

Aus der Klinik für Augenheilkunde  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Rolle von myeloiden Zellen im Mausmodell der Sauerstoff-  
induzierten Retinopathie

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Christina Claudia Angelika Nürnberg

aus Berlin

Datum der Promotion: 23.06.2019

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>4</b>
<b>Abstract</b>	<b>6</b>
<b>1. Stand der Forschung</b>	<b>8</b>
<b>2. Methoden</b>	<b>10</b>
2.1. <b>Tiere und tierexperimentelle Arbeiten</b>	<b>10</b>
2.2. <b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>11</b>
2.2.1. DNA- und RNA-Isolation	11
2.2.2. Reverse Transkription	12
2.2.3. Genomische PCR	12
2.2.4. Quantitative Real-Time PCR	13
2.2.5. Agarose-Gelelektrophorese	14
2.3. <b>Zellbiologische Methoden</b>	<b>14</b>
2.3.1. Immunzytochemische Untersuchungen	14
2.3.2. Zelllinien und Zellkulturexperimente	15
2.4. <b>Histologische Methoden</b>	<b>15</b>
2.4.1. Gewebefixierung	15
2.4.2. Hämatoxylin Eosin (HE)-Färbung von Paraffin-eingebetteten Schnitten	15
2.4.3. Immunhistochemische Färbungen von Paraffin-eingebetteten Schnitten	16
2.4.4. Streptavidin-Biotin-Färbung von Makrophagen auf Paraffin-eingebetteten Milzschnitten	17
2.4.5. Präparation und Färbung retinaler Flachpräparate	17
2.4.6. Mikroskopie und Auswertung retinaler Flachpräparate	18
2.5. <b>Statistische Auswertung</b>	<b>18</b>
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>19</b>
3.1. Charakterisierung myeloid-spezifischer VEGF-A-defizienter Mausmutanten	19
3.2. Retinale Morphologie	19

3.3.	VEGF-A Expression in der Retina	20
3.4.	Immunzytochemische Analysen	20
3.5.	Müller-Zell-Aktivierung in der Mausretina	21
3.6.	Retinaler Phänotyp in Clodronat-behandelten VEGF <sup>mcko</sup> Mäusen	22
3.7.	VEGF-A Expression in MIO-M1 Zellen <i>in vitro</i>	22
<b>4.</b>	<b>Klinische Anwendung / weiterführende Fragestellungen</b>	<b>23</b>
<b>5.</b>	<b>Quellennachweis</b>	<b>24</b>
	<b>Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>29</b>
	<b>Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation</b>	<b>30</b>
	<b>Auszug aus der <i>Journal Summary List (ISI Web of Knowledge<sup>SM</sup>)</i></b>	<b>31</b>
	<b>Druckexemplar der Publikation</b>	<b>32</b>
	<b>Curriculum Vitae</b>	<b>46</b>
	<b>Publikationsliste</b>	<b>52</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>53</b>

## Zusammenfassung

EINLEITUNG. Ischämisch-neovaskuläre Retinopathien (u.a. Frühgeborenenretinopathie oder diabetische Retinopathie) sind die häufigste Erblindungsursache in Industrienationen und stellen somit eine Herausforderung für die Augenheilkunde dar. Der Einsatz von anti-VEGF-A-Antikörpern hat die Therapie revolutioniert, jedoch profitieren nicht alle Patienten davon. Interessanterweise reduziert eine Makrophagendepletion im Modell der Sauerstoff-induzierten Retinopathie (einem Tiermodell der Frühgeborenenretinopathie) pathologische retinale Neovaskularisation. Daher wurde bisher das von Makrophagen synthetisierte VEGF-A als pathophysiologisch relevante Quelle pro-angiogener Stimuli vermutet. Ziel dieser Arbeit war, mit Hilfe zellspezifischer Mausmutanten und *in vitro* Methoden die Rolle myeloider Zellen im Mausmodell der Sauerstoff-induzierten Retinopathie zu untersuchen, um Konzepte für selektivere therapeutische Eingriffsmöglichkeiten aufzuzeigen.

METHODEN. Mäuse, die selektiv für VEGF-A in Zellen der myeloiden Zellreihe defizient sind, konnten durch Kreuzung von VEGF<sup>fl/fl</sup>- mit LysMCre-Mäusen auf einem genetischen C57BL/6J-Hintergrund erzeugt werden. Sowohl unbehandelte, als auch durch Clodronat-Liposomen makrophagendepletierte VEGF-A-defiziente LysMCre Mäuse wurden im Vergleich zu Geschwisterkontrolltieren im Modell der Sauerstoff-induzierten Retinopathie untersucht. Die Analyse der Netzhäute der Tiere erfolgte an den postnatalen Tagen 14 und 17 mittels quantitativer Real-Time PCR, immunhistochemischer Verfahren und Durchflusszytometrie. Parallel wurde *in vitro* die Menge des VEGF-A Transkripts in MIO-M1 Zellen, einer humanen Müller-Zelllinie, in alleiniger Kultur und in Ko-Kultur mit der murinen Mikrogliazelllinie BV-2 überprüft.

ERGEBNISSE. Übereinstimmend mit der Literatur zeigte sich an systemisch makrophagendepletierten Mäusen im Modell der Sauerstoff-induzierten Retinopathie eine Reduktion der avaskulären und neovaskulären Fläche, die jedoch keine statistische Signifikanz erreichte. Parallel fielen deutliche immunhistochemische VEGF-A Signale in Müllerzellen auf.

Eine durchflusszytochemische Analyse von Netzhäuten neugeborener Mäuse bestätigte Makrophagen als die bei weitem größte Gruppe von Immunzellen. Die FACS-

basierte Subspezifizierung von Makrophagen und Mikroglia zeigte, dass der Anteil residentieller Mikroglia nach Sauerstoffbehandlung signifikant anstieg. Jedoch hatte die zellspezifische VEGF-A-Defizienz in myeloiden Zellen keinen Einfluss auf die relative mRNA Expression von VEGF-A in der Gesamtretna. Weder die Netzhautmorphologie, noch die Größe der avaskulären Fläche als Ausdruck einer anti-angiogenen Wirkung war in den gendefizienten Mäusen verändert. Immunhistochemisch stellten sich die Müllerzellen nach Sauerstoffexposition morphologisch aktiviert dar. Eine Zellkulturstudie zeigte, dass die relative mRNA Expression von VEGF-A in MIO-M1 Müllerzellen signifikant höher war, wenn sie in Gegenwart von BV-2 Mikrogliazellen kultiviert wurden.

SCHLUSSFOLGERUNGEN. Unsere Ergebnisse aus dem Modell der Sauerstoff-induzierten Retinopathie legen nahe, dass nicht das aus myeloiden Zellen sezernierte VEGF-A pathologische retinale Neovaskularisation stimuliert. Aufgrund unserer *in vitro* erhobenen Befunde vermuten wir vielmehr einen indirekten Mechanismus. Wir postulieren, dass Makrophagen über die Freisetzung von Mediatoren die VEGF-A Sekretion aus Müllerzellen induzieren.

## Abstract

INTRODUCTION. Ischemic neovascular retinopathies (e.g. retinopathy of prematurity or diabetic retinopathy) still challenge the ophthalmic community as they represent the leading cause for blindness in industrialized countries. While the application of anti-VEGF-A-directed antibodies has revolutionized the treatment regime, some patients do not benefit due to a lack of response. Interestingly, depletion of macrophages reduces pathological neovascularization in the model of oxygen-induced retinopathy (an animal model for retinopathy of prematurity). Since, VEGF-A expression by macrophages has been considered to be the pathophysiologically relevant source of VEGF-A.

The aim of this study was to analyze the relevance of myeloid cells in oxygen-induced retinopathy by using cell-specific mouse mutants and *in vitro* methods to reveal new therapeutical strategies.

METHODS. Mice that selectively lack VEGF-A-expression in myeloid cells were generated by crossbreeding VEGF<sup>fl/fl</sup> and LysMCre mice on a C57BL/6J background. Knockout mice with or without macrophage-depletion through systemic administration of clodronate-liposomes were analyzed in the model of oxygen-induced retinopathy. Their retinas were analyzed on postnatal days 14 and 17 by quantitative Real-Time PCR, immunohistochemistry, and flow cytometry.

Furthermore, relative expression of VEGF-A was measured in an *in vitro* model in MIO-M1 cells, a human Müller cell line, cultured solitary and in co-culture with BV-2 cells, a murine microglia cell line.

RESULTS. In accordance with the literature, we found that macrophage-depleted mice in the mouse model of oxygen-induced retinopathy showed a reduced avascular and neovascular area which did not reach statistical significance in our studies. However, striking were the concomitantly prominent VEGF-A signals in immunohistochemical stainings of Müller cells. Flow cytometric analyses in retinas of newborn mice confirmed that macrophages represent by far the most dominant group of immune cells. FACS-based differentiation of macrophages and microglia showed that the relative number of residential microglia significantly increased after oxygen exposure. However, the myeloid-specific knockout of VEGF-A did not affect relative VEGF-A mRNA expression,

retinal morphology or the size of the avascular area. Müller cells were morphologically activated in immunohistochemical stainings following oxygen-treatment. Relative VEGF-A mRNA expression in MIO-M1 cells was significantly higher in co-culture with BV-2 cells than alone.

