

Aus dem Zentrum für Augenheilkunde der Universität zu Köln
Klinik und Poliklinik für Allgemeine Augenheilkunde
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. C. Cursiefen

**Eignung und Eigenschaften der Collaborative
Cross Linien zur Identifikation neuer endogener
Modulatoren der Lymphangiogenese mittels QTL-
Analyse am Modell der Hornhaut**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Felix Nüst
aus Bielefeld

promoviert am 06. September 2023

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln
Druckjahr 2023

Dekanin/Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. C. Cursiefen
2. Gutachter: Professor Dr. med. R. Widder

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.¹

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Herr Dr. Thomas Clahsen

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Messergebnisse wurden unter Anleitung von Dr. Thomas Clahsen von mir selbst im Labor des Zentrums für experimentelle Augenheilkunde ermittelt (Präparation und Anfärbung der Flachpräparate), verarbeitet (Bild und Bildverarbeitung) und ausgewertet.

Die Beschaffung der CC-Linien erfolgte durch Kooperationen mit den entsprechenden Instituten über Dr. Clahsen.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 24.04.23

Unterschrift:  (Felix Nüst)

Danksagung

Für meine Eltern.
Vires aquirit eundo.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
1. ZUSAMMENFASSUNG	9
2. EINLEITUNG	10
2.1. Die Hornhaut:	10
2.1.1. Aufbau der Hornhaut:	10
2.1.2. Das „angiogene Privileg“ der Hornhaut	13
2.1.3. Das „Immunprivileg“ der Hornhaut und die Hornhauttransplantation	14
2.2. Das lymphatische System und die Modulatoren der Lymphangiogenese	16
2.2.1. Bekannte Aktivatoren der (Lymph-)angiogenese	17
2.2.2. Bekannte Inhibitoren der (Lymph-)angiogenese	19
2.3. Die Hornhaut der Maus als Modell zur Identifikation neuer Modulatoren der Lymphangiogenese	23
2.3.1. Rekombinante, durch Inzucht gewonnene Mauslinien (zur Erforschung der Lymphangiogenese)	24
2.3.2. Limitationen bisheriger Inzuchtlinien	25
2.4. Collaborative Cross Linien	26
2.4.1. Was sind die Collaborative Cross Linien	26
2.4.2. Vorteile der Collaborative Cross Linien	27
2.4.3. Nachteile der Collaborative Cross Linien	28
2.5. Zielsetzung	29
3. MATERIAL UND METHODEN	30
3.1. Ausrüstung	30
3.2. Chemikalien und Medien	30
3.3. Material	30
3.4. Antikörper für Immunhistochemie	31
3.4.1. Primäre Antikörper	31
3.4.2. Sekundäre Antikörper	31
3.5. Software	32

3.6.	Studiendesign	32
3.6.1.	Mäuse	33
3.7.	Vorbereitung der Flachpräparate und Immunhistochemie	34
3.8.	Aufarbeitung der Bilder und Quantifizierung der Parameter Gefäßfläche, Gefäßendpunkte, Gefäßverzweigungen und Gefäßneusprossungen für die QTL-Analyse	35
3.8.1.	Digitale Bildanalyse:	35
3.8.2.	DCE Filter (Differential Contrast Enhancement-Filter)	35
3.8.3.	Erosion Filter:	35
3.8.4.	Gradient-Filter	35
3.8.5.	Kontrast-Filter:	35
3.8.6.	Definition des Bereichs von Interesse (region of interest/ROI)	36
3.8.7.	Markierung der Gefäße	36
3.8.8.	Gefäßfläche	37
3.8.9.	Gefäßneusprossungen	37
3.8.10.	Gefäßverzweigungen	38
3.8.11.	Gefäßendpunkte	39
3.8.12.	Durchmesser des limbalen Gefäßes	39
3.9.	Kartierung und QTL-Analyse	40
3.9.1.	Datengrundlage	40
3.9.2.	Kartierung	40
4.	ERGEBNISSE	41
4.1.	CC-Linien in der Immunfluoreszenz	41
4.2.	Gesamtfläche der Hornhaut und anteilige Lymphgefäßfläche	43
4.3.	Etablierte morphometrische Merkmale für die Charakterisierung der Lymphgefäße	46
4.3.1.	Gefäßendpunkte	48
4.3.2.	Gefäßverzweigungen	50
4.3.3.	Gefäßneusprossungen	52
4.4.	Gefäßdurchmesser des limbalen Gefäßes	54
4.5.	QTL-Analyse	57
5.	DISKUSSION	59
5.1.	Zusammenfassung der Hauptergebnisse	59

5.2.	Diskussion der Methode	60
5.2.1.	Studiendesign	60
5.2.2.	Mäuse	62
5.2.3.	Antikörper	63
5.2.4.	Bildanalyse	64
5.3.	Diskussion der Ergebnisse	66
5.3.1.	CC-Linien in der Immunfluoreszenz	66
5.3.2.	Anteilige Gefäßfläche	66
5.3.3.	Etablierte morphometrische Parameter der Lymphgefäße	67
5.3.4.	Gefäßdurchmesser des limbalen Gefäßes	69
5.3.5.	Gruppierung der CC-Linien auf Basis der Lymphgefäßstruktur	70
5.3.6.	QTL-Analyse	72
5.4.	Ausblick	73
6.	LITERATURVERZEICHNIS	75
7.	ANHANG	80
7.1.	Abbildungsverzeichnis	80
7.2.	Tabellenverzeichnis	81
8.	VORABVERÖFFENTLICHUNGEN VON ERGEBNISSEN	82

Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigen präsentierende Zelle
CC-Linien	Mauslinien der Collaborative Crosslines
CD4	cluster of differentiation 4 / Differenzierungsklaster 4
CD31	cluster of differentiation 31 / Differenzierungsklaster 31
cM	Centimorgan
DCE	Differential contrast enhancement / Kontrastdifferenzierungsverstärkung
DO	diversity outbred / Diversität ausgezüchtet
FGF	fibroblast growth factor / Fibroblasten-Wachstumsfaktor
HGF	hepatocyte growth factor / Hepatozyten- Wachstumsfaktor
HLA	Human leukocyte antigen / Humane Leukozytenantigene
IgG	Immunglobulin G
IRS-1	insulin receptor substrat 1 / Insulin-Rezeptor-Substrat 1
lncRNA	long non coding ribonucleic acid, lange nicht-kodierende Ribonukleinsäure
LOD	logarithm of the odds / Logarithmus der Chancen
Lyve1	lymphatic vessel endothelial hyaluronic acid receptor 1 / Endothelialer Hyaluronsäurerezeptor 1 der Lymphgefäße
Mb	Megabasen
MHC	major histocompatibility complex / Haupthistokompatibilitätskomplex
MicroRNA	micro ribonucleic acid / Mikro Ribonukleinsäure
miR	microRNA
ml	Milliliter
Mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PFA	Perfluoralkoxylalkan
prox1	prospero homeobox protein 1/ Prospero Homeobox Protein 1
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	region of interest / Region von Interesse
tPA	tissue plasminogen activator /Gewebespezifischer Plasminogenaktivator

TRAIL	TNF related apoptosis inducing ligand / TNF bezogener Apoptoseligand
µm	Mikrometer
VEGF	vascular endothelial growth factor / Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VEGFR	vascular endothelial growth factor rezeptor / Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktorrezeptor
sVEGFR	soluble vascular endothelial growth factor rezeptor / löslicher vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktorrezeptor
PDGF	platelet derived growth factor / Wachstumsfaktor aus Thrombozyten
QTL	quantitative trait locus / Quantitativer Eigenschaftslokus

1. Zusammenfassung

Die unter normalen Bedingungen avaskuläre Hornhaut wird auf Grund Ihrer Transparenz die „Windschutzscheibe“ des Auges genannt und ist essenziell für die Erhaltung der Sehkraft. Ist die Avaskularität gestört kommt es deutlich häufiger zu Abstoßungsreaktionen bei Hornhauttransplantationen. Dabei sind in erster Linie die eingewachsenen Lymphgefäße, nicht die Blutgefäße, prognostisch entscheidend.

Die murine Hornhaut konnte aufgrund ihrer einzigartigen Eigenschaften und der Entwicklung von Antikörpern zur Anfärbung der Lymphgefäße bereits erfolgreich als Modell zur Identifizierung von Modulatoren der Lymphangiogenese eingesetzt werden. Dabei wurden quantitative Merkmale der Lymphgefäße, wie die Lymphgefäßfläche der naiven Hornhaut, erhoben und mittels Intervallkartierung Genloci identifiziert, die im Zusammenhang mit der Lymphangiogenese stehen.

Bei den bisher für die Intervallkartierung eingesetzten Mäusen handelt es sich um Inzuchtlinien gängiger Labormauslinien, die nur einen Teil der Diversität des Genoms abdecken. Die Collaborative Cross-Linien sind Inzuchtlinien, die entworfen wurden um eine deutlich größere Diversität abzudecken und als Ressource für die Intervallkartierung zu dienen.

Die Studie bestätigt die Eignung der untersuchten CC-Linien für die Intervallkartierungen. Es zeigte sich eine deutlich größere Variation der gängigen morphometrischen Parameter „Gefäßfläche“, „Gefäßendpunkte“, „Gefäßverzweigungen“ und „Gefäßaussprossungen“, als auf Basis bisheriger Laborlinien zu erwarten war. Die anteilige Gefäßfläche variierte zwischen 0% und 6,36%. Somit enthalten die CC-Linien sowohl „extrem hoch-angiogene“ als auch „extrem niedrig-angiogene“ Linien.

Der „Durchmesser des limbalen Gefäßes“ korreliert im gleichen Maße wie die bisher genutzten Parameter mit der Gefäßfläche und kann als morphometrisches Merkmal zur Intervallkartierung genutzt werden.

Darüber hinaus zeigten sich unter den CC-Linien strukturelle Unterschiede der Lymphgefäßarchitektur, insbesondere des limbalen Gefäßes. Die Linie FIV zeigte sowohl die größte Gefäßfläche als auch ein auffällig vergrößertes limbales Lymphgefäß, während die Linie HAX2 bei ähnlich großer Lymphgefäßfläche nur ein rudimentär ausgeprägtes limbales Gefäß, aber viele Gefäßverzweigungen ausbildete.

Die Ergebnisse demonstrieren eine große Variationsbreite der Lymphgefäße verschiedener CC-Linien und liefern wichtige Erkenntnisse für Forscher, die mit CC-Linien arbeiten oder an komplexen Erkrankungen mit Beteiligung des Lymphsystems forschen.

2. Einleitung

Die unter normalen Bedingungen avaskuläre Hornhaut wird auf Grund Ihrer Transparenz die „Windschutzscheibe“ des Auges genannt und ist essenziell für die Erhaltung der Sehkraft ¹.

Hornhauttransplantationen zur Behandlung von Erkrankungen der Hornhaut zählen zu den häufigsten Transplantationen weltweit. Allein in Europa werden 40.000 Hornhauttransplantationen pro Jahr durchgeführt ², um bei Verletzungen oder Erkrankungen, wie beispielsweise der Hornhautdystrophie, die Sehkraft wiederherzustellen. Dem Behandlungserfolg kommt eine besondere Relevanz für die Lebensqualität zu, weil das Sehen für den Großteil der Menschen die wichtigste Sinneswahrnehmung darstellt und damit einhergehend die Angst zu erblinden von Patienten regelmäßig auf Platz 1 oder 2 der am meisten gefürchtetsten gesundheitlichen Einschränkungen angegeben wird ³. Gleichzeitig nehmen Erkrankungen, die das Sehen beeinflussen, mit dem Altern und damit in der alternden Gesellschaft zu ^{4,5}.

Zu Transplantatabstoßungen nach Hornhauttransplantationen kommt es vor allem durch die Weiterleitung immunologischer Stimuli durch Blut- und Lymphgefäße. Dabei hat sich die Präsenz von Lymphgefäßen in der normalerweise avaskulären Hornhaut als wichtigster prädikativer Faktor für eine Transplantatabstoßung herausgestellt ⁶⁻⁸.

Die genauen Mechanismen, die die Lymphangiogenese in der Hornhaut beeinflussen, sind noch nicht vollständig geklärt, weil die Forschung, im Vergleich zur Hämangiogenese, auf diesem Gebiet mangels eines geeigneten Markers für Lymphgefäße lange vernachlässigt wurde. Einige Modulatoren der Hämangiogenese, beispielsweise vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren, zeigen allerdings auch Effekte auf die Lymphangiogenese ^{9 10}.

Mehrere neue Modulatoren der Lymphangiogenese konnten bereits durch Forschungen an der Hornhaut im Mausmodell identifiziert werden und validieren die Hornhaut als geeignetes Modell sowohl zur Erforschung der Lymphangiogenese in der Hornhaut als auch zur Identifikation potenzieller übertragbarer Modulatoren der Lymphangiogenese auf andere Gewebe, Organtransplantationen oder Tumormetastasierung ².

2.1. Die Hornhaut:

2.1.1. Aufbau der Hornhaut:

Die Hornhaut wird oft auf Grund ihrer einzigartigen Eigenschaften als die „Windschutzscheibe“ des Auges beschrieben¹. Sie ist für die Brechung des Lichtes zuständig, wobei 2/3 der gesamten Brechkraft des Auges auf die Hornhaut entfallen.

Die menschliche Hornhaut ist 550µm dick und setzt sich aus 5 Schichten zusammen, die von einem Tränenfilm bedeckt sind. Die obere Epithelschicht besteht aus unverhorntem Plattenepithel. Darunter liegen die Bowman-Membran und das Stroma, das relativ wenige Zellen enthält und in erster Linie aus Kollagen besteht. Es macht mit 470µm den größten Anteil aus. Die folgende dicht mit Kollagen besetzte Descemet Membran geht in das einschichtige Endothel über. Darunter ist die vordere Kammer des Auges lokalisiert ¹¹ (Abbildung 1).

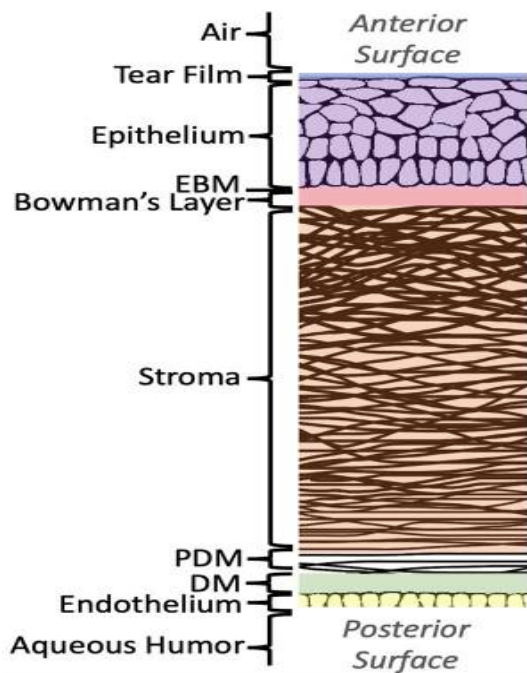


Abbildung 1 Die verschiedenen Schichten der Hornhaut.

Von außen (oben) nach innen (unten): Luft, Tränenfilm, Epithelschicht, Epithel Basalmembran, Bowman-Membran, Stroma, Pre-Descemet-Membran, Descemet-Membran, Endothel, Wässrige Flüssigkeit (Kammerwasser) ¹¹

Außen liegt der Hornhaut die Bindehaut an. Der Übergangsbereich wird als Limbus bezeichnet (Abbildung 2). Die Bindehaut ist im Vergleich zur Hornhaut sowohl mit Lymph- als auch mit Blutgefäßen vaskularisiert. Diese aus der Bindehaut kommenden Blut und Lymphgefäße enden an der Grenze zwischen Bindehaut und Hornhaut und verlaufen oft, aber nicht immer, in Form eines limbalen Gefäßes um die Hornhaut herum und dringen unter physiologischen Umständen nicht in die Hornhaut ein ^{1 12}. Neben anderen Faktoren, wie der strikten parallelen Anordnung der Fibrillen im Stroma, gewährleistet die Avaskularität der Hornhaut die über 80-prozentige Lichtdurchlässigkeit und damit die intakte Sehkraft ¹¹.

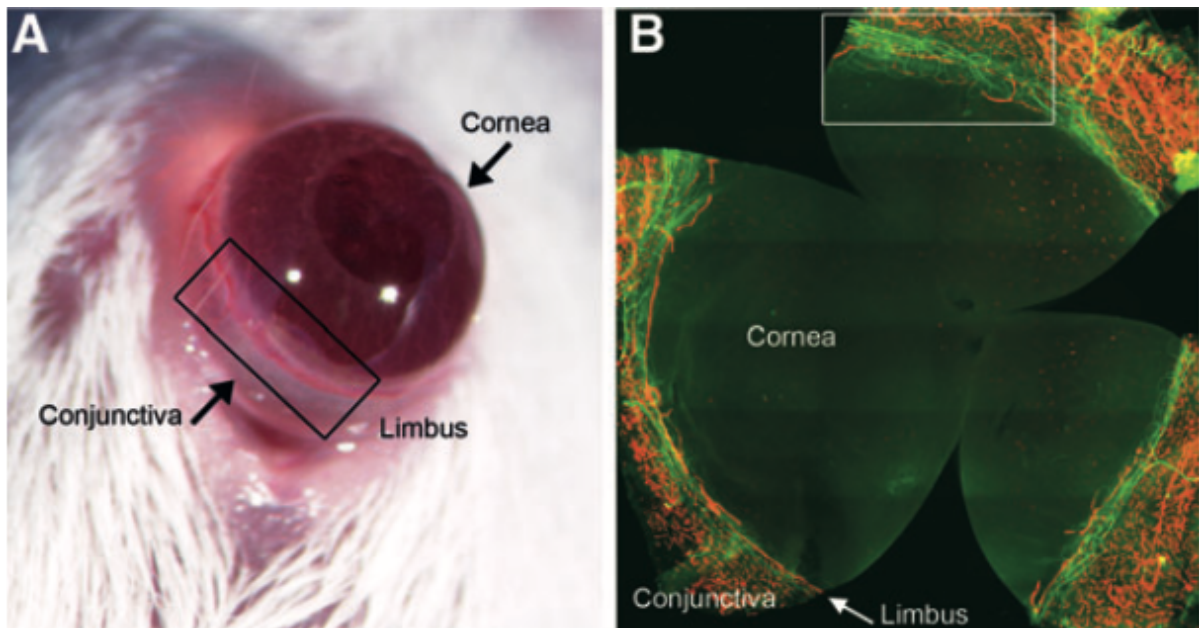


Abbildung 2 Limbale Übergangszone zwischen der physiologischerweise avaskulären Hornhaut und physiologischerweise vaskularisierten Bindehaut.

A) Hornhaut einer BALB/c Maus. In der schwarzen Box ist der Übergang zwischen Bindehaut und Hornhaut (Cornea), sowie das dazwischen liegende limbale Gefäß dargestellt. B) Immunfluoreszenzfärbung der Gefäße der Blut- (hier in grün) und Lymphgefäße (hier in rot)¹⁰.

2.1.2. Das „angiogene Privileg“ der Hornhaut

„Das Angiogene Privileg“ beschreibt den Fakt, dass die Hornhaut physiologischerweise frei von Lymph- und Blutgefäßen ist ¹. Verschiedene aktive und passive Mechanismen existieren, die unabhängig voneinander die Avaskularität der Hornhaut bei kleinen Stimuli sichern. Es besteht ein ständiges Gleichgewicht aus Aktivatoren und Inhibitoren der Angiogenese. Dieses wirkt als Puffer, wodurch es bei schwachen Reizen nicht direkt zum Einwachsen von Blut- oder Lymphgefäßen kommt ².

Evolutionsbiologisch ist dies sinnvoll, weil eine klare, lichtdurchlässige Hornhaut essenziell für die Sehfähigkeit ist und die Hornhaut durch ihre anatomische Lage dauerhaft kleinen Stimuli ausgesetzt wird ¹.

Bei verschiedenen Erkrankungen des Auges hingegen wie chronischen Entzündungen, Infektionen oder aufgrund von Verätzungen können innerhalb von Stunden Blut- und Lymphgefäßen in die Hornhaut einwachsen^{13 1 14 15}. Dabei kommt es zum Verlust der Sehfähigkeit durch Aufhebung der Transparenz der Hornhaut durch die Gefäße selbst, aber auch durch Einschwemmung von Fetten, Flüssigkeiten und Erythrozyten in die Hornhaut ¹⁶. Das „angiogene Privileg“ ist daher unvollständig.

Die Aufrechterhaltung des „angiogenen Privileges“ steht in einer gegenseitigen Abhängigkeit zum „Immunprivileg“ und wird teilweise über die gleichen Mechanismen reguliert ¹.

2.1.3. Das „Immunprivileg“ der Hornhaut und die Hornhauttransplantation

Hornhauttransplantationen werden bereits seit über 100 Jahren durchgeführt. Bei Transplantation von Hornhäuten ohne HLA-Abgleich waren die Abstoßungsraten im Vergleich zu anderen Organen und Geweben wesentlich geringer. Daraus wurde eine immunprivilegierte Eigenschaft der Hornhaut geschlussfolgert, die „Immunprivileg“ genannt wird².

Natürlicherweise wird das Immunprivileg über zahlreiche aktive und passive Mechanismen aufrechterhalten. Neben dem angiogenen Privileg, also der Gefäßfreiheit, zählt hierzu die reduzierte Anzahl an MHC-II-positiven antigenpräsentierenden Zellen in der Hornhaut, die bei Transplantatabstoßungen auf direktem Weg allo-reaktive T-Zellen aktivieren. Weitere Faktoren sind die reduzierte Expression von MHC-I in der Hornhaut, die ebenfalls von allo-reaktiven T-Zellen über T-Zell-Rezeptoren erkannt werden und die Expression von Ligand CD 95^{1,17}. Des Weiteren sind Immunzellen und inflammatorische Zellen natürlicherweise im Auge supprimiert. Dieser Umstand wird Vorderkammer-assoziierte-Immunabweichung genannt¹⁷. Alle diese Eigenschaften verhindern bei kleinen Stimuli eine systemische Immunreaktion. So wird eine gute Transplantierbarkeit bei normalen Empfängern ermöglicht.

Heute liegt die 5-Jahres-Überlebensrate nach Hornhauttransplantation bei über 90%. Allerdings liegen die Abstoßungsraten bei „Hochrisikoempfängern“ mit stark vaskularisierter Hornhaut trotz Immunsuppression und HLA-Abgleich bei über 50%^{2 18}. Damit stellt die Prävaskularisation der Hornhaut den größten Risikofaktor für eine Transplantatabstoßung dar. Dabei hat sich herausgestellt, dass primär die Lymphgefäße, nicht Blutgefäße für die Transplantatabstoßung entscheidend sind⁸. Im Mausmodell der Hornhauttransplantation hatten „Hochrisikoempfänger“ mit starker Neovaskularisation nur dann deutlich schlechtere Transplantatüberlebensraten, wenn eine Neovaskularisation mit Lymphgefäßen vorlag. Bei selektiver Inhibition der Lymphgefäße in „Hochrisikoempfängern“ mit starker Neovaskularisation von ausschließlich Blutgefäßen waren die Abstoßungsraten gleich niedrig wie bei „Niedrigrisikoempfängern“ ohne Neovaskularisation^{6,7 8 19}.

Der Zusammenhang zwischen Prävaskularisation und Transplantatüberleben liegt in der verstärkten Ausprägung des Immunreflexbogens (Abbildung 3). Antigene und Immunzellen, in erster Linie MHC-II+ dendritische Zellen und Makrophagen, haben durch die Lymphgefäße einer prävaskularisierten Hornhaut des Empfängers einen erleichterten Zugang zu den regionalen Lymphknoten. Dort findet eine Allo-Sensibilisierung statt, wodurch Immunzellen, in erster Linie CD4+ T-Zellen, über die Blutgefäße in die Spenderhornhaut migrieren. Diese sorgen für eine Abstoßungsreaktion des Transplantats^{1 20}.

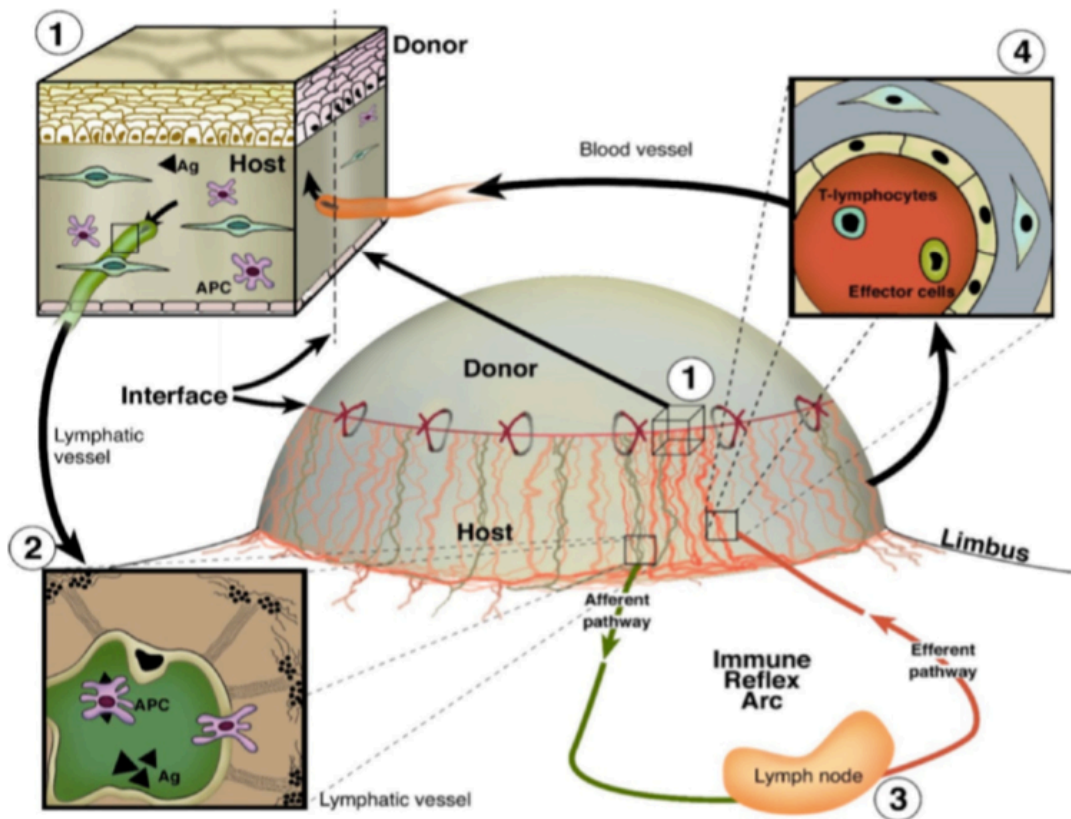


Abbildung 3 Der Immunreflexbogen

Der Immunreflexbogen zeigt die Bedeutung von Blut- und Lymphgefäßen bei der Abstoßung von Hornhauttransplantaten. 1: Spender-Empfänger-Schnittstelle an der Blut- (rot) und Lymphgefäße die Hornhaut erreichen. 2: Antigene und Antigenpräsentierende Zellen (APC) des Spenders des Empfängers können über die Lymphgefäße die Hornhaut verlassen. 3: Sie migrieren zu den regionalen Lymphknoten 4: Nach Stimulation von Immuneffektorzellen in den regionalen Lymphknoten können T-Zellen über die efferenten Blutgefäße direkt in die Hornhaut gelangen und eine Abstoßungsreaktion initiieren².

Neben einer stärkeren Ausprägung des Immunreflexbogens wird unter anderem auch durch die Vaskularisation der Hornhaut die Vorderkammer-assoziierte-Immunabweichung aufgehoben und damit Entzündungen begünstigt und Abstoßungsreaktionen ausgelöst²¹.

Das angiogene Privileg und das Immunprivileg haben viele Gemeinsamkeiten. Wie oben beschrieben schwächen Blut- und Lymphgefäße in der Hornhaut das „Immunprivileg“, indem sie den Immunreflexbogen verstärken. Auf der anderen Seite sind Entzündungen im Rahmen von Immunreaktionen kausal für die Neovaskularisation der Hornhaut^{1,22}.

Dieser Zusammenhang zwischen Angiogenese und Entzündungs- bzw. Immunreaktion liegt in den Mediatoren der Angiogenese. Diese beeinflussen neben der Gefäßneubildung gleichzeitig Entzündungsprozesse und die Immunreaktion. Vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren (VEGF), die zu den stärksten Aktivatoren der Angiogenese gehören, werden unter anderem von Makrophagen ausgeschüttet, die auch eine Schlüsselrolle bei der Amplifikationskaskade der Immunreaktionen spielen. Auf der inhibitorischen Seiten ist

beispielsweise Thrombospondin-1 ein Inhibitor von sowohl Entzündungen als auch durch Entzündungen verursachte Neovaskularisation in der Hornhaut ¹.

2.2. Das lymphatische System und die Modulatoren der Lymphangiogenese

Das lymphatische System erfüllt im menschlichen Körper zahlreiche Funktionen, zu denen die Aufnahme von Vitaminen und Fetten, der Abtransport von interstitieller Flüssigkeit und Makromolekülen sowie die Antigenpräsentation in den Lymphknoten gehört. Darüber hinaus spielt es bei verschiedenen Erkrankungen, insbesondere Tumormetastasierung, eine Rolle ^{9,21}.

Die Forschung auf dem Gebiet der Lymphangiogenese wurde im Vergleich zur Hämangiogenese lange vernachlässigt und ist weniger weit fortgeschritten. ² Das ist auf zwei Faktoren zurückzuführen: den Mangel eines spezifischen Markers für Lymphgefäße und die Konzentration auf die Hämangiogenese durch die Tumorforschung. Seit der Identifikation spezifischer Marker wie VEGFR-3, LYVE-1, Podoplanin und Prox1 hat die Forschung in diesem Bereich einen Aufschwung erlebt ⁹. Es wurden lymphatische Netzwerke an Orten entdeckt, die vorher als frei von Lymphgefäßen galten. Im Jahr 2015 wurden beispielsweise lymphatische Gefäße im zentralen Nervensystem nachgewiesen ²³.

Die klinisch nicht sichtbaren Lymphgefäße in der Hornhaut wurden auch durch diese neuen Marker identifiziert ²⁴. Zuvor wurde davon ausgegangen, dass nur Blutgefäße in die Hornhaut einwachsen können, weil Lymphgefäße biomikroskopisch nicht nachzuweisen waren. Die Lymphgefäße können dabei in Form von Aussprossungen existierender Gefäße oder *de novo* entstehen ²¹.

Verschiedene molekulare Mechanismen, die die Lymphangiogenese verstärken oder inhibieren, sind identifiziert worden. Dazu gehören verschiedene Proteine und Peptide, aber auch nichtcodierende RNA. Einige dieser Modulatoren sind bereits als Modulatoren der Hämangiogenese bekannt gewesen und zeigen ebenfalls einen Effekt auf die Lymphangiogenese. Andere sind in den vergangenen Jahren neu entdeckt worden ². Werden im Rahmen der Suche nach neuen Modulatoren der Lymphangiogenese mit Hilfe der Intervallkartierung bereits bekannte Modulatoren erneut identifiziert, spricht dies für die Validität der angewendeten Methode ¹⁰.

Bisher wurden allerdings noch keine Medikamente, die die Lymphangiogenese beeinflussen, für die klinische Behandlung am Auge zugelassen. Dies macht es erforderlich weitere Modulatoren der Lymphangiogenese zu identifizieren. Die neuen endogenen Modulatoren der Lymphangiogenese stellen potenzielle zukünftige pharmazeutische Ziele/Ansatzpunkte dar, für die allerdings derzeit noch keine Anwendungen in der Klinik gefunden werden konnten.

2.2.1. Bekannte Aktivatoren der (Lymph-)angiogenese

Endogene Aktivatoren der Angiogenese sind durch das verstärkte Interesse im Bereich der Tumorforschung vergleichsweise gut erforscht. Viele Aktivatoren der Hämangiogenese haben auch einen angiogenen Effekt auf Lymphgefäße. Im Wesentlichen wird die Lymphangiogenese von Mitgliedern der Familie der vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren (VEGF) induziert² (Abbildung 4). Die wichtigsten Mitglieder für die Hornhautneovaskularisation sind VEGF-A, VEGF-C und VEGF-D. Dabei sind VEGF-C und -D spezifisch für das Wachstum von Lymphgefäßen. Diese binden im Fall der Lymphangiogenese an die endothelialen Rezeptoren VEGFR-2 und VEGFR-3²⁵. VEGF-A kann indirekt durch Anlocken von VEGFR-1-positiven Makrophagen, die VEGF-C und D sekretieren, lymphangiogen wirken¹⁴.

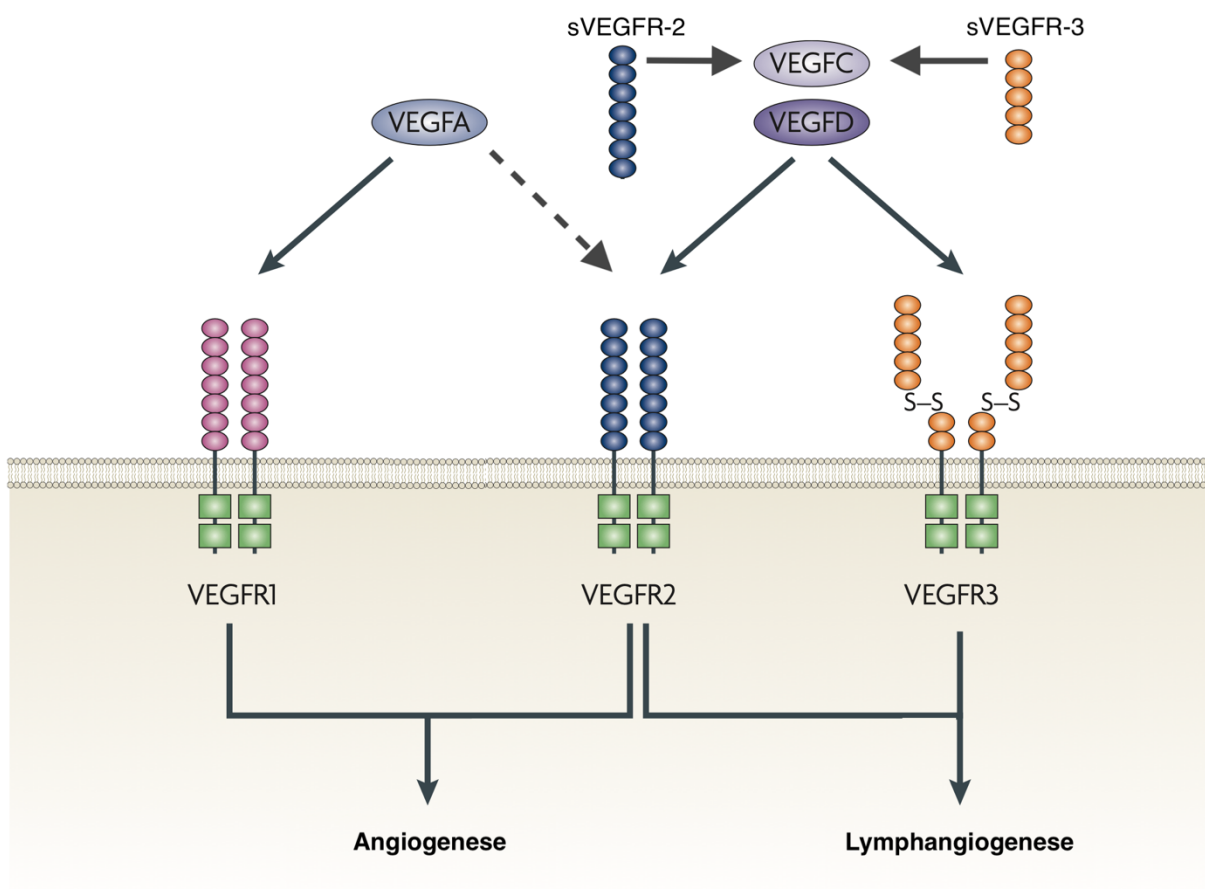


Abbildung 4 Die VEGF-Familie

Die VEGF-Familie zählt zu den bekanntesten endogenen Modulatoren der Angiogenese. VEGF-C und VEGF-D wirken über die Rezeptoren VEGFR2 und VEGFR3 aktivierend auf die Lymphangiogenese. Abbildung modifiziert von Ellis et al. 2018²⁵

Sowohl VEGF-A als auch VEGF-C und VEGF-D sind Ansatzpunkte klinischer Anwendungsmöglichkeiten.

Ein Ansatz besteht in der Blockade von VEGF-A mittels einer VEGF-Falle_{R1R2}. Dies führt bei Mäusen zu einem besseren Transplantatüberleben nach Hornhauttransplantation. Darüber hinaus wird die Infiltration von Immunzellen wie Makrophagen und T-Zellen signifikant inhibiert^{2,15,26,27}. Bevacizumab, ein Angiogenesehemmer, der in der Krebsforschung entwickelt wurde und alle VEGF-A Isoformen hemmt, zeigte in der subkonjunktivalen Anwendung im Mausmodell ein verlängertes Transplantatüberleben und weniger Angiogenese in der Hornhaut²⁸.

Dieser Ansatz wurde in die Klinik übertragen und wird in Form von off-label intrastromaler Applikation^{29 30 31}, topischer Applikation³¹⁻³³ und subkonjunktivaler Applikation³⁴ nach Hornhauttransplantation getestet und zeigt vielversprechende Ergebnisse. Es wurden sogar vergleichbare Abstoßungsraten von „Hochrisikopatienten“ und „Niedrigrisikopatienten“ nach kombinierter Anwendung von Feinnadel Diathermie und subkonjunktivaler Injektion von Bevacizumab beobachtet^{2 19 35}.

Eine kürzlich durchgeführte prospektiv klinische Studie zeigte außerdem, dass Bevacizumab einen positiven Effekt auf das Transplantatüberleben nach Hochrisikohornhauttransplantationen haben kann.³⁶

Ein weiterer Ansatz besteht in der Reduktion der Expression von VEGF-A durch IRS-1 (insulin receptor substrat-1). IRS-1 ist ein zytosolisches Adapterprotein, das andere Proteine zu deren Rezeptor leitet, wodurch VEGF-A, jedoch nicht VEGF-C, VEGF-D oder VEGFR-3, beeinflusst werden. Neben erfolgreichen Versuchen mit IRS-1 Antisenseoligonukleotiden im nahtinduzierten Entzündungsmodell³⁷ wurden bereits Versuchsreihen der Phase II und III erfolgreich absolviert. Dabei wurde bei den Patienten die Neovaskularisation signifikant inhibiert³⁸.

Auch mit einem anti-VEGF-C-Antikörper (VGX-100) kann die Lymphangiogenese bei „Hochrisikoempfängern“ im Mausmodell reduzieren werden²⁷. Integrin _{$\alpha_9\beta_1$} fördert die von VEGF-C und VEGF-D stimulierte Zellmigration durch direkte Bindung^{39,40}. Die subkonjunktivale Injektion eines blockierenden Antikörpers gegen Integrin α_9 resultiert zwar nicht in verminderter Lymphangiogenese, jedoch in verminderter Valvulogenese und signifikant verminderter Abstoßungsreaktion⁴¹. Darüber hinaus zeigt Integrin $\alpha_5\beta_1$, das in der entzündeten Hornhaut exprimiert wird, bei systemischer Inhibition eine spezifische Abwesenheit von Lymphgefäßen ohne Auswirkung auf die Blutgefäße. Dies resultiert in besserem Transplantatüberleben in murinen „Hochrisikoempfängern“⁸.

Neben der VEGF-Familie existieren weitere bekannte Faktoren, wie PDGF⁴², FGF-2, Angiopoietin und HGF⁴³, die die Lymphangiogenese induzieren².

2.2.2. Bekannte Inhibitoren der (Lymph-)angiogenese

Zu den Inhibitoren der (Lymph)angiogenese gehören im Wesentlichen lösliche VEGF-Rezeptoren (sVEGFR-2 und sVEGFR-3, (Abbildung 4), Plasminogen-/Serine-Protease-Inhibitoren und Mitglieder der Thrombospondin-Familie. Außerdem zeigen Vasohibin-1 und Neuropilin-2 und einige nicht-kodierende RNAs Effekte auf die Lymphangiogenese².

Lösliche VEGF-Rezeptoren:

Das Epithel der Hornhaut exprimiert durch alternatives Spleißen der Rezeptoren VEGFR-2 und VEGFR-3 die löslichen VEGF-Rezeptoren -2 und -3 (sVEGFR-2, sVEGFR-3). VEGFR-2 und -3 sind die Rezeptoren für die Wachstumsfaktoren VEGF-C und -D. Die löslichen Spleißvarianten binden VEGF-C und VEGF-D und unterbinden deren Signalwirkung⁴⁴.

sVEGFR-2 ist das Monomer der extrazellulären Domäne des membrangebundenen Rezeptors VEGFR-2. sVEGFR-2 bindet VEGF-C. Bei Verlust von sVEGFR-2 nach der Geburt im Mausmodell zeigte sich eine spontane Invasion von ausschließlich Lymphgefäßen in die Hornhaut und eine Hyperplasie der Lymphgefäße der Haut⁴⁵.

sVEGFR-3 ist die gekürzte Isoform von VEGFR-3. sVEGFR-3 bindet ebenfalls VEGF-C. Dadurch wird der angiogene Effekt an VEGFR-3 unterbunden. Bei nahtinduzierter Angiogenese in Mäusehornhäuten resultiert eine Überexpression von sVEGFR-3 in reduzierter Lymph- und Hämangiogenese. Auf der anderen Seite konnte gezeigt werden, dass eine Ausschaltung von sVEGFR-3 in verstärkter Angiogenese resultiert⁴⁴. Es wurde sogar eine Regression fetaler Lymphgefäße *in vivo* durch sVEGFR-3 nachgewiesen⁴⁶. Darüber hinaus kann VEGFR-3, das normalerweise auf dem Endothel von Lymph- und proliferierenden Blutgefäßen exprimiert wird, auch auf Epithelzellen der Hornhaut vermehrt gefunden werden. Dort trägt es durch Bindung von VEGF-C zur Aufrechterhaltung der Avaskularität bei^{47 2}.

Präklinisch wurde die Blockade von VEGF-C und VEGF-D durch die löslichen Rezeptoren sVEGFR-2 und sVEGFR-3 getestet. Dabei erzielten sVEGFR-2 und sVEGFR-3 eine signifikante Blockade der Lymphangiogenese und ein signifikant verlängertes Transplantatüberleben⁴⁸. sVEGFR-2 unterdrückt darüber hinaus die Proliferation von Lymphangiomen im Mausmodell

⁴⁵.

Plasminogen/Serin Protease-Inhibitoren:

Angiostatin ist ein endogener Faktor, der in der Hornhaut von Plasminogen abgespalten wird. Er kann verschiedene Oberflächenproteine in vaskulären Endothelzellen binden und verhindert ihre Migration und die Entstehung kleiner Tubuli^{49 2,50}.

Endostatin Analoga:

Zu den Endostatin Analoga gehören Endostatin, Tumstatin und Arresten. Sie sind Fragmente des Kollagens der extrazellulären Matrix des Stromas.

Wichtige Bestandteile der Hornhaut sind parallel angeordneten Kollagenfibrillen und mit diesen interagierende Proteoglykane. Die Proteoglykane des Stroma gehören zur Gruppe der kleinen leucinreichen Proteine (small leucin-rich proteins/SLRP), die Funktionen beim Wachstum und Organisation der Kollagenfibrillen, bei der Zusammensetzung der Extrazellulären Matrix, der Transparenz der Hornhaut und der Regulation von inflammatorischen Prozessen haben⁵¹.

Endostatin ist einer der potentesten bekannten Inhibitoren der Angiogenese. Es handelt sich um ein Fragment des Kollagen Typ XVIII der Extrazellulären Matrix, das Integrine bindet und dadurch die Zellproliferation inhibiert und die Zellmigration unterbindet⁵²⁻⁵⁴.

Tumstatin bindet die Integrine $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$, die anti-angiogenen Eigenschaften besitzen. Dabei ist die Bindung an $\alpha_v\beta_3$ entscheidend für die anti-angiogene Aktivität^{55,56}.

Arresten ist ein Fragment von Kollagen IV, das seinen anti-angiogenen Effekt über die Bindung von Integrin $\alpha_1\beta_1$ ausübt^{2,56}.

Thrombospondin:

Die Thrombospondine sind eine Familie von extrazellulären Proteinen, die Funktionen bei der Zell-Zell und Zell-Matrix-Kommunikation haben. In fast jedem Gewebe wird eine der 5 Subgruppen der Thrombospondine in einem bestimmten Expressionsmuster exprimiert. Thrombospondin-1 und -2 haben einen starken anti-angiogenen Effekt⁵⁷. Thrombospondin-1 wird auf Blutplättchen exprimiert und war deswegen das erste Protein der Familie, dessen inhibitorische Wirkung auf die Angiogenese identifiziert wurde⁵⁸. In der Hornhaut ist es in die Hemmung der Hämangiogenese sowohl direkt durch Inhibition der Migration von Endothelzellen und Effekte auf das Zellüberleben als auch indirekt involviert. Es bindet CD36 auf Makrophagen, wodurch weniger VEGF-C in den Makrophagen produziert wird. Das wiederum inhibiert die Lymphangiogenese⁵⁷.

Auch Thrombospondin-2 zeigt anti-angiogene Eigenschaften. Es bindet verschiedene Rezeptoren und kann den Zellzyklus von Endothelzellen unterbrechen^{57 2}.

Vasohibin-1:

Vasohibin-1 wird selektiv auf Endothelzellen exprimiert. Die Expression kann von Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise VEGF oder FGF-2 induziert werden. Es inhibiert die Migration, Proliferation und Formation kleiner kapillarähnlicher Strukturen⁵⁹. Darüber hinaus wird ein direkter anti-lymphangiogener Effekt angenommen, weil Vasohibin-1 die durch VEGF-C induzierte Lymphangiogenese hemmt^{60 2}.

Neuropilin-2:

Neuropilin-2 vermittelt die durch VEGF-C aktivierte Aussprossung von Lymphgefäßen. Dabei wirkt Neuropilin-2 auf VEGFR-3⁶¹. Eine künstliche microRNA, die Neuropilin-2 als Ziel hat, reduziert die Expression von Neuropilin-2 in lymphatischen Endothelzellen. Darüber hinaus kann die Abstoßungsrate nach Hornhauttransplantation von „Hochrisikopatienten“ nach subkonjunktivaler Applikation von Neuropilin-2 verbessert werden^{62 2}.

Nicht-kodierende RNA:

Zu nicht-kodierender RNA gehören alle Formen von RNA, die nicht zur Transkription von Proteinen genutzt werden. Sie können die Expression von Genen regeln^{2 63}. Eine Unterkategorie der nicht-kodierenden RNA sind microRNAs. Sie sind weit in verschiedenen Organen und Geweben weit verbreitet und haben verschiedene regulatorische Aufgaben. Sie spielen auch bei Organtransplantationen eine Rolle⁶⁴. Mehrere nicht-kodierende RNAs, die im Zusammenhang mit der Transplantatabstoßung und Lymphangiogenese stehen, sind in den letzten Jahren identifiziert worden.

Dazu zählt beispielsweise miR-184, die bei entzündeten Hornhäuten mit reduzierten Lymphgefäßen eine geringere Expression im Vergleich zu normalen Hornhäuten zeigt. In lymphatischen Endothelzellen mit erhöhter Expression von miR-184 *in vitro* wird die Adhäsion und Migration der Zellen sowie die Formation von kleinen kapillarähnlichen Strukturen supprimiert, was auf einen hemmenden Einfluss auf die Lymphangiogenese schließen lässt⁶³.

Prox1 ist ein Transkriptionsfaktor, dessen Aktivität wichtig für die Entstehung und Erhaltung von Lymphgefäßen ist, dessen genauere Mechanismen allerdings noch nicht bekannt sind^{65 66 67}. Prox1 wird hauptsächlich in lymphatischen Endothelzellen exprimiert und hat keinen Einfluss auf Blutgefäße⁶⁷. miR-181 kann Prox1 binden, was zum Abbau von Prox-1 führt. Auf diese Weise wird die Prox-1 Expression während der Entwicklung von Blutgefäßen unterdrückt⁶⁸. Darüber hinaus ist Prox1 entscheidend für die Expression von VEGFR-3, was die indirekte Regulation von VEGFR-3 auf Endothelzellen der Blutgefäße durch miR-181 erklärt².

Auch andere Formen der nicht-kodierenden RNA, wie lange nicht-kodierende RNA, konnten mit Neovaskularisation in Zusammenhang gebracht werden. Beispielsweise fungiert lncRNA H19 wie ein molekularer Schwamm für miR-29c und reguliert auf diese Weise die Expression von VEGF-A⁶⁹.

Insgesamt lässt sich sagen, dass nicht-kodierende RNA in der Regulation von Hämangiogenese und Lymphangiogenese eine Rolle spielen und ein vielversprechendes Ziel therapeutischer pharmazeutischer Intervention sein könnten².

2.3. Die Hornhaut der Maus als Modell zur Identifikation neuer Modulatoren der Lymphangiogenese

Die Hornhaut ist ein geeignetes Modell zur Erforschung der (Lymph)angiogenese und wurde in der Vergangenheit auf Grund ihrer einzigartigen und gut studierten Eigenschaften bereits vielfach zur Forschung der Lymph- und Hämangiogenese verwendet.

Neben der guten Zugänglichkeit spielen das „angiogene Privileg“, die Induzierbarkeit von Häm- und Lymphangiogenese, die Transparenz und die Transplantierbarkeit, deren Erfolg auf dem Immunprivileg und den Lymphgefäßen beruht, eine Rolle. Darüber hinaus sichern gleich mehrere Mechanismen das „angiogene Privileg“^{1,9}.

Mehrere Modelle zur Erforschung der Lymphangiogenese mit Hilfe der Hornhaut sind entwickelt worden. Dazu zählen nahtinduzierte Entzündungen, Transplantationen und chemische Verbrennungen. Ungefähr ein Drittel der Erkenntnisse über Blutgefäße basieren auf Forschung an der Hornhaut⁹.

Auch der genetische Hintergrund verschiedener Mauslinien beeinflusst das lymphangiogene Potenzial und die (Lymph)angiogenese der Hornhaut. Es kann durch Analyse der phänotypischen Unterschiede, wie der physiologischen Vaskularisation, des Transplantatüberlebens nach Hornhauttransplantation oder der Reaktion auf bestimmte Stimuli, wie beispielsweise nahtinduzierte Entzündungen oder Wachstumsreize durch VEGF, zur Erforschung der Lymphangiogenese nutzbar gemacht werden^{12,70}.

Man fand einen bis zu 10-fachen Unterschied in der Neovaskularisation in den Hornhäuten unterschiedlicher Mauslinien als Reaktion auf FGF-2 und VEGF und konnte durch QTL-Analyse 6 chromosomale Regionen bestimmen, die für die Reaktion auf FGF-2 und VEGF verantwortlich sind⁷¹. Auch bei der Induktion der Lymphangiogenese durch VEGF-C variierte die Gefäßfläche beim Vergleich der sechs Mauslinien¹² BALB/c, C57BL/6, SJL/JCrI, 129S1/SvImJ, FVB/NCrI und Cast/EiJ bis um den Faktor 1,9 (zwischen der Linie BALB/c und FVB/NCrI) bzw. um den Faktor 1,4 (zwischen BALB/c und C57BL/6). Auch im nahtinduzierten Entzündungsmodell der Lymphangiogenese betrug die Variation der Linien das bis zu 1,7fache beim Vergleich von BALB/c und FVB/NCrI bzw. das 1,3fache beim Vergleich von BALB/c und C57BL/6¹².

Bemerkenswert war jedoch, dass sich die Lymphgefäße in der Hornhaut verschiedener Mauslinien auch ohne angiogenen Stimulus unterschieden. So unterschied sich beispielsweise die Fläche der limbalen Lymphgefäße in der Hornhaut bei Vergleich von BALB/c und C57BL/6 Tieren um den Faktor 1,8. Dieser Zusammenhang spiegelte sich auch in anderen morphometrischen Parametern, wie der Anzahl an Gefäßeinsprossungen in die

Hornhaut mit einer Variation um den Faktor 1,5 wider. Dies verdeutlichte den starken Einfluss des genetischen Hintergrundes auf die Lymphangiogenese.

Beim Vergleich mittels signalwegspezifischer Expressionsanalyse von BALB/c (einer Laborlinie mit besonders wenigen Lymphgefäßen in der Hornhaut; „niedrig-lymphangiogen“) und C57BL/6 Mäusen (mit besonders vielen Lymphgefäßen in der Hornhaut; „hoch-lymphangiogen“) wurden 13 unterschiedlich exprimierte Gene identifiziert. Diese kodieren teilweise für Proteine, die bereits im Zusammenhang mit der Lymphangiogenese bekannt sind, wie beispielsweise Thrombospondin⁵⁷. Auf diese Weise wurde nachgewiesen, dass sich die Methode zur Identifikation neuer endogener Modulatoren der Lymphangiogenese eignet. Zwei dieser Gene, TNF-bezogener Apoptoseligand (TRAIL) und Gewebespezifischer Plasminogenaktivator (tPA), sind in beiden Linien auch auf Proteinebene exprimiert, und zeigten eine höhere Expression in BALB/c. *In vitro* hemmen TRAIL und tPA die Proliferation lymphatischer Endothelzellen und könnten im Zusammenhang zum angiogenen Privileg der Hornhaut stehen^{2,72}.

Daher ist erkennbar, dass die Hornhäute genetisch unterschiedlicher Mauslinien ein gutes Modell für die Identifizierung neuer Modulatoren der Lymphangiogenese wie TRAIL, tPA und Tyrosinase sind².

2.3.1. Rekombinante, durch Inzucht gewonnene Mauslinien (zur Erforschung der Lymphangiogenese)

In genetisch definierten Mauslinien können chromosomale Regionen als „quantitative Eigenschaftsloci“ (QTL/ quantitative trait loci) dargestellt werden, die für die genetische Variation von komplexen Eigenschaften ursächlich sind^{73, 74}.

Sobald quantitative Eigenschaftsloki bei Mäusen identifiziert sind, kann die genetische Analyse auf den Menschen ausgedehnt werden⁷³.

Bei der Kreuzung von durch Inzucht gewonnenen Mauslinien fällt auf, dass nachfolgende Generationen oft Eigenschaften der Lymphgefäße und Lymphangiogenese ausprägen, die in keinem der Tiere der Elterngenerationen vorhanden sind. Dadurch ist erkennbar, dass ein Inzuchtstamm eine große Menge genetischer Variabilität beinhaltet, die Einfluss auf die Lymphangiogenese ausübt¹². Diese kann durch rekombinante, durch Inzucht erzeugte Linien (RIL, recombinant inbred lines) zur Forschung nutzbar gemacht werden⁷³.

Die Lymphangiogenese ist ein quantitatives Merkmal mit verschiedenen Aspekten, die mit morphometrischen Methoden in der Mäusehornhaut zuverlässig quantifiziert werden können.⁷⁵ Um weitere endogene Regulatoren der Lymphangiogenese zu identifizieren wurde ein solcher Inzuchtstamm aus der Mauslinie BALB/c, die vorher eine gering ausgeprägte

Lymphangiogenese zeigte, und C57BL/6 Mäusen, die eine stark ausgeprägte Lymphangiogenese zeigten, miteinander gekreuzt, um eine Population mit genetischer und phänotypischer Varianz zu erzeugen. Durch Quantifizierung der Lymphgefäße und Auswertung mittels QTL-Analyse konnte dabei ein Genlokus auf Chromosom 7 identifiziert werden (Abbildung 5), auf dem sich das Enzym „Tyrosinase“ befindet. Tyrosinase ist ein Schlüsselenzym der Melanin-Biosynthese. Die Melaninproduktion ist beschränkt auf Melanozyten der Haut, der Iris, der Aderhaut, des Pigmentepithels der Netzhaut und des Ziliarkörpers ⁷⁶.

Bei Albino C57BL/6 Tieren, die eine Mutation im Gen für Tyrosinase haben, können signifikant erhöhte Lymphgefäße sowohl mit als auch ohne entzündlichen Stimulus festgestellt werden ¹⁰. Dadurch wurde Tyrosinase als neuer endogener Regulator der Lymphangiogenese validiert.

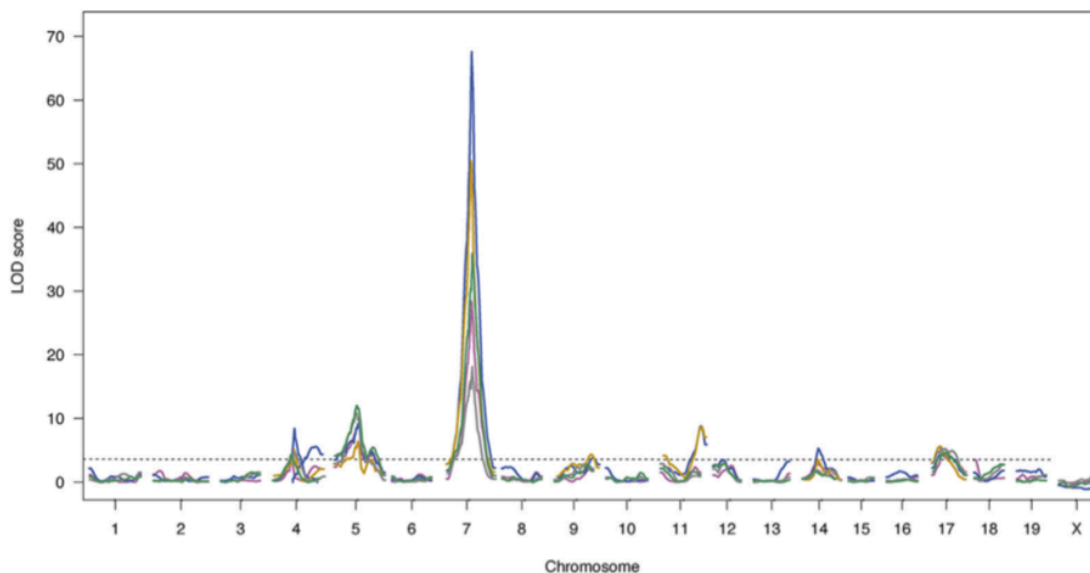


Abbildung 5 QTL-Analyse mit Peak auf Chromosom 7

Der genomweite Wert des Logarithmus der Wahrscheinlichkeiten (LOD, logarithm of the odds) zeigt quantitative Eigenschaftsloci (QTL) von fünf Phänotypen, die im Bezug zur Lymphangiogenese stehen. Genomweite QTL-Profile der Gefäßlänge/mm² (Grün), Gefäßfläche/ (Grau), Gefäßaufzweigungen/mm² (Orange), Gefäßendpunkte/mm² (Blau) und Gefäßaussprossungen/mm² (Lila) von 795 F₂ Tieren wurden abgebildet. Genomweit signifikante Eigenschaftsloci für alle Phänotypen auf den Chromosomen 5, 7, und 17 wurden identifiziert. ¹⁰

2.3.2. Limitationen bisheriger Inzuchtlinien

Die Verpaarung zweier Linien stellt zwar eine valide Methode zu Identifikation potenzieller Genloci dar, birgt jedoch einige Nachteile. Das Verfahren ist extrem zeit- und kostenintensiv und benötigt mehrere Generationen um die Ergebnisse zu bestätigen. ⁷⁷

Zudem nutzen genetische Studien an Mäusen typischerweise lediglich zwei Inzuchtstämme mit phänotypischen Unterschieden, wodurch die genetische Variabilität stark limitiert ist und nicht die genetische Diversität des menschlichen Genoms reflektiert wird. Ein großer Teil der

klassischerweise verwendeten Linien weist darüber hinaus eine gemeinsame Abstammung auf ⁷⁸. Dies führt bei einer rekombinanten Inzuchtlinie dazu, dass genetische Variationen ungleich auf dem Genom verteilt werden und „Blinde Flecke“ entstehen, die nicht abgebildet werden können ⁷⁹. Die Collaborative Cross Linien haben eine deutlich höhere Variabilität ⁸⁰.

2.4. Collaborative Cross Linien

2.4.1. Was sind die Collaborative Cross Linien

Die Collaborative Cross Linien, im Folgenden „CC-Linien“ genannt, sind rekombinante durch Inzucht erzeugte Mauslinien, in der 8 unterschiedlichen Mauslinien tunnelförmig in jeder Kombination verpaart wurden (siehe Abbildung 6). Dabei sind 3 der Linien von Wildmäusen abgeleitet, um die genetische Variabilität zu erhöhen. Bei den Gründersträngen handelt es sich um die Linien A/J, C57BL/6J, 129S1/SvImJ, NOD/LtJ, NZO/HiLtJ, CAST/Ei, PWK/PhJ und WSB/EiJ. ⁷³ Dabei sind CAST/EiJ, PWK/PhJ und WSB/EiJ die von Wildmäusen abgeleiteten Linien, die sich bereits optisch durch ihre kleinere Körpergröße stark von den anderen Linien unterscheiden (Abbildung 6) ⁸¹.

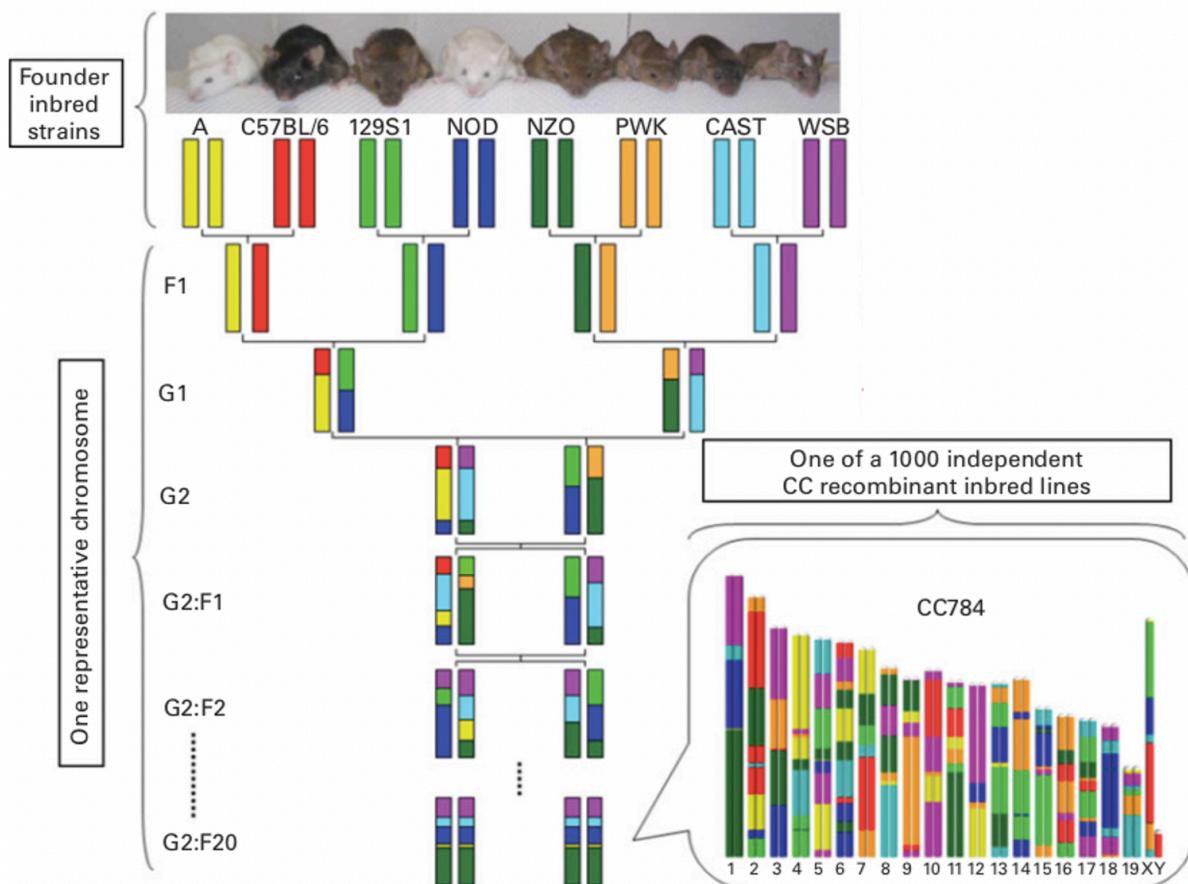


Abbildung 6 Die Collaborative Cross Linien

*Die Collaborative Cross Linien sind mehrfach in verschiedenen Kombinationen verpaarte Mauslinien, die dazu generiert wurden um die humane genetische Variabilität besser abzubilden. Jede einzelne Linie der CC repräsentiert ein genetisches Mosaik der acht Gründerstämme. Diese bestehen aus den 5 klassischen Inzucht-Linien (C57BL A/J, C57BL/6 J, 129S1/SvImJ, NOD/ItJ und HZO/HqLtJ) und drei dem Wildtyp ähnlichen Linien (WSB/EIJ, CAST/EIJ und PWK/PhJ). Die CC-Linien bilden mehr als 90% der Diversität des Menschlichen Genoms ab.*⁸²

Ziel der CC-Linien war es, eine Referenzpopulation zu schaffen, die zur Identifikation und Analyse von genetischen Netzwerken und ursächlichen genetischen Varianten von Krankheiten genutzt werden kann und die Limitationen der bisher verfügbaren rekombinanten durch Inzucht erzeugten Linien umgeht^{83 84 80}.

Die F1 Generation wurde gekreuzt, die F2 Generation wurde gekreuzt und die entstandene Generation wurde 20fach mit sich selbst verpaart⁸¹.

Die Zucht der CC-Linien startete 2004 an drei Orten weltweit. Eine Linie wurde am „Oak Ridge National Laboratory Institute“ in Tennessee gestartet und 2009 zur Universität von North Carolina verlegt. Diese Linien wird als CC-UNC bezeichnet.

Eine weitere Linie wurde am „International Livestock Institute“ in Kenia gestartet und 2006 zur „Tel Aviv University“ in Israel umgesiedelt. Diese Linien werden als CC-TAU bezeichnet.

Eine dritte Linie wurde in Australien durch „Geniad Ltd“ gestartet und wird als CC-GND bezeichnet⁸³.

Die CC-Linien umgehen die Limitationen einer Selektion von nur zwei klassischen rekombinanten Inzuchtlinien und sind so zu einer wichtigen genetischen Ressource geworden⁸⁰. Heute bestehen die CC-Linien aus etwa 100 Linien⁸¹.

2.4.2. Vorteile der Collaborative Cross Linien

Durch die Kombination von 8 Gründerlinien, von denen 3 von Wildmäusen abgeleitet sind, fließen über 90% der genetischen Variabilität der Spezies Maus in die CC-Linien ein und können zur QTL-Analyse genutzt werden⁸⁰.

Die Variabilität wird dabei durch die Hinzunahme der von den Wildmäusen abgeleiteten Linien gleichmäßig über das Genom verteilt. Dabei liegt eine ausgewogene Allelfrequenz vor⁸¹.

Somit stellen die CC-Linien eine nützliche Ressource da, die bereits zur Identifikation vieler Gene und komplexer Eigenschaften genutzt werden konnte. Ein aktuelles Beispiel für den Einsatz der CC-Linien ist ihre Charakterisierung im Hinblick auf und zur Forschung an diabetischer Retinopathie.⁸⁵

2.4.3. Nachteile der Collaborative Cross Linien

Die Nachteile der CC-Linien ergeben sich in erster Linie aus der Haltung und der schlechten Reproduktion und kurzen Lebensspanne mancher Linien.

Einige Linien (NOD/ShiLtJ und NZO/HILtJ) erkranken nach 4 bis 6 Monaten an Diabetes, was die Haltung erschwert. Andere Linien sind adipös (NZO/HILtJ), wodurch sie nur kurze Zeit nach Erreichen der Geschlechtsreife zur Fortpflanzung in der Lage sind ⁸¹.

Mehr als 50% der Linien sterben aus. Der Grund dafür sind vermutlich inkompatible Kombinationen von Allelen in verschiedenen Subspezies ⁸¹.

Es ist nicht möglich, die „Blinde Flecke“ komplett zu vermeiden.

2.5. Zielsetzung

Durch die Verpaarung zweier phänotypisch verschiedener Tiere konnten bereits einige neue endogene Modulatoren der Lymphangiogenese, wie die Tyrosinase und die Cystathionine β -synthase, identifiziert werden. Jedoch ist diese Verpaarung sehr zeitintensiv, es müssen sehr viele Tiere untersucht werden und das Genom spiegelt nicht die Diversität des humanen Genoms wider. Um die Diversität des humanen Genoms besser abzubilden und die Zeitintensität einzelner Verpaarungen zu umgehen sind die Collaborative Cross Linien entwickelt worden. Daher ist die Hypothese durch die Verwendung einzelner CC-Linien mit wenigen Replikaten weitere Modulatoren der Lymphangiogenese zu identifizieren können. Ziel dieser Versuchsreihe ist die Lymphgefäße der naiven Hornhäute der CC-Linien auf phänotypische Unterschiede zu untersuchen und die Eignung für die Kartierung endogener Regulatoren der Lymphangiogenese zu prüfen. Anhand der quantifizierten phänotypischen Merkmale sollen mittels QTL-Analyse potenzielle neue Genloci im Zusammenhang mit der Lymphangiogenese identifiziert werden.

Dazu wurden die Hornhäute von 59 Tieren aus 22 Linien der Collaborative Cross Linien auf ihre Lymphgefäßfläche, die Anzahl der Lymphgefäßendpunkte, Lymphgefäßverzweigungspunkte und Lymphgefäßneusprossungen hin untersucht und quantifiziert. Die QTL-Analyse erfolgte durch das Institut für Humangenetik an der Universität Erlangen.

Durch die Identifikation neuer Modulatoren der Lymphangiogenese könnten zukünftig neue Ansatzpunkte für therapeutische Interventionen, unter anderem auf dem Gebiet der Hornhauttransplantation, entwickelt werden.

3. Material und Methoden

3.1. Ausrüstung

Name	Modell	Hersteller
Pipetten	Eppendorf Research Plus 100-1000ul	Eppendorf AG
Mikroskop für die Präparation	Olympus SZ61	Olympus Deutschland GmbH
Lampe für die Präparation	KL 1500 compact	Schott GmbH
Automatisches Fluoreszenzmikroskop	Olympus BX63	Olympus Deutschland GmbH
Mikroskop- Digitalkamera	Olympus XM10	Olympus Deutschland GmbH
Kamera-Adapter	Olympus U-TV0,5XC-3	Olympus Deutschland GmbH

Tabelle 1 Ausrüstung

3.2. Chemikalien und Medien

Name	Hersteller
PBS	PanReac AppliChem
Triton	Sigma Aldrich
Magnesium	VWR
Calcium	VWR

Tabelle 2 Chemikalien und Medien

3.3. Material

Material	Modell	Hersteller
Zellkulturschale	„Petri Dish“	BD Falcon
Mikroreaktionsgefäße 1,5 ul	Micro tube 1,5 ml Safe Seal	Sarstedt AG & Co. KG
Pipettenspitzen	Quality Pipette Tips	Sarstedt AG & Co. KG

Präparationsbesteck (Schere, Pinzette)	Geuder AG	
Objektträger	Deckgläser Nr. 1 24mm x 60mm	Th. Geyer GmbH & Co. KG
Deckglas	Cover Glass 24mm x 24mm, Thickness No.1, Borosilicate Glass	VWR International
Eindeckmedium	Fluorescence Mounting Medium	Dako

Tabelle 3 Verbrauchsmaterialien

3.4. Antikörper für Immunhistochemie

3.4.1. Primäre Antikörper

Name	Hersteller
CD31	Origene Clone ERMP12
Lyve1	Gentauer

Tabelle 4 Primäre Antikörper für die Färbung der Flachpräparate

3.4.2. Sekundäre Antikörper

Name	Mischverhältnis	Hersteller
Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (H+L)	2 mg/mL	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific – Life Technologies Corporation
Alexa Fluor 555goat anti-rat IgG (H+L)	2 mg/mL	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific – Life Technologies Corporation

Tabelle 5 Sekundäre Antikörper für die Färbung der Flachpräparate

3.5. Software

Name	Version	Hersteller
CellF	3.4	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg Germany
Prism Graphpad	8.4.0	GraphPad Software
ImageJ	1,53a	Wayne Rasban Institutes of Health, USA
Excel	16.39	Microsoft

Tabelle 6 Software für die Erstellung, Bearbeitung und Auswertung der Bilder

3.6. Studiendesign

22 Mauslinien der Collaborative Cross Linien wurden genutzt, um Flachpräparate der naiven Hornhäute zu generieren. Diese wurden genutzt, um immunhistochemisch gefärbte Aufnahmen der limbalen und in die Hornhaut eingesprossenen Lymph- und Blutgefäße zu generieren.

Die Lymphgefäße wurden nach folgenden Kriterien quantifiziert:

- Die anteilige Fläche der Lymphgefäße an der Gesamtfläche der Hornhaut,
- Die Anzahl an Verzweigungspunkten der Lymphgefäße,
- Die Anzahl an Gefäßendpunkten von Lymphgefäßen innerhalb der Hornhaut,
- Die Anzahl an Gefäßausprossungen aus dem limbalen Gefäß von Lymphgefäßen in die Hornhaut,
- Der Gefäßdurchmesser des limbalen Gefäßes.

Dazu wurde eine semi-automatische Methode, die auf dem Programm cell^F (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Germany) basiert, genutzt. Die Analyse basiert auf der Detektion von Grauwerten, bei denen hauptsächlich Lymph- und Blutgefäße angezeigt werden. Durch Softwarefilter wird verhindert, dass andere Objekte markiert werden ⁷⁵. Nachträglich werden falsch-positiv markierte Gebiete manuell gelöscht und falsch-negative manuell hinzugefügt.

Die daraus resultierenden Daten wurden genutzt, um eine QTL-Analyse am Institut für Humangenetik an der Universität Erlangen durchzuführen.

3.6.1. Mäuse

Bei den Tieren handelt es sich um Mäuse der „Collaborative Cross“ Linien. Die CC-Linien wurden von der Collaborative Cross Gesellschaft seit 2002 angelegt, um eine integrative Analyse von komplexen Systemen zu ermöglichen und Interaktionen zwischen Allelen und der Umgebung bei der Entstehung von komplexen Krankheiten aufzudecken ⁸¹.

Bei den hier genutzten Tieren handelt es sich um Mäuse, die in Australien gezüchtet und genutzt worden sind, um die Organe für verschiedene andere Experimente zu untersuchen, bei denen die Augen keine Verwendung fanden. Das heißt, es wurden keine Mäuse primär für diese Versuchsreihe getötet, sondern die Augen von Mäusen der CC-Linien für andere Versuche konnten auf diese Weise nutzbringend weiterverwendet werden und wären ansonsten vernichtet worden.

Die Bulbi mitsamt Sehnerv wurden beim Züchter entnommen und 4 Stunden in PFA fixiert, in PBS gewaschen, über Nacht bei 4 Grad in Sucroslösung gelagert und am nächsten Tag ohne Flüssigkeit bei -80 Grad eingefroren.

3.7. Vorbereitung der Flachpräparate und Immunhistochemie

Die Hornhäute wurden mit Hilfe von Operationsbesteck unter mikroskopischer Sicht von der Linse entnommen und in 1000µl phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) in Mikroreaktionsgefäßen aufbewahrt.

Der nicht verwendete Teil des Auges wurde zur eventuellen RNA-Extraktion bei -80 Grad verwahrt.

Bei zwei Waschdurchgängen wurde jeweils das PBS ausgetauscht und die Hornhäute fünf Minuten auf einen Schüttler gestellt.

Das PBS wurde entnommen und 50µl von 2% BSA in PBS mit 0,1% Triton; 1mM MgCl₂; 0,1mM CaCl₂ hinzugegeben und die Hornhäute für zwei Stunden zur Fixierung auf den Schüttler gestellt.

Die Antikörper LYVE-1 und CD31 wurden im Verhältnis 1:200 zu 2% BSA in PBS mit 0,1% Triton, 1mM MgCl₂, 0,1mM CaCl₂ gemischt und 50µl auf die Hornhäute gegeben, nachdem das 2% BSA in PBS mit 0,1% Triton, 1mM MgCl₂; 0,1mM CaCl₂ entfernt wurde. Die Hornhäute mit den Antikörpern wurden über Nacht im Kühlschrank bei 4 Grad gelagert.

Die Hornhäute wurden entnommen und 3-mal fünf Minuten in 1000µl PBS auf den Schüttler gestellt

Die Antikörper anti-rat Alexa555 und anti-rabbit Alexa488 wurden im Verhältnis 1:100 zu 2% BSA in PBS mit 0,1% Triton, 1mM MgCl₂, 0,1mM CaCl₂ gemischt und 50µl auf die Hornhäute gegeben, nachdem das PBS entfernt wurde.

Die Mikroreaktionsgefäße wurden in Dunkelheit für 45 Minuten auf einen Schüttler gestellt.

Die Antikörper wurden entnommen und die Hornhäute 2-mal mit 1000µl PBS mit 0,1% Triton, 1mM MgCl₂; 0,1mM CaCl₂ gespült und jeweils 5 Minuten bei Dunkelheit auf den Schüttler gestellt

Das PBS mit 0,1% Triton, 1mM MgCl₂, 0,1mM CaCl₂ wurden durch 1000µl reines PBS ersetzt und für 5 Minuten bei Dunkelheit auf den Schüttler gestellt.

Die Hornhäute wurden unter mikroskopischer Sicht auf einen Objektträger mit dem Endothel in Richtung des Objektträgers ausgebreitet und mit einem Tropfen Eindeckmedium und einem Deckglas bedeckt und anschließend abgedunkelt bei 4°C gelagert.

Die doppelt gefärbten Flachpräparate wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (BX63, Olympus Optical Co., Hamburg, Germany) analysiert und digitale Bilder wurden mit einer Kamera (Olympus XM10) erstellt ⁷⁵.

3.8. Aufarbeitung der Bilder und Quantifizierung der Parameter Gefäßfläche, Gefäßendpunkte, Gefäßverzweigungen und Gefäßneusprossungen für die QTL-Analyse

3.8.1. Digitale Bildanalyse:

Eine semiautomatische Methode, basierend auf dem Programm cell[^]F (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Germany), wurde genutzt um die von Lymph- und Blutgefäßen bedeckte Fläche zu detektieren.

Dabei wurden vier Filter genutzt, um das Bild für die automatische Detektion der Gefäße durch die Software aufzuarbeiten ⁷⁵.

3.8.2. DCE Filter (Differential Contrast Enhancement-Filter)

Zunächst kontrastierte der DCE-Filter schwer zu unterscheidende Strukturen. Dadurch wurde das Bild detaillierter und der Fokus schärfer ⁷⁵.

3.8.3. Erosion Filter:

Der Erosion Filter ist ein morphologischer Filter, der punktuell Rauschen entfernt. Der Filter identifizierte den tiefsten Grauwert in einer definierten Pixelregion und ersetzte den zentralen Pixel durch diesen Grauwert ⁷⁵.

3.8.4. Gradient-Filter

Der Filter Gradient ist eine Kombination der Filter Erosion und Dilatation und eine arithmetische Subtraktion mit dem Ziel, letzte Überschneidungen zu entfernen und den äußeren Rand der Gefäße darzustellen. Das originale Bild wurde zunächst erodiert. Parallel wurde das originale Bild ausgeweitet. Dabei wurden kleine Löcher und Unregelmäßigkeiten vom Gefäßrand gelöscht. Das resultierende, erweiterte Bild wurde vom erodierten Bild subtrahiert.

Insgesamt wurden Ränder und Kanten hervorgehoben ⁷⁵.

3.8.5. Kontrast-Filter:

Das Bild wurde wie folgt kontrastiert: Die hellsten und dunkelsten 3% der Pixel wurde ausgeblendet und der Intensitätsbereich der verbleibenden Pixel maximal linear ausgebreitet. Hauptsächlich dunkle und hauptsächlich helle Areale blieben unverändert. Der Kontrast von durchgängig erhellten Arealen wird erhöht ⁷⁵.

3.8.6. Definition des Bereichs von Interesse (region of interest/ROI)

Die Fläche der Hornhaut wurde durch den Verlauf des limbalen Gefäßes begrenzt. Um diese Fläche zu bestimmen, wurde der Verlauf des limbalen Gefäßes manuell und exakt mit einer Linie markiert. Dabei verlief die ROI am peripheren Rand des limbalen Gefäßes. An Stellen, an denen kein limbales Lymphgefäß existierte, erfolgte eine Orientierung an den Blutgefäßen. Die Fläche des ROI definierte die Gesamtfläche der Hornhaut (Abbildung 7).

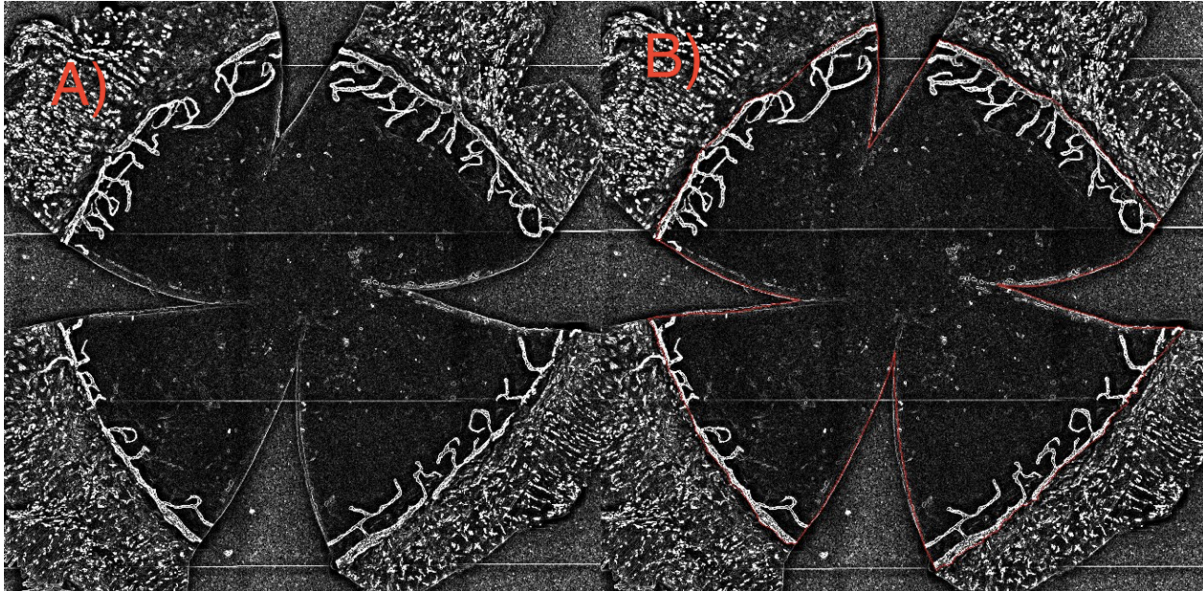


Abbildung 7 Definition des Bereichs von Interesse

A: Flachpräparat vor Definition der Fläche B: Die Region von Interesse (region of interest/ROI) hier in Rot wird um das limbale Gefäß gelegt und gibt die Begrenzung der Hornhaut an.

3.8.7. Markierung der Gefäße

Nach der Vorverarbeitung durch die oben genannten Filter wurden die Gefäße über eine Schwellenwerttransformation, bei der dem Gefäß zugehörigen Pixeln der Wert 1 (weiße Pixel) und Pixeln im Hintergrund der Wert 0 (schwarze Pixel) zugewiesen wird, markiert und angefarbt.^{75,86} Dabei kam es häufig zu falsch-positiv markierten Gefäßen und zu falsch-negativ markierten Bereichen, die vom Programm nicht richtig erkannt wurden. Diese wurden manuell

nachbearbeitet indem falsch-positiv markierte Bereich gelöscht und falsch-negative Bereich hinzugefügt werden (Abbildung 8).

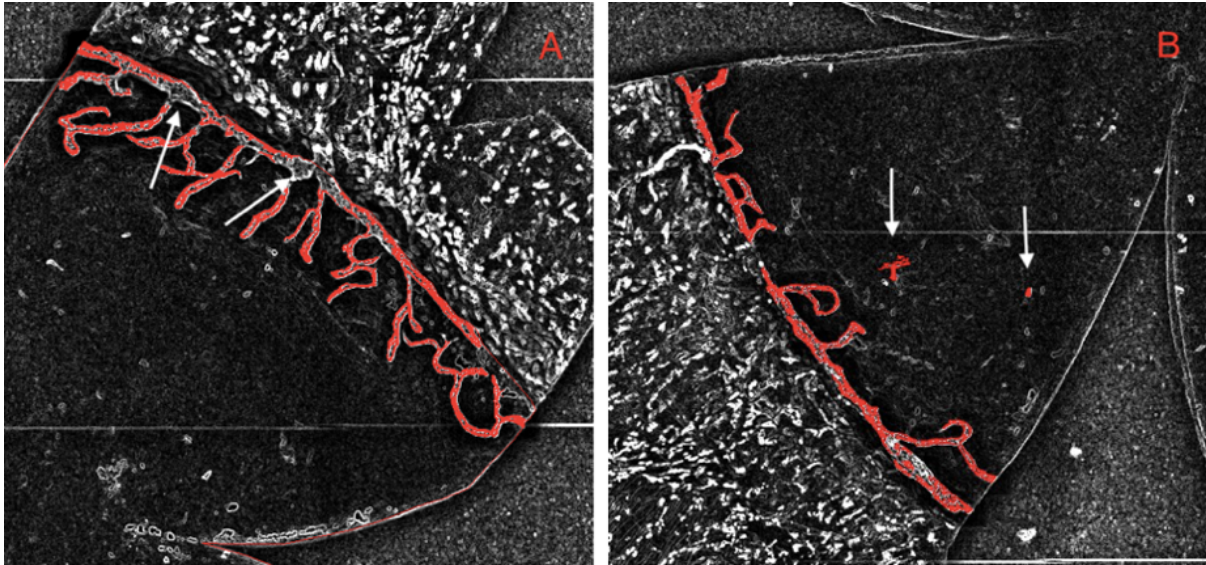


Abbildung 8 Markierung der Gefäße

A Falsch-negativ markierte Areale, die nicht angefärbt wurden und manuell nachgearbeitet. B Falsch-positive Areale, sind Artefakte die fälschlicherweise als Lymphgefäße detektiert werden. Diese werden anschließend manuell entfernt

3.8.8. Gefäßfläche

Die anteilig von den Lymphgefäßen bedeckte Fläche wurde mit Hilfe des Bildanalyseprogrammes cellF 3.4 (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg Germany) detektiert.

Dabei wurde die Gesamtfläche definiert, indem das limbale Gefäß als äußere Grenze genutzt wurde. Das limbale Gefäß wurde dabei genau durch die Erstellung eines ROI (region of interest) eingeschlossen.

Die LYVE1-positiven Lymphgefäßstrukturen und die CD31-positiven Blutgefäße wurden durch Schwellenwerteneinstellungen detektiert, die die hellen Gefäße ein- und den dunklen Hintergrund ausschließen.

Die Lymphgefäßfläche wurde mit der Gesamtfläche des ROI ins Verhältnis gesetzt, um das anteilige Verhältnis der Lymphgefäßfläche an der Gesamtfläche zu ermitteln. Dies geschah durch Detektion der markierten Fläche durch das Programm CellF.

3.8.9. Gefäßneussprossungen

Als Gefäßneussprossungen wurden Lymphgefäße definiert, die aus dem limbalen Gefäß in die Hornhaut sprießen und bei denen sich das limbale Gefäß beidseitig der Aussprossung fortsetzte (Abbildung 9).

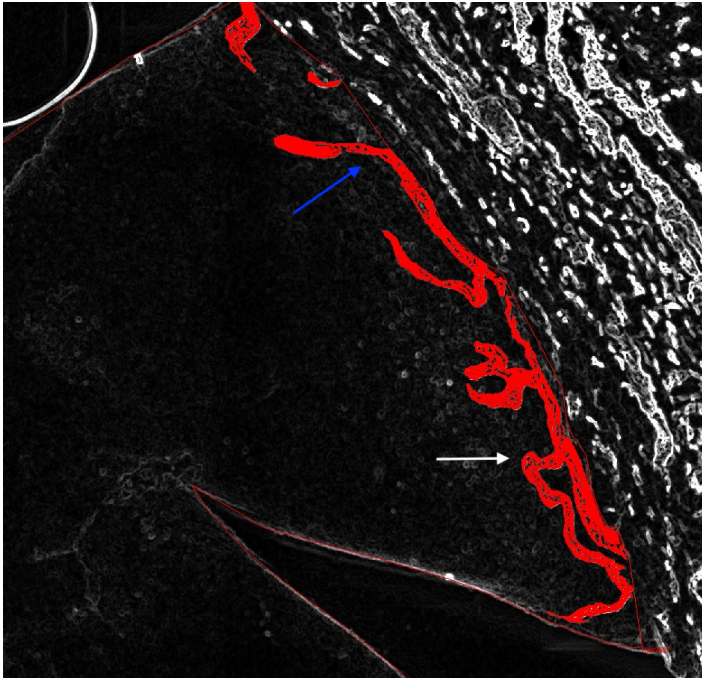


Abbildung 9: Gefäßneusprossungen

Weißer Pfeil: Es handelt sich um eine Gefäßneusprossung, da das Gefäß als neues Gefäß aus dem limbalen Gefäß entsteht. Blauer Pfeil: Es handelt sich nicht um eine Gefäßneusprossung, weil sich das limbale Gefäß in die Hornhaut fortsetzt.

3.8.10. Gefäßverzweigungen

Als Gefäßverzweigungen wurden Punkte definiert, bei denen sich das Lymphgefäß in zwei nachvollziehbare Gefäße mit eigenem, erkennbarem Verlauf teilte (Abbildung 10).

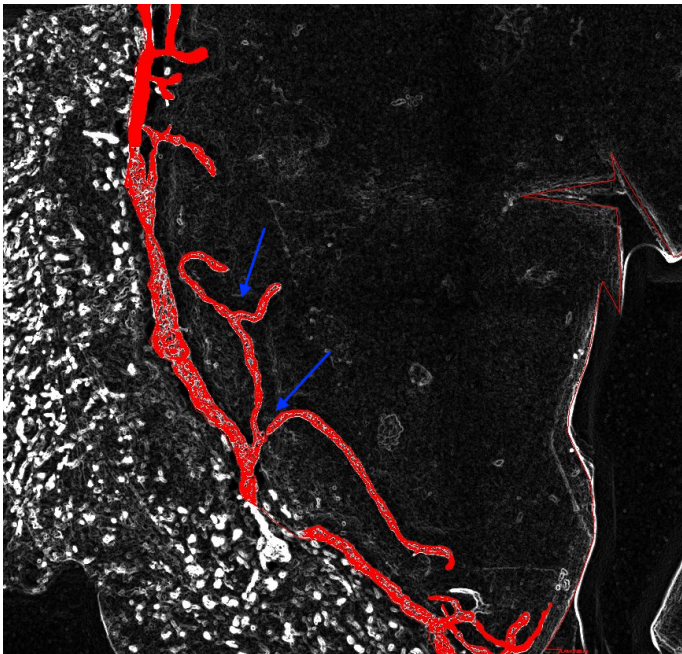


Abbildung 10 Gefäßverzweigungen

Die blauen Pfeile markieren Lymphgefäße, die sich in zwei Gefäße mit eigenem klar erkennbarem Verlauf teilen.

3.8.11. Gefäßendpunkte

Als Gefäßendpunkte wurden Punkte definiert, an denen Lymphgefäße innerhalb der Hornhaut enden. Gefäße, die innerhalb des ROI begannen und außerhalb des ROI endeten, wurden nicht als Gefäßendpunkte gezählt (Abbildung 11).

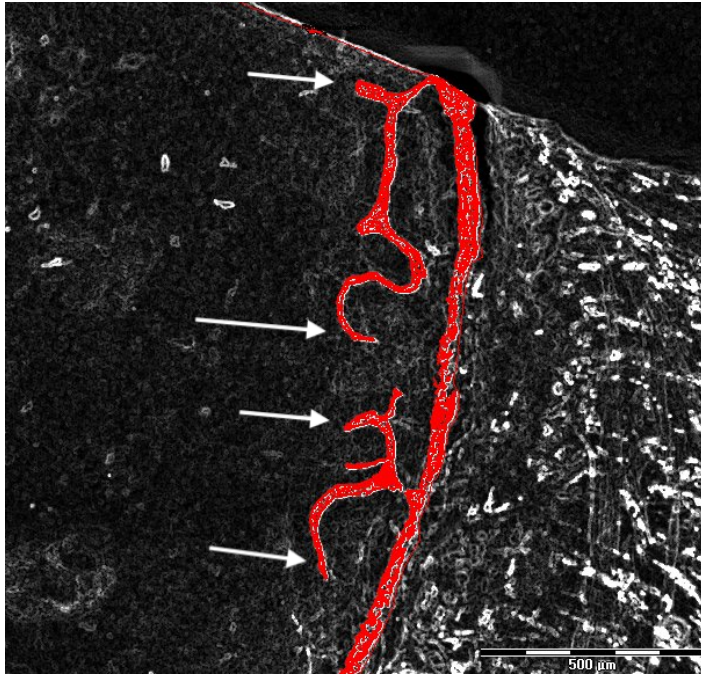


Abbildung 11: Gefäßendpunkte
Die weißen Pfeile markieren Gefäßendpunkte in der Hornhaut.

3.8.12. Durchmesser des limbalen Gefäßes

Im Abstand von 500µm wurde mit Hilfe von Image J im vollständigen Verlauf des Limbus der Durchmesser des limbalen Gefäßes gemessen und später aus den Messwerten der Durchschnitt errechnet. Dabei wurde nur an Punkten gemessen, an denen auch ein limbales Gefäß vorhanden war; im Falle eines nicht vorhandenen limbalen Gefäßes wurde der Punkt übersprungen und nach 500µm erneut gemessen.

3.9. Kartierung und QTL-Analyse

3.9.1. Datengrundlage

Die Kartierung wurde auf Grundlage der gemessenen phänotypischen Ausprägungen Lymphgefäßfläche, -neusprossungen, -verzweigungen, -endpunkte sowie durchschnittlicher Gefäßdurchmesser des limbalen Gefäßes der Linien mit mindestens 3 Proben sowie der SNP-Genotypen erstellt. Die SNP-Genotypen wurden von Professor Morahan mit Bead Arrays der MegaMUGA bzw. GigaMUGA-Generation erstellt und von Christian Büttner auf Mausgenom mm9 designt, auf mm10 gehoben und nach den Vorschlägen von K. Broman auf Fehlerfreiheit geprüft.⁸⁷

3.9.2. Kartierung

Die Methode der Intervall-Kartierung über Linkage mit Restriktionslängenpolymorphismen als Marker wurde unter Nutzung des „R-Paket qtl2“ in der R Statistik-Umgebung (Version 4.0.3) durchgeführt.^{74 88}

Dabei bezieht sich die Kartierung auf eine genetische Karte, die den geschlechterspezifischen Unterschieden sowie der Heterogenität mitotischer Rekombinationen Rechnung trägt. Die resultierenden Loci wurden dadurch primär in cM angegeben, können aber in Megabasen übersetzt werden.⁸⁹

Für die Kartierung wurden die Marker durch ein gleichmäßig verteiltes Raster an Pseudomarkern im Abstand 0,5 cM ersetzt und mit einer maximalen Fehlerrate der Arrays von 0.05 die Wahrscheinlichkeit der Gründerstränge der CC-Linien errechnet. Über eine stringenten Error LOD-Obergrenze von 2 wurden verbleibende scheinbare Doppelrekombinationen in geringem Abstand ausgeschlossen. Die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den verwendeten CC-Linien wurden über eine die gesamten Genome umfassende Kinship-Matrize berücksichtigt. Die X-Kovariante wurde mit der Funktion `get_x_covar` berücksichtigt, darüber hinaus wurden keine Kovarianten für die Kartierung verwendet.

Die LOD-Kurven sind das Ergebnis eines ein-Lokus- und ein-Phänotyp-Scans (Funktion `qtl2::scan1`). Die Schwellenwerte für die genomweite Signifikanz für eine Konfidenz von 0.001, 0.01, 0.05, 0.1 und 0.33 wurden für die Autosomen und das X-Chromosom getrennt mit mindestens 1000 Permutationen ermittelt.

4. Ergebnisse

4.1. CC-Linien in der Immunfluoreszenz

Um die verschiedenen CC-Linien zu vergleichen wurden Flachpräparate der Hornhäute präpariert und mit dem Marker für den Hyaluronanrezeptor 1 lymphatischer Gefäße (LYVE-1) angefärbt. Für die Ermittlung der Gesamtfläche der Hornhaut wurde das limbale Gefäß als äußere Grenze definiert.

Bereits bei der makroskopischen Untersuchung der Gefäßfläche unterschieden sich die CC-Linien phänotypisch untereinander und im Vergleich zur bekannten hoch-lymphangiogenen C57BL/6 Linie in der Menge und Form der Lymphgefäße.

Die untersuchten Linien enthalten sowohl augenscheinlich stark vaskularisierte Linien (beispielsweise FIV, HAX2, LAM2, NUK, Abbildung 12) mit mehr Lymphgefäßen als C57BL/6 als auch Linien mit extrem niedrig ausgeprägter oder fehlender Lymphgefäßarchitektur (beispielsweise LUV, LOT, PAT, YID (Abbildung 12)).

Dabei fällt auf, dass die Linien FIV und HAX2 zwar beide augenscheinlich eine große anteilige Lymphgefäßfläche aufweisen, jedoch unterschiedliche Gefäßstrukturen. Während die Linie FIV über ein ausgeprägtes limbales Gefäß verfügt, ist bei der Linie HAX2 nur in wenigen Abschnitten überhaupt ein limbales Gefäß mit wenigen Gefäßneusproßungen vorhanden. Darüber hinaus zeigte HAX2 eine stark vernetzte Lymphgefäßstruktur in Form vieler Gefäßverzweigungen und Endpunkte (Abbildung 12). Um diese verschiedenen CC-Linien nun weiter quantitative Auszuwerten, haben wir die morphometrischen Parameter, wie die anteilige Lymphgefäßfläche, die gesamt Hornhautfläche, die Anzahl der Gefäßneusproßungen, die Anzahl der Gefäßverzweigungen, die Anzahl der Gefäßendpunkte und den Durchmesser des limbale Gefäßes bestimmt.

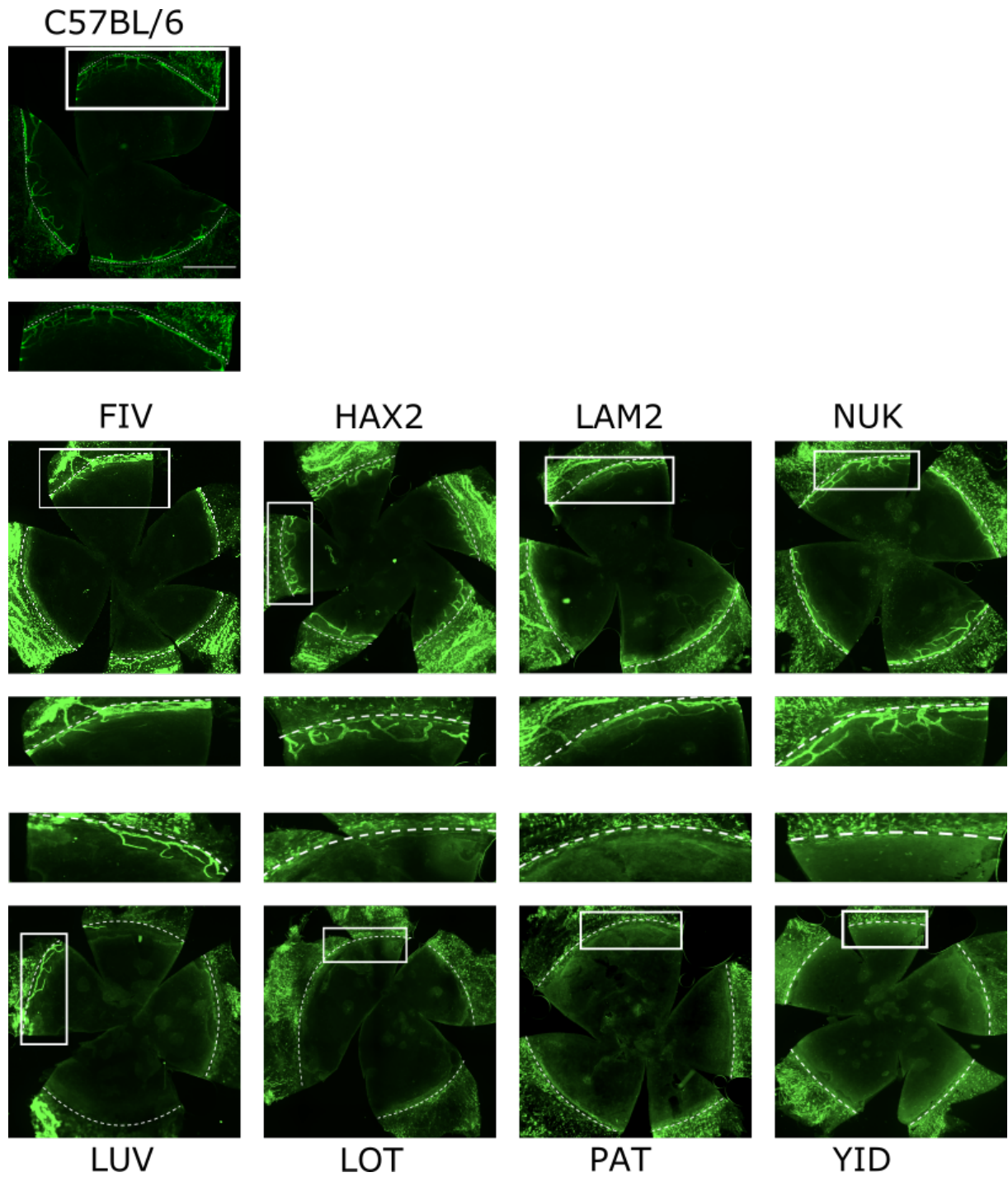


Abbildung 12 Immunfluoreszenzaufnahmen der Flachpräparate

C57BL/6 dient als Referenz. FIV, HAX2, LAM2 und NUK zeigen eine große anteilige Lymphgefäßfläche. LUV, LOT, PAT und YID zeigen eine niedrige anteilige Lymphgefäßfläche. Gestrichelte Linien = Abgrenzung des limbalen Gefäßes.

4.2. Gesamtfläche der Hornhaut und anteilige Lymphgefäßfläche

Als erster quantitativer Parameter wurde die Lymphgefäßfläche bestimmt und zur Gesamtfläche der jeweiligen Hornhaut ins Verhältnis gesetzt um eine Vergleichbarkeit verschieden großer Hornhäute zu ermöglichen (Abbildung 13).

Die durchschnittliche Gesamtfläche der Hornhaut variierte dabei um bis zu 28% zwischen den verschiedenen CC-Linien. Die größte durchschnittliche Gesamtfläche der Hornhaut zeigte die Linie FIV mit einer Fläche von 9,92mm². Die kleinste durchschnittliche Gesamtfläche der Hornhaut zeigte die Linie LAT mit 7,75 mm².

Die Linien LAM2 und SEH zeigten eine sehr signifikant kleinere ($p < 0,01$) und ZIF2 eine hoch signifikant kleinere ($p < 0,001$) Gesamtfläche der Hornhaut im Vergleich zu C57BL/6 (Abbildung 13).

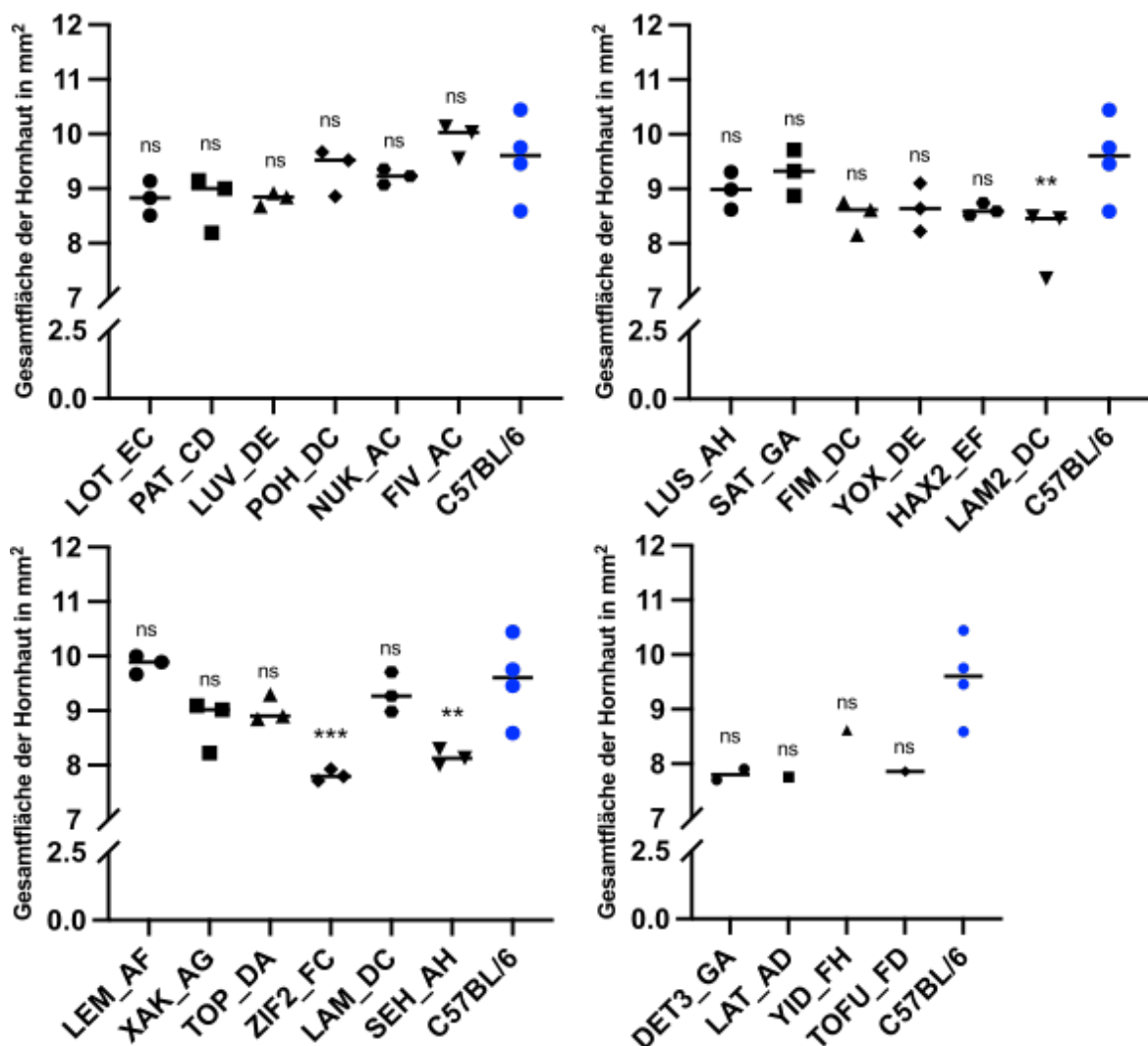


Abbildung 13 Gesamtfläche der Hornhaut

Die Gruppen wurden nach der Standardabweichung der anteiligen Lymphgefäßfläche (Abbildung 14 gebildet) Oben links: Gruppe 1 der CC-Linien mit geringster Standardabweichung, oben rechts: Gruppe 2 mit mittlerer Standardabweichung, unten links: Gruppe 3 mit großer Standardabweichung, unten rechts Gruppe 4 mit CC-Linien mit $n < 3$.

Bei den untersuchten CC-Linien erkennt man Linien, die kaum (unter 1% der Fläche), bzw. eine nicht vorhandene Gefäßarchitektur (LUV, LOT, PAT, YID) aufweisen, sowie CC-Linien bei denen eine stark vaskularisierte Hornhaut zu beobachten sind

Die Linien NUK, FIV, HAX2 und LAM2 zeigen deutlich mehr Lymphgefäßfläche als der „hochlymphangiogene“ Stamm C57BL/6, der hier als Referenzgröße verwendet wurde (Tabelle 7, Abbildung 14). Dieser zeigte eine durchschnittliche Gefäßfläche von 3,445%.

Linie	Anteilige Gefäßfläche in %	Gesamtfläche Hornhaut in mm ²	Gefäßneusprossungen pro mm ²	Gefäßverzweigungen pro mm ²	Gefäßendpunkte pro mm ²	Durchmesser des limbalen Gefäßes in µm
FIV	6,36 ±0,30	9,9 ±0,25	2,37 ±0,78	0,98 ±0,44	2,54 ±0,94	59,88 ±8,33
LAM2	5,60 ±0,44	8,98 ±0,53	4,48 ±1,01	2,93 ±0,61	5,09 ±0,28	36,17 ±1,40
HAX2	5,45 ±0,81	8,62 ±0,09	1,12 ±0,15	2,94 ±0,36	5,30 ±0,42	30,66 ±3,96
NUK	5,40 ±0,22	9,22 ±0,12	1,66 ±0,07	2,10 ±0,26	4,38 ±0,18	35,34 ±0,38
DET3	5,13 ±0,67	7,80 ±0,10	3,08 ±0,42	1,60 ±0,08	4,62 ±0,31	34,99 ±4,85
LAM	4,99 ±1,05	9,32 ±0,30	2,35 ±1,05	3,11 ±0,84	4,92 ±1,55	34,51 ±1,40
LAT	4,67 ±	7,75 ±0	1,55 ±	1,42 ±	5,29 ±	34,99 ±
SEH	3,12 ±1,43	8,14±0,12	1,67 ±0,97	0,86 ±0,36	2,53 ±1,13	32,60 ±1,62
LEM	2,79 ±1,43	9,85±0,14	2,24 ±1,74	1,05 ±0,06	2,61 ±1,24	32,42 ±4,76
POH	2,75 ±0,27	9,35±0,35	0,94 ±0,22	1,11 ±0,14	2,61 ±0,32	32,18 ±6,72
TOP	2,11 ±1,50	9,02±0,20	1,22 ±0,78	0,44 ±0,27	1,56 ±0,72	26,22 ±5,07
TOFU	2,19 ±	7,86±	0 ±	0 ±	0 ±	32,00 ±
SAT	1,66 ±0,53	9,3 ±0,34	0,96 ±0,54	0,07 ±0,05	1,17 ±0,42	26,61 ±4,69
YOX	1,56 ±0,45	8,65 ±0,36	0,40 ±0,28	0,43 ±0,31	1,05 ±0,30	26,89 ±2,81
ZIF2	1,48 ±1,03	7,81 ±0,09	0,51 ±0,41	0 ±0	0,60 ±0,59	24,92 ±1,18
XAK	1,39 ±0,99	8,8 ±0,39	0,51 ±0,40	0,11 ±0,09	0,77 ±0,48	29,98 ±7,78
FIM	1,35 ±0,97	8,51 ±0,25	0,47 ±0,50	0,12 ±0,16	0,94 ±0,75	21,57 ±15,52
LUS	1,26 ±0,68	8,98 ±0,28	1,12 ±0,28	0,77 ±0,25	1,57 ±0,51	24,78 ±5,26
LUV	0,78 ±0,15	8,82 ±0,10	0,38 ±0,20	0,19 ±0,19	0,72 ±0,15	25,17 ±6,47
LOT	0,10 ±0,07	8,83 ±0,20	0 ±0	0 ±0	0,07 ±0,10	0 ±
PAT	0,07 ±0,10	8,78 ±0,42	0 ±0	0,04 ±0,06	0,08 ±0,12	8,36 ±11,82
YID	0 ±	8,62 ±	0 ±	0 ±	0 ±	0 ±
C57BL/6	3,45 ±0,34	9,56 ±0,67	2,17 ±0,06	1,16 ±0,33	3,06 ±0,42	27,93 ±3,97

Tabelle 7 Die Tabelle zeigt die Mittelwerte und Standardabweichung der erhobenen Parameter „Anteilige Gefäßfläche“, „Gesamtfläche der Hornhaut“, „Gefäßneusprossungen pro mm²“, „Gefäßverzweigungen pro mm²“, „Gefäßendpunkte pro mm²“ und „Gefäßdurchmesser des limbalen Gefäßes“

Bei den untersuchten Linien zeigte sich eine heterogene Verteilung der Messwerte. Es lassen sich verschiedene Gruppen nach der Standardabweichung abgrenzen (Abbildung 14 Gefäßfläche). In der ersten Gruppe befinden sich die Linien mit niedriger Standardabweichung der Messwerte. In dieser Gruppe gab es hoch signifikante Abweichungen von C57BL/6 bei allen 6 Linien. LOT, PAT, und LUV zeigten eine hoch signifikant ($p < 0,0001$) geringere und POH eine signifikant ($p < 0,05$) geringere Lymphgefäßfläche, wohingegen NUK und FIV eine hoch signifikant ($p < 0,0001$) höhere Lymphgefäßfläche im Vergleich zu C57BL/6 zeigten.

Auch bei den Linien der Gruppe 2 mit mittlerer Standardabweichung der Messwerte zeigten sich signifikante Abweichungen. Die Linien LUS, SAT, FIM und YOX zeigten eine signifikant ($p < 0,05$) geringere Gefäßfläche im Vergleich zu C57BL/6, wohingegen HAX2 und LAM2 eine signifikant ($p < 0,05$) größere Lymphgefäßfläche im Vergleich zu C57BL/6 zeigten.

Die Linien LEM, XAK, TOP, ZIF2, LAM und SEH der Gruppe 3 zeigten eine größere Abweichung der Lymphgefäßfläche, wobei keine signifikanten Unterschiede zu C57BL/6 erkennbar waren. Die Linien DET3, LAT, YID und TOFU beinhalteten weniger als 3 Messwerte pro Linie und bilden die 4. Gruppe.

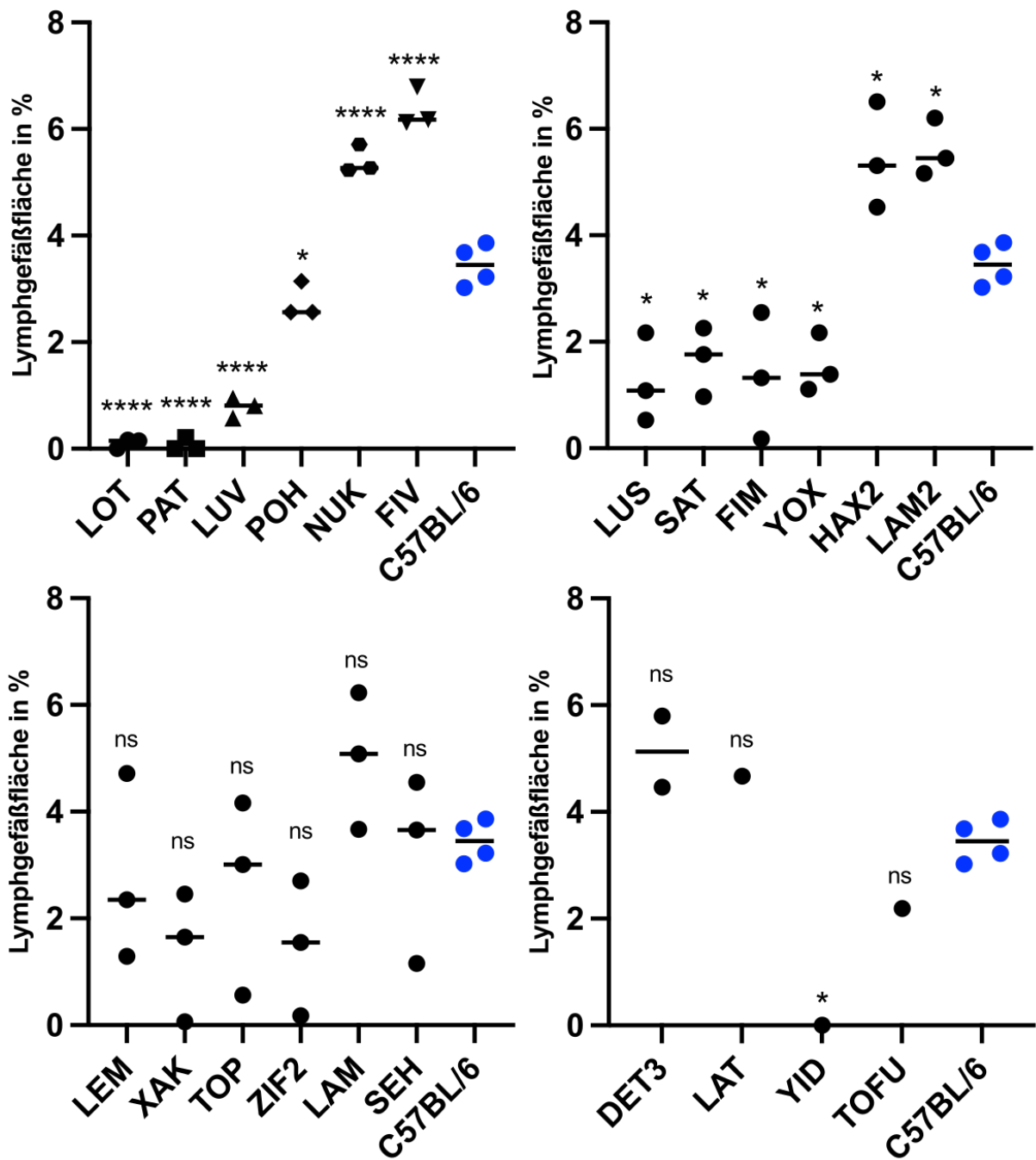


Abbildung 14 Anteilige Lymphgefäßfläche in Prozent

Die Gruppen wurden nach der Standardabweichung der anteiligen Lymphgefäßfläche (Abbildung 14 gebildet) Oben links: Gruppe 1 der CC-Linien mit geringster Standardabweichung, oben rechts: Gruppe 2 mit mittlerer Standardabweichung, unten links: Gruppe 3 mit großer Standardabweichung, unten rechts Gruppe 4 mit CC-Linien mit $n < 3$.

4.3. Etablierte morphometrische Merkmale für die Charakterisierung der Lymphgefäße

Um die Lymphgefäßstruktur weiter zu charakterisieren und zu verifizieren, wurden weitere verschiedene morphometrische Parameter, wie die Anzahl der Gefäßendpunkte, -verzweigungen und Gefäßneussprossungen aus dem vorhandenen limbalen Gefäß, bestimmt.

Wie man in Abbildung 12 augenscheinlich erkennt unterscheiden sich die einzelnen CC-Linien nicht nur in der anteiligen Lymphgefäßfläche, sondern auch den oben genannten morphometrischen Parametern (Abbildung 12).

Die Parameter Gefäßendpunkte, Gefäßverzweigungen und Gefäßneusprossungen wurden zur Gesamtfläche der jeweiligen Hornhaut (Abbildung 13) ins Verhältnis gesetzt um eine Vergleichbarkeit verschieden großer Hornhäute zu ermöglichen.

Alle morphometrischen Merkmale zeigten eine hohe Korrelation zur anteiligen Gefäßfläche und bestätigten damit den logischen Zusammenhang zwischen Gefäßfläche und Gefäßendpunkten, -verzweigungen und Gefäßneusprossungen (Abbildung 15).

Dabei zeigt der Parameter Gefäßendpunkte mit einer Korrelation um den Korrelationskoeffizienten R von 0,8932 den stärksten Zusammenhang zur anteiligen Gefäßfläche. Die Gefäßverzweigungen korrelierten um den Korrelationskoeffizienten R = 0,8350. Der Parameter Gefäßneusprossungen zeigten die geringste, aber dennoch hoch ausgeprägte Korrelation um den Korrelationskoeffizienten R = 0,7953. Alle 3 Parameter eignen sich augenscheinlich zur Quantifizierung der Lymphangiogenese.

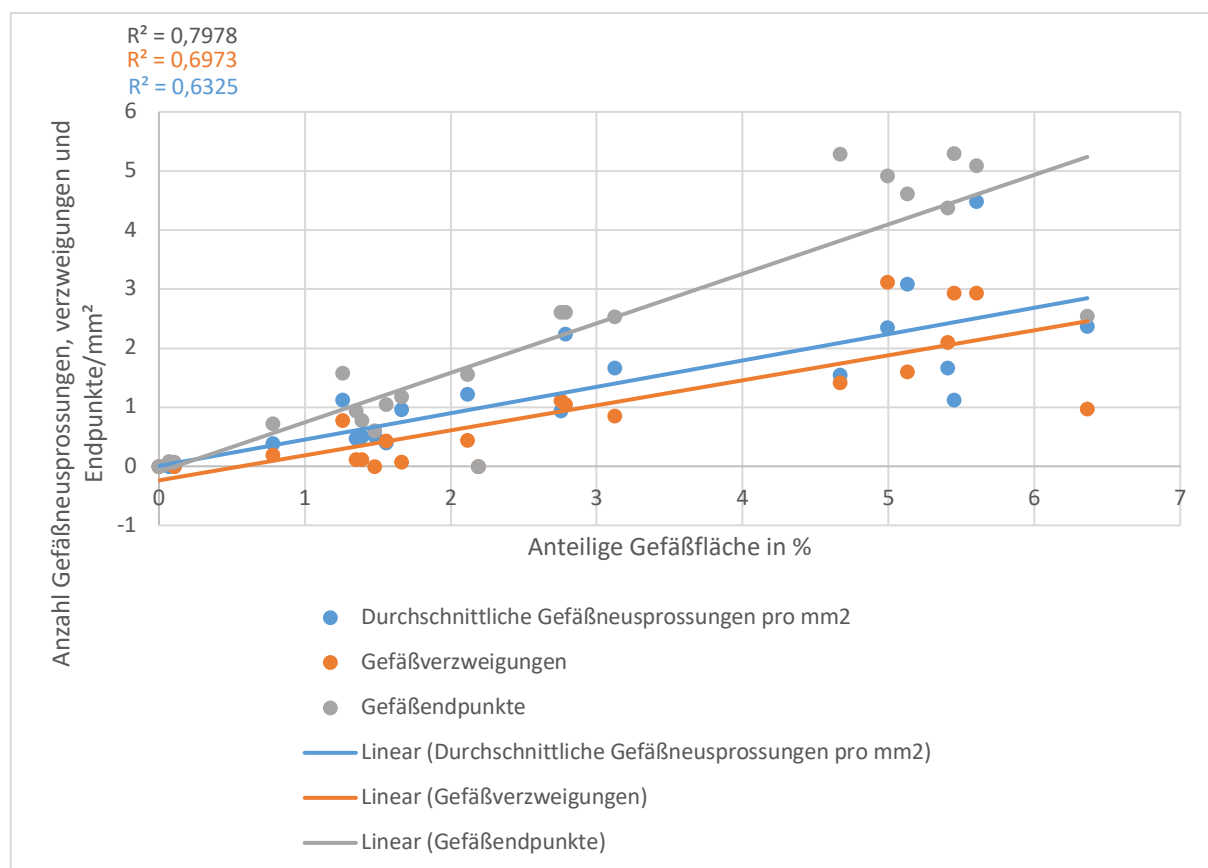


Abbildung15 Korrelation der morphometrischen Parameter Gefäßendpunkte, Gefäßverzweigungen und Gefäßneusprossungen mit dem Parameter Gefäßfläche in %.

4.3.1. Gefäßendpunkte

Die Bestimmung der Gefäßendpunkte verdeutlichte, dass die untersuchten CC-Linien sowohl Linien enthielten, die sowohl signifikant mehr als auch signifikant weniger Gefäßendpunkten aufwiesen als der hoch-lymphangiogene C57BL/6 Stamm (Abbildung 16).

Dabei zeigte sich, dass alle vier Linien, die weniger als 1% Lymphgefäßfläche aufwiesen, signifikant weniger Gefäßendpunkte im Vergleich zu C57BL/6 ausbildeten. Dabei konnten für LOT ($0,07 \pm 0,10/\text{mm}^2$), PAT ($0,08 \pm 0,12/\text{mm}^2$), LUV ($0,72 \pm 0,15/\text{mm}^2$) und YID ($0/\text{mm}^2$) Gefäßendpunkte bezogen auf die Hornhautgesamtfläche bestimmt werden.

Von den fünf CC-Linien POH, LUS, SAT, FIM und YOX die über 1% und eine signifikant niedrigere Lymphgefäßfläche ($p < 0,05$) im Vergleich zu C57BL/6 aufwiesen, war nur bei den CC-Linien LUS ($1,57 \pm 0,51\text{mm}^2$), SAT ($1,17 \pm 0,42\text{mm}^2$), FIM ($0,94 \pm 0,75\text{mm}^2$) und YOX ($1,05 \pm 0,30\text{mm}^2$) ein signifikant niedrigerer Unterschied zum hoch-lymphangiogenen Referenzstamm C57BL/6 erkennbar. Bei der CC-Linie POH konnte kein signifikanter Unterschied zu Referenzstamm festgestellt werden.

Bei den Linien LEM, XAK, TOP, ZIF2, LAM, SEH, DET3, LAT und TOFU, die keinen signifikanten Unterschied in der Lymphgefäßfläche aufwiesen, zeigte nur die Linie LAT ($5,29\text{mm}^2$) eine signifikant höhere Anzahl an Gefäßendpunkten und die CC-Linie TOFU (0mm^2) keine Gefäßendpunkte im Vergleich zu den hoch-lymphangiogenen C57BL/6 Stamm. Die anderen sieben Linien LEM ($2,61 \pm 1,24\text{mm}^2$), XAK ($0,77 \pm 0,48\text{mm}^2$), TOP ($1,56 \pm 0,72\text{mm}^2$), ZIF2 ($0,60 \pm 0,59\text{mm}^2$), LAM ($4,92 \pm 1,55\text{mm}^2$), SEH ($2,53 \pm 1,13\text{mm}^2$) und DET3 ($4,62 \pm 0,31\text{mm}^2$) zeigten keinen signifikanten Unterschied zu C57BL/6.

Von den CC- Linien, die eine signifikant höhere Lymphgefäßfläche im Vergleich zu C57BL/6 aufwiesen, zeigten drei der vier Linien auch eine signifikant höhere Anzahl an Gefäßendpunkten bezogen auf die gesamte Hornhautfläche im Vergleich zu den C57BL/6 Tieren. Hier konnte die Anzahl der Gefäßendpunkte für LAM2 mit $5,09 \pm 0,28\text{mm}^2$, für HAX2 mit $5,30 \pm 0,42\text{mm}^2$ und für NUK mit $4,38 \pm 0,18\text{mm}^2$ bestimmt werden. Interessanterweise wurde bei der CC-Linie FIV ($2,54 \pm 0,94\text{mm}^2$), die auch eine signifikant höhere Lymphgefäßfläche als die C57BL/6 Maus zeigte, kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Gefäßendpunkte im Vergleich zu C57BL/6 bestimmt.

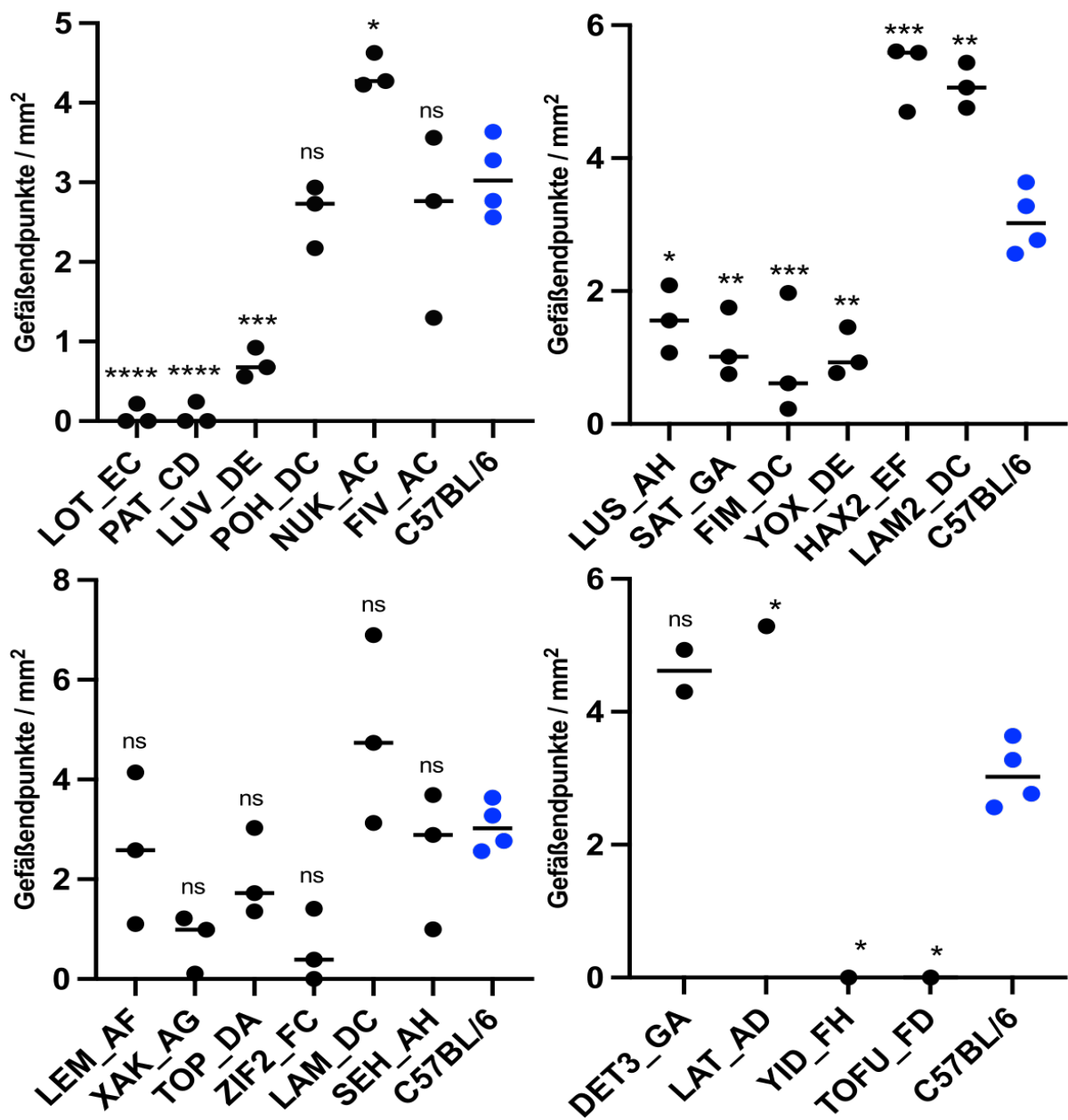


Abbildung 16 Anzahl an Gefäßendpunkte pro mm² der CC-Linie mit C57BL/6 als Referenz.

Die Gruppen wurden nach der Standardabweichung der anteiligen Lymphgefäßfläche (Abbildung 14 gebildet) Oben links: Gruppe 1 der CC-Linien mit geringster Standardabweichung, oben rechts: Gruppe 2 mit mittlerer Standardabweichung, unten links: Gruppe 3 mit großer Standardabweichung, unten rechts Gruppe 4 mit CC-Linien mit $n < 3$.

4.3.2. Gefäßverzweigungen

Auch bei der Bestimmung der Gefäßverzweigungen wurde deutlich, dass die untersuchten CC-Linien sowohl Linien enthielten, die signifikant mehr als auch signifikant weniger Gefäßverzweigungen aufwiesen als der hoch-lymphangiogene C57BL/6 Stamm (Abbildung 17).

Es zeigten sich bei drei der vier CC-Linien mit weniger als 1% Lymphgefäßfläche signifikant weniger Gefäßendpunkte im Vergleich zu C57BL/6. Bezogen auf die Gesamtfläche der Hornhaut wurden für LOT $0/\text{mm}^2$, PAT $0,04 \pm 0,06/\text{mm}^2$ und LUV $0,19 \pm 0,19/\text{mm}^2$ Gefäßverzweigungen bestimmt. Auch die Linie YID ($0/\text{mm}^2$) bildete keine Gefäßverzweigungen, aber erreichte keinen signifikanten Unterschied.

Unter den fünf CC-Linien POH, LUS, SAT, FIM und YOX, die über 1% Gefäßfläche und eine signifikant niedrigere Lymphgefäßfläche ($p < 0,05$) im Vergleich zu C57BL/6 aufwiesen, war nur bei den beiden Linien SAT mit $0,07 \pm 0,05/\text{mm}^2$ und FIM mit $0,12 \pm 0,16/\text{mm}^2$ einen signifikant niedrigeren Unterschied zum hoch-lymphangiogenen Referenzstamm erkennbar. Die Linien POH ($1,11 \pm 0,14/\text{mm}^2$), LUS ($0,77 \pm 0,25/\text{mm}^2$) und SAT ($0,07 \pm 0,05/\text{mm}^2$) zeigten keinen signifikanten Unterschied.

Bei den Linien LEM, XAK, TOP, ZIF2, LAM, SEH, DET3, LAT und TOFU, die keinen signifikanten Unterschied zu C57BL/6 in der Lymphgefäßfläche zeigten, waren nur bei der Linie LAM hochsignifikant ($p < 0,001$) mehr Gefäßverzweigungen als beim hoch-lymphangiogenen Referenzstamm erkennbar. Interessanterweise zeigte die Linie LAM damit die höchste Anzahl Gefäßverzweigungen aller CC-Linien, die mit $3,11 \pm 0,84/\text{mm}^2$ bestimmt wurde. Darüber hinaus bildeten die Linien XAK ($0,11 \pm 0,09/\text{mm}^2$) signifikant ($p < 0,05$) weniger als C57BL/6 und die Linie ZIF2 ($0/\text{mm}^2$) keine Gefäßverzweigungen aus. Die anderen sechs Linien LEM ($2,24 \pm 1,74/\text{mm}^2$), TOP ($0,44 \pm 0,27/\text{mm}^2$), SEH ($0,86 \pm 0,36/\text{mm}^2$), DET3 ($1,60 \pm 0,08/\text{mm}^2$), LAT ($1,42/\text{mm}^2$) und TOFU ($0/\text{mm}^2$) zeigten keinen signifikanten Unterschied zu C57BL/6.

Von den Linien NUK, FIV, HAX2 und LAM2, die eine signifikant höhere Lymphgefäßfläche als der hoch-lymphangiogene Referenzstamm C57BL/6 aufwiesen, zeigten drei von vier Linien auch eine signifikant höhere Anzahl an Gefäßverzweigungen bezogen auf die gesamte Hornhautfläche im Vergleich zu den C57BL/6 Tieren. Dabei konnte die Anzahl an Gefäßverzweigungen bei NUK mit $2,10 \pm 0,26/\text{mm}^2$, bei HAX2 mit $2,94 \pm 0,36/\text{mm}^2$ und bei LAM2 mit $2,93 \pm 0,61/\text{mm}^2$ bestimmt werden. Auffällig war, dass bei der CC-Linie FIV ($0,98 \pm 0,44/\text{mm}^2$), die auch eine signifikant höhere Lymphgefäßfläche als die C57BL/6 Maus besaß, kein signifikanter Unterschied in der Anzahl an Gefäßverzweigungen im Vergleich zu C57BL/6 bestimmt wurde.

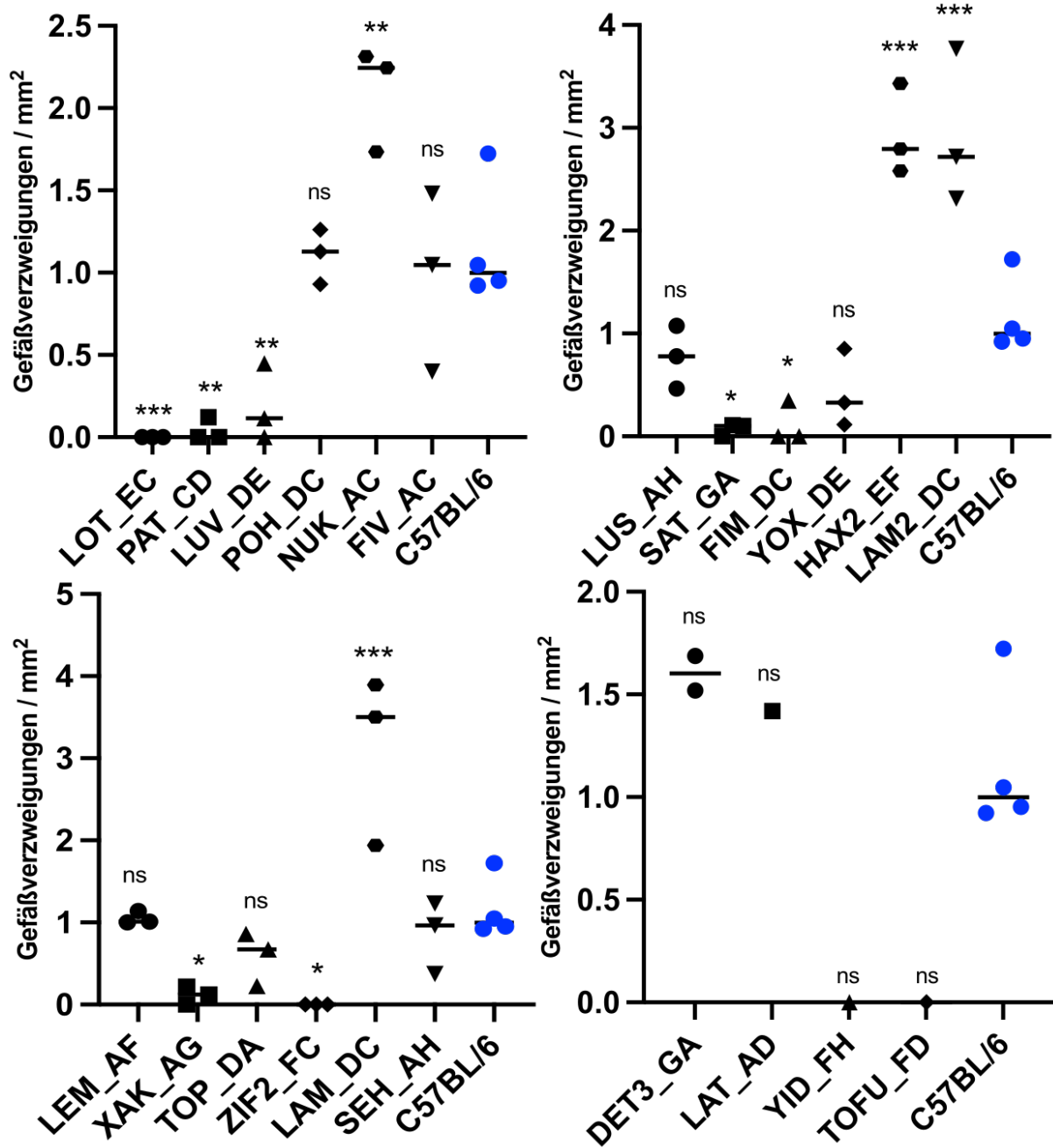


Abbildung 17 Anzahl an Gefäßverzweigungen pro mm² der CC-Linie mit C57BL/6 als Referenz.

Die Gruppen wurden nach der Standardabweichung der anteiligen Lymphgefäßfläche (Abbildung 14 gebildet) Oben links: Gruppe 1 der CC-Linien mit geringster Standardabweichung, oben rechts: Gruppe 2 mit mittlerer Standardabweichung, unten links: Gruppe 3 mit großer Standardabweichung, unten rechts Gruppe 4 mit CC-Linien mit n < 3 Proben.

4.3.3. Gefäßneusprossungen

Die Quantifizierung der Gefäßneusprossungen verdeutlichte, dass sowohl Linien mit signifikant mehr als auch signifikant weniger Gefäßneusprossungen als der hoch-lymphangiogene C57BL/6 Stamm mit $2,17 \pm 0,06/\text{mm}^2$ in den CC-Linien enthalten waren (Abbildung 18).

Unter den vier CC-Linien LOT, PAT, LUV und YID, die eine Lymphgefäßfläche von weniger als 1% aufwiesen, zeigten alle vier auch signifikant weniger Gefäßneusprossungen bezogen auf die Gesamtfläche der Hornhaut als der hoch-lymphangiogene Referenzstamm C57BL/6. Die Gefäßneusprossungen wurde für LUV mit $0,38 \pm 0,20/\text{mm}^2$ ermittelt. LOT, PAT und YID bildeten keine ($0/\text{mm}^2$) Gefäßneusprossungen aus.

Unter den fünf CC-Linien POH, LUS, SAT, FIM und YOX, die mehr als 1% anteilige Lymphgefäßfläche und signifikant ($p < 0,05$) weniger Gefäßneusprossungen als C57BL/6 aufwiesen, zeigten die drei Linien POH mit $0,94 \pm 0,22/\text{mm}^2$, FIM mit $0,47 \pm 0,50/\text{mm}^2$ und YOX mit $0,40 \pm 0,28/\text{mm}^2$ auch signifikant weniger Gefäßneusprossungen. Bei den Linien LUS ($1,12 \pm 0,28/\text{mm}^2$) und SAT ($0,96 \pm 0,54/\text{mm}^2$) war kein signifikanter Unterschied zum Referenzstamm erkennbar.

Unter den CC-Linien LEM, XAK, TOP, ZIF2, LAM, SEH, DET3, LAT und TOFU, die keinen signifikanten Unterschied in der anteiligen Lymphgefäßfläche im Vergleich zum Referenzstamm aufwiesen, zeigt nur die Linie TOFU ($0/\text{mm}^2$) signifikant weniger Gefäßneusprossungen. Die anderen acht Linien LEM ($2,24 \pm 1,74/\text{mm}^2$), XAK ($0,51 \pm 0,40/\text{mm}^2$), TOP ($1,22 \pm 0,78/\text{mm}^2$), ZIF2 ($0,51 \pm 0,41/\text{mm}^2$), LAM ($2,35 \pm 1,05/\text{mm}^2$), SEH ($1,67 \pm 0,97/\text{mm}^2$), DET3 ($3,08 \pm 0,42/\text{mm}^2$) und LAT ($1,55/\text{mm}^2$) zeigten keinen signifikanten Unterschied zu C57BL/6.

Auffällig ist, dass unter den vier Mauslinien NUK, FIV, HAX2, LAM2, die eine signifikant höhere anteilige Gefäßfläche als der hoch-lymphangiogene Referenzstamm C57BL/6 aufwiesen, nur die Linie LAM2 ($4,48 \pm 1,01/\text{mm}^2$) eine hochsignifikant ($p < 0,001$) höhere Anzahl Gefäßneusprossungen bezogen auf die Gesamtfläche der Hornhaut zeigte. LAM2 wies damit deutlich mehr Gefäßneusprossungen als alle anderen CC-Linien auf. Bei den Linien NUK ($1,66 \pm 0,07/\text{mm}^2$), FIV ($2,37 \pm 0,78/\text{mm}^2$) und HAX2 ($1,12 \pm 0,15/\text{mm}^2$) hingegen war kein signifikanter Unterschied zu C57BL/6 erkennbar.

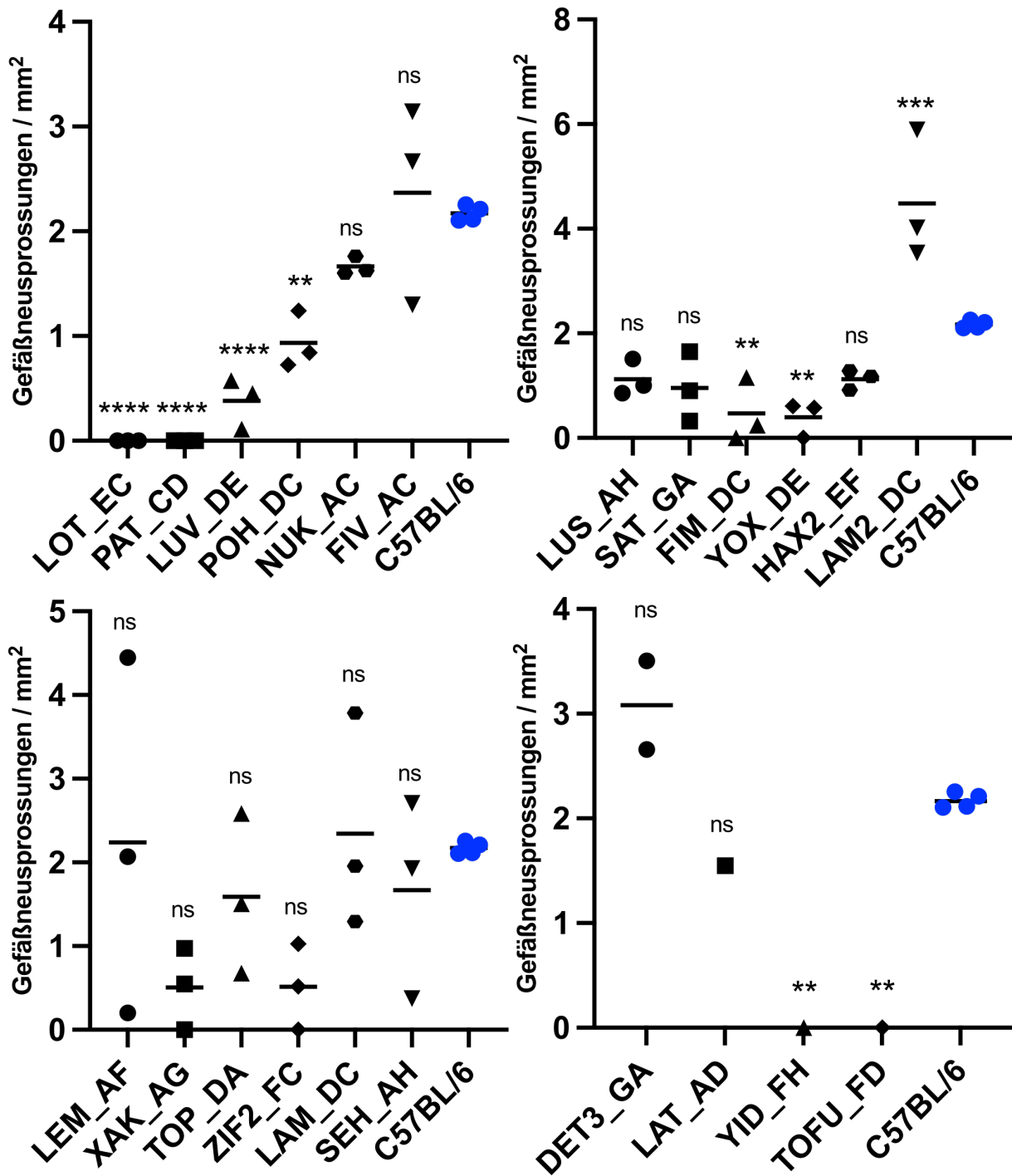


Abbildung 18 Anzahl an Gefäßneussprossungen pro mm² der CC-Linie mit C57BL/6 als Referenz.

Die Gruppen wurden nach der Standardabweichung der anteiligen Lymphgefäßfläche (Abbildung 14 gebildet) Oben links: Gruppe 1 der CC-Linien mit geringster Standardabweichung, oben rechts: Gruppe 2 mit mittlerer Standardabweichung, unten links: Gruppe 3 mit großer Standardabweichung, unten rechts Gruppe 4 mit CC-Linien mit n < 3.

4.4. Gefäßdurchmesser des limbalen Gefäßes

Bereits in der mikroskopischen Betrachtung (Abbildung 12) fiel auf, dass bei der Linie FIV die Gefäßfläche anteilig besonders auf ein verdicktes limbales Gefäß und weniger auf Gefäßendpunkte, -verzweigungen oder Gefäßneuspaltungen entfiel und die Linie HAX2 trotz einer großen Lymphgefäßfläche nur ein unvollständiges limbales Gefäß ausbildete.

Die Bestimmung des Gefäßdurchmessers verdeutlicht, dass die untersuchten CC-Linien sowohl Linien beinhalteten, die einen signifikant höheren als auch einen signifikant niedrigeren Gefäßdurchmesser des limbalen Gefäßes im Vergleich zum hoch-lymphangiogenen Referenzstamm C57BL/6 aufwiesen (Abbildung 19).

Unter den vier CC-Linien LOT, PAT, LUV und YID, die eine Lymphgefäßfläche von unter 1% der Hornhautfläche aufwiesen, zeigte sich bei den zwei Linien LOT und PAT auch ein signifikant niedrigerer Gefäßdurchmesser des limbalen Gefäßes, der bei PAT mit $8,36 \pm 11,82 \mu\text{m}$ ausfiel und bei LOT aufgrund eines nicht vorhandenen limbalen Gefäßes mit $0/\text{mm}^2$ bestimmt wurde. Die Linien LUV ($25,17 \pm 6,47 \mu\text{m}$) und YID ($0 \mu\text{m}$) hingegen zeigten keinen signifikanten Unterschied.

Weder unter den Linien POH ($32,18 \pm 6,72 \mu\text{m}$), LUS ($24,78 \pm 5,26 \mu\text{m}$), SAT ($26,61 \pm 4,69 \mu\text{m}$), FIM ($21,57 \pm 15,52 \mu\text{m}$) und YOX ($26,89 \pm 2,81 \mu\text{m}$), die über 1% anteilige Gefäßfläche, aber signifikant weniger anteilige Gefäßfläche als der Referenzstamm C57BL/6, noch unter den Linien LEM ($32,42 \pm 4,76 \mu\text{m}$), XAK ($29,98 \pm 7,78 \mu\text{m}$), TOP ($26,22 \pm 5,07 \mu\text{m}$), ZIF2 ($24,92 \pm 1,18 \mu\text{m}$), LAM ($34,51 \pm 1,40 \mu\text{m}$), SEH ($32,60 \pm 1,62 \mu\text{m}$), DET3 ($34,99 \pm 4,85 \mu\text{m}$), LAT ($34,99 \mu\text{m}$) und TOFU ($32,00 \mu\text{m}$), die keinen signifikanten Unterschied zu C57BL/6 in der anteiligen Gefäßfläche aufwiesen, zeigten sich signifikante Unterschiede zum hoch-lymphangiogenen Referenzstamm C57BL/6 im Gefäßdurchmesser des limbalen Gefäßes.

Interessanterweise zeigten von den vier Linien NUK, FIV, HAX2 und LAM2, die eine signifikant höhere Gefäßfläche aufwiesen, nur die Linien FIV auch mit $59,88 \pm 8,33 \mu\text{m}$ auch einen deutlichen signifikant ($p < 0,001$) größeren Gefäßdurchmesser. Die Linien NUK mit $35,34 \pm 0,38 \mu\text{m}$, HAX2 mit $30,66 \pm 3,96 \mu\text{m}$ und LAM2 mit $36,17 \pm 1,40 \mu\text{m}$ zeigten keinen signifikanten Unterschied zum C57BL/6 Stamm.

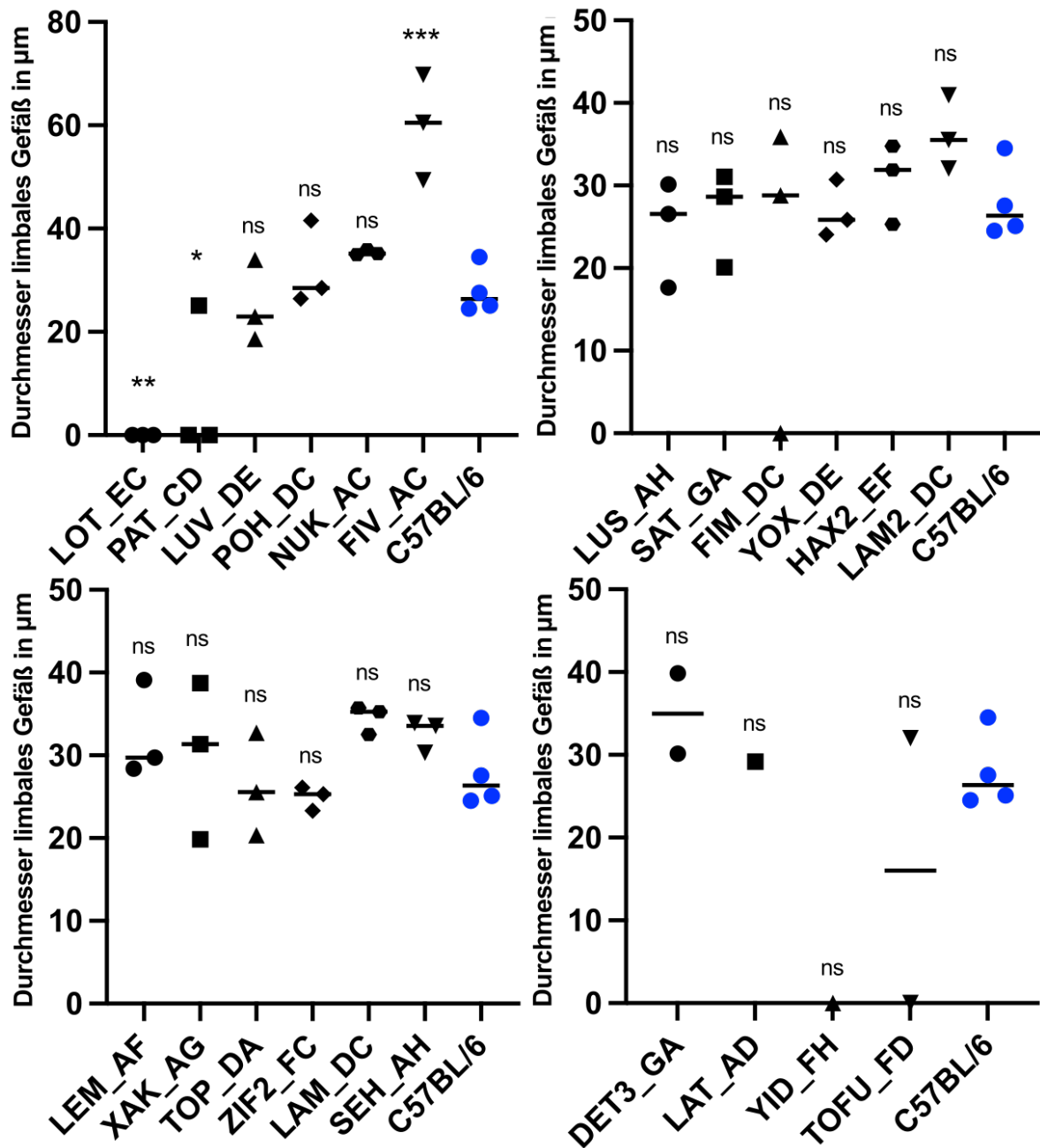


Abbildung 19 Durchmesser des limbalen Gefäßes in µm der CC-Linie mit C57BL/6 als Referenz.

Die Gruppen wurden nach der Standardabweichung der anteiligen Lymphgefäßfläche (Abbildung 14 gebildet) Oben links: Gruppe 1 der CC-Linien mit geringster Standardabweichung, oben rechts: Gruppe 2 mit mittlerer Standardabweichung, unten links: Gruppe 3 mit großer Standardabweichung, unten rechts Gruppe 4 mit CC-Linien mit $n < 3$.

Wie die etablierten morphometrischen Merkmale Gefäßendpunkte, -verzweigungen und Gefäßneussprossungen korrelierte auch der Parameter „Gefäßdurchmesser des limbalen Gefäßes“ mit der anteiligen Gefäßfläche um den Korrelationskoeffizienten $R = 0,8244$ (Abbildung 20).

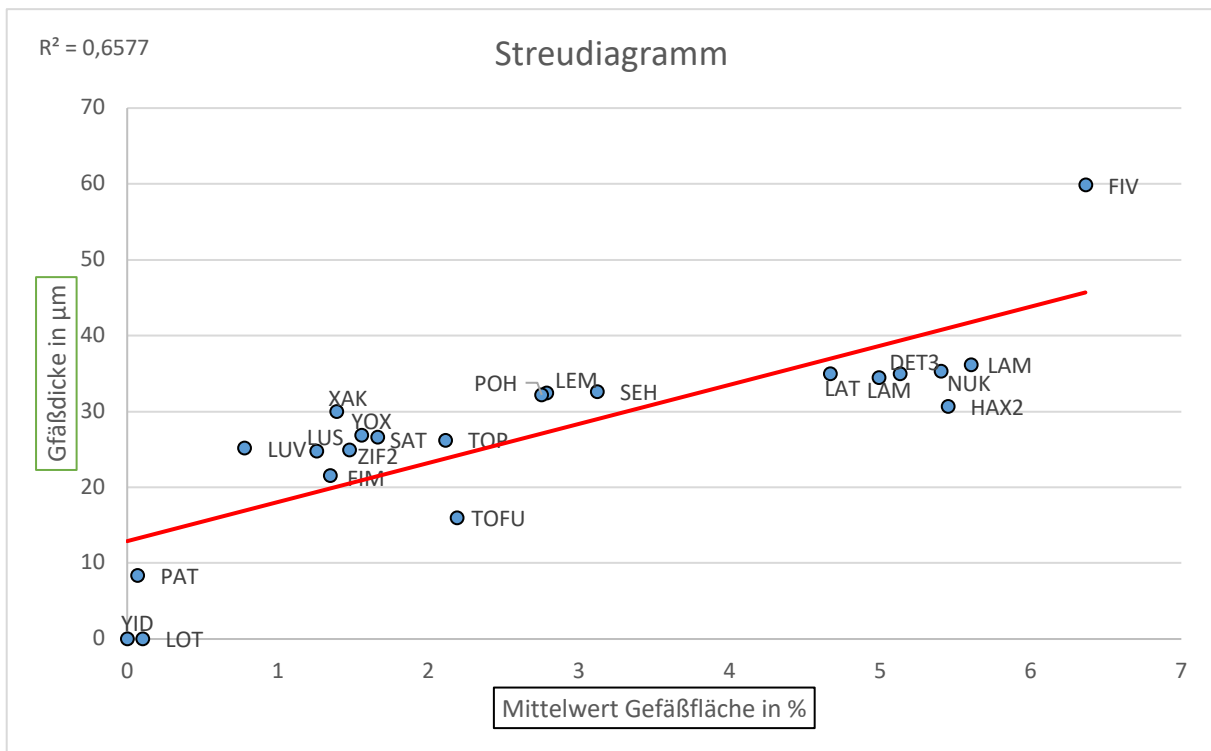


Abbildung 20: Abhängigkeit des Gefäßdurchmessers von der Anteiligen Gefäßfläche

Punkte: unterschiedliche CC-Linien, Y-Achse: Durchschnittliche morphometrischer Parameter Gefäßdurchmesser des limbalen Gefäßes, X-Achse: durchschnittliche Gefäßfläche in %. Wie die Parameter Gefäßendpunkte, -verzweigungen und Gefäßneusprossungen korreliert auch der Gefäßdurchmesser der Lymphgefäße mit einem Korrelationsfaktor von 0,68 mit der Anteilig bedeckten Gefäßfläche.

4.5. QTL-Analyse

In der Kartierung ergaben sich mehrere Spitzen (Abbildung 21, Tabelle 8), die jedoch bei einem Signifikanzniveau von 0,05 keine genom-weite Signifikanz für einen Genlokus hatten. Die Spitze mit dem genom-weit höchsten LOD-Score von 9,13 stammte aus der Kartierung der Gefäßfläche und befand sich auf Chromosom 17 bei 84650591-85080031 Mb (Abbildung 22). Bei einem Signifikanzniveau von 0,05 wäre die Signifikanzschwelle für die Gefäßfläche 11,04.

An der gleichen Stelle befand sich die genom-weit höchste Spitze für den Gefäßdurchmesser mit einem LOD-Score von 7,66. Bei einem Signifikanzniveau von 0,05 wäre die Signifikanzschwelle für den Gefäßdurchmesser 11,06.

Die genomweit zweithöchste Spitzen mit einem LOD-Score von 9,11 stammte aus der Kartierung der Gefäßneussprossungen und befand sich auf Chromosom 3 bei 119775901-124015473 Mb. Bei einem Signifikanzniveau von 0,05 wäre die Signifikanzschwelle für die Gefäßneussprossungen bei 12,7 und für die Gefäßfläche 11,04.

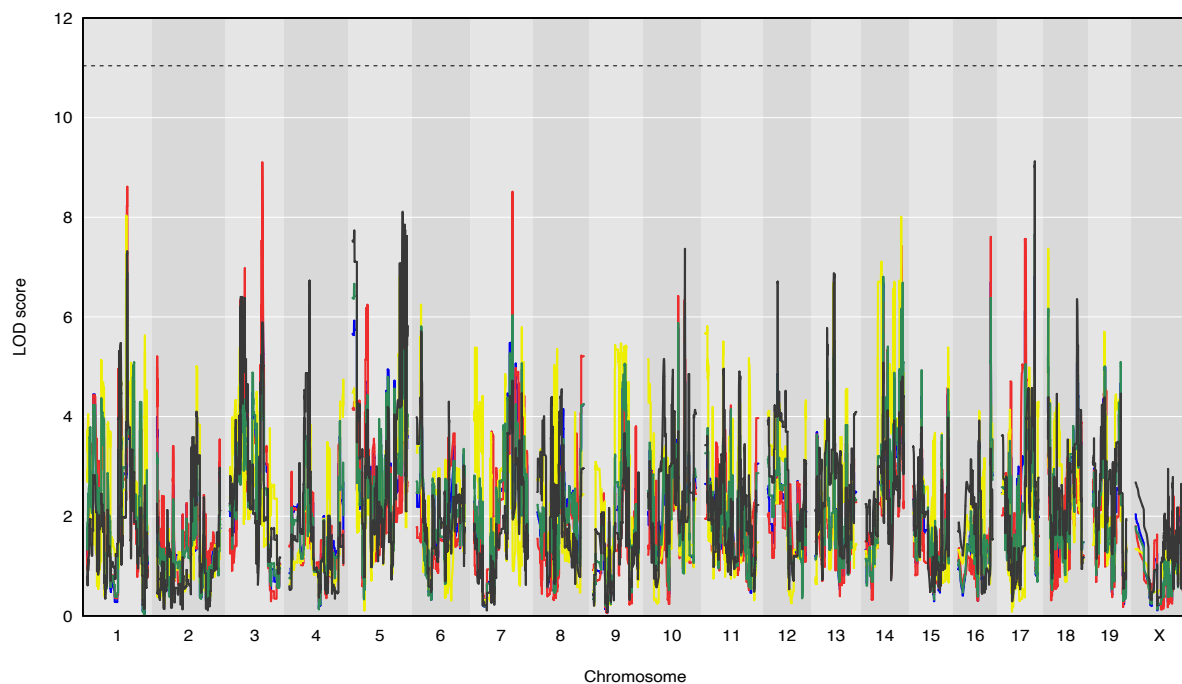


Abbildung 21 QTL-Analyse der CC-Linien

Y-Achse: LOD-Score, X-Achse: Chromosom. Gestrichelte Linie: Signifikanzschwelle von 11,04 für die Gefäßfläche bei einem Signifikanzniveau von 0,05. Farben: blau = Gefäßendpunkte, rot = Gefäßneussprossungen, gelb = Gefäßverzweigungen, schwarz = Gefäßfläche, grün = Gefäßdurchmesser. Die zwei höchsten Spitzen mit einem LOD-Score von 9,13 und 9,11 befinden sich auf Chromosom 17 und Chromosom 3.

Phänotyp	Chromosom	95% Konfidenzintervall Mb	LOD-Score
Gefäßneussprossungen	3	3:119775901-124015473	9,11
Gefäßfläche	17	17:84650591-85080031	9,13
Gefäßdurchmesser	17	17:84650591-85080031	7,66

Tabelle 8 Spitzen des LOD-Score

Das Konfidenzintervall wurde auf 95% Genauigkeit berechnet, wie im R/qtl Softwarepaket. LOD: logarithm oft the odds; Mb: Megabasen

Der Locus auf Chromosom 17 zeigte bei genauerer Betrachtung für alle untersuchten Merkmale eine Spitze des LOD-Scores (Abbildung 22). Die LOD-Scores der verschiedenen Parameter verliefen vielfach sehr ähnlich. Die Top 5 Loci der Gefäßfläche enthielten an der gleichen Stelle in 5 von 5 Fällen für den Gefäßdurchmesser des limbalen Gefäßes, in 2 von 5 Fällen für die Gefäßneussprossungen, in 2 von 5 Fällen für die Gefäßverzweigungen sowie in 3 von 5 Fällen für die Gefäßendpunkte auch eine Spitze von über 6 im LOD-Score.

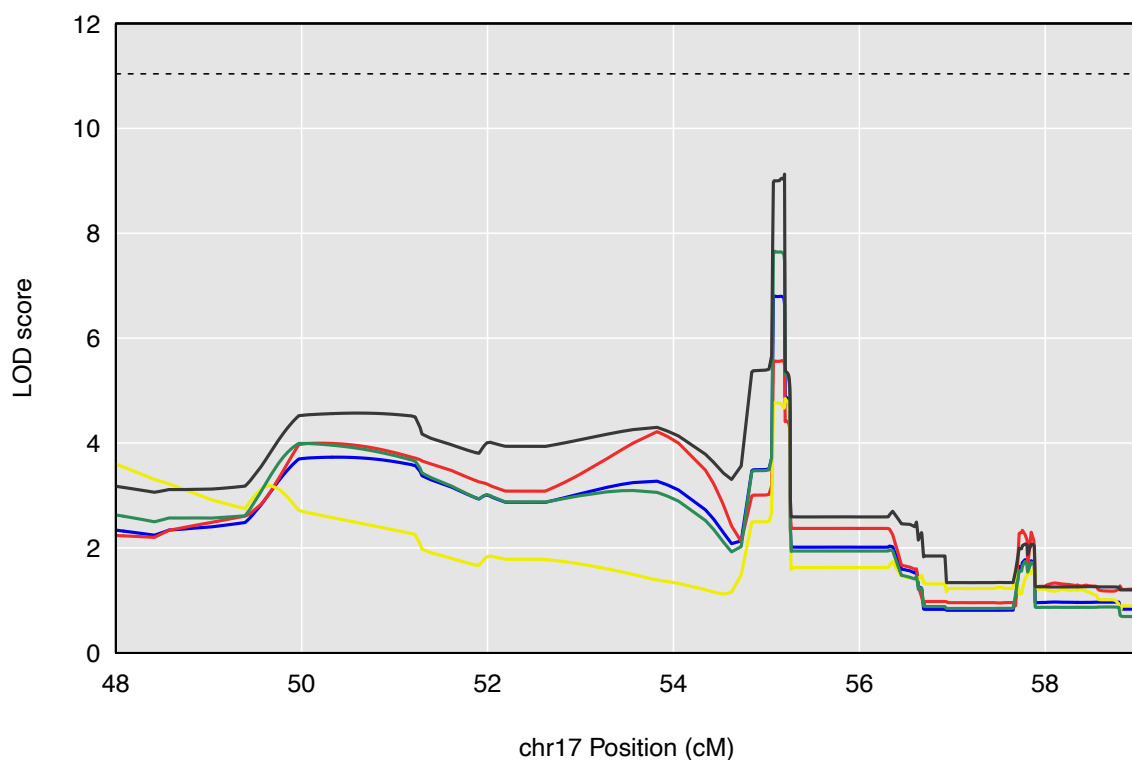


Abbildung 22 QTL-Analyse mit Locus auf Chromosom 17 bei 55,2 cM

Y-Achse: LOD-Score, X-Achse: Chromosom. Gestrichelte Linie: Signifikanzschwelle von 11,04 für Gefäßfläche bei Signifikanzniveau 0,05. Farben: blau = Gefäßendpunkte, rot = Gefäßneussprossungen, gelb = Gefäßverzweigungen, schwarz = Gefäßfläche, grün = Gefäßdurchmesser

5. Diskussion

5.1. Zusammenfassung der Hauptergebnisse

1. Die durchgeführte Intervall-Kartierung auf Basis der erhobenen phänotypischen morphometrischen Daten bestätigte, dass sich die CC-Linien zur Identifikation potenzieller Modulatoren der Lymphangiogenese mittels QTL-Analyse eignen. Es ergaben sich mehrere für die verschiedenen Parameter geteilte Spitzen des LOD-Scores, die bei Erhöhung der Power potenzielle Kandidatengene enthalten könnten. Dabei fielen mehrere der Spitzen der verschiedenen Merkmale in der Kartierung auf die gleichen Loci, was eine gemeinsame Vererbung der Phänotypen plausibel erscheinen lässt.

2. Neben den bisher zur Analyse der Gefäße verwendeten morphometrischen Merkmalen Lymphgefäßfläche, Gefäßendpunkte, -verzweigungen und Gefäßneusprossungen unterschieden sich die CC-Linien auch im Durchmesser des limbalen Gefäßes. Dieser korrelierte wie die anderen Parameter mit der Gefäßfläche. Durch die Intervallkartierung wurde der Durchmesser des limbalen Gefäßes als quantitativer Parameter für die QTL-Analyse der Lymphangiogenese in der Hornhaut validiert.

In der Linie FIV war der Durchmesser des limbalen Gefäßes hoch signifikant vergrößert, die Linie HAX2 hingegen zeigte trotz einer signifikant vergrößerten Lymphgefäßfläche nur ein rudimentär ausgebildetes limbales Gefäß.

3. Die Studie zeigt, dass sich die Phänotypen der CC-Linien in Bezug auf ihre Lymphgefäßarchitektur der naiven Hornhaut deutlich unterscheiden. Dabei waren die Unterschiede in etablierten morphometrischen Parametern deutlich größer, als es auf Basis der Untersuchung von Labor und Wildmäusen bisher bekannt war. Dies erweitert die bisherige Einteilung von Mauslinien in „hoch-lymphangiogen“ und „niedrig-lymphangiogen“ um die CC-Linien NUK, FIV, HAX2 und LAM2 als „extrem hoch-lymphangiogen“ und die CC-Linien LUV, LOT, PAT, YID als „extrem niedrig-lymphangiogen“.

5.2. Diskussion der Methode

5.2.1. Studiendesign

In dieser Studie wurden die „anteilige Gefäßfläche“, „Gefäßendpunkte“, „Gefäßverzweigungen“, „Gefäßaussprossungen aus dem limbalen Gefäß“ sowie der „Gefäßdurchmesser des limbalen Gefäßes“ in Flachpräparaten von insgesamt 22 Mauslinien der CC-Linien untersucht. Dabei waren jeweils 3 Proben pro Linie vorhanden, außer bei den Linien DET3, LAT, YID und TOFU mit jeweils 2, 1, 1, 1 Proben.

Die oben genannten Parameter sind phänotypische Ausprägungen, die als „quantitative Merkmale“ erfasst werden können. Merkmale im menschlichen sowie in tierischen Organismen unterscheiden sich stark in den Individuen einer Population. Häufig besteht ein Merkmal in einer kleinen Anzahl qualitativ unterschiedlicher Formen mit einem einfachen Vererbungsmuster. Diese Art von Merkmalen wird nach Gregor Mendel auch als „mendelsche Merkmale“ bezeichnet.^{90 91 92}

Im Fall einer kontinuierlichen und quantitativ messbaren Form eines Merkmales wird von „quantitativen Merkmalen“ gesprochen. Häufig sind diese kontinuierlichen und quantitativen Variationen das Ergebnis kumulativer Effekte zahlreicher Umweltfaktoren im Zusammenspiel mit verschiedenen genetischen Faktoren und können auf verschiedenen Ebenen wie Metabolismus, im Immunsystem oder der Anfälligkeit für die Entstehung chronischer oder infektiöser Erkrankungen beobachtet werden. Daher werden diese Merkmale als „komplexe“ oder „quantitative“ Merkmale bezeichnet, zu denen auch die Lymphangiogenese zählt.^{90 93 94}
^{95 75 10}

Genetische Elemente, die verantwortlich für die Variation eines Merkmales sind, zu identifizieren ist sowohl in der Medizin als auch in der Landwirtschaft von großem Interesse. Als erster Schritt wird dabei die Anzahl der Kandidatengene reduziert, indem die verantwortlichen genetischen Elemente einer spezifischen chromosomalen Region zugeordnet werden. Diese wird quantitativer Eigenschaftslokus (quantitative trait locus), kurz QTL, genannt.^{90 74}

Im Gegensatz zu mendelschen Merkmalen, bei denen wenige von den Merkmalen abweichende Linien ausreichen um einen verantwortlichen QTL mit wenigen Kandidatengenen zu identifizieren, ist die Präzision der Kartierung bei „komplexen“ oder „quantitativen Merkmalen“ deutlich niedriger, insbesondere im Menschen auf Grund von komplexen Familien- und Populationsstrukturen. Deshalb wird zunächst in Modellorganismen mit spezifisch für diesen Zweck entworfenen Populationen gearbeitet, die eine höhere Vorhersagekraft besitzen und mit kleineren Populationsgrößen exaktere chromosomale Regionen identifizieren können. Dadurch wird die anschließende Suche nach dem entsprechenden Element im Menschen deutlich vereinfacht. Die CC-Linien stellen einen

solchen entworfenen Modellorganismus mit hoher Vorhersagekraft über eine große Reichweite des Genoms dar.^{90 96 96 97}

Ursprünglich sollten die CC-Linien aus über 1000 individuellen Linien bestehen, was eine große statistische Power und Präzision für die Kartierung selbst wenig effektstarker QTL, die typisch für „komplexe“ Merkmale sind, bedeutet hätte. Mit den unter 100 verbliebenen Linien ist eine Kartierung effektschwacher QTL mit weniger als 5% Einfluss voraussichtlich nicht möglich. Durch die 3 von Wildtypen abgeleiteten Gründerstränge können jedoch erfahrungsgemäß effektstarke QTL mit 20% oder mehr Einfluss mit hoher Präzision kartiert werden.^{90 98 99 100 100}

Im Fall der Lymphangiogenese der Hornhaut konnte bereits mit den zwei Inzuchtstämmen der Linien C57BL/6 und BALB/c ein Locus auf Chromosom 7 identifiziert werden, der 16,8-18% der Variation der kartierten Phänotypen erklärt.¹⁰

Zur Planung der benötigten Populationsgröße für eine QTL-Analyse mit CC-Linien existieren zwar Studien, die versuchen die ungefähre Power abhängig von der Größe des zu untersuchenden Kollektivs der CC-Linien vorherzusagen, allerdings ist dies von vielen Variablen abhängig, darunter das Genom der CC-Linien, die Anzahl der Proben pro Linie, die Anzahl der Linien, Hintergrundeffekte, Anzahl der Allele und der vor allem der Effektstärken des Locus.

Als groben Anhaltspunkt geben Gregory R. Keele et al. 2019 an mit 72 CC-Linien und einer Probe pro Linie eine Power von 96,4% für einen für 50% der phänotypischen Varianz verantwortlichen quantitativen Eigenschaftsloкус. Bei einer Einflussstärke von 40% des QTL ergäbe sich im selben Szenario eine Power von 79,2%, für 30% Einflussstärke eine Power von 44,1% und für eine Einflussstärke von 20% eine Power von 12,4%. Die Anzahl an verschiedenen CC-Linien hatte einen größeren Einfluss auf die Power als die Anzahl an Proben pro Linie, welches einen der entscheidenden Gründe darstellen könnte, weshalb in dieser Studie kein signifikanter Locus in der QTL-Analyse gefunden werden konnte.¹⁰¹ Unabhängig davon schlagen auch Soller et al. 2019 vor 30 Linien mit 3 bis 5 Tieren pro Linie zu verwenden.⁹⁰

Allerdings beziehen sich die Studien auf CC-Linien, die an der Universität von North Carolina gezüchtet wurden, während die hier verwendeten CC-Linien aus Australien stammen. Außerdem sind die Lymphgefäße der CC-Linien bisher noch nicht phänotypisiert worden.

Da die genutzten Augen aus Tieren entnommen wurden, die für andere Zwecke benötigt wurden, konnte die Anzahl an verfügbaren Linien sowie Proben pro Linie nicht beliebig erhöht werden, was eine der Limitationen dieser Versuchsreihe darstellt.

5.2.2. Mäuse

Die Maus ist das am häufigsten zur medizinischen Forschung genutzte Säugetiermodell und die hier als Referenzmaßstab genutzte Linie C57BL/6J ist der am häufigsten genutzte Inzuchtstamm, der auch als Referenzgenom der Maus dient und für die Mehrheit der Knockout-Mäuse verwendet wird sowie einer der Gründerlinien der CC-Linien darstellt ¹⁰².

Bei der Erforschung komplexer Merkmale wird häufig in mehreren Schritten vorgegangen. Zunächst wird die Vererbbarkeit eines Merkmals ermittelt, danach die Beziehungen verschiedener Merkmale anhand von Korrelationen evaluiert, um auf gemeinsame molekulare Mechanismen zu schließen. Als nächstes folgt die Identifizierung von Modelllinien für genauere mechanische Studien und zuletzt die Kartierung zur Identifizierung der genetischen Grundlage ¹⁰³.

Genetisch diverse Mäuse können dabei auf verschiedene Weisen eingesetzt werden (Abbildung 23), wobei jede Mäusepopulation für unterschiedliche Zwecke am besten geeignet ist. Die in dieser Studie eingesetzten CC-Linien sind als diverse, stabile und reproduzierbare Population vorgesehen gewesen und deswegen besonders geeignet um Merkmals-Korrelationen zu identifizieren. ¹⁰³ Die Korrelation komplexer Merkmale diverser Mauslinien repetiert sich häufig im Menschen, beispielsweise die Korrelation zwischen dem Persönlichkeitsmerkmal „Sensation Seeking“ mit Drogeneinnahme und Suchtverhalten ^{104 105}. Darüber hinaus eignen sich CC-Linien besonders gut zur Untersuchung der Interaktion des Genoms mit Umwelteinflüssen ^{106 107}. Extreme Linien können auch genutzt werden um Interventionen zu testen ¹⁰³.

In dieser Studie wurden die CC-Linien wie oben beschrieben genutzt, um die quantitativen Merkmale der Lymphgefäße der Hornhaut zu untersuchen. Dabei wurden mehrere Korrelationen und extreme Linien identifiziert. Dazu gehören die Linien LOT, PAT und LUV mit extrem wenig Lymphgefäße während FIV, HAX2, LAM2 und NUK extreme viele Lymphgefäße zeigen. Die Linien FIV zeigt außerdem ein im Durchmesser signifikant vergrößertes limbales Gefäß.

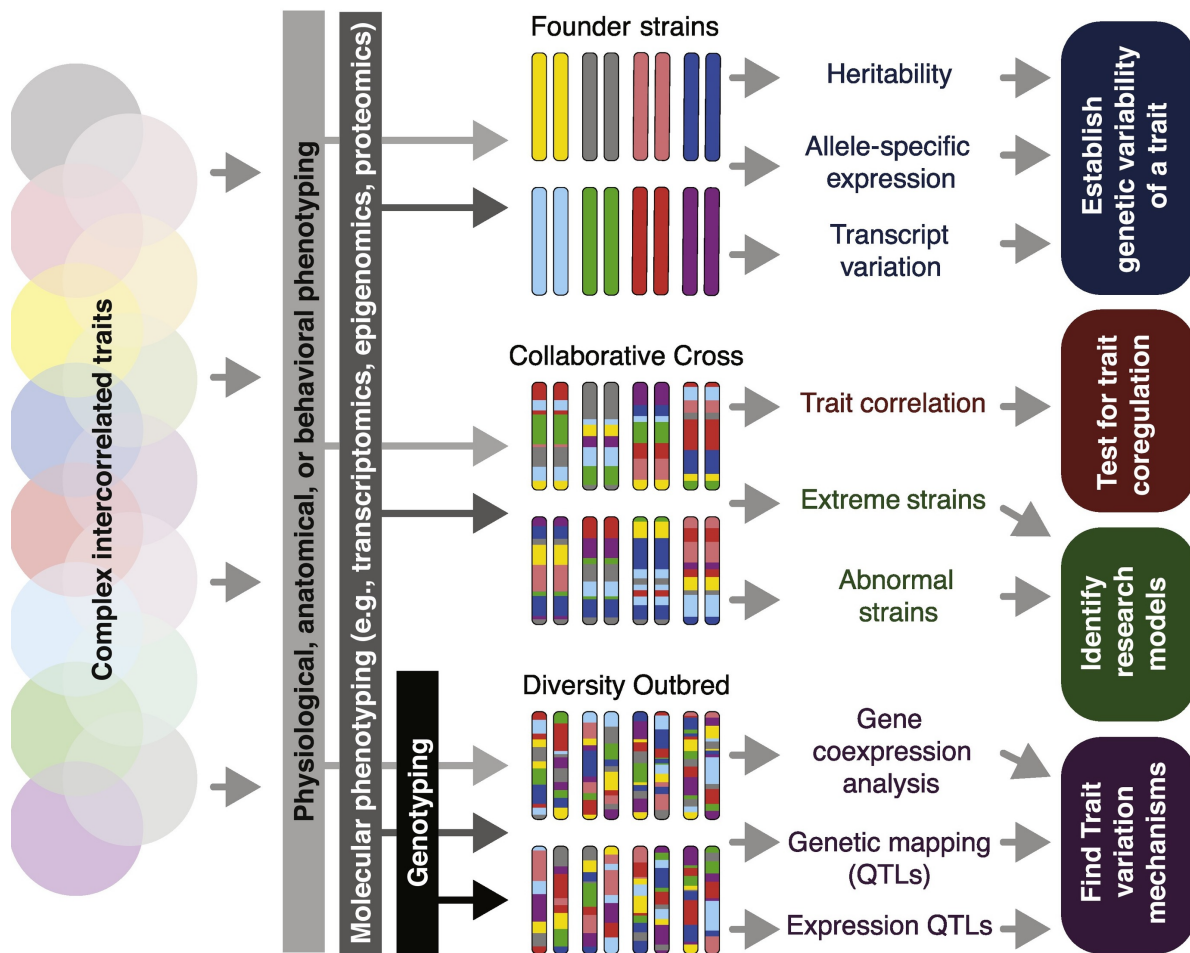


Abbildung 23 Zusammensetzung und Einsatzbereich verschiedener Populationen von Inzuchtmäusen. ¹⁰³

Darüber hinaus sind die CC-Linien häufig erfolgreich zur Genkartierung vieler Merkmale wie diätinduzierter Adipositas sowie Glukosetoleranzentwicklung bei Diabetes Typ 2 eingesetzt worden ^{108,109 110} Obwohl die CC-Linien als Population für Genkartierungen vorgesehen war und in frühen Studien auf diese Weise eingesetzt wurden, ist die Power aufgrund des Aussterbens vieler Linien, welches in erster Linie auf Unfruchtbarkeit der männlichen Tiere zurückzuführen ist, nur noch für Genloci mit großer Effektstärke ausreichend ^{103 111}.

5.2.3. Antikörper

LYVE-1 wird auf lymphatischen Endothelzellen der Hornhaut stark exprimiert. Während in anderen Teilen des Auges teilweise über die adäquaten Marker diskutiert wird, gilt LYVE-1 in der Hornhaut als gut etablierter und spezifischer Marker für Lymphgefäße, weshalb auf eine doppelte Färbung verzichtet werden kann ¹¹². Allerdings ist die Expression variabel und hängt unter anderem vom Alter der Tiere ab. Es wurden Lücken in den Gefäßen des Limbus beschrieben, die bis zum Alter von 8 Wochen zunehmen. Möglicherweise handelt es sich bei

diesen Lücken um klappenähnliche Strukturen, die dem unidirektionalen lymphatischen Fluss dienen und als Eintrittspforte für Makrophagen in die Lymphbahn genutzt werden. Interessanterweise waren diese LYVE-1-negativen Lücken bei C57BL/6 Mäusen stärker ausgeprägt als bei BALB/c Mäusen, einer Linie mit allgemein weniger Lymphgefäßen der naiven Hornhaut ¹¹³.

Entsprechende Unterschiede könnten eventuell auch teilweise für die unterschiedlichen Gefäßflächen der CC-Linien verantwortlich sein.

Deswegen wurden Stellen, an denen Lymphgefäße offensichtlich weiterführten, aber initial Lücken bestanden, in der Nachbearbeitung als „falsch-negativ“ manuell ergänzt, um diese LYVE-1 negativen Bereich auszugleichen und eine möglichst vollständige Abbildung der Lymphgefäße zu ermöglichen.

5.2.4. Bildanalyse

Die semiautomatische Methode wurde von Bock et al. 2008 etabliert und zeichnet sich im Vergleich zur manuellen Auswertung durch höhere Präzision, höhere Validität und mindestens gleichwertige Reproduzierbarkeit und Objektivität aus ⁷⁵.

Bei der Validität zeigt sich, dass die semiautomatische Methode weniger falsch-positive Gefäße detektiert als die manuelle Methode. Dieser Effekt war allerdings für Blutgefäße stärker ausgeprägt als für Lymphgefäße. Bei vergleichbar guter Reproduzierbarkeit war die semiautomatische Methode in der Objektivität der manuellen Methode überlegen. Wieder war der Effekt für Blutgefäße stärker als für Lymphgefäße.

Dies wurde darauf zurückgeführt, dass Lymphgefäße im Vergleich zu Blutgefäßen eher als einzelne, große Gefäße in die Hornhaut einwachsen und leichter mit der manuellen Methode zu detektieren sind als Blutgefäße. Allerdings wurde die Methode bei nahtinduzierter Neovaskularisation getestet. Durch die von der Naht induzierte Entzündungsreaktion entwickeln deutlich mehr und stärker differenzierte Gefäße. Man kann also annehmen, dass je einfacher die Gefäßstruktur ist desto weniger stark die Vorteile der semiautomatischen Methode sind. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei naiven Hornhäuten, die deutlich weniger differenzierte Lymphgefäße zeigen, die manuelle Methode eventuell gleiche oder bessere Ergebnisse erzielen könnte.

Ungenauigkeiten ergeben sich unter anderem aus sich kreuzenden Gefäßen. Die Hornhaut ist zwar sehr flach, trotzdem verlaufen die Gefäße 3-dimensional.

Bei zwei übereinander liegenden Gefäßen ist eine genaue Differenzierung zu einer Gefäßverzweigung nicht möglich. Daher kann der Parameter Gefäßverzweigungen vermutlich nicht so genau erhoben werden wie Gefäßneusprossungen und Gefäßendpunkte.

Es existieren Parameter, die weitere Informationen über die Beschaffenheit der Gefäße liefern könnten. So schlagen Blacher et al. vor, die Dichte der Gefäße an Gefäßneusprossungen und -aufzweigungen, sowie die maximale Gefäßlänge zu messen und konnten auf diese Weise bereits Ro-28-2653, einen Inhibitor von Matrix-Metalloproteasen, mit lymphangiogenen Eigenschaften in Verbindung bringen ⁸⁶.

Ein Vorteil der semiautomatischen Methode liegt darin, dass auch Regenfuß et al. ⁷² sowie Büttner et al. ¹⁰ diese Methode bereits erfolgreich zur Identifizierung von Modulatoren der Lymphangiogenese genutzt haben. Dadurch sind die Ergebnisse besonders gut vergleichbar.

5.3. Diskussion der Ergebnisse

5.3.1. CC-Linien in der Immunfluoreszenz

Bereits in der groben Betrachtung der Immunfluoreszenz wurde deutlich, dass eine große Variation in der Lymphgefäßarchitektur der naiven Hornhaut der CC-Linien besteht. Aufgrund der Studie von Regenfuß et al. 2010 an Laborlinien war eine Variation zu erwarten, jedoch fällt bereits bei grober Betrachtung auf, dass unter den CC-Linien einige mit sowohl deutlich mehr als auch deutlich weniger Lymphgefäßen als die von Regenfuß untersuchten Linien vorhanden waren (Abbildung 12) ¹².

Eine mögliche Erklärung ergibt sich aus der Züchtung der CC-Linien aus 8 Gründerlinien. Es ist anzunehmen, dass aktivierend oder inhibierend auf die Lymphangiogenese wirkende Effekte, die in die gleiche Richtung wirken, durch die Verpaarung verstärkt werden können.

Die Linien FIV und HAX2 zeigten augenscheinlich unterschiedliche Gefäßstrukturen. Während die Linie FIV über ein ausgeprägtes limbales Gefäß verfügt, hat die Linie HAX2 nur in wenigen Abschnitten überhaupt ein limbales Gefäß und zeigt stark vernetzte Lymphgefäßarchitektur mit vielen Gefäßverzweigungen und -endpunkten.

5.3.2. Anteilige Gefäßfläche

Die untersuchten CC-Linien unterschieden sich in der Gesamtfläche der Hornhaut signifikant um bis zu 28%. Diese Abweichung war soweit keine Überraschung und befand sich im erwarteten Rahmen.

Die in der Immunfluoreszenz beobachtbare Variation der Lymphgefäßarchitektur zeigte sich deutlich in der Auswertung der anteiligen prozentualen Gefäßfläche in Form von CC-Linien mit durchschnittlich 0% bis 6,363% anteiliger Lymphgefäßfläche.

Die beobachteten Unterschiede in der anteiligen Lymphgefäßfläche der naiven Hornhaut stehen prinzipiell im Einklang mit den Ergebnissen von Regenfuß et al. 2010 und Nakao et al. 2010, die für verschiedene Mauslinien (BALB/c, C57BL/6, SJL, 129S1/Sv, FVB, Cast/Ei) (C57BL/6, BALB/c, nu/nu, 129E, Black Swiss) zeigten, dass diese sich bezüglich der Lymphgefäße in der naiven Hornhaut unterscheiden und genetische Faktoren diese entscheidend beeinflussen. Die von Regenfuß et al. benutzten Linien waren fast ausschließlich gängige Laborlinien, die wie fast alle Laborlinien in großen Teilen auf die Gattungen *Mus musculus domesticus*, *Mus musculus musculus* und *Mus musculus castaneus* und nur einem kleinen Teil auf Wildmäuse zurückzuführen sind ^{114 12}. Die verwendete Linie Cast/EiJ war als einzige Linie zu einem großen Teil von Wildmäusen abgeleitet ¹¹⁵.

Die hier eingesetzten CC-Linien waren stärker von Wildmäusen abgeleitet und bestätigen, dass diese Unterschiede vermutlich auch in Wildtieren bestehen^{12 70}.

Insgesamt war die ermittelte oben genannte Variation in der Lymphgefäßfläche mit einem Oberwert bis 6,363% deutlich größer, als auf Basis von Regenfuß et al. 2010 und Nakao et al. zu vermuten war.

Während Nakao et al. und Regenfuß et al. die Linie C57BL/6 als Linien mit der größten Gefäßfläche identifiziert haben und sich die anderen Linien maximal um den Faktor 2 bzw. 1,8 von C57BL/6 unterschieden, enthielten die CC-Linien Linien mit signifikant mehr Gefäßfläche als die von Regenfuß et al. als „hoch-lymphangiogen“ postulierten Tiere der C57BL/6 Linie. Auch enthielten die CC-Linien Linien mit weniger Gefäßfläche als die von Regenfuß als „niedrig-lymphangiogen“ postulierten BALB/c Linien^{12 70}.

FIV zeigte im Vergleich zur „hoch-lymphangiogenen“ C57BL/6 mit 3,445% eine um den Faktor 1,84 vergrößerte anteilige Lymphgefäßfläche von 6,363%. Die Linien LUV, LOT und PAT und YID zeigten mit 0,78%, 0,10%, 0,07% und 0% extrem wenig Lymphgefäße. Dabei zeigten im Fall von LOT eine Probe, im Fall von PAT 2 von 3 Proben und im Fall von YID die einzige vorhandene Probe überhaupt keine Lymphgefäße, was bisher noch nicht beschrieben wurde. Daher sind im Vergleich zu den von Regenfuß untersuchten Linien einige der CC-Linien (NUK, FIV, HAX2, LAM2) als „extrem hoch-lymphangiogen“ und (LOT, PAT, YID) „extrem niedrig-lymphangiogen“ anzusehen¹⁰.

Die Stärke dieser Studie in Bezug auf die Charakterisierung der anteiligen Lymphgefäßfläche der naiven Hornhaut liegt in der großen Anzahl von 20 verschiedenen Linien, die eine bessere Einordnung der Ergebnisse ermöglicht. Eine Schwäche liegt in der limitierten Aussagekraft durch die Fallzahl aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit und Wirtschaftlichkeit von $n = 3$ Tieren der CC-Linien. Die von Regenfuß et al. und Nakao et al. durchgeführten Studien sind für die insgesamt charakterisierten 9 Linien mit zwischen 4 und 19 Tieren pro Linie aussagekräftiger. Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist als hoch anzusehen, da die Methode anhand von 4 Tieren der C57BL/6 Linie als Kontrollgröße validiert wurde^{12 70}.

5.3.3. Etablierte morphometrische Parameter der Lymphgefäße

Die wie erwartet hohen Korrelationen der drei morphometrischen Parameter Gefäßneusprossungen pro mm^2 mit $R^2=0,63$, -verzweigungen pro mm^2 mit $R^2=0,69$ und -endpunkte pro mm^2 mit $R^2=0,79$ mit der anteiligen Lymphgefäßfläche an der Gesamtfläche der Hornhaut bestätigten, dass große Unterschiede zwischen den CC-Linien bestehen und ein enger Zusammenhang zwischen der anteiligen Gefäßfläche und den morphometrischen Parametern bestehen, wie logisch zu erwarten war.

Die unerwartet große Variation zwischen den CC-Linien spiegelte sich auch in den morphometrischen Merkmalen -in Form von Linien mit extrem wenigen und Linien mit sehr vielen Gefäßendpunkten, -verzweigungen und Gefäßneusprossungen - wider. Dies bestätigt abermals die Ergebnisse von Regenfuß et al. 2010, die sich jedoch auf die Gefäßneusprossungen beschränkt und deren Anzahl nicht ins Verhältnis zur Gesamtfläche der Hornhaut gesetzt haben. Dennoch ist erkennbar, dass die beobachtete Variation der morphometrischen Merkmale der CC-Linien analog zur anteiligen Gefäßfläche deutlich größer waren. Regenfuß et al. beschreiben eine maximale Abweichung um den Faktor 1,6. Die CC-Linien enthielten mehrere Linien mit im Durchschnitt weniger als 1 Gefäßneusprossung pro mm² sowie Linien mit einem Vielfachen dessen, beispielsweise die Linie LAM2 mit durchschnittlich 4,48¹².

Die im Vergleich zu C57BL/6 signifikant in der Lymphgefäßfläche vergrößerten Linien FIV, LAM2, HAX2 und NUK zeigten strukturell deutlich unterschiedliche morphometrischer Merkmale (Tabelle 9). Während bei FIV trotz größter anteiliger Gefäßfläche weder Gefäßendpunkten, -verzweigungen noch Gefäßneusprossungen pro mm² im Vergleich zu C57BL/6 vermehrt vorhanden waren, zeigt LAM2 in allen 3 Parametern hoch signifikante Abweichungen.

Nakao et al. 2010 berichten von Lymphgefäßen, die ohne Kontakt zum limbalen Gefäß innerhalb der Hornhaut vorlagen. Solche Gefäße waren unter den CC-Linien vereinzelt aufgetreten, erklärten jedoch in den Linien FIV und LAM2 nicht die beobachteten Unterschiede. Diese Unterschiede beruhen auf dem Gefäßdurchmesser des limbalen Gefäßes (Tabelle 9)

70.

CC-Linien mit hoher Lymphgefäßfläche	FIV	LAM2	HAX2	NUK
Gefäßneusprossungen pro mm²	ns	↑ ***	ns	ns
Gefäßverzweigungen pro mm²	ns	↑ ***	↑ ***	↑ **
Gefäßendpunkte pro mm²	ns	↑ ***	↑ ***	↑ *
Gefäßdurchmesser	***	ns	ns	ns

Tabelle 9 Morphometrische Parameter der CC-Linien mit der größten anteiligen Lymphgefäßfläche

Dargestellt sind die Linien FIV, LAM2, HAX2, NUK im Vergleich zu C57BL/6. Die Sterne geben das Signifikanzniveau in Dunnett-Test als Post-Hoc-Test der einfaktoriellem Varianzanalyse: *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$; ns = nicht signifikant ($p > 0,05$) jeweils im Vergleich zu C57BL/6.

5.3.4. Gefäßdurchmesser des limbalen Gefäßes

Zur Charakterisierung der Lymphgefäßarchitektur der Hornhaut wurden bisher in erster Linie die Merkmale Gefäßfläche, -neusprossungen und -endpunkte sowie die Gefäßdichte genutzt.^{10 12} Um die Unterschiede der Linien FIV, LAM2, HAX2 und NUK mit viel anteiliger Lymphgefäßfläche weiter quantitativ zu erklären, erfolgte die Erhebung des Gefäßdurchmessers des limbalen Gefäßes.

Die Linie FIV zeigte einen hoch signifikant vergrößerten Gefäßdurchmesser des limbalen Gefäßes, welches die erhöhte anteilige Gefäßfläche erklärt (Tabelle 9). LAM2 hingegen hatte mit einem nicht signifikant von C57BL/6 abweichendem Gefäßdurchmesser des vorhandenen limbalen Gefäßes und einer Vielzahl vernetzter Gefäße eine erhöhte anteilige Lymphgefäßfläche. Die Linie HAX2 zeigte mit einem nur rudimentär ausgeprägten limbalen Gefäß und einer Vielzahl vernetzter Gefäße die erhöhte anteilige Lymphgefäßfläche.

Bisher wurde keine solchen Unterschiede im Durchmesser des limbalen Gefäßes beschrieben. Allerdings haben Yuen et al.¹¹⁶ gezeigt, dass die Lymphgefäße der Hornhaut insgesamt bei jungen Mäusen im Vergleich zu älteren Tieren einen deutlich größeren Durchmesser aufweisen. Dies war bei den Blutgefäßen nicht der Fall. Der vergrößerte Durchmesser der Lymphgefäße wird mit der erhöhten Abstoßungsrate von Hornhauttransplantaten bei Kindern und Säuglingen in Verbindung gebracht, was auf Grund des kritischen Behandlungszeitfensters für die Entwicklung des Auges bei Kindern von besonderer Wichtigkeit ist.¹¹⁶ Auch in anderen Bereichen außerhalb der Hornhaut, beispielsweise der Tumormetastase bei kolorektalen Karzinomen, korreliert der Durchmesser der Lymphgefäße mit der Häufigkeit von Frühmetastasen.¹¹⁷

In vivo OCT-Aufnahmen der limbalen Gefäße des Menschen konnten den logischen Zusammenhang des Gefäßdurchmessers und der Gefäßtiefe durch eine hohe Korrelation der beiden Parameter bestätigen. Allerdings wird in der Studie nicht zwischen Blut- und Lymphgefäßen unterschieden und die Teilnehmerzahl war mit 14 gering.¹¹⁸

Horstmann et al. 2017 konnten für ein *in vivo* Mausmodell zeigen, dass Lymphgefäße der Hornhaut mittels OCT darstellbar und von Blutgefäßen abgrenzbar waren.¹¹⁹ Eine Studie zu *ex vivo en-face* humanen Augen von Palme et al. 2020 bestätigt die Darstellbarkeit und Bestimmbarkeit des Durchmessers der limbalen Lymphgefäße der Hornhaut, indem konfokalmikroskopische Aufnahmen mit Immunfluoreszenzaufnahmen verglichen wurden. Sie beschreiben den im Vergleich zu Blutgefäßen vergrößerten Gefäßdurchmesser der limbalen lymphatischen Gefäße als Abgrenzungsmerkmal.¹²⁰

5.3.5. Gruppierung der CC-Linien auf Basis der Lymphgefäßstruktur

Die strukturellen Unterschiede der Lymphgefäßarchitektur der CC-Linien legten eine Einteilung nach morphologischen Parametern nahe, die die klassische Einteilung in „hoch-lymphangiogen“ und „niedrig-lymphangiogen“, die in erster Linie auf der anteiligen Lymphgefäßfläche beruht, sinnvoll ergänzt. Diese könnte nach 4 Gruppen erfolgen:

Gruppe 1: Besonders breites limbales Gefäß

Insbesondere bei der Linie FIV fiel auf, dass das limbale Gefäß über alle Proben hinweg eine sehr ausgeprägte Breite besaß (Abbildung 24, Gruppe 1). Dadurch bedingt war auch die anteilige mit Lymphgefäßen bedeckte Fläche überdurchschnittlich groß. Die Gefäßausprossungen aus dem limbalen Gefäß waren deutlich feiner und entsprachen eher denen der anderen Linien.

Gruppe 2: Besonders differenzierte Lymphgefäße

Einige Linien wiesen überproportional viele Differenzierungen der Lymphgefäße in Form von Gefäßendpunkten, -verzweigungen und Gefäßneusprossungen auf (Abbildung 24, Gruppe 2). Durch die große Differenzierung zeigten sie auch eine tendenziell eine große Gefäßfläche. Zu dieser Gruppe zählen LAM, HAX2, NUK und LAM2.

Gruppe 3: Keine oder sehr wenige Lymphgefäße

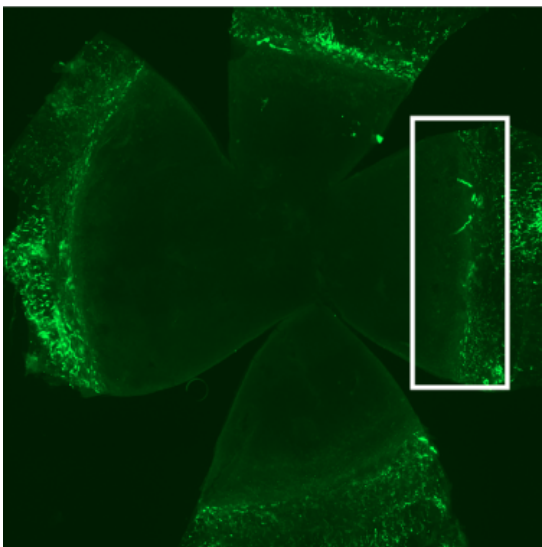
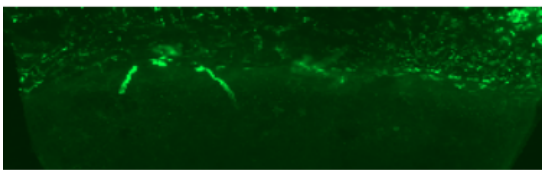
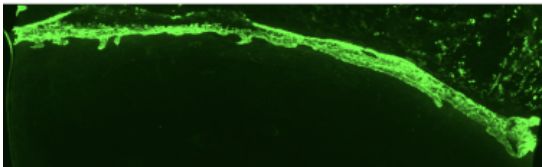
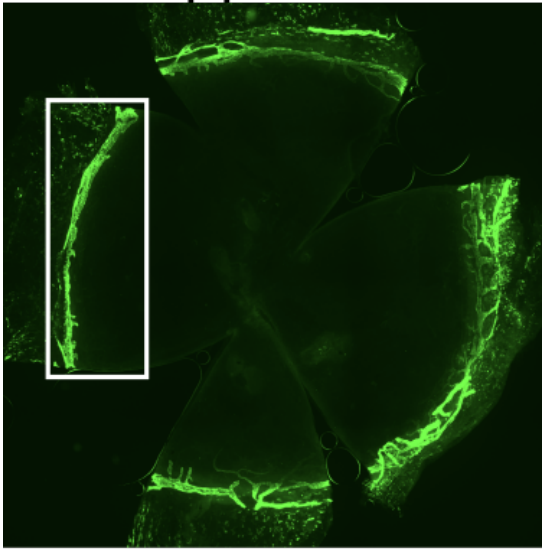
LOT, PAT, LUV, YOX, ZIF2 und YID zeigten in den naiven Hornhäuten nur sehr wenige oder keine Lymphgefäße (Abbildung 24, Gruppe 3).

Gruppe 4: Durchschnittliche Lymphgefäße

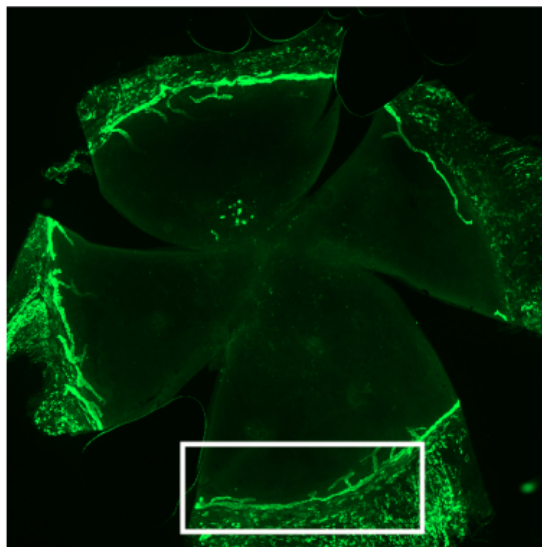
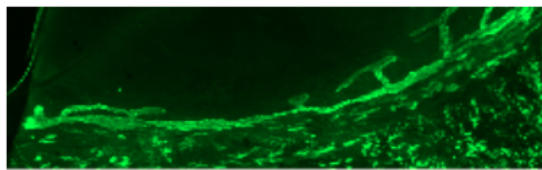
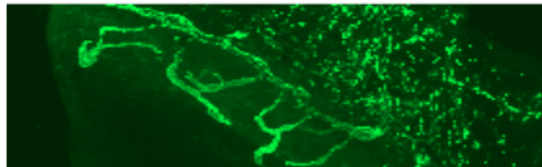
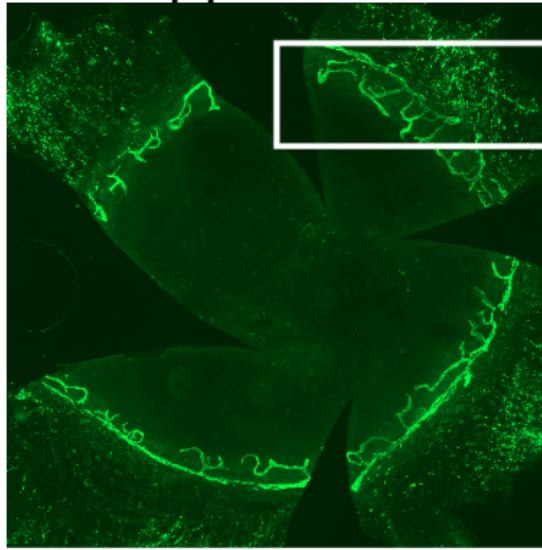
Ein großer Teil der Linien zeigte Lymphgefäße, die keine besonderen Eigenschaften besaßen. Sie zeigten eine durchschnittliche Gefäßfläche (Abbildung 24, Gruppe 4). Sie zeigten auch eine Differenzierung in Form von Gefäßendpunkten, -verzweigungen und Gefäßneusprossungen, aber weniger ausgeprägt als Gruppe C.

Zu dieser Gruppe gehören SEH, LUS, FIM, POH, TOP, TOFU, DET3, LAT, LEM, XAK und SAT.

Gruppe 1: FIV



Gruppe 2: LAM



Gruppe 3: LOT

Gruppe 4: SEH

Abbildung 24 Gruppierung der CC-Linien nach morphometrischen Parametern der Lymphgefäße

Die gelben Linien dienen der Orientierung am Limbus. In den roten Kästen sind Vergrößerungen des enthaltenen Abschnitts abgebildet. A) Hornhaut der Linie FIV stellvertretend für die Gruppe mit besonders breitem limbalen Gefäß. B) Hornhaut der Linie HAX2 stellvertretend für die Gruppe der besonders differenzierten Lymphgefäße. C) Hornhaut der Linie ZIF2 stellvertretend für die Gruppe mit sehr wenigen oder keinen Lymphgefäßen. D) Hornhaut der Linie SEH stellvertretend für die Gruppe mit durchschnittlichen Lymphgefäßen.

5.3.6. QTL-Analyse

Es ergaben sich genom-weit bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ keine signifikanten Loci. Die 2 Top-Loci lagen bei 17:84650591-85080031 und 3:119775901-124015473. Auf eine genauere Diskussion der dort enthaltenen Gene wird verzichtet, weil keine Signifikanz bestand und eine Signifikanz mit mehr Tieren pro Linie möglich, aber nicht gesichert war. Auch auf die Berechnung von Gründereffekten wurde aus diesem Grund verzichtet.

Die Daten beschreiben die Kopplung in Form von Haploblöcken, nicht von einzelnen Markern. Die untersuchten Linien haben in bestimmten Intervallen den genetischen Ursprung einer Gründerlinie. Das Intervall wird dabei als Ganzes auf den Phänotyp bezogen. Bei einer Gruppengröße $n = 3$ waren dabei auf einigen chromosomalen Intervallen nicht alle Gründerlinien vertreten und der gebildete Durchschnittswert war bei dieser Fallzahl deswegen nicht hinreichend stabil. Deshalb ergaben sich bei mindestens 1000 Permutationen und einem Signifikanzniveau von 0,05 erhöhte Schwellenwerte für eine genomweite Signifikanz von >10 , die sonst (als Referenzgröße) genomweit erfahrungsgemäß deutlich niedriger liegen würden.

Die Ähnlichkeit der LOD-Scores für die verschiedenen untersuchten Parameter legte nahe, dass geteilte Genloci für die Ausprägung der verschiedenen Parameter verantwortlich sind. Diese Ähnlichkeit der LOD-Scores ist für den Parameter Durchmesser des limbalen Gefäßes, bei dem alle 5 Top-Loci der Gefäßfläche auch eine Spitze über 6 zeigten, besonders ausgeprägt und deutete somit auf eine besonders enge genetische Beziehung der beiden Parameter hin. Diese Beziehung war auch am Locus mit dem höchsten LOD-Score erkennbar (Abbildung 22). Nahe dem Locus des höchsten LOD-Scores für die Gefäßfläche auf Chromosom 17 zwischen 84650591 und 85080031 befanden sich auch Spitzen für Gefäßneusprossungen, -endpunkte und Gefäßdurchmesser. Die zweithöchste Spitze war dabei mit einem LOD-Score von 7,66 der Gefäßdurchmesser bei 55,09 cM.

5.4. Ausblick

Bereits auf Basis der phänotypischen Unterschiede wurde mit den Linien C57BL/6 als hoch-lymphangiogene und BALB/c als niedrig-lymphangiogene Linie durch Kreuzung dieser beiden Linien ein Inzuchtstamm erzeugt. Mittels anschließender QTL-Analyse der quantitativen Merkmale des C57BL/6 X BALB/c Inzuchtstammes konnte das Enzym Tyrosinase, sowie kürzlich auch die Cystathionin- β -Synthase¹²¹, als endogener Modulator der Lymphangiogenese und inflammatorischen Lymphangiogenese identifiziert werden. Dabei wurde die Tyrosinase direkt über einen in der QTL-Analyse sehr auffälligen Locus identifiziert, wohingegen die Cystathionin- β -Synthase mittels zusätzlicher RNA-Isolation und anschließender Expressions-QTL-Analyse (eQTL) an einem initial weniger prominenten Locus auf Chromosom 17 gefunden wurde. Dies gelang unter der Annahme, dass sich eine Expressionsdifferenz in Hornhautproben der F0-Generation der untersuchten Population detektieren ließe, woraufhin circa 1000 unterschiedlich exprimierte Gene zwischen C57BL/6 und BALB/c gefunden wurden. Nach Abgleichen dieser Gene mit dem Locus auf Chromosom 17, Anlage eines Vertrauensintervall und Beschränkung auf proteinkodierende und Antisense-Gene zeigte sich Cystathionin- β -Synthase als das am stärksten herunterregelte QTL-Gen mit einem de facto Expressionsausfall in BALB/c. Darüber hinaus beinhaltete der Locus weitere im Zusammenhang mit Gefäßentstehung bekannte Gene, was das Verfahren verifizierte. Auch für die hier untersuchten CC-Linien ist daher annehmbar, dass mit einer ergänzenden Bestimmung der RNA-Expressionsdaten und Abgleich der QTL und eQTL-Analysen das Rauschen in den Daten (Abbildung 21) reduziert und auf diese Weise weitere endogene Regulatoren identifiziert werden könnten^{121 10}.

Darüber hinaus könnten die CC-Linien verwendet werden um, analog zur Identifikation der Tyrosinase mittels QTL-Analyse eines BALB/c X C57BL/6 Inzuchtstammes, aus noch extremeren Linien einen Inzuchtstamm zu züchten. Vielversprechende Kandidaten der CC-Linien dafür wären die in dieser Studie genutzten und anhand der Fläche als „extrem hoch-lymphangiogen“ identifizierten CC-Linien FIV und NUK, die deutlich mehr Lymphgefäße aufweisen als C57BL/6, sowie die Linien „extrem niedrig-lymphangiogenen“ Linien LOT, PAT und LUV als „niedrig-angiogenes“ Gegenstück zur Linie BALB/c¹⁰.

Ein anderer vielversprechender Ansatz zur Reduktion des Rauschens in den Daten wäre die Studie mit einer erhöhten Anzahl an CC-Linien und Mäusen pro Linie auszuweiten. Dadurch würden sich stabilere Mittelwerte bilden und Modulatoren der Lymphangiogenese könnten möglicherweise in der QTL-Analyse identifiziert werden, wenn sich die oben genannten Spitzen als signifikant herausstellen.

In diesem Fall wäre es möglich Gründereffekte für den betreffenden Locus zu berechnen. Darunter versteht man die Einbeziehung von Informationen über den Phänotyp besonders

stark abweichender Gründerlinien, wodurch die Anzahl der in einem Intervall vorkommenden Varianten auf die Varianten mit dem höchsten vorhergesagten Einfluss reduziert wird.

Die auf signifikanten Loci vorkommenden Gene würden danach auf Übereinstimmung mit bereits bekannten Modulatoren der Lymphangiogenese untersucht, um abermals die Methode zu bestätigen und im nächsten Schritt würden die von neu aufgetretenen Genen kodierten Elemente auf ihre Eigenschaften bezüglich der Lymphangiogenese hin untersucht.

Durch die Hinzunahme des Gefäßdurchmessers des limbalen Lymphgefäßes als morphologischen Parameters würde die Wahrscheinlichkeit für die Identifikation weiterer Genloci erhöht und der Parameter selbst abermals validiert.

Darüber hinaus lassen die Ergebnisse des Gefäßdurchmessers vermuten, dass weitere morphologische Parameter existieren, die potenziell noch besser zur Identifikation weiterer endogener Regulatoren der Lymphangiogenese mittels QTL-Analyse geeignet sind als die bisher vorrangig eingesetzten. Denkbar wäre beispielsweise eine genauere Untersuchung der durchschnittlichen Gefäßlänge oder Gefäßdichte als morphologische Parameter. Durch Etablierung und Einbringung der optimalen Parameter ließe sich die Wahrscheinlichkeit weiter erhöhen.

Für die Identifikation von sehr kleinen Loci hingegen sind die CC-Linien nur bedingt geeignet. Für diesen Zweck bieten sich die Diversity Outbred (DO) Linien an (Abbildung 22). DO enthalten die gleichen 8 Gründerstränge und somit die gleiche genetische Variation wie die CC-Linien. Allerdings wurden die Mäuse nicht als Inzuchtlinien der 2. Generation tunnelförmig sondern pseudozufällig verpaart. Die dadurch erzeugten Populationen enthalten die gleiche Variation der Allele wie die CC-Linien, aber eine höhere genetische Heterogenität mit einer einzigartigen gleichmäßig verteilten Kombination der Allele der 8 Gründerlinien auf dem Genom in jedem Individuum. Sie sind deshalb weniger anfällig für Erkrankungen wie Diabetes und verpaaren sich besser als die CC-Linien, wodurch leichter größere Populationen erzeugt werden können. Mit Hilfe der DO könnte so die Kartierung kleiner Loci mit sehr hoher Präzision zur Identifikation weiterer Modulatoren möglich sein ^{103 122 123}.

6. Literaturverzeichnis

1. Cursiefen C. Immune privilege and angiogenic privilege of the cornea. *Chem Immunol Allergy* 2007; **92**: 50-7.
2. Clahsen T, Buttner C, Hatami N, Reis A, Cursiefen C. Role of Endogenous Regulators of Hem- And Lymphangiogenesis in Corneal Transplantation. *J Clin Med* 2020; **9**(2).
3. Scott AW, Bressler NM, Ffolkes S, Wittenborn JS, Jorkasky J. Public Attitudes About Eye and Vision Health. *JAMA Ophthalmol* 2016; **134**(10): 1111-8.
4. Flaxman SR, Bourne RRA, Resnikoff S, et al. Global causes of blindness and distance vision impairment 1990-2020: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health* 2017; **5**(12): e1221-e34.
5. Cursiefen C. [Ophthalmology: our discipline with a future]. *Ophthalmologe* 2019; **116**(9): 815-6.
6. Dana MR, Streilein JW. Loss and restoration of immune privilege in eyes with corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; **37**(12): 2485-94.
7. Sano Y, Ksander BR, Streilein JW. Fate of orthotopic corneal allografts in eyes that cannot support anterior chamber-associated immune deviation induction. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; **36**(11): 2176-85.
8. Dietrich T, Bock F, Yuen D, et al. Cutting edge: lymphatic vessels, not blood vessels, primarily mediate immune rejections after transplantation. *J Immunol* 2010; **184**(2): 535-9.
9. Chen L. Ocular lymphatics: state-of-the-art review. *Lymphology* 2009; **42**(2): 66-76.
10. Buttner C, Clahsen T, Regenfuss B, et al. Tyrosinase Is a Novel Endogenous Regulator of Developmental and Inflammatory Lymphangiogenesