktivierung des Neuropilin-1-Signalweges durch Rhodocetin $\alpha\beta$ könnte die Transkription von mRNA für Neuropilin-1 gehemmt werden. Feedbackschleifen, sowie weitere Signalmodulatoren wie die Signalredundanz sind bekannte Faktoren in der Signaltransduktion von Rezeptoren (59). Die Regulation auf der Ebene der Transkription kann ebenfalls über Feedbackschleifen stattfinden, und eine Hemmung durch einen Überfluss an dem jeweiligen Produkt ist häufig (4). Entsprechend könnte die Herabregulierung der mRNA-Menge von Neuropilin-1 nach Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ einer übermäßigen Aktivierung von Neuropilin-1 entgegenwirken (Abb. 65). Eine Injektion des cMet-Inhibitors SU11274 reduzierte die Wirkung von Rhodocetin $\alpha\beta$ auf die Neuropilin-1-Expression (Abb. 65 a und b). Dies steht in Einklang mit den immunhistologischen Ergebnissen dieser Arbeit sowie den *in vitro* Ergebnissen von Niland *et. al* (43).

Die Expression von cMet wurde durch die Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ an P4 ebenfalls signifikant reduziert, sodass eine negative Rückkopplung nach vermehrter Aktivierung durch Rhodocetin $\alpha\beta$ vorliegen könnte (Abb. 67a). Dies steht im Einklang mit aktuellen Ergebnissen anderer Forschungsprojekte, denn für cMet sind bereits Feedbackschleifen bekannt. Beispielsweise ist eine positive Feedbackschleife zwischen Stat3 und cMet bekannt, die zur Blockade der Tumorzellinvasion in einem *in vivo*-Modell führt (57). Im Gegensatz dazu konnte nach Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ an P5 keine gegenüber der Kontrollgruppe verringerte cMet-Expression gezeigt werden (Abb. 67b). Jedoch zeigt Abbildung 68, dass die mRNA-Menge von cMet an P5 im Vergleich zu P4 nur geringfügig erhöht war und weiterhin unterhalb des Niveaus von P7 lag. Die mRNA-Menge von cMet in der Kontrollgruppe schien jedoch an P5 drastisch verringert im Vergleich zu P4 und P7, sodass auch von einem Ausreißer der mRNA-Menge der Kontrollgruppe an P5 ausgegangen werden könnte (Abb. 68). Zusätzlich zeigte sich eine erhöhte mRNA-Menge an cMet nach Injektion mit dem cMet-Inhibitor SU11274 an P5 und P7, sodass ein zusätzlicher Effekt des cMet-Inhibitors unabhängig von der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ vorliegen könnte (Abb. 67 b und c).

An P4 wurde die Menge an mRNA des VEGF-Rezeptors 2 durch die Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ signifikant verringert (Abb. 69a). Auch hier könnte eine negative Rückkopplung aufgrund verstärkter Aktivität von Neuropilin-1 durch Rhodocetin $\alpha\beta$ eine verminderte Transkription von mRNA für VEGF-R2 auslösen. Dafür spricht, dass Neuropilin-1 die Internalisierung von VEGF-R2 bewirken kann (34). Die Internalisierung von Tyrosinkinase-Rezeptoren ist ein bekanntes Prinzip um die Signaltransduktion zu modulieren (59). Trotz Internalisierung können Rezeptoren weiterhin Signale weitergeben, jedoch bleibt die Internalisierung der Hauptfaktor für eine Desensitivierung von Rezeptoren (34, 59). Bereits bekannt ist für den VEGF-Rezeptor 3, dass er Notch aktiviert, welches daraufhin die Expression von VEGF-R3 herunterreguliert (64). Ebenso ist bekannt, dass der VEGF-Rezeptor 2 die Expression von VEGF-R3 fördert, welcher in einer negativen Feedbackschleife daraufhin die Expression von VEGF-R2 verringert (64). Auch wurde im Mausmodell gezeigt, dass die VEGF-induzierte Angiogenese eine verstärkte mRNA-Expression von Neuropilin-1 hervorruft und so eine Feedbackschleife bildet (35). Eine negative Feedbackschleife über die vermehrte Aktivierung von Neuropilin-1 durch Rhodocetin $\alpha\beta$ für die mRNA-Menge von VEGF-R2 scheint somit wahrscheinlich (Abb. 69a).

Insgesamt lassen sich Auswirkungen der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ auf mRNA-Ebene zeigen, da an P4 bzw. P5 die mRNA-Mengen von Neuropilin-1, cMet und VEGF-R2 verringert wurden (Abb. 65 a und b, 67a und 69a). Ein negativer Feedbackmechanismus nach verstärkter Aktivierung von Neuropilin-1 und cMet durch Rhodocetin $\alpha\beta$ könnte dafür die Erklärung sein. Jedoch wurde die Bestimmung der mRNA-Menge mit der gesamten Retina durchgeführt, sodass die verringerte mRNA-Menge der drei untersuchten Proteine auch auf einen noch unbekanntem Effekt von Rhodocetin $\alpha\beta$ auf andere Zellen der Retina als Endothelzellen zurückzuführen sein könnte (siehe 2.4.2). Sowohl Neuropilin-1 als auch cMet und der VEGF-Rezeptor 2 werden von weiteren Zellen der Retina exprimiert (12, 25, 48, 56).

4.4 Rhodocetin $\alpha\beta$ wirkt auf unreife Gefäßnetze

Die beobachteten Wirkungen von Rhodocetin $\alpha\beta$ zeigten sich immunhistochemisch sowie auf Translations-Ebene vor allem an unreifen Gefäßnetzen.

Die Bildung von Ausstülpungen nach Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ fand bevorzugt im venösen Stromgebiet statt (Abb. 40). Ebenfalls bildeten sich Ausstülpungen nach Rhodocetin $\alpha\beta$ -Injektion in den in der Peripherie gelegenen Gefäßen (Abb. 40). Dagegen konnte keine signifikante Bildung von Ausstülpungen im arteriellen Stromgebiet beobachtet werden (Abb. 40). Auch die vermehrte Bildung von Filopodien stellte sich im venösen Stromgebiet, jedoch nicht im arteriellen Stromgebiet dar (Abb. 26). Nach Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ zeigte sich eine signifikant erhöhte Anzahl an Verzweigungspunkten der Gefäße in den peripheren Gefäßen (Abb. 46). Dagegen wurde die Anzahl an Verzweigungspunkten der arteriellen sowie venösen Gefäße durch Rhodocetin $\alpha\beta$ nicht signifikant beeinflusst (Abb. 46). Ebenfalls steigerte sich die vaskularisierte Fläche nach Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ signifikant in der Peripherie sowie im venösen Stromgebiet (Abb. 50). Auch hier fehlte ein Einfluss von Rhodocetin $\alpha\beta$ auf die vaskularisierte Fläche im arteriellen Stromgebiet (Abb. 50). Die Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ führte somit zu Wirkungen vor allem im venösen Stromgebiet sowie in der Peripherie. Im arteriellen Stromgebiet zeigte die Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ keine Effekte.

Wie unter 4.2 erläutert, konnten im Rahmen dieser Arbeit weitere Indizien für den *in vitro* beschriebenen Signalweg von Rhodocetin $\alpha\beta$ über Neuropilin-1 und cMet *in vivo* gezeigt werden. Neuropilin-1 wird jedoch vor allem von arteriellen Gefäßen exprimiert während Neuropilin-2 bevorzugt von Venen und lymphatischen Gefäßen exprimiert wird (23, 34). Eine Erklärung für diese Diskrepanz könnte ein Signalweg von Rhodocetin $\alpha\beta$ bevorzugt über Neuropilin-2 in Assoziation mit cMet als über Neuropilin-1 und cMet sein. Bekannt ist bereits, dass sowohl Neuropilin-1 als auch Neuropilin-2 HGF binden und darüber cMet aktivieren können (55). Auch wenn Rhodocetin $\alpha\beta$ und HGF keine homologe Struktur miteinander teilen, so ist eine Aktivierung von Neuropilin-2 durch Rhodocetin $\alpha\beta$ dennoch denkbar aufgrund der ausgeprägt homologen Struktur von Neuropilin-1 und Neuropilin-2 zueinander (43, 48). Ebenso ist es möglich, dass Rhodocetin $\alpha\beta$ vor allem an einem unreifen Gefäßnetz einen Angriffspunkt findet, da das Aussprossen vor allem von Venolen ausgeht (50). Dafür spricht auch, dass sich die Arterien früher differenzieren als die Venen und somit eine bevorzugte Wirkung von Rhodocetin $\alpha\beta$ im venösen Stromgebiet aus einer bevorzugten Wirkung an einem unreiferen Gefäßnetz hervorgeht (5). Jedoch bleibt der Umbau von

bereits bestehenden, unreifen Gefäßnetzen in ein hierarchisch organisiertes Gefäßnetz weiterhin nur schlecht verstanden. Deshalb ist weitere Forschung nötig um die Hypothese, dass Rhodocetin $\alpha\beta$ an unreifen Gefäßnetzen angreift, zu bestätigen oder zu widerlegen (50).

Neben den nach der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ beobachteten Effekten bevorzugt im venösen Stromgebiet und in der Peripherie zeigten sich auch Unterschiede in den Effekten je nach Injektionstag (Abb. 40, 46, 50).

Wurde an Tag 7 nach der Geburt oder später Rhodocetin $\alpha\beta$ injiziert, so konnten keine Ausstülpungen oder sonstige Wirkungen beobachtet werden (Vorversuche, nicht gezeigt). Die starke Abhängigkeit der Rhodocetin $\alpha\beta$ -Wirkungen vom Injektionstag zeigte sich vor allem in der qPCR. Nach der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ verringerte sich die mRNA-Menge von Neuropilin-1 signifikant, sofern Rhodocetin $\alpha\beta$ an P4 oder P5 injiziert worden war (Abb. 65 a und b). Fand die Rhodocetin $\alpha\beta$ -Injektion an P7 statt, so konnte kein Unterschied zwischen der Neuropilin-1-Expression nach Rhodocetin $\alpha\beta$ -Injektion und der mRNA-Menge von Neuropilin-1 in der Kontrollgruppe festgestellt werden (Abb 65c). Auch Abbildung 66 zeigt deutlich, dass der Unterschied der mRNA-Menge zwischen der Gruppe nach Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ und der Kontrollgruppe an P4 und P5 am größten ist sowie keine Differenz an P7. Ähnlich verhält es sich mit der Expression von cMet. Auch diese zeigte sich nach der Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ an P4 vermindert (Abb. 67a). Fand die Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ jedoch an P5 oder an P7 statt, so zeigte sich kein Unterschied in der mRNA-Menge von cMet zwischen der Injektionsgruppe mit Rhodocetin $\alpha\beta$ und der Kontrollgruppe (Abb. 67 b und c). Jedoch zeigte sich eine verstärkte mRNA-Menge nach Injektion des cMet-Inhibitors SU11274 an P7, sodass der p-Wert vor allem auf die Differenz zwischen den Injektionsgruppen mit dem cMet-Inhibitor und den Injektionsgruppen ohne den cMet-Inhibitor zurückzuführen ist (Abb. 67c). Ebenfalls erschwert ein im Gegensatz zu P4 und P7 deutlich verringerte mRNA-Menge von cMet in der Kontrollgruppe die Interpretation (Abb. 68). Ein Ausreißer in der mRNA-Quantifizierung könnte die verminderte Menge an cMet-mRNA an P5 erklären. Aber dennoch zeigte sich, dass nach Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ die mRNA-Menge von cMet an P4 verringert wurde, während sich nach Rhodocetin $\alpha\beta$ -Injektion

an P7 die mRNA-Menge nicht von der mRNA-Menge der Kontrollgruppe unterschied (Abb. 67 a und c).

Ebenso bewirkte eine Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ an P4 eine Verringerung der Expression des VEGF-Rezeptors 2 (Abb. 69a). Nach der Injektion an P5 und P7 konnte keine Differenz in der mRNA-Menge von VEGF-R2 zwischen mit Rhodocetin $\alpha\beta$ behandelten Tieren und Tieren der Kontrollgruppe festgestellt werden (Abb. 69 b und c). Zusätzlich zeigte sich eine die mRNA-Menge von VEGF-R2 verstärkende Wirkung nach Injektion des cMet-Inhibitors SU11274 an P7 (Abb. 69c).

Insgesamt konnte eine verringerte Menge der mRNA von Neuropilin-1, cMet und VEGF-R2 an P4 sowie eine im Vergleich zur Kontrollgruppe normale Menge an mRNA von Neuropilin-1, cMet und VEGF-R2 an P7 beobachtet werden (Abb. 65-70). Dies unterstützt ebenfalls die Hypothese, dass Rhodocetin $\alpha\beta$ seine Effekte vor allem an unreifen Gefäßnetzwerken entfalten kann, da die primäre Vaskularisation der Retina durch den oberflächlichen Gefäßplexus an P7 bereits abgeschlossen ist (51).

Allerdings wurde zur Bestimmung der mRNA-Menge die gesamte Retina eingesetzt, und somit auch andere Zellen als Endothelzellen. Daher könnte eine starke Veränderung der Anzahl an Endothelzellen oder eine Expressionsänderung anderer Zellen durch Rhodocetin $\alpha\beta$ ebenfalls in das Ergebnis einfließen (siehe 2.4.2). Neben Neuropilin-1 werden auch cMet und VEGF-R2 von Nicht-Endothelzellen der Retina exprimiert (12, 25, 48, 56).

Eines der sechs Kennzeichen von Tumoren ist die Induktion der Angiogenese (44). Bereits früh während des Tumorwachstums werden ruhende Gefäßnetzwerke aktiviert und diese bilden daraufhin Neogefäße, die ein weiteres Tumorwachstum ermöglichen (44). Jedoch sind die tumorassoziierten Blutgefäße von schlechter Qualität, chaotisch und unorganisiert sowie undicht und ähneln so einem unreifen Gefäßnetz (44). Aufgrund dieser schlechten Qualität der Blutgefäße von Tumoren wird die Anflutung von Medikamenten im Tumor beeinträchtigt (44). Daher konzentriert sich die aktuelle Forschung auf Möglichkeiten die Gefäße von Tumoren zu normalisieren anstatt sie zu veröden (44). Im Blick darauf könnte Rhodocetin $\alpha\beta$ mit seiner Wirkung hauptsächlich auf unreife Gefäßnetzwerke für die Aufklärung der an Neoangiogenese und Gefäßnormalisierung beteiligten Signalwege nützlich sein. Darüber hinaus könnte es

auch als Leitstruktur zur Entwicklung neuer Pharmaka von Bedeutung sein (siehe 4.1 sowie 4.4).

4.5 Rhodocetin $\alpha\beta$ beeinflusst die Art und Weise des Auswachsens des Gefäßplexus

Neben der Bildung von Ausstülpungen sowie dem Einfluss auf unreife Gefäßnetzwerke zeigte die Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ auch Effekte auf die Art und Weise des Auswachsens des oberflächlichen Gefäßplexus der Retina. Trotz der vermehrten Bildung von Ausstülpungen konnte kein schnelleres Auswachsen des oberflächlichen Gefäßplexus nach Rhodocetin $\alpha\beta$ -Injektion beobachtet werden. Nach Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ an P5 bzw. P6 schritt die angiogenetische Front nicht schneller Richtung Peripherie der Retina voran als die der Kontrollgruppe (Abb. 41). Die durch Rhodocetin $\alpha\beta$ vermehrt gebildeten Ausstülpungen in der Peripherie scheinen somit die Ausdehnung der angiogenetischen Front nicht wesentlich zu beschleunigen. Auch eine vermehrte Proliferation der Endothelzellen nach Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$, welche für eine verstärkte Angiogenese im Zuge der vermehrt gebildeten Ausstülpungen sprechen würde, konnte nicht beobachtet werden. Im Gegenteil dazu erschienen weniger Zellen EdU-positiv nach Rhodocetin $\alpha\beta$ -Injektion als in der Kontrollgruppe (Abb. 23).

Da die Ausstülpungen durch Rhodocetin $\alpha\beta$ die angiogenetische Front nicht schneller in avaskuläre Areale der Retina führten und sich keine vermehrte Proliferation der Endothelzellen nach Rhodocetin $\alpha\beta$ -Injektion zeigte, könnte ein von Rhodocetin $\alpha\beta$ initiiertes Dickenwachstum bei bereits bestehenden Gefäßnetzwerken ursächlich für die beobachteten Veränderungen sein. Daher wurde die Anzahl an Verzweigungsstellen zwischen den unterschiedlichen Injektionsgruppen miteinander verglichen. Hier zeigte sich eine signifikant leicht gesteigerte Anzahl an Verzweigungspunkten nach Rhodocetin $\alpha\beta$ -Injektion gegenüber der Kontrollgruppe in der retinalen Peripherie (Abb. 46c). Im venösen sowie im arteriellen Stromgebiet konnte kein Einfluss von Rhodocetin $\alpha\beta$ auf die Anzahl an Verzweigungspunkten festgestellt werden (Abb. 46 a und b). Daneben nahm die vaskularisierte Fläche in der Peripherie sowie im venösen Stromgebiet nach Rhodocetin $\alpha\beta$ -Injektion im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant zu (Abb. 50 b und c). Im arteriellen Stromgebiet zeigte sich kein Einfluss von Rhodocetin $\alpha\beta$ auf die vaskularisierte Fläche (Abb. 50a). Die Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ bewirkte somit im venösen und im peripheren Stromgebiet eine stärkere

Verzweigung des oberflächlichen Gefäßplexus und eine größere vaskularisierte Fläche (Abb. 47-50). Letzteres kann zum einen durch im Durchschnitt vergrößerte Gefäßkaliber sowie zum anderen durch eine vermehrte Anzahl an Gefäßen im gleichen Ausschnitt hervorgerufen werden. In der Peripherie schien Rhodocetin $\alpha\beta$ die vaskularisierte Fläche vor allem über die erhöhte Anzahl an Verzweigungspunkte und damit einer erhöhten Anzahl an Gefäßen in Kombination mit größeren Gefäßkalibern zu bewirken (Abb. 45 und 49). Im venösen Stromgebiet beruhte die signifikant erhöhte vaskularisierte Fläche auf einem vergrößerten Kaliber der Gefäße, da kein Anstieg der Verzweigungspunkte nach Rhodocetin $\alpha\beta$ -Injektion sichtbar war (Abb. 44 und 48). Insgesamt bewirkte die Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ die Bildung von Ausstülpungen, diese führten jedoch nicht zu einer beschleunigten Vaskularisation von avaskulären Arealen, sondern es zeigte sich nach Rhodocetin $\alpha\beta$ -Injektion ein stärker verzweigtes Gefäßnetz mit größeren Gefäßkalibern (siehe 4.1).

Auch in der Wundheilung spielt die Angiogenese eine wichtige Rolle, da sich nach dem Abschluss der Entwicklung der Blutgefäße die Endothelien der Gefäße normalerweise in einem Ruhezustand befinden (40, 44). Dieser Ruhezustand wird beispielsweise bei der Menorrhö oder der Wundheilung überwunden und Angiogenese setzt ein (44). Diese wird vor allem durch VEGF vermittelt, jedoch zeigten *in vitro*- und *in vivo*-Studien, dass Neuropilin-1 ebenfalls an der Angiogenese während der Wundheilung beteiligt ist (35, 40). Die Expression von Neuropilin-1 ist am höchsten kurz bevor eine Wunde maximal vaskularisiert ist und werden Antikörper zur Inhibierung von Neuropilin-1 gegeben, so vermindert sich die vaskuläre Dichte (40). Wird jedoch lediglich die Bindung von VEGF an Neuropilin-1 unterbunden, so ändert sich die Gefäßdichte nicht signifikant (48). Der genaue Mechanismus, über den Neuropilin-1 in die Angiogenese während der Wundheilung eingreift, ist noch nicht genau verstanden (40). Bekannt ist jedoch, dass auch cMet den Gewebeumbau bei der Wundheilung fördert (59). Aufgrund der verstärkten vaskulären Dichte nach Rhodocetin $\alpha\beta$ -Injektion und dem unter 4.2 beschriebenen Signalweg über Neuropilin-1 erscheint es wahrscheinlich, dass Rhodocetin $\alpha\beta$ in die Wundheilung eingreift (Abb. 50). Die Wundheilung ist abhängig von neu auswachsenden Kapillaren, die eine bis zu 10fach erhöhte vaskuläre Dichte im verletzten Gebiet bewirken (13). Hier könnte eine

Erhöhung der vaskulären Dichte nach Rhodocetin $\alpha\beta$ -Injektion bei Wunden mit verminderter Gefäßdichte sinnvoll sein.

5 Zusammenfassung

Rhodocetin ist ein Bestandteil des Giftes von *Calloselasma rhodostoma* und besteht aus vier Untereinheiten von denen schon einige interessante Wirkungen bekannt sind. So hemmt die $\gamma\delta$ -Untereinheit spezifisch das Integrin $\alpha_2\beta_1$, und die $\alpha\beta$ -Untereinheit bindet an GPIb und inhibiert so die Thrombozytenaggregation. Niland *et al.* konnten zeigen, dass die $\alpha\beta$ -Untereinheit von Rhodocetin über die Assoziation von Neuropilin-1 mit cMet zu einer verstärkten Motilität von Endothelzellen *in vitro* führt (43). In dieser Arbeit sollte am sich bildenden superficialen Gefäßplexus der Retina der Signalweg von Rhodocetin $\alpha\beta$ über Neuropilin-1 und cMet *in vivo* untersucht werden. Dazu wurden Mäuse zwischen dem 4. und dem 7. Tag nach Geburt intravitreal mit Rhodocetin $\alpha\beta$, PBS als Kontrolle oder dem cMet-Inhibitor SU11274 injiziert. Nachfolgend wurden mittels Immunhistochemie sowie qPCR die am Signalweg beteiligten Moleküle und die Gefäße untersucht.

Es zeigte sich, dass die Injektion von Rhodocetin $\alpha\beta$ zur Bildung von Gefäßausstülpungen führte, welche bevorzugt im venösen und im peripheren Stromgebiet auftraten. Die Ausstülpungen stellten sich verstärkt Neuropilin-1- sowie cMet-positiv dar, und ihre Ausbildung wurde durch die Injektion des cMet-Inhibitors SU11274 verhindert. Ebenfalls nahm die Anzahl an Filopodien im venösen Stromgebiet nach Rhodocetin $\alpha\beta$ -Injektion signifikant zu, sowie auch die vaskularisierte Fläche und in der Peripherie die Anzahl an Verzweigungspunkten der Gefäße. In der qPCR zeigte sich eine verringerte mRNA-Menge an P4 bzw. an P5 von Neuropilin-1, cMet und VEGF-Rezeptor 2. An P7 glich die mRNA-Menge nach Rhodocetin $\alpha\beta$ -Injektion der der Kontrollgruppe. Insgesamt konnten deutliche Hinweise für den von Niland *et al.* *in vitro* entdeckten Signalweg von Rhodocetin $\alpha\beta$ über die Assoziation von Neuropilin-1 mit cMet *in vivo* gezeigt werden. Ebenfalls zeigte sich, dass sich der beobachtete Einfluss von Rhodocetin $\alpha\beta$ vermutlich vor allem auf unreifere Gefäßnetzwerke beschränkte, da die Effekte vor allem an P4 bis P6 sowie im venösen und im peripheren

Stromgebiet beobachtet werden konnten. Daneben scheint Rhodocetin $\alpha\beta$ den Spitzenzellstatus zu fördern und ist somit als pro-angiogenetisch einzuordnen.

6 Literaturverzeichnis

- (1) Adams RH, Eichmann A (2010) Axon guidance molecules in vascular patterning. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, 5: a001875
- (2) Arlinghaus FT, Eble JA (2012) C-type lectin-like proteins from snake venoms. *Toxicon* 60, 4: 512–519
- (3) Arlinghaus FT, Momic T, Ammar NA, Shai E, Spectre G, Varon D, Marcinkiewicz C, Heide H, Lazarovici P, Eble JA (2013) Identification of alpha2beta1 integrin inhibitor VP-i with anti-platelet properties in the venom of *Vipera palaestinae*. *Toxicon* 64: 96–105
- (4) Ayala YM, Conti L de, Avendaño-Vázquez SE, Dhir A, Romano M, D'Ambrogio A, Tollervey J, Ule J, Baralle M, Buratti E, Baralle FE (2011) TDP-43 regulates its mRNA levels through a negative feedback loop. *EMBO J* 30, 2: 277–288
- (5) Bautch VL, Caron KM (2015) Blood and lymphatic vessel formation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, 3: a008268
- (6) Beck SC, Feng Y, Sothilingam V, Garcia Garrido M, Tanimoto N, Acar N, Shan S, Seebauer B, Berger W, Hammes H-P, Seeliger MW (2017) Long-term consequences of developmental vascular defects on retinal vessel homeostasis and function in a mouse model of Norrie disease. *PLoS ONE* 12, 6: e0178753
- (7) Berger W, Meindl A, van de Pol TJ, Cremers FP, Ropers HH, Dörner C, Monaco A, Bergen AA, Lebo R, Warburg M (1992) Isolation of a candidate gene for Norrie disease by positional cloning. *Nat Genet* 1, 3: 199–203
- (8) Bhat SK, Joshi MB, Ullah A, Masood R, Biligiri SG, Arni RK, Satyamoorthy K (2016) Serine proteinases from Bothrops snake venom activates PI3K/Akt mediated angiogenesis. *Toxicon* 124: 63–72
- (9) Bolas G, Rezende FF de, Lorente C, Sanz L, Eble JA, Calvete JJ (2014) Inhibitory effects of recombinant RTS-jerdostatin on integrin alpha1beta1 function during adhesion, migration and proliferation of rat aortic smooth muscle cells and angiogenesis. *Toxicon* 79: 45–54
- (10) Bracht T, Figueiredo de Rezende F, Stetefeld J, Sorokin LM, Eble JA (2011) Monoclonal antibodies reveal the alteration of the rhodocetin structure upon alpha2beta1 integrin binding. *Biochem J* 440, 1: 1–11
- (11) Cerani A, Tetreault N, Menard C, Lapalme E, Patel C, Sitaras N, Beaudoin F, Leboeuf D, Guire V de, Binet F, Dejda A, Rezende FA, Miloudi K, Sapiha P (2013) Neuron-derived semaphorin 3A is an early inducer of vascular permeability in diabetic retinopathy via neuropilin-1. *Cell Metab* 18, 4: 505–518
- (12) Dejda A, Mawambo G, Daudelin J-F, Miloudi K, Akla N, Patel C, Andriessen E, Labrecque N, Sennlaub F, Sapiha P (2016) Neuropilin-1-expressing microglia are associated

- with nascent retinal vasculature yet dispensable for developmental angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 57, 4: 1530–1536
- (13) DiPietro LA (2016) Angiogenesis and wound repair: When enough is enough. *J Leukoc Biol* 100, 5: 979–984
- (14) Döme B, Hendrix MJC, Paku S, Tóvári J, Tímár J (2007) Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications. *Am J Pathol* 170, 1: 1–15
- (15) Eble JA, Beermann B, Hinz HJ, Schmidt-Hederich A (2001) alpha 2beta 1 integrin is not recognized by rhodocytin but is the specific, high affinity target of rhodocetin, an RGD-independent disintegrin and potent inhibitor of cell adhesion to collagen. *J Biol Chem* 276, 15: 12274–12284
- (16) Eble JA, McDougall M, Orriss GL, Niland S, Johannningmeier B, Pohlentz G, Meier M, Karrasch S, Estevão-Costa MI, Martins Lima A, Stetefeld J (2017) Dramatic and concerted conformational changes enable rhodocetin to block $\alpha 2\beta 1$ integrin selectively. *PLoS Biol* 15, 7: e2001492
- (17) Eble JA, Niland S, Bracht T, Mormann M, Peter-Katalinic J, Pohlentz G, Stetefeld J (2009) The alpha2beta1 integrin-specific antagonist rhodocetin is a cruciform, heterotetrameric molecule. *FASEB J* 23, 9: 2917–2927
- (18) Eble JA, Niland S, Dennes A, Schmidt-Hederich A, Bruckner P, Brunner G (2002) Rhodocetin antagonizes stromal tumor invasion in vitro and other alpha2beta1 integrin-mediated cell functions. *Matrix Biol* 21, 7: 547–558
- (19) Eble JA, Tuckwell DS (2003) The alpha2beta1 integrin inhibitor rhodocetin binds to the A-domain of the integrin alpha2 subunit proximal to the collagen-binding site. *Biochem J* 376, Pt 1: 77–85
- (20) Ehling M, Adams S, Benedito R, Adams RH (2013) Notch controls retinal blood vessel maturation and quiescence. *Development* 140, 14: 3051–3061
- (21) Fan S, Gao M, Meng Q, Laterra JJ, Symons MH, Coniglio S, Pestell RG, Goldberg ID, Rosen EM (2005) Role of NF-kappaB signaling in hepatocyte growth factor/scatter factor-mediated cell protection. *Oncogene* 24, 10: 1749–1766
- (22) Fantin A, Herzog B, Mahmoud M, Yamaji M, Plein A, Denti L, Ruhrberg C, Zachary I (2014) Neuropilin 1 (NRP1) hypomorphism combined with defective VEGF-A binding reveals novel roles for NRP1 in developmental and pathological angiogenesis. *Development* 141, 3: 556–562
- (23) Fantin A, Schwarz Q, Davidson K, Normando EM, Denti L, Ruhrberg C (2011) The cytoplasmic domain of neuropilin 1 is dispensable for angiogenesis, but promotes the spatial separation of retinal arteries and veins. *Development* 138, 19: 4185–4191
- (24) Fruttiger M (2007) Development of the retinal vasculature. *Angiogenesis* 10, 2: 77–88, Online im Internet: doi: 10.1007/s10456-007-9065-1
- (25) Gariano RF, Hu D, Helms J (2006) Expression of angiogenesis-related genes during retinal development. *Gene Expr Patterns* 6, 2: 187–192

- (26) Gariano RF, Iruela-Arispe ML, Hendrickson AE (1994) Vascular development in primate retina: Comparison of lamellar plexus formation in monkey and human. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35, 9: 3442–3455
- (27) Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, Jeltsch M, Mitchell C, Alitalo K, Shima D, Betsholtz C (2003) VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol* 161, 6: 1163–1177
- (28) Hoon M, Okawa H, Della Santina L, Wong ROL (2014) Functional architecture of the retina: Development and disease. *Prog Retin Eye Res* 42: 44–84
- (29) Hu J, Popp R, Fromel T, Ehling M, Awwad K, Adams RH, Hammes H-P, Fleming I (2014) Muller glia cells regulate Notch signaling and retinal angiogenesis via the generation of 19,20-dihydroxydocosapentaenoic acid. *J Exp Med* 211, 2: 281–295
- (30) Jubb AM, Strickland LA, Liu SD, Mak J, Schmidt M, Koeppen H (2012) Neuropilin-1 expression in cancer and development. *J Pathol* 226, 1: 50–60
- (31) Kels BD, Grzybowski A, Grant-Kels JM (2015) Human ocular anatomy. *Clin Dermatol* 33, 2: 140–146
- (32) Kenchegowda D, Harvey SAK, Swamynathan S, Lathrop KL, Swamynathan SK (2012) Critical role of Klf5 in regulating gene expression during post-eyelid opening maturation of mouse corneas. *PLoS ONE* 7, 9: e44771
- (33) Ko J-A, Mizuno Y, Shibasaki M, Yamane K, Chikama T-i, Sonoda K-H, Kiuchi Y (2012) Differential expression of semaphorin 3A and its receptors during mouse retinal development. *Cell Biochem Funct* 30, 7: 563–568
- (34) Koch S, van Meeteren LA, Morin E, Testini C, Westrom S, Bjorkelund H, Le Jan S, Adler J, Berger P, Claesson-Welsh L (2014) NRP1 presented in trans to the endothelium arrests VEGFR2 endocytosis, preventing angiogenic signaling and tumor initiation. *Dev Cell* 28, 6: 633–646
- (35) Lim JI, Spee C, Hangai M, Rocha J, Ying HS, Ryan SJ, Hinton DR (2005) Neuropilin-1 expression by endothelial cells and retinal pigment epithelial cells in choroidal neovascular membranes. *Am J Ophthalmol* 140, 6: 1044–1050
- (36) Lutty GA, McLeod DS (2018) Development of the hyaloid, choroidal and retinal vasculatures in the fetal human eye. *Prog Retin Eye Res* 62: 58–76
- (37) Makanya AN, Hlushchuk R, Djonov VG (2009) Intussusceptive angiogenesis and its role in vascular morphogenesis, patterning, and remodeling. *Angiogenesis* 12, 2: 113–123
- (38) Malhotra A, Minja FJ, Crum A, Burrowes D (2011) Ocular anatomy and cross-sectional imaging of the eye. *Semin Ultrasound CT MR* 32, 1: 2–13
- (39) Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Sefter EA, Gardner LM, Pe'er J, Trent JM, Meltzer PS, Hendrix MJ (1999) Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: Vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* 155, 3: 739–752
- (40) Matthies AM, Low QEH, Lingen MW, DiPietro LA (2002) Neuropilin-1 participates in wound angiogenesis. *Am J Pathol* 160, 1: 289–296

- (41) Nakamura T, Sakai K, Nakamura T, Matsumoto K (2011) Hepatocyte growth factor twenty years on: Much more than a growth factor. *J Gastroenterol Hepatol* 26 Suppl 1: 188–202
- (42) Navdaev A, Lochnit G, Eble JA (2011) The rhodocetin alphabeta subunit targets GPIIb and inhibits von Willebrand factor induced platelet activation. *Toxicon* 57, 7-8: 1041–1048
- (43) Niland S, Ditkowski B, Parrandier D, Roth L, Augustin H, Eble JA (2013) Rhodocetin-alphabeta-induced neuropilin-1-cMet association triggers restructuring of matrix contacts in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33, 3: 544–554
- (44) Niland S, Eble JA (2012) Integrin-mediated cell-matrix interaction in physiological and pathological blood vessel formation. *J Oncol* 2012: 125278
- (45) Ochsenbein AM, Karaman S, Proulx ST, Berchtold M, Jurisic G, Stoeckli ET, Detmar M (2016) Endothelial cell-derived semaphorin 3A inhibits filopodia formation by blood vascular tip cells. *Development* 143, 4: 589–594
- (46) Pan Q, Chanthery Y, Liang W-C, Stawicki S, Mak J, Rathore N, Tong RK, Kowalski J, Yee SF, Pacheco G, Ross S, Cheng Z, Le Couter J, Plowman G, Peale F, Koch AW, Wu Y, Bagri A, Tessier-Lavigne M, Watts RJ (2007) Blocking neuropilin-1 function has an additive effect with anti-VEGF to inhibit tumor growth. *Cancer Cell* 11, 1: 53–67
- (47) Ponzetto C, Bardelli A, Zhen Z, Maina F, dalla Zonca P, Giordano S, Graziani A, Panayotou G, Comoglio PM (1994) A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. *Cell* 77, 2: 261–271
- (48) Raimondi C, Brash JT, Fantin A, Ruhrberg C (2016) NRP1 function and targeting in neurovascular development and eye disease. *Prog Retin Eye Res* 52: 64–83
- (49) Rosenow F, Ossig R, Thormeyer D, Gasmann P, Schluter K, Brunner G, Haier J, Eble JA (2008) Integrins as antimetastatic targets of RGD-independent snake venom components in liver metastasis corrected. *Neoplasia* 10, 2: 168–176
- (50) Saint-Geniez M, D'Amore PA (2004) Development and pathology of the hyaloid, choroidal and retinal vasculature. *Int J Dev Biol* 48, 8-9: 1045–1058
- (51) Selvam S, Kumar T, Fruttiger M (2018) Retinal vasculature development in health and disease. *Prog Retin Eye Res* 63: 1–19
- (52) Shimizu M, Murakami Y, Suto F, Fujisawa H (2000) Determination of cell adhesion sites of neuropilin-1. *J Cell Biol* 148, 6: 1283–1293
- (53) Shin Y, Morita T (1998) Rhodocytin, a functional novel platelet agonist belonging to the heterodimeric C-type lectin family, induces platelet aggregation independently of glycoprotein Ib. *Biochem Biophys Res Commun* 245, 3: 741–745
- (54) Stella MC, Trusolino L, Pennacchietti S, Comoglio PM (2005) Negative feedback regulation of Met-dependent invasive growth by Notch. *Mol Cell Biol* 25, 10: 3982–3996
- (55) Sulpice E, Plouët J, Bergé M, Allanic D, Tobelem G, Merkulova-Rainon T (2008) Neuropilin-1 and neuropilin-2 act as coreceptors, potentiating proangiogenic activity. *Blood* 111, 4: 2036–2045

- (56) Sun W, Funakoshi H, Nakamura T (1999) Differential expression of hepatocyte growth factor and its receptor, c-Met in the rat retina during development. *Brain Res* 851, 1-2: 46–53
- (57) Syed ZA, Yin W, Hughes K, Gill JN, Shi R, Clifford JL (2011) HGF/c-met/Stat3 signaling during skin tumor cell invasion: Indications for a positive feedback loop. *BMC Cancer* 11: 180
- (58) Tang ELH, Tan CH, Fung SY, Tan NH (2016) Venomics of *Calloselasma rhodostoma*, the Malayan pit viper: A complex toxin arsenal unraveled. *J Proteomics* 148: 44–56
- (59) Trusolino L, Bertotti A, Comoglio PM (2010) MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 12: 834–848
- (60) Wang R, Kini RM, Chung MC (1999) Rhodocetin, a novel platelet aggregation inhibitor from the venom of *Calloselasma rhodostoma* (Malayan pit viper): synergistic and noncovalent interaction between its subunits. *Biochemistry* 38, 23: 7584–7593
- (61) Wehrle-Haller B (2012) Structure and function of focal adhesions. *Curr Opin Cell Biol* 24, 1: 116–124
- (62) Yamamoto H, Ehling M, Kato K, Kanai K, van Lessen M, Frye M, Zeuschner D, Nakayama M, Vestweber D, Adams RH (2015) Integrin beta1 controls VE-cadherin localization and blood vessel stability. *Nat Commun* 6: 6429
- (63) Yang W-J, Hu J, Uemura A, Tetzlaff F, Augustin HG, Fischer A (2015) Semaphorin-3C signals through Neuropilin-1 and PlexinD1 receptors to inhibit pathological angiogenesis. *EMBO Mol Med* 7, 10: 1267–1284
- (64) Zarkada G, Heinolainen K, Makinen T, Kubota Y, Alitalo K (2015) VEGFR3 does not sustain retinal angiogenesis without VEGFR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 3: 761–766
- (65) Zelensky AN, Gready JE (2005) The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS J* 272, 24: 6179–6217
- (66) Zhang Y-W, Wang L-M, Jove R, Vande Woude GF (2002) Requirement of Stat3 signaling for HGF/SF-Met mediated tumorigenesis. *Oncogene* 21, 2: 217–226

7 Lebenslauf

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
Abk	Abkürzung
Actb	Actin Beta
ALK1	activin receptor-like kinase 1
BMP 9/10	bone morphogenetic protein 9/10
BSA	bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CLP	c-type lektin like protein
Cy	Cyanine
DAPI	4', 6-Diamidin-2-phenylindol
Dll4	delta-like 4
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EdU	5-ethynyl-2'-deoxyuridin
ERK	extracellular signal-regulated kinases
FGF	Fibroblasten Wachstumsfaktor
G	Gauge
g	Gramm

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GPIb	Glykoprotein Ib
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HGF	hepatocyte growth factor
ITGAV	Integrin alpha V
ITGB8	Integrin subunit beta 8
I κ B α	NF κ B inhibitor alpha
Jag1	jagged 1
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
M	molare Masse
MAPK	mitogen-activated protein kinase
mg	Milligramm = 10 ⁻³ g
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter = 10 ⁻³ l
mm	Millimeter = 10 ⁻³ m
mM	millimolar
MMP	Matrixmetalloproteinase

MnCl ₂	Mangan(II)-chlorid
mRNA	messenger RNA (Boten-Ribonukleinsäure)
ms	Millisekunde
n	Anzahl der Werte
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NDP	Norrie disease pseudoglioma
NFκB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
nl	Nanoliter = 10 ⁻⁹ l
nM	Nanomolar
Nr.	Nummer
Nrp-1	Neuropilin-1
P0/4/5/21	postnataler Tag 0/4/5/21
PBS	Phosphat buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PI3K-Akt	Phosphoinositid-3-Kinase-Proteinkinase-B
P-Paxillin	Y31-Phosphopaxillin
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RC	Rhodocetin, αβ-Untereinheit
RCαβ	Rhodocetin αβ

RGD-Sequenz	Arginin-Glycin-Asparaginsäure-Sequenz
sec	Sekunde
SEMA3	Semaphorin Klasse 3
STAT	signal transducers and activators of transcription
TGFRB2	Transforming growth factor receptor beta 2
TGFβ	transforming growth factor beta
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGF-R1/2/3	VEGF-Rezeptor 1/2/3
vWF	von Willebrand Faktor
ZNS	zentrales Nervensystem
μg	Mikrogramm = 10 ⁻⁶ g
μl	Mikroliter = 10 ⁻⁶ l
μm	Mikrometer = 10 ⁻⁶ m
μm ²	Quadratmikrometer = 10 ⁻¹² m ²

8.2 Genehmigung der Tierversuche

Landesamt für Natur,
Umwelt und Verbraucherschutz
Nordrhein-Westfalen



LANUV NRW, Postfach 10 10 52, 45610 Recklinghausen

Herrn Dr. Peter Heiduschka
Klinik für Augenheilkunde
Universitätsklinikum Münster
Domagkstr. 15
48149 Münster

Auskunft erteilt:

Frau Marczischewski
Direktwahl 02361 305-3064
Fax 02361 305-3062
fachbereich81@lanuv.nrw.de

Aktenzeichen
81-02.04.2017.A444
bei Antwort bitte angeben

Ihre Nachricht vom:
Ihr Aktenzeichen:

Datum: 24.04.2018

Tierversuche

Ihr Antrag auf Genehmigung eines Versuchsvorhabens gemäß § 8 Abs. 1 Tierschutzgesetz (TierSchG) i. V. m. § 31 Tierschutz-Versuchstierverordnung (TierSchVersV) vom 06.11.2017, eingegangen am 13.11.2017; unser Schreiben vom 14.11.2017; Ihre Antwort vom 21.11.2017, eingegangen am 23.11.2017; Unser Schreiben vom 04.12.2017; Sitzung der Tierschutzkommission am 30.01.2018; Unser Schreiben vom 02.02.2018; Ihre Antwort vom 29.03.2018, eingegangen am 12.04.2018;

Sehr geehrter Herr Dr. Heiduschka,

- I. Gemäß § 8 Abs. 1 Tierschutzgesetz (TierSchG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 18.05.2006 (BGBl. I, S.1206,1313) in der derzeit geltenden Fassung i. V. m. § 33 der Verordnung zum Schutz von zu Versuchszwecken oder zu anderen wissenschaftlichen Zwecken verwendeten Tieren (Tierschutz-Versuchstierverordnung – TierSchVersV) vom 01.08.2013 (BGBl. I, 3125) in der derzeit gültigen Fassung erteile ich Ihnen, unter dem Vorbehalt des jederzeitigen Widerrufs, die Genehmigung zur Durchführung des Tierversuches mit dem Titel:

Hauptsitz:
Leibnizstraße 10
45659 Recklinghausen
Telefon 02361 305-0
Fax 02361 305-3215
poststelle@lanuv.nrw.de
www.lanuv.nrw.de

Dienstgebäude:
Hauptsitz Recklinghausen

Öffentliche Verkehrsmittel:
Ab Recklinghausen Hbf mit
Buslinie 236 oder 237 bis
Haltestelle "LANUV" und 5 Min.
Fußweg oder mit Buslinie SB 20
bis Haltestelle "Hohenhorster
Weg" und 15 Min. Fußweg in
Richtung Trabrennbahn bis
Leibnizstraße

Bankverbindung:
Landeskasse Düsseldorf
Helaba
BIC-Code: WELADED3
IBAN-Code:
DE 41 3005 0000 0004 1000 12

LANUV
Kompetenz für ein
lebenswertes Land



"Der Einfluß von Rhodocetin auf die retinale Angiogenese im experimentellen Modell der Maus".

II. Die Verantwortung für die Durchführung des Tierversuchsvorhabens obliegt folgenden Personen:

Verantwortlicher Leiter: Herr Dr. Peter Heiduschka

Stellvertretender Leiter: Herr Prof. Dr. Johannes Eble

III. An der Durchführung des Tierversuchsvorhabens dürfen neben dem Leiter und dem Stellvertreter folgende Personen beteiligt werden:

1. Charlotte Mittmann

IV. Die Versuche dürfen nur im Forschungslabor der Augenklinik, Raum 100.016 und 100.017, Domagkstr. 19, 48149 Münster durchgeführt werden.

V. Eine rückblickende Bewertung nach § 35 TierSchVersV ist nicht vorzunehmen.

VI. Die Genehmigung erstreckt sich auf Versuche mit:

<u>Tierart</u>	<u>Anzahl</u>
Maus	162

VII. Sie haben folgende Auflagen zu beachten:

1. Ist ein Transport der Versuchstiere zwischen Operations- und Tierhaltungsraum unvermeidbar, so ist dafür Sorge zu tragen, dass mit Hilfe geeigneter Behältnisse dieser Transport so durchgeführt wird, dass negative Beeinflussungen durch äußere Einflüsse (z.B. Witterung, Lärm, etc.) ausgeschlossen sind. Es ist insbesondere darauf zu achten, dass die Tiere keinen Temperaturschwankungen ausgesetzt sind.
2. Unabhängig von den im Antrag angeführten Abbruchkriterien ist der Versuch abubrechen und das betroffene Tier tierschutzgerecht zu töten, wenn dies aufgrund des Zustandes des Tieres nach der Einschätzung der/des Tierschutzbeauftragten aus Tierschutzgründen unerlässlich ist.



3. Bitte teilen Sie nach Erhalt der Genehmigung mit, ob die von Ihnen eingestellte Nichttechnische Projektzusammenfassung (NTP) immer noch den Inhalt der Genehmigung vollständig und richtig darstellt und somit zur Veröffentlichung freigegeben werden kann. Andernfalls aktualisieren und übersenden Sie bitte die NTP mit der neuen ID-Nummer.

VIII. Diese Genehmigung ist bis zum 30.04.2020 befristet.

- IX. Für diesen Bescheid wird eine Gebühr erhoben. Hierzu ergeht ein gesonderter Gebührenbescheid.

Erläuterungen und Begründung:

Zu I.:

Der Inhalt Ihrer Antragsunterlagen ist Gegenstand dieser Genehmigung. Jede Änderung ist dem Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW (LANUV) unverzüglich - unter Angabe des Aktenzeichens - mitzuteilen (§ 34 Abs. 1 Nr. 4 TierSchVersV).

Es wird empfohlen, allen an der Tierversuchsdurchführung beteiligten Personen diese Genehmigung zur Kenntnis zu geben.

Der Tierschutzbeauftragte, Herr Dr. Martin Lücke, und das zuständige Veterinäramt der Stadt Münster erhalten eine Durchschrift dieser Genehmigung.

Der Widerruf dieser Genehmigung kann erfolgen, wenn gegen diese Genehmigung verstoßen wird.

Außerdem kann die Einstellung des Tierversuchs gemäß § 16a Abs. 1 Nr. 4 TierSchG angeordnet werden, wenn Tierversuche ohne die erforderliche Genehmigung oder entgegen tierschutzrechtlicher Bestimmungen durchgeführt werden.

Zu II.:

Für die Einhaltung der tierschutzrechtlichen Vorschriften zur Durchführung von Tierversuchen ist der bzw. die oben bezeichnete Leiter/in des Tierversuchsvorhabens oder im Falle deren/dessen Verhinderung ihr/sein in dieser Genehmigung bezeichnete/r Vertreter/in verantwortlich (§ 30 TierSchVersV).



Jeder beabsichtigte Wechsel der/des Versuchsleiterin/-leiters oder der Stellvertreterposition ist dem Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW unverzüglich anzuzeigen (§ 34 Abs. 2 TierSchVersV).

Zu III.:

Die bezeichneten Personen dürfen ausschließlich die im Genehmigungsantrag aufgeführten Eingriffe oder Behandlungen im Rahmen der zulässigen Verantwortlichkeitsstufe durchführen. Zu beachten ist, dass Personen, die Eingriffe und Behandlungen innerhalb des Versuchsvorhabens durchführen sollen und die Voraussetzungen nach § 16 Abs. 1 Sätze 2 und 3 TierSchVersV nicht erfüllen, erst nach Erteilung einer Ausnahmegenehmigung gem. § 16 Abs. 1 Satz 5 TierSchVersV durch die zuständige Kreisordnungsbehörde eingesetzt werden dürfen.

Zu VIII.:

Die Genehmigung ist gem. § 33 Abs. 2 Satz 1 TierSchVersV auf höchstens fünf Jahre zu befristen.

Sofern die Befristung antragsgemäß weniger als fünf Jahre beträgt, kann ein Antrag auf Verlängerung gestellt werden. Der Antrag ist rechtzeitig vor Ablauf der Genehmigungsfrist – über den/die zuständige/n Tierschutzbeauftragte/n – zu stellen. Die Verlängerung kann gem. § 33 Abs. 2 Satz 2 TierSchVersV höchstens zweimal um jeweils bis zu einem Jahr erfolgen, wobei die Gesamtdauer der Genehmigung von fünf Jahren nicht überschritten werden darf.

Hinweis:

Eventuell erforderliche weitere Genehmigungen nach dem Tierschutzgesetz oder anderen gesetzlichen Bestimmungen bleiben von dieser Genehmigung unberührt.

Rechtsbehelfsbelehrung:

Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe Klage bei Verwaltungsgericht Münster, Piusallee 38, 48147 Münster; (Postfach 80 48, 48043 Münster) erhoben werden.

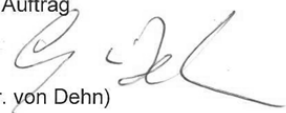
Die Klage ist schriftlich beim Verwaltungsgericht einzureichen oder zur Niederschrift der Urkundsbeamten der Geschäftsstelle zu erklären.



Die Klage kann auch durch Übertragung eines elektronischen Dokuments an die elektronische Poststelle des Gerichts erhoben werden. Das elektronische Dokument muss für die Bearbeitung durch das Gericht geeignet sein. Es muss mit einer qualifizierten elektronischen Signatur der verantwortenden Person versehen sein oder von der verantwortenden Person signiert und auf einem sicheren Übermittlungsweg gemäß § 55a Absatz 4 VwGO eingereicht werden. Die für die Übermittlung und Bearbeitung geeigneten technischen Rahmenbedingungen bestimmen sich nach näherer Maßgabe der Verordnung über die technischen Rahmenbedingungen des elektronischen Rechtsverkehrs und über das besondere elektronische Behördenpostfach (Elektronischer-Rechtsverkehr-Verordnung - ERVV) vom 24. November 2017 (BGBl. I S. 3803).

Mit freundlichen Grüßen

Im Auftrag



(Dr. von Dehn)