CONCLUSIONS. Our data obtained from the model of oxygen-induced retinopathy suggest that myeloid cells do not stimulate retinal neovascularization through direct VEGF-A secretion. Instead, our *in vitro* data rather indicate that myeloid cells indirectly activate retinal VEGF-A *via* Müller cells. Thus we hypothesize that macrophages stimulate Müller cells to secrete VEGF-A through the release of soluble mediators.

# 1. Stand der Forschung

„Das Auge war vor allen anderen das Organ, womit ich die Welt faßte [sic].“ [1]

Mit diesen wenigen Worten bringt Johann Wolfgang von Goethe die Macht menschlichen Sehens und damit die Bedeutung des Auges zum Ausdruck. Evolutionsbiologisch ist das Auge als Teil des Diencephalons und damit des zentralen Nervensystems zu verstehen. Seine Funktion reicht von der dreidimensionalen optischen Wahrnehmung im Raum über die Befähigung über non-verbale Kommunikation mit unserer Umwelt in Kontakt zu treten, bis hin zur Steuerung von Hormon- und Körperfunktionen im Rahmen des Tag/Nacht Rhythmus. Einschränkung und Verlust der Sehfähigkeit bedeuten folglich massive Eingriffe in unsere Eigenständigkeit und damit einhergehend nicht zuletzt auch ein Verlust an Lebensqualität.

Neben den angeborenen Sehschwächen gehören vor allem die erworbenen Augenleiden zu den medizinisch und gesundheitspolitisch immer bedeutsameren Erkrankungen. Insbesondere Retinopathien treten häufig als Komplikationen von Wohlstandserkrankungen wie der diabetischen Retinopathie oder als Folge der höheren Lebenserwartung, zum Beispiel bei der altersbedingten Makuladegeneration, auf. Folglich repräsentieren die sogenannten ischämisch-neovaskulären Netzhauterkrankungen, zu denen auch die Frühgeborenenretinopathie und retinale Venenastverschlüsse gehören, die weltweit häufigsten Erblindungsursachen in Industrienationen [2]. Mit dem Einsatz von Ranibizumab (Lucentis®), einem humanisierten rekombinanten monoklonalen Fab-Antikörperfragment, das durch Bindung an den *vascular endothelial growth factor A* (VEGF-A) diesen inhibiert, hat sich die visuelle Prognose der Patienten, die an altersbedingter Makuladegeneration und am diabetischen Makulaödem leiden, dramatisch verbessert. Jedoch kann ein Teil der Patienten nicht von der Therapie mit Anti-VEGF-A-Antikörpern profitieren, sodass weiterhin mit Hochdruck an neuen, innovativeren therapeutischen Eingriffsmöglichkeiten geforscht wird [3].

VEGF-A gehört zu der fünf Mitglieder umfassenden VEGF-Familie (VEGF-A bis VEGF-D, sowie *placenta growth factor*), die aus löslichen Glykoproteindimeren mit einer apparenten Molmasse von 34-42 kDa bestehen. Alle Mitglieder der VEGF-Familie wirken als Liganden der Rezeptor-Tyrosinkinasen VEGFR-1 bis VEGFR-3. VEGF-A



wurde initial als vaskulärer Permeabilitätsfaktor, der vaskuläre Leckagen begünstigt, von Senger und Kollegen (1983) beschrieben [4]. Unter den verschiedenen Isoformen von VEGF-A, die durch alternatives Splicing entstehen, hat die 165 Aminosäuren umfassende Isoform VEGF-A<sub>165</sub> die größte Bedeutung für okuläre vaskulär-assoziierte Erkrankungen [5]. Frühere Studien konnten zeigen, dass VEGF-A in hohen Konzentrationen in verschiedenen Kompartimenten in den Augen von Patienten mit ischämischen Retinopathien vorhanden ist [6]. Hintergrund ist ein Mechanismus, bei dem es unter hypoxischen Bedingungen zur Stabilisierung der 1 $\alpha$ -Untereinheit des sogenannten *hypoxia-inducible protein complex* (HIF) kommt. HIF-1 $\alpha$  und HIF-1 $\beta$  bilden ein stabiles Heterodimer, das in den Nukleus transloziert und Hypoxie-sensible Gene wie das *VEGF-Gen* aktiviert [7]. Die meisten biologischen Effekte von VEGF-A werden durch den VEGFR-2 vermittelt. Dieser wiederum stimuliert vor allem pro-angiogene vaskuläre Effekte [8].

Aktuell stellt das Tiermodell der Frühgeborenenretinopathie, die Sauerstoff-induzierte Retinopathie, den Goldstandard zur Untersuchung ischämisch-neovaskulärer Retinopathien dar. In einem an die murine Entwicklung angepassten Protokoll werden hier die beiden pathomechanistisch entscheidenden Phasen der Frühgeborenenretinopathie simuliert: Mäuse, deren retinales Gefäßnetz im Unterschied zu humanen Neonaten zum Geburtstermin unausgereift ist, werden postnatal von Tag sieben bis zwölf einer hyperoxischen Umgebung, die 75% Sauerstoff enthält, ausgesetzt. In dieser Phase kommt es durch das Überangebot an Sauerstoff zu einer vaskulären Regression. Sobald die Tiere aus dieser Umgebung wieder unter normoxischen Bedingungen gehalten werden, führt die nun einsetzende relative Hypoxie zur Stimulation einer unkoordinierten Neovaskularisation in Folge exzessiver VEGF-A Synthese. Die Bildung qualitativ minderwertiger Blutgefäße bedingt wiederum vaskuläre Leckagen, die zu retinalen Blutungen führen, sowie vitreo-retinale Proliferationen, die im schlimmsten Fall, wie auch im humanen Krankheitsbild, eine traktive Netzhautablösung begünstigen können [9].

Ein spezifischer Forschungsansatz beschäftigt sich bei den ischämisch-neovaskulären Netzhauterkrankungen intensiv mit den wechselseitigen Beziehungen zwischen Neovaskularisation und Inflammation. Im Mausmodell der diabetischen Retinopathie konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass die Blockade der Leukozyten-Adhäsion an und die Diapedese durch das Gefäßendothel an den Ort der Entzündung durch Inhibition von *cluster of differentiation 18* (CD18) und *intercellular adhesion*

*molecule 1* (ICAM-1) den endothelialen Zelltod verhindert [10,11]. Interessanterweise reduzierte die Depletion von Makrophagen durch Injektion von Clodronat-Liposomen die VEGF-A Sekretion und choroidale Neovaskularisation im Modell der exsudativen Form der altersbedingten Makuladegeneration [12,13]. Unter ischämischen Bedingungen migrieren Makrophagen an den Ort pathologisch-vaskulärer Proliferationen [14], wo sie an der vitreo-retinalen Grenzfläche nachweislich VEGF exprimieren [15]. Schließlich konnte auch im Modell der Sauerstoff-induzierten Retinopathie gezeigt werden, dass Makrophagendepletion durch lokale oder systemische Clodronat-Liposomen-Injektion beziehungsweise durch genetische Alteration pathologische Neovaskularisation reduziert [16,17]. Dies führte zu der Hypothese, dass Makrophagen VEGF-A in pathomechanistisch relevantem Maße sezernieren.

In einer kürzlich veröffentlichten Studie von Christiana Ruhrberg und Kollegen (2015) konnte gezeigt werden, dass das von myeloiden Zellen gebildete VEGF-A sowie HIF-1 $\alpha$  in verschiedenen Tiermodellen der ischämisch-neovaskulären Retinopathien keinen Einfluss auf pathologische okuläre Neovaskularisation hat [18]. Die Frage, warum die Makrophagendepletion zu einer reduzierten vaskulären Antwort nach Sauerstoffbehandlung führt, blieb jedoch ungeklärt.

Ziel dieser Arbeit war sowohl die bereits von Ruhrberg *et al.* (2015) erhobenen Daten im Mausmodell der Sauerstoff-induzierten Retinopathie zu verifizieren als auch darüber hinaus einen alternativen Pathomechanismus aufzuzeigen, um so in Zukunft spezifischere therapeutische Eingriffsmöglichkeiten zu ermöglichen.

## **2. Methoden**

### **2.1. Tiere und tierexperimentelle Arbeiten**

Wir verwendeten konditionale gendefiziente Mäuse beiderlei Geschlechts zur Untersuchung der Hypothese, ob myeloide Zellen an ischämisch-bedingter pathologischer retinaler Neovaskularisation beteiligt sind. Durch Kreuzung von VEGF-A<sup>fl/fl</sup> Mäusen mit LysMCre Tieren konnten Mäuse generiert werden, die selektiv in der myeloiden Zellreihe für VEGF-A defizient sind [19,20]. Alle Tiere wurden auf einem C57BL/6J Hintergrund gezüchtet und unter standardisierten Bedingungen gehalten. Die

Versuche wurden nach Maßgabe der ARRIVE-Bestimmungen der EU-Richtlinie 2010/63/EU beantragt und durchgeführt. Die Genehmigung der Versuche erfolgte durch das Komitee für Tierexperimente der Charité – Universitätsmedizin Berlin und die Berliner Landesbehörde (Landesamt für Gesundheit und Soziales, LaGeSo, Berlin: G0366/12).

Zur Induktion pathologischer Neovaskularisationen hielten wir uns an das von Lois Smith publizierte Originalprotokoll (1994) der Sauerstoff-induzierten Retinopathie [21]: Muttertier und Jungtiere wurden zunächst ab dem postnatalen Tag sieben (P7) bis P12 unter hyperoxischen Bedingungen in einer speziell dafür angefertigten Box (Modell THF3384, EHRET Labor- u. Pharmatechnik GmbH, Emmendingen, Deutschland) gehalten. Einmal täglich wurde die Box zur Kontrolle der Tiere geöffnet. Im seltenen Fall des Versterbens eines Muttertiers wurde eine Leihmutter eingesetzt. Anschließend wurden die Tiere wieder den dann relativ hypoxischen Raumlufbedingungen ausgesetzt und entweder an P14 (dem Beginn der pathologischen Neovaskularisation) oder P17 (dem Höhepunkt der pathologischen Neovaskularisation) untersucht. Alle Tiere wurden an P12 durch Ohrbiopsien und nach Abschluss des Experimentes an P14 oder P17 mittels Schwanzbiopsie re-genotypisiert. Parallel dazu wurden Raumlufkontrolltiere zu jedem Zeitpunkt unter Raumlufbedingungen gehalten.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden VEGF<sup>fl/fl</sup> LysMCre<sup>tg/+</sup> (hier VEGF<sup>mcko</sup> genannt) Mäuse zum Zwecke systemischer Makrophagendepletion täglich mit 50 µl Clodronat- oder PBS-Liposomen intraperitoneal injiziert. Die Tiere wurden nach Abschluss des Experimentes an P17 genotypisiert.

Alle verwendeten Mäuse wurden zunächst mit einer Kombination aus 10 mg/g Körpergewicht (KG) Ketamin (Ketamine-Actavis®, Actavice Group PTC ehf., Hafnarfjörður, Island) und 0,015 mg/g KG Xylazin (CP-Pharma, Burgdorf, Deutschland) narkotisiert und anschließend mittels zervikaler Dislokation euthanisiert.

## **2.2. Molekularbiologische Methoden**

### 2.2.1. DNA- und RNA-Isolation

Die DNA oder RNA verschiedener muriner Gewebe wurden mit dem DNEasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Deutschland), dem RNA Mini Kit (Machery Nagel, Düren, Deutschland) oder dem RNEasy Mini Kit (QIAGEN) isoliert. Gewebe, die der Isolation von RNA dienen sollten, wurden im RNA-stabilisierenden Reagenz *RNAlater* (QIAGEN) in RNase freien Tubes gelagert, um so die Degradation der RNA zu verhindern. Für die

retinale Analyse verwendeten wir jeweils eine Netzhaut pro Tier. Die Konzentration der Nukleinsäuren wurde mittels eines NanoDrop Gerätes (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) gemessen. Für die untersuchte RNA wurde das Verhältnis 260/280 nm mit Werten um 2,0 akzeptiert.

### 2.2.2. Reverse Transkription

Zur Herstellung von cDNA (copy DNA) aus RNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase, das ursprünglich in Retroviren gefunden wurde, verwendeten wir das High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) für murine Gewebe und für die Zellkulturexperimente das QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN). Die so gewonnene cDNA wurde bei -20°C gelagert.

### 2.2.3. Genomische PCR

Die Genotypisierung der Versuchstiere, sowie die Testung der Rekombinationseffizienz in Hirn und CD11b positiven Zellen aus Knochenmark nach magnetischer Zellseparation erfolgte qualitativ mittels genomischer PCR (Polymerase Kettenreaktion). Wir setzten folgende Primer zur VEGF flox-Genotypisierung ein: VEGF fwd: 5'-CCT GGC CCT CAA GTA CAC CTT-3', VEGF rev: 5'-TCC GTA CGA CGC ATT TCT AG-3'. Diese detektieren die lox P-Sequenz in Intron 2-3 etwa 780 Basenpaare vor Exon 3 des VEGF-A-kodierenden Gens in transgenen Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrolltieren. Der Nachweis der lox P-Sequenz war durch eine 168 Basenpaare lange Bande im Vergleich zu einer 100 Basenpaare langen Bande bei Wildtyp-Tieren möglich. Für den qualitativen Nachweis erfolgreicher Exzision des VEGF-A-kodierenden Gens nach Rekombination mussten die Primer das VEGF-A-kodierende Gen umspannen, sodass hier der Reverse-Primer durch einen alternativen Primer ersetzt wurde: VEGF recom rev: 5'-ACA TCT GCT GTG CTG TAG GAA G-3'. Nach Rekombination in VEGF<sup>mcko</sup>, das heißt in VEGF<sup>fl/fl</sup> LysMCre<sup>tg/+</sup> Tieren, kam eine 420 Basenpaare lange Bande zum Vorschein, während bei Wildtyp-Tieren eine 1866 Basenpaare lange Bande die Anwesenheit des VEGF-A-kodierenden Gens signalisierte.

Für die Cre-PCR im Rahmen der Genotypisierung wurden drei verschiedene Primer benötigt, um zwischen Cre-positiven (700 Basenpaare) und Cre-negativen (350 Basenpaare) Tieren unterscheiden zu können (eingesetzte Primer: Cre ko 5'-CCC AGA AAT GCC AGA TTA CG-3', Cre wt + ko 5'-CTT GGG CTG CCA GAA TTT CTC-3' und Cre wt 5'-TTA CAG TCG GCC AGG CTG AC-3').

Da die homozygote Ausprägung einer *Pdeb<sup>rd1</sup>*-Mutation zu einer postnatal rapide einsetzenden retinalen Degeneration führt und somit unsere Ergebnisse verfälschen würde, setzten wir zum Ausschluss dieser Mutation auf Genomebene folgende Primer ein [22]: rd3: 5'-TGA CAA TTA CTC CTT TTC CCT CAG TCT G-3', rd4: 5'- GTA AAC AGG AAG AGG CTT TAT TGG GAA C-3' und rd6: 5'- TAC CCA CCC TTC CTA ATT TTT CTC AGC-3'. Für die jeweilige PCR wurden 60 – 80 ng DNA eingesetzt.

#### 2.2.4. Quantitative Real-Time PCR

Zur Testung, ob das von myeloiden Zellen exprimierte VEGF-A in relevantem Maße zur Gesamtmenge des VEGF-A-Transkriptes in der Netzhaut nach Sauerstoffbehandlung beiträgt, führten wir quantitative Messungen des VEGF-A-Expressionsniveaus mittels Real-Time PCR an unseren Mausmutanten und den Geschwisterkontrolltieren durch. Da der qualitative Nachweis der Rekombinationseffizienz mittels genomischer PCR in der Netzhaut nicht erfolgreich war, interessierten wir uns darüber hinaus für die Expression des Cre-Transgens in VEGF<sup>mcko</sup> und Kontrolltieren.

Für jede Messung wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um Primer-Dimere oder unspezifische Amplifikationsprodukte aus der Berechnung ausschließen zu können. Wir verwendeten das  $\beta$ -Aktin-kodierende Gen als Standard, da Sauerstoff das Expressionsniveau des Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)-kodierenden Gens beeinflusst, was üblicherweise verwendet wird. Für die Untersuchungen in der Netzhaut wurde das SensiFAST SYBR Kit (Bioline, Luckenwalde, Deutschland) und folgende Primer eingesetzt: Cre fwd: 5'-GAT TTC GAC CAG GTT CGT TC-3', Cre rev: 5'-GCT AAC CAG CGT TTT CGT TC-3', die ein 195 Basenpaare langes Produkt kodieren, VEGF-A fwd: 5'-CAG CTA TTG CCG TCC GAT TGA GA-3' und VEGF-A rev: 5'-TGC TGG CTT TGG TGA GGT TTG AT-3', die ein 201 Basenpaare langes Produkt kodieren, sowie  $\beta$ -Aktin fwd: 5'- AAG GCC AAC CGT GAA AAG AT-3' und  $\beta$ -Aktin rev: 5'- GTG GTA CGA CCA GAG GCA TAC-3', die ein 110 Basenpaare langes Produkt kodieren. Die Proben wurden auf eine 96-Well-Platte aufgetragen und im LightCycler 480 (Roche, Basel, Schweiz) sowie der entsprechenden Software analysiert.

Darüber hinaus untersuchten wir das VEGF-A-Expressionsniveau in einer humanen Müller-Zelllinie (siehe 2.3.2.). Hierfür wurden folgende Primer verwendet: VEGF-A fwd: (5'-AGG AGG AGG GCA GAA TCA TCA-3') und VEGF-A rev: (5'-CTC GAT TGG ATG GCA GTA GCT-3'), die ein 76 Basenpaare langes Produkt amplifizieren und  $\beta$ -Aktin

fwd: (5'-GCC GCC AGC TCA CCA T-3') und  $\beta$ -Aktin rev: (5'-GAT GCC TCT CTT GCT CTG GG-3'), die ein 206 Basenpaare langes Produkt amplifizieren. Die Proben wurden im Rotor-Gene analysiert und die Auswertung erfolgte mittels der Rotor-Gene Software (QIAGEN)

#### 2.2.5. Agarose-Gelelektrophorese

Standardmäßig wurden 2,5%ige Agarose-Gele verwendet. Dafür wurde die entsprechende Menge Agarose in TE-Puffer aufgelöst und 2  $\mu$ l Ethidiumbromid zugefügt. Ein konstantes elektrisches Feld von 90 Volt führte zur Auftrennung der Fragmente entsprechend ihrer Größe. Durch Interkalierung von Ethidiumbromid in die Helix der DNA konnten die Amplifikationsprodukte unter UV-Licht mittels Chemidoc-Analyseapparatur (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) sichtbar gemacht werden.

### **2.3. Zellbiologische Methoden**

#### 2.3.1. Immunzytochemische Untersuchungen

Zur Untersuchung der quantitativen Verteilung von Immunzellen in der Netzhaut unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen setzten wir immunzytochemische Verfahren ein. Die Methode wurde nach dem von Liu *et al.* publizierten Protokoll (2013) in modifizierter Form angewandt [23]: Beide Netzhäute einer Maus wurden durch ein Zellsieb mit 40  $\mu$ m großen Maschen gepresst. Die gewonnenen Zellen wurden in PBS re-suspendiert und der Überstand verworfen. Die Zellsuspension wurde bei 380  $\times$  g für 8 Minuten zentrifugiert und in 100  $\mu$ l 1:500 Fc-block (anti-ms-Fc $\gamma$ R Klon 2.4G2, 6,03 mg/ml, DRFZ, Berlin, Deutschland) in PBS/BSA re-suspendiert. Folgende Fluorochromgekoppelte Antikörper wurden verwendet: FITC anti-Maus F4/80 Klon BM8, PerCP-Cy5.5 anti-Maus Ly6C Klon HK1.4, APCCy7 anti-Maus NK1.1 Klon PK136 (alle von Bio Legend, San Diego, CA, USA), PE anti-Maus CD45 Klon 30- F11, PE-Cy7 anti-Maus CD11b Klon M1/70, APC anti-Maus Ly6G Klon 1A8 (alle von BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA), und AF405 anti-CD3 Klon KT3 (DRFZ). Nach Zentrifugation wurden die Zellen in PBS/BSA re-suspendiert und auf einem LSRFortessa (BD Biosciences) gemessen und die Daten mittels der FlowJo Software (Version 9.8.1; Treestar, Ashland, OR, USA) analysiert. Zelldebris, Konglomerate und DAPI-negative Zellen wurden von der Analyse ausgeschlossen.

### 2.3.2. Zelllinien und Zellkulturexperimente

Unsere initialen Ergebnisse ließen vermuten, dass Makrophagen nicht die pathomechanistisch bedeutsame Quelle für VEGF-A im Modell der Sauerstoff-induzierten Retinopathie sein könnten. Wir testeten daher *in vitro*, ob Makrophagen beziehungsweise Mikrogliazellen die Expression von VEGF-A in Müllerzellen beeinflussen. Dazu kultivierten wir zum einen MIO-M1 Zellen [24] (UCL Business PLC, London, U.K., P = 28), eine humane Müller-Zelllinie, sowie zum anderen BV-2 Zellen, eine murine Mikroglia-Zelllinie [25] (Heppner, Charité - Universitätsmedizin Berlin, interne Passage 9) mit einer 80%igen Konfluenz. Die MIO-M1 Zellen wurden auf 0,4 µm Polyester Transwell Membraneinlagen (Corning Inc., Kennebunk, ME, USA) und die BV-2 Zellen auf einer 24-Well Styroporplatte (Corning Inc.) ausgesät. Als Nährmedium wurde zunächst DMEM (1×)+Glutamax-I mit 4,5 g/l D-glucose, Pyruvat (Life Technology, Grand Island, NY, USA), 10% FCS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) und 1% Penicillin/Streptomycin (Biochrom, Berlin, Deutschland) verwendet. Die Membraneinlagen, die die MIO-M1 Zellen enthielten, wurden dann in neue Wells umgesetzt, die entweder das Nährmedium mit 5% hitzeinaktiviertem FCS alleine oder Nährmedium mit BV-2 Zellen enthielten. Nach 24 beziehungsweise 48 Stunden wurden die Zellen mit PBS gewaschen, in 350 µl RLT-buffer (QIAGEN) re-suspendiert und bei -80 °C für die RNA-Isolation (siehe 2.3.1.) gelagert.

## **2.4. Histologische Methoden**

### 2.4.1. Gewebefixierung

Die Gewebeproben (Netzhaut und Milz) wurden für 48 Stunden in modifizierter Davidson-Lösung (95% Ethanol, 37% Formaldehyd, Ethansäure und Leitungswasser in einem 3:2:1:3 Verhältnis) bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde das Gewebe für je 30 Minuten in 50% und 70% Ethanol dehydriert, in Paraffin eingebettet und auf Objektträgern zugeschnitten.

### 2.4.2. Hämatoxylin Eosin (HE)-Färbung von Paraffin-eingebetteten Schnitten

Die in Paraffin eingebetteten Gewebsschnitte wurden mittels Xylen, Isopropyl und einer absteigenden Ethanol-Reihe zunächst deparaffinisiert. Die Zellkern-Färbung erfolgte durch Inkubation in Hämatoxylin (Hämalaunlösung sauer nach Mayer, Carl Roth GmbH & Co.KG; Karlsruhe, Deutschland) für 10 Minuten. Die Schnitte wurden zunächst in destilliertem Wasser, dann in warmem Leitungswasser für 10 Minuten und

anschließend wieder in destilliertem Wasser gewaschen. Für die Zytoplasma-Färbung wurden die Schnitte für 10 Minuten in Eosin (Eosin G-Lösung, Carl Roth GmbH & Co.KG) gefärbt und anschließend wieder mit destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend erfolgte die Dehydratation in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe, Isopropanol und Xylen. Danach wurden die Schnitte in Cytoseal XYL (Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland) eingedeckelt.

#### 2.4.3. Immunhistochemische Färbungen von Paraffin-eingebetteten Schnitten

Auf der Suche nach alternativen Quellen für VEGF-A legten wir unser Augenmerk insbesondere auf Müllerzellen, also spezialisierte Astrozyten der Netzhaut. Zur Färbung von Müllerzellen auf Paraffin-eingebetteten Netzhautschnitten färbten wir Vimentin, ein Intermediärfilament, das der Membranstabilität dient, in Kreuzfärbung mit saurem Gliafaserprotein (GFAP) als Aktivitätsmarker, das an reaktiver retinaler Gliose als Antwort auf Schädigungen der Netzhaut beteiligt ist. Sowohl Schnitte unbehandelter VEGF<sup>mcko</sup> und Kontrolltiere, als auch Schnitte Clodronat- und PBS-Liposomen behandelter VEGF<sup>mcko</sup> Tiere unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen wurden gefärbt. Die Schnitte der Liposomen-vorbehandelten Augen wurden VEGF-A gefärbt. Für alle Färbungen nutzten wir die indirekte immunhistochemische Methode, die auf spezifischen Antigen-Antikörper-Bindungen basiert. Dabei wird ein spezifischer primärer Antikörper verwendet, der gegen das Epitop von Interesse gerichtet ist. In einem zweiten Schritt wird ein mit einem fluoreszierenden Chromogen gekoppelter sekundärer Antikörper zum Einsatz gebracht, der gegen den primären Antikörper gerichtet ist. Im Unterschied zur direkten Immunfärbung kommt es beim indirekten Verfahren zu einer amplifizierten Signalverstärkung, da zwei sekundäre an einen primären Antikörper binden können. Auch die für Immunfärbungen verwendeten Schnitte wurden zunächst nach oben genanntem Protokoll deparaffinisiert.

Nach Inkubation mit Proteinase K wurde die Membranpermeabilität durch 0,25% des Detergens Triton-X-100/TBS erhöht. Unspezifische Antigenbindungen wurden durch einstündige Inkubation mit 5% bovinem Serumalbumin unterbunden. Anschließend wurde der Antikörper Master Mix mit den primären Antikörpern (anti-GFAP, 1:250, DAKO, Glostrup, Dänemark und monoklonaler Maus-anti-Vimentin Antikörper, 1:50, Santa Cruz, Dallas, Tx, USA) über Nacht in einer dunklen befeuchteten Kammer bei 4°C inkubiert. Als sekundärer Antikörper diente ein Ziege-anti-Kaninchen IgG-Cy3 (1:200; Dianova, Hamburg, Deutschland) in 0,8% BSA/TBS, der gegen den primären



anti-GFAP-Antikörper gerichtet war. Anschließend wurde Kaninchen-anti-Maus IgG-Alexa488 (1:200; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), der gegen den primären anti-Vimentin-Antikörper gerichtet war, inkubiert. So wurde eine Interaktion zwischen den sekundären Antikörpern verhindert. Alle Schnitte wurden mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol), einem fluoreszierendem Zellkern-Farbstoff, in einer Konzentration von 3 µM gegengefärbt und in Fluorescent Mounting Medium (DAKO) eingedeckelt. Zur Färbung von VEGF-A wurden die Schnitte von Clodronat- beziehungsweise PBS-Liposomen behandelten VEGF<sup>mcko</sup> Mäusen mit dem primären Antikörper (Kaninchen-anti-VEGF-A, 1:100, Abcam, Cambridge, UK) und dem sekundären Antikörper (Esel-anti-Kaninchen AlexaFluor488, 1:10000 Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) inkubiert. Parallel wurde eine Wasserkontrolle, die lediglich den sekundären Antikörper enthielt, durchgeführt, um unspezifische Fluorochrombindungen detektieren zu können.

#### 2.4.4. Streptavidin-Biotin-Färbung von Makrophagen auf Paraffin-eingebetteten Milzschnitten

Wir färbten Makrophagen auf Milzschnitten von Clodronat- beziehungsweise PBS-Liposomen vorbehandelten Mäusen, um die Tiere ausschließen zu können, bei denen Clodronat nicht zur Makrophagendepletion geführt hatte. Dazu wurden die Schnitte zunächst für 10 Minuten in Natriumcitrat-Puffer (pH 6) gekocht. Anschließend wurde das Immuno Cruz rabbit LSAB Kit (Santa Cruz) verwendet und ein gegen CD11b gerichteter Kaninchen-Antikörper (Kaninchen-anti-CD11b, 1:100, Novus Biologicals, Littleton, CA, USA) eingesetzt.

#### 2.4.5. Präparation und Färbung retinaler Flachpräparate

Anders als im Menschen, bei dem sich das retinale Gefäßnetz von zentral nach peripher entwickelt, kommt es in der Maus umgekehrt zur einer von peripher nach zentral fortschreitenden retinalen Vaskularisation. Dies kann durch Färbung des Gefäßendothels auf retinalen Flachpräparaten dargestellt werden. Ziel war es, pathologische Gefäßalterationen durch die Gendefizienz selbst oder durch Sauerstoffbehandlung feststellen zu können und darüber hinaus avaskuläre und neovaskuläre Flächen als Maß der vaskulären Antwort auf den Sauerstoffreiz quantifizieren zu können. Dazu wurden die Tiere an P14 beziehungsweise P17 mittels zervikaler Dislokation nach gewichtsadaptierter Narkotisierung getötet, enukleiert und die Augen in 4%iger Paraformaldehydlösung für insgesamt 15 Minuten fixiert.

Anschließend wurden überschüssiger Muskel, der optische Nerv, die Linse und die Hornhaut entfernt, sodass lediglich der Augenbecher übrig blieb. Durch vier radiale Schnitte konnte dieser in einer Kleeblattform geebnet und die Netzhaut von der Choroidea an der *Ora serrata* und dem optischen Nerven abgetrennt werden. Eine Membranpermeabilisierung erfolgte durch Inkubation in 0,1% Triton X-100/TBS für 10 Minuten, bevor die Netzhäute in TBS gewaschen wurden. Unspezifische Antigenbindung wurde durch Inkubation mit 15% normalem Ziegenserum unterbunden. Ratte-anti-Maus CD11b (antibodies-online.com, Atlanta, GA, USA) in 10% NGS/TBS wurde als primärer Antikörper bei 4 °C über Nacht unter abgedunkelten Verhältnissen inkubiert. Als sekundärer Antikörper wurde Ziege-anti-Ratte-Cy3 (1:200, Dianova) in 10% NGS/TBS über zwei Stunden inkubiert und alle Präparate mit AF488-konjugiertem Isolectin-IB4 (Invitrogen) in 10% NGS/TBS über Nacht kreuzgefärbt und anschließend in Fluorescent Mounting Medium (Dako) eingedeckelt.

#### 2.4.6. Mikroskopie und Auswertung retinaler Flachpräparate

Wir verwendeten das Imager.M2 Mikroskop mit einer AxioCam MRm Kamera (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany), und nutzten die Zen 2012 Software zur Dokumentation. Für die retinalen Flachpräparate wurden dreimal drei Kachelbilder angefertigt. Abgesehen von Anpassung des Kontrastes am gesamten Bild und Reduktion unnötigen Hintergrundes in ImageJ (Version 1.41; National Institutes of Health, Bethesda, USA) wurden die Bilder nicht verändert.

Zur Gewinnung unvoreingenommener Resultate wurden die avaskulären und neovaskulären Flächen durch einen verblindeten Auswerter mittels ImageJ nach dem Protokoll von Connor *et al.* (2009) ermittelt [26].

### **2.5. Statistische Auswertung**

Wir werteten alle quantitativ erhobenen Daten mit der Prism 6 Software für Mac von GraphPad (La Jolla, CA, USA) aus. Für die statistische Erfassung von Analysen mit zwei oder mehr Gruppen wurde eine einfache ANOVA-Auswertung mit anschließender Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Zum Vergleich zweier Gruppen wurde ein ungepaarter t-Test mit Welch-Korrektur angewandt. In jedem Fall wurde ein P-Wert von 0,05 oder kleiner als statistisch signifikant anerkannt.

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Charakterisierung myeloid-spezifischer VEGF-A-defizienter Mausmutanten

Über Jahre hinweg wurde das von Makrophagen sezernierte VEGF-A als mechanistisch relevante Quelle im Rahmen ischämisch-neovaskulärer Retinopathien angesehen. Zur Prüfung dieser Hypothese verwendeten wir Mausmutanten, die selektiv in der myeloiden Zellreihe VEGF-A-defizient waren [18]. Dies wurde durch eine vom zellspezifischen Promotor abhängige Expression der Cre-Rekombinase, die das durch zwei lox P-Sequenzen markierte VEGF-A-Gen erkennt und herausschneidet, sichergestellt. Unsere VEGF-A<sup>fl/fl</sup> LysMCre<sup>tg/+</sup> Mäuse (VEGF<sup>mcko</sup>) wurden auf einem C57BL/6J Hintergrund gezüchtet. Sie waren lebensfähig und fertil.

Die Rekombinationseffizienz der Tiere wurde auf Basis genomischer PCR-Daten von CD11b-positiven Zellen von Knochenmark und Hirn adulter Mäuse bestimmt [27]. Der positive Rekombinationsnachweis im Hirn bestätigte, dass auch in der Mikroglia eine Rekombination stattfindet [27, 28]. Da der qualitative Rekombinationsnachweis in der Netzhaut nicht gelang, führten wir Messungen des Expressionsniveaus des Cre-Transgens in der Netzhaut von VEGF<sup>mcko</sup> und Kontrollmäusen durch. Diese bestätigten, dass die Cre-Expression auf die Mausmutanten beschränkt war [27]. Ebenso schlossen wir in den Tieren eine *Pdeb*<sup>rd1</sup>-Mutation mittels genomischer PCR aus, die zu einer postnatal rapide fortschreitenden Netzhautdegeneration führt [27], sodass die von uns verwendeten Mäuse für alle folgenden Untersuchungen geeignet waren. Zur Induktion hypoxisch-bedingter pathologischer Neovaskularisationen verwendeten wir das aktuelle Standardverfahren, das Mausmodell der Sauerstoff-induzierten Retinopathie nach dem Protokoll von Smith *et al.* (1994) [21].

### 3.2. Retinale Morphologie

Sowohl in den HE-gefärbten Schnitten als auch in den AF488 Isolectin-IB4-gefärbten retinalen Flachpräparaten zeigte sich unter Raumluftbedingungen bei beiden Genotypen eine altersgerechte Netzhautmorphologie (Fig. 1A in der Publikation). Wie bereits durch Lois Smith *et al.* (1994) im Originalprotokoll für das Retinopathie-Modell beschrieben, fanden sich wie erwartet Sauerstoffbehandlung präretinale Proliferationen (sogenannte Tufts) und pathologische Blutgefäßformationen [21]. Auch hier zeigte sich kein Unterschied zwischen Mausmutanten und Kontrolltieren (Fig. 1A und B).

Die Auswertung der Größe der avaskulären Fläche nach Sauerstoffbehandlung als vaskuläre Antwort auf den hypoxischen Stimulus ergab ebenfalls keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den VEGF<sup>mcko</sup> und Kontrollmäusen (Fig. 1C). Übereinstimmend mit der Literatur [18] interpretierten wir diese Daten als ersten Hinweis darauf, dass myeloide Zellen nicht durch Sekretion von VEGF-A zu pathologischer Neovaskularisation unter hypoxischen Bedingungen beitragen.

### **3.3. VEGF-A Expression in der Retina**

In einer weiteren Versuchsreihe führten wir Messungen des Expressionsniveaus des VEGF-A-Transkriptes mittels quantitativer Real-Time PCR durch, um zu untersuchen, ob die VEGF-A-Defizienz in myeloiden Zellen zu einer Verminderung des Gesamtexpressionsniveaus in der Netzhaut führt.

Die Daten zeigen, dass unter normoxischen Bedingungen an P14 VEGF<sup>mcko</sup> und Kontrollmäuse ein ähnliches Expressionsniveau haben, das gleichermaßen wie erwartet unter hypoxischen Bedingungen ansteigt. Unter normoxischen Bedingungen zeigte sich jedoch an P17 statistisch signifikant weniger VEGF-A-Transkript in VEGF<sup>mcko</sup> Mäusen im Vergleich zu den Geschwisterkontrolltieren. Unter hypoxischen Bedingungen erreichten die Mausmutanten an P17 jedoch wieder das Expressionsniveau der Kontrolltiere (Fig. 1D).

### **3.4. Immunzytochemische Analysen**

Zur Quantifizierung der Immunzell-Subtypen in der Netzhaut von P14 und P17 alten VEGF<sup>mcko</sup> und Kontrollmäusen unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen nutzten wir immunzytochemische Methoden der Durchflusszytometrie.

Zunächst wurden alle Leukozyten durch Gating auf alle CD45 positiven Zellen herausgefiltert (Fig. 2A). Dabei zeigte sich, dass von P14 auf P17 der relative Anteil an Leukozyten um circa 50% in beiden Genotypen lediglich unter normoxischen Bedingungen sank (Fig. 2B). Alle anderen Bedingungen zeigten gleichbleibende Werte. Makrophagen wurden durch positives Gating auf CD11b und F4/80 identifiziert und als Anteil aller Leukozyten (CD45 positiver Zellen) berechnet (Fig. 2A). Makrophagen stellten mit einem mittleren Anteil von etwa 38% die bei weitem größte Gruppe der Immunzellen in der Retina dar. Wie es auch schon bei den Leukozyten der Fall war, sank der relative Anteil an Makrophagen lediglich unter normoxischen Bedingungen von P14 auf P17 (Fig. 2C).

Granulozyten (CD11b positiv und Ly6G positiv als relativer Anteil an CD45 positiven Zellen) machten nur ca. 1% aller Immunzellen in der Retina aus. Auch hier zeigte sich ein Abfall der Zellzahlen in beiden Genotypen von P14 auf P17 unter normoxischen Konditionen (Fig. 2D). Weiterhin beobachteten wir an P17 einen signifikanten Unterschied in den Zellzahlen beider Genotypen unter hypoxischen Bedingungen.

Die Zahl der T-Zellen (der CD3 positive Anteil an CD45 positiven Zellen) stieg signifikant in den VEGF<sup>mcko</sup> Mäusen unter hypoxischen Bedingungen von P14 auf P17 an (Fig. 2E).

Mittels einer selektiven Gating-Strategie in den FACS-Analysen nach Vorlage von Vainchtein *et al.* (2014) [29] gelang uns eine weitere Unterscheidung zwischen infiltrierenden Monozyten und Mikroglia (Fig. 2F). Zusammenfassend wurden in unserer Analyse infiltrierende Monozyten als F4/80<sup>hi</sup> CD45<sup>hi</sup> von NK1.1 negativen CD3 negativen CD11b positiven Ly6G negativen Zellen nachgewiesen (Fig. 2F). Hierbei zeigte sich ein Genotyp-unabhängiger Abfall der Zellzahlen unter hypoxischen Bedingungen sowohl an P14, als auch an P17 im Vergleich zu den normoxischen Messbedingungen (Fig. 2H).

Im Gegensatz dazu stieg der Anteil residentieller Mikroglia (F4/80<sup>lo</sup> CD45<sup>lo</sup> von NK1.1 negativen CD3 negativen CD11b positiven Ly6G negativen Zellen) nach hypoxischem Stimulus in den VEGF<sup>mcko</sup> Mäusen an P14 und in den Kontrollmäusen an beiden Untersuchungszeitpunkten an (Fig. 2I).

### **3.5. Müller-Zell-Aktivierung in der Mausretina**

Die bisher dargestellten Resultate lassen den Schluss zu, dass myeloide Zellen keine relevante Quelle für VEGF-A in der hypoxischen Retina im Mausmodell der Sauerstoff-induzierten Retinopathie sind. Die Daten verschiedener früherer Arbeiten ließen uns jedoch vermuten, dass Müllerzellen eine relevante Quelle für VEGF-A in der Retina sein könnten [30]. Wir untersuchten daher den Aktivierungszustand von Müllerzellen durch Kreuzfärbung von Vimentin (struktureller Marker) und saurem Gliafaserprotein (GFAP als Aktivitätsmarker) (Fig. 3). Unter normoxischen Bedingungen konnte sowohl an P14 als auch an P17 keine Gliose als Nachweis aktivierter Müllerzellen festgestellt werden (Fig. 3). Nach Sauerstoffbehandlung war jedoch eine deutliche Aktivierung von Müllerzellen sowohl an P14 als auch P17 als potenzieller Nachweis einer pathomechanistisch relevanten Beteiligung ersichtlich (Fig. 3).

### **3.6. Retinaler Phänotyp in Clodronat-behandelten VEGF<sup>mcko</sup> Mäusen**

Frühere Arbeiten legen nahe, dass die systemische Depletion von Makrophagen im Tiermodell der Sauerstoff-induzierten Retinopathie die pathologische retinale Neovaskularisation signifikant reduziert [16,17]. Wir überprüften diese Befunde unter Verwendung unserer zellspezifischen Mausmutanten der myeloiden Zellreihe. Dazu wurden VEGF<sup>mcko</sup> Mäuse im Mausmodell der Sauerstoff-induzierten Retinopathie entweder PBS- oder Clodronat-Liposomen intraperitoneal von P12 bis P17 appliziert. Die Auswertung der avaskulären und neovaskulären Fläche in Isolectin-IB4 gefärbten retinalen Flachpräparaten (Fig. 4A) zeigte jedoch keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen (Fig. 4B und C). Wir sahen lediglich eine statistisch insignifikante Reduktion der relativen neovaskulären Fläche in Clodronat-behandelten Mäusen (Fig. 4C). Dies werteten wir als weiteren Hinweis darauf, dass Makrophagen durch andere Mechanismen als durch eine eigene VEGF-A Expression an der pathologischen Neovaskularisation beteiligt sind. Eine Müller-Zell-Färbung auf Paraffin-eingebetteten Retinaschnitten zeigte deutliche Müller-Zell-Aktivierungen sowohl in Clodronat- als auch PBS-behandelten Mäusen (Fig. 4D). Eine VEGF-A Färbung ebenfalls in den Liposomen-behandelten Schnitten bestätigte ein VEGF-A Signal in Müllerzellen als Nachweis einer VEGF-A Expression in diesen Zellen in beiden Gruppen (Fig 4E).

### **3.7. VEGF-A Expression in MIO-M1 Zellen *in vitro***

Um die Hypothese, dass myeloide Zellen die Expression von VEGF-A in Müllerzellen aktivieren, weiter zu untersuchen, haben wir die VEGF-A mRNA Expressionsniveaus *in vitro* in einer humanen Müller-Zelllinie (MIO-M1) alleine und in Ko-Kultur mit der murinen Mikroglia-Zelllinie (BV-2) nach 24 und 48 Stunden Inkubation bestimmt.

Die quantitative Real-Time PCR zeigte ein dreifach höheres VEGF-A mRNA Expressionsniveau in MIO-M1 Zellen, wenn diese für 24 Stunden in Ko-Kultur mit BV-2 Zellen gehalten wurden. Nach 48 Stunden zeigte sich sogar ein 5,4 facher Anstieg (Fig. 5).

Dies bestätigte unsere Vermutung, dass Makrophagen Müllerzellen zur VEGF-A Expression anregen.

## 4. Klinische Anwendung / weiterführende Fragestellungen

Ischämische neovaskuläre Retinopathien repräsentieren die weltweit häufigste Erblindungsursache in Industrienationen [2]. Die Therapie mit anti-VEGF-Antikörpern war ein wesentlicher medizinischer Fortschritt, jedoch kann ein Teil der Patienten nicht davon profitieren, sodass auch weiterhin intensiv an neuen Therapieansätzen geforscht werden muss [3].

Kürzlich publizierte Befunde haben die über Jahre hinweg vorherrschende Hypothese, dass das zu pathologischer Neovaskularisation führende VEGF-A durch myeloide Zellen sezerniert wird, in Frage gestellt [18]. Dies konnten wir durch Verwendung VEGF-A-defizienter Mausmutanten der myeloiden Zellreihe im Mausmodell der Sauerstoff-induzierten Retinopathie bestätigen. So hat die zellspezifische Defizienz von VEGF-A in myeloiden Zellen keinen Einfluss auf die avaskulären und neovaskulären Flächen auf retinalen Flachpräparaten. Auch gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede in den VEGF-A mRNA-Expressionsniveaus in der Netzhaut zwischen Kontrollen und VEGF<sup>mcko</sup> Mäusen [18,31].

Über die bekannten Befunde hinaus haben wir auf der Suche nach dem Mechanismus der VEGF-A Wirkung durch immunzytochemische Analysen Hinweise darauf gefunden, dass es nach Sauerstoffbehandlung zu einem signifikanten Anstieg des relativen Anteils an residentiellen Mikroglia kommt. Dies unterstützt frühere Erkenntnisse einer Hypoxie-induzierten Mikroglia proliferierung. Im Gegenzug konnten wir ausschließen, dass hämatogene Makrophagen auf den ischämischen Stimulus hin in die Netzhaut einwandern.

Interessanterweise zeigte sich jedoch an P17 signifikant weniger VEGF-A-Transkript in den VEGF<sup>mcko</sup> Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren unter normoxischen Bedingungen, sodass möglicherweise das von myeloiden Zellen gebildete VEGF-A unter physiologisch normoxischen Bedingungen von Bedeutung sein könnte. Dies müsste in weiteren Untersuchungen abgeklärt werden.

Unsere bis dahin erhobenen Befunde gaben jedoch keine Erklärung dafür, warum eine Makrophagendepletion die pathologische retinale Neovaskularisation inhibiert, sodass wir nach alternativen Pathomechanismen suchten.

Zu den weiteren Hauptproduzenten von VEGF-A in der Netzhaut gehören Müllerzellen, Gefäßendothelzellen, retinale Ganglienzellen und retinale Pigmentepithelzellen [29,32-

34]. Frühere Arbeiten hatten bereits die besondere Rolle von Müllerzellen in diesem Kontext untersucht: In knockout Mäusen, die eine Müllerzell-spezifische VEGF-Defizienz aufwiesen, konnte tatsächlich eine Reduktion der pathologischen Neovaskularisation im Mausmodell der Sauerstoff-induzierten Retinopathie gefunden werden [32], sodass wir uns auf das Zusammenspiel zwischen Müllerzellen, myeloiden Zellen und VEGF-A Synthese konzentrierten.

Durch *in vitro* Experimente konnten wir nachweisen, dass die Anwesenheit einer Mikrogliazelllinie die VEGF-A Synthese in einer Müller-Zelllinie stimuliert. Aufgrund der Tatsache, dass in unserem experimentellen Aufbau beide Zelllinien räumlich voneinander getrennt waren, ist die Vermutung einer parakrinen Stimulation durch einen löslichen Faktor naheliegend. Die zukünftigen Arbeiten sollten deshalb darauf gerichtet sein, durch Kombination von *in vitro* und *in vivo* Versuchsansätzen diesen Faktor zu identifizieren und im Tiermodell zu bestätigen. Der bisherige Goldstandard zur Therapie ischämisch-proliferativer Netzhauterkrankungen mit einem monoklonalen Fab-Antikörperfragment zur Hemmung von VEGF-A (Ranibizumab; Lucentis®) zielt darauf ab, jegliche retinale VEGF-Expression zu hemmen, sodass auch das physiologisch benötigte Maß einer VEGF-Stimulation in der Netzhaut nicht mehr gewährleistet wird. Unsere Befunde einer mechanistisch bedeutsamen Zell-Zell-Interaktion zwischen Mikroglia und Müllerzellen könnte den Weg zu gezielten und nebenwirkungsärmeren Therapieansätzen bahnen, sodass eine physiologische VEGF-Homöostase gewahrt wird. Ziel ist es, bessere Langzeit-Ergebnisse in der Therapie ischämisch-proliferativer Netzhauterkrankungen und damit einer Verbesserung der Lebensqualität zu erreichen [35].

## 5. Quellenverzeichnis

1. von Goethe JW. Aus meinem Leben. Dichtung und Wahrheit. 3 Bde. Cotta, Stuttgart und Tübingen 1811 – 1814.
2. Taylor HR, KeeVe JE. (2001) World blindness: a 21st century perspective. *Br J Ophthalmol* 85: 261 – 266.
3. Bressler SB, Ayala AR, Bressler NM, Melia M, Qin H, Ferris III FL, Flaxel CJ, Friedmann SM, Glassmann AR, Jampol LM, Rauser ME. (2016) Persistent



- macular thickening after ranibizumab treatment for diabetic macular edema with vision impairment. *JAMA Ophthalmol* 134: 278 – 285.
4. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. (1983) Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219(4587): 983 – 985.
  5. Marialaura A, Stefano G, Alessia P. (2016) Targeting VEGF in eye neovascularization: What's new? A comprehensive review on current therapies and oligonucleotide-based interventions under development. *Pharmacol Res* 103: 253 – 269.
  6. Aiello LP, Avery RP, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, Pasquale LR, Thieme H, Iwamoto MA, Park JE, Nguyen HV, Aiello LM, Ferrara N, King GL. (1994) Vascular Endothelial Growth Factor in Ocular Fluid of Patients with Diabetic Retinopathy and Other Retinal Disorders. *NEJM* 331:1480-1487.
  7. Ramakrishnan S, Anand V, Roy S. (2014) Vascular Endothelial growth factor signaling in hypoxia and Inflammation. *J Neuroimmune Pharmacol* 9(2): 142–160.
  8. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu X-F, Breitmann ML, Schuh AC. (1995) Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 376: 62 – 66.
  9. Retinopathy of Prematurity. In: Jousen AM, Gardner TW, Kirchhof B, Ryan SJ, (Hrsg.): Retinal Vascular Disease. Springer-Verlag, 1. Auflage, S. 392 – 423, 2007.
  10. Jousen AM, Murata T, Tsujikawa A, Kirchhof B, Bursell S-E, Adamis AP. (2001) Leukocyte-mediated endothelial cell injury and death in the diabetic retina. *Am J Pathol* 158: 147-152.
  11. Jousen AM, Poulaki V, Le ML, Koizumi K, Esser C, Janicki H, Schraermeyer U, Kociok N, Fauser S, Kirchhof B, Kern TS, Adamis AP. (2004) A central role for inflammation in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *FASEB J* 18: 1450-1452.
  12. Sakurai E, Anand A, Ambati BK, van Rooijen N, Ambati J. (2003) Macrophage depletion inhibits experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44: 3578-3585.
  13. Espionas-Heidmann DG, Suner IJ, Hernandez EP, Monroy D, Csaky KG, Cousins SW. (2003) Macrophages Depletion Diminishes Lesion Size and

- Severity in Experimental Choroial Neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(8): 3586 – 3592.
14. Davies MH, Eubanks JP, Powers MR. (2006) Microglia and macrophages are increased in response to ischemia-induced retinopathy in the mouse retina. *Mol Vis* 12: 467-77.
  15. Naug HL, Browning J, Gole GA, Gobé G. (2000) Vitreal macrophages express vascular endothelial growth factor in oxygen-induced retinopathy. *Clin Exp Ophthalmol* 28: 48-52.
  16. Ishida S, Usui T, Yamashiro K, Kaji Y, Amano S, Ogura Y, Hida T, Oguchi Y, Ambati J, Miller JW, Gragoudas ES, Ng YS, D'Amore PA, Shima DT, Adamis AP. (2003) VEGF164-mediated inflammation is required for pathological, but not physiological, ischemia-induced retinal neovascularization. *J Exp Med* 198: 483-489.
  17. Kubota Y, Takubo K, Shimizu T, Ohno H, Kishi K, Shibuya M, Saya H, Suda T. (2009) M-CSF inhibition selectively targets pathological angiogenesis and lymphangiogenesis. *J Exp Med* 206: 1089-1102.
  18. Liyanage SE, Fantin A, Villacampa P, Lange CA, Denti L, Cristante E, Smith AJ, Ali RR, Luhmann UF, Bainbridge JW, Ruhrberg C. (2016) Myeloid-derived vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor are dispensable for ocular neovascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 36: 19-24.
  19. Gerber HP, Hillan KJ, Ryan AM, Kowalski J, Keller GA; Rangell L, Wright BD, Radtke F, Aguet M, Ferrara . (1999) VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development* 126: 1149 – 1159.
  20. Clausen BE, Burkhardt C, Reith W, Renkawitz R, Förster I. (1999) Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMCre mice. *Transgenic Res* 8: 265 – 277.
  21. Smith LE, Wesolowski E, McLellan A, Kostyk SK, D'Amato R, Sullivan R, D'Amore PA. (1994) Oxygen-induced retinopathy in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 101 – 111.
  22. Gimenez E, Montoliu L. (2001) A simple polymerase chain reaction assay for genotyping the retinal degeneration mutation (Pdeb(rd1)) in FVB/N transgenic mice. *Lab Anim* 35: 153 – 156.
  23. Liu J, Copland DA, Horie S, Wu WK, Chen M, Xu Y, Paul MB, Mack M, Xu H, Nicholson LB, Dick AD. (2013) Myeloid cells expression VEGF and arginase-1

- following uptake of damaged retinal pigment epithelium suggests potential mechanism that drives the onset of choroidal angiogenesis in mice. *PLoS.One*8, e72935.
24. Limb GA, Salt TE, Munro PM, Moss SE, Khaw PT, (2002) In vitro characterization of spontaneously immortalized human Muller cell line (MIO-M1). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43: 864 - 869.
  25. Henn A, Lund S, Hedtjarn M, Schrattenholz A, Porzgen P, Leist M. (2009) The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation. *ALTEX* 26: 83 – 94.
  26. Connor KM, Krah NM, Dennison RJ, Aderman CM, Chen J, Guerin KI, Sapieha P, Stahl A, Willett KL, Smith LE. (2009) Quantification of oxygen-induced retinopathy in the mouse: a model of vessel loss, vessel regrowth and pathological angiogenesis. *Nat Protoc* 4: 1565 – 1573.
  27. Nürnberg C, Kociok N, Brockmann C, Lischke T, Crespo-Garcia S, Reichhart N, Wolf S, Baumgrass R, Eming SA, Beer-Hammer S, Joussem AM. (2018) Dataset on the activation of Müller cells through macrophages upon hypoxia in the retina. *Data in Brief* 16:489-500.
  28. Goldmann, T, Wieghofer P, Muller PF, Wolf Y, Varol D, Yona S, Brendecke SM, Kierdorf K, Staszewski O, Datta M, Luedde T, Heikenwalder M, Jung S, Prinz M. (2013) A new type of microglia gene targeting shows TAK1 to be pivotal in CNS autoimmune inflammation. *Nat Neurosci* 16: 1618-1626.
  29. Vainchtein ID, Vinet J, Brouwer N, Brendecke S, Biagini G, Biber K, Boddeke HW, Eggen BJ. (2014) IN acute experimental autoimmune encephalomyelitis, infiltrating macrophages are immune activated, whereas microglia remain immune suppressed. *Glia* 62: 1724 – 1735.
  30. Pierce EA, Avery RI, Foley ED, Aiello LP, Smith LEH. (1995) Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization. *PNAS* 92: 905 – 909.
  31. Nürnberg C, Kociok N, Brockmann C, Lischke T, Crespo-Garcia S, Reichhart N, Wolf S, Baumgrass R, Eming SA, Beer-Hammer S, Joussem AM. (2018) Myeloid cells contribute indirectly to VEGF expression upon hypoxia via activation of Müller cells. *Exp Eye Res* 166: 56-69.
  32. Chan-Ling T, Pe'er J, Itin A, Gnessin H, Keshet E. (1996) Roles of vascular endothelial growth factor and astrocyte degeneration in the genesis of

- retinopathy of prematurity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 290–299.
33. Miller JW. (1997) Vascular endothelial growth factor and ocular neovascularization. *Am J Pathol* 151: 13–23.
  34. Bai Y, Ma JX, Guo J, Wang J, Zhu M, Chen Y, Le YZ. (2009) Muller cell-derived VEGF is a significant contributor to retinal neovascularization. *J Pathol* 219: 446 – 454.
  35. Nürnberg C, Kociok N, Jousseaume AM. (2018) Targeting myeloid cells in ischemic retinal vascular diseases. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*; doi: 10.1007/s00417-018-4107-5.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Christina Claudia Angelika Nürnberg, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Die Rolle von myeloiden Zellen im Mausmodell der Sauerstoff-induzierten Retinopathie* selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Mein Anteil an der ausgewählten Publikation entspricht dem, der in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin, angegeben ist. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

---

Unterschrift

## Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Christina Claudia Angelika Nürnberg hatte folgende Anteile an der vorliegenden Publikation:

**Nürnberg C**, Kociok N, Brockmann C, Lischke T, Crespo-Garcia S, Reichhart N, Wolf S, Baumgrass R, Eming SA, Beer-Hammer S, Joussem AM. (2018) Myeloid cells contribute indirectly to VEGF expression upon hypoxia via activation of Müller cells. *Exp Eye Res* 166: 56-69.

Beitrag im Einzelnen:

Alleinige Erstautorenschaft. Verfassen des Publikationsmanuskriptes unter Anleitung von Frau Univ.-Prof. Dr. med. Antonia Joussem. Zucht und Anwendung des Mausmodells der Sauerstoff-induzierten Retinopathie, sowie Injektion von Clodronat-Liposomen.

Präparation und Färbungen dargestellt in Abbildung 1A und 1B.

Verblindung und statistische Auswertung der avaskulären Fläche in Abbildung 1C; die Messung der avaskulären Fläche erfolgte durch einen verblindeten Auswerter. Probenaufarbeitung, Durchführung und Auswertung der Messung der relativen mRNA Expression dargestellt in Abbildung 1D. Durchführung der durchflusszytometrischen Untersuchungen und statistische Datenauswertung unter Anleitung von Dr. rer. nat. Timo Lischke dargestellt in Abbildung 2. Präparation und Anfertigung der immunhistochemischen Färbungen in Abbildung 3.

Injektion der Tiere mit Clodronat- beziehungsweise PBS-Liposomen, Präparation und immunhistochemische Färbungen, die zu Abbildung 4A geführt haben.

Statistische Auswertung der avaskulären und tuft Fläche, die zu Abbildung 4B und 4C geführt haben. Die Flächen wurden von einem verblindeten Auswerter gemessen. Abbildung 4D wurde nach meinem Protokoll angefertigt. Anfertigung des Studiendesigns, das zu Abbildung 5 geführt hat.

---

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

---

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

---

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2016** Selected Editions: SCIE,SSCI  
 Selected Categories: **"OPHTHALMOLOGY"** Selected Category Scheme: WoS  
**Gesamtanzahl: 59 Journale**

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	PROGRESS IN RETINAL AND EYE RESEARCH	5,428	11.587	0.008930
2	OPHTHALMOLOGY	36,581	8.204	0.058470
3	JAMA Ophthalmology	3,089	5.625	0.014080
4	AMERICAN JOURNAL OF OPHTHALMOLOGY	24,353	5.052	0.032900
5	Ocular Surface	1,412	4.383	0.001890
6	BRITISH JOURNAL OF OPHTHALMOLOGY	19,029	3.806	0.025400
7	JOURNAL OF REFRACTIVE SURGERY	3,966	3.709	0.009230
8	RETINA-THE JOURNAL OF RETINAL AND VITREOUS DISEASES	9,827	3.700	0.021970
9	SURVEY OF OPHTHALMOLOGY	4,915	3.374	0.004250
10	EXPERIMENTAL EYE RESEARCH	10,894	3.332	0.013420
11	INVESTIGATIVE OPHTHALMOLOGY & VISUAL SCIENCE	50,452	3.303	0.078370
12	ACTA OPHTHALMOLOGICA	7,077	3.157	0.012040
13	CLINICAL AND EXPERIMENTAL OPHTHALMOLOGY	2,904	3.000	0.005370
14	CURRENT OPINION IN OPHTHALMOLOGY	3,059	2.920	0.005690
15	JOURNAL OF CATARACT AND REFRACTIVE SURGERY	11,899	2.687	0.017330
16	JOURNAL OF VISION	8,660	2.671	0.020780
17	Annual Review of Vision Science	59	2.522	0.000480
18	OCULAR IMMUNOLOGY AND INFLAMMATION	1,442	2.453	0.002300
19	GRAEFES ARCHIVE FOR CLINICAL AND EXPERIMENTAL OPHTHALMOLOGY	7,472	2.349	0.012790
20	OPHTHALMIC AND PHYSIOLOGICAL OPTICS	2,317	2.302	0.003500
21	EYE	7,463	2.275	0.011210
22	JOURNAL OF GLAUCOMA	4,068	2.263	0.005940

## Druckexemplar der Publikation

**Nürnberg C**, Kociok N, Brockmann C, Lischke T, Crespo-Garcia S, Reichhart N, Wolf S, Baumgrass R, Eming SA, Beer-Hammer S, Jousen AM. (2018) Myeloid cells contribute indirectly to VEGF expression upon hypoxia via activation of Müller cells. *Exp Eye Res* 166: 56-69. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2017.10.011>































## **Curriculum Vitae**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.













## Publikationsliste

### Originalarbeiten (peer-review):

Kociok N, Crespo-Garcia S, Liang Y, Klein SV, **Nürnberg C**, Reichhart N, Skosyrski S, Moritz E, Maier AK, Brunken WJ, Strauß O, Koch M, Jousen AJ. (2015) Lack of netrin-4 modulates pathologic neovascularization in the eye. *Sci Rep* 6: 18828; doi: 10.1038/srep 18828.

**Nürnberg C**, Kociok N, Brockmann C, Lischke T, Crespo-Garcia S, Reichhart N, Wolf S, Baumgrass R, Eming SA, Beer-Hammer S, Jousen AM. (2018) Myeloid cells contribute indirectly to VEGF expression upon hypoxia via activation of Müller cells. *Exp Eye Res* 166: 56-69.

**Nürnberg C**, Kociok N, Brockmann C, Lischke T, Crespo-Garcia S, Reichhart N, Wolf S, Baumgrass R, Eming SA, Beer-Hammer S, Jousen AM. (2018) Dataset on the activation of Müller cells through macrophages upon hypoxia in the retina. *Data in Brief* 16:489-500.

**Nürnberg C**, Kociok N, Jousen AM. (2018) Targeting myeloid cells in ischemic retinal vascular diseases. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*; doi: 10.1007/s00417-018-4107-5.

### Weitere Publikationen:

Nagel S, **Nürnberg C**, Purrucker J, Reichardt C, Reiff T, Rizos T, Ringleb PA. (2018) Behandlungsstandards Stroke Unit und Wachstation. Neurologische Klinik Heidelberg

## Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich allen Personen danken, die durch Ihre Unterstützung das Gelingen dieser Arbeit erst möglich gemacht haben.

Dazu gehört primär meine Doktormutter, Frau Univ.-Prof. Dr. med. Antonia Jousen, für die Bereitstellung des Themas, die intensive Betreuung und Förderung auf persönlicher Ebene und ihre motivierende Begeisterung für unser Forschungsthema. Ganz herzlich möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, meine Forschungsergebnisse auch auf internationalen Kongressen vorstellen zu dürfen. Ebenso möchte ich an dieser Stelle Frau Prof. Dr. rer. nat. Sandra Beer-Hammer, Universität Tübingen, nennen, die mir trotz räumlicher Distanz als Co-Mentorin persönlich und in unzähligen Telefonaten mit ihrer immensen fachlichen Kompetenz jederzeit tatkräftig zur Seite stand. Weiterhin gilt mein Dank Herrn Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Olaf Strauß für seinen Rat und konstruktive Kritik während des gesamten Prozesses. Herrn Dr. rer. nat. Nobert Kociok und Frau Dr. med. Claudia Brockmann möchte ich mich für die Hilfestellungen bei den alltäglichen laborexperimentellen Fallstricken bedanken. Besonderer Dank geht an Frau Prof. Dr. rer. nat. Ria Baumgrass und Herrn Dr. rer. nat. Timo Lischke vom Deutschen Rheuma Forschungszentrum, Berlin, für Ihre Unterstützung und die Bereitstellung der nötigen Ressourcen für die immunzytochemischen Untersuchungen. Ich möchte mich ganz herzlich bei Frau Dr. rer. nat. Fee Schmitt bedanken, die mich im Institut für Pharmakologie und Experimentelle Therapie des Universitätsklinikums Tübingen einen Sommer lang mit nicht endender Geduld und großem Einsatz in die Geheimnisse der quantitativen Real-Time PCR eingeführt hat.

Frau Karin Oberländer danke ich für das Einbetten und Schneiden der Retinapräparate für Färbungszwecke und Frau Gabriele Fels bei der Hilfe in der Durchführung der Zellkulturexperimente. Ebenso möchte ich allen hier nicht explizit genannten Mitarbeitern des Labors für ihre Kollegialität und die positive Arbeitsatmosphäre danken. Besonders hervorzuheben sind hier insbesondere Frau Dr. rer. nat. Nadine Reichhart und Herr Dr. rer. medic. Sergio Crespo-Garcia, die mich insbesondere in der Endphase der Publikation mit ihrer fachlichen Expertise unterstützt haben.

Schlussendlich möchte ich mich herzlichst bei meiner Familie für ihre immerwährende Unterstützung bedanken. In den vielen Momenten in denen ich dachte, dass am Ende des Tunnels keine Publikation in Sicht ist, standet ihr an meiner Seite, habt mich motiviert und mir Mut gemacht. Danke für die Konstanz, auf die ich immer vertrauen kann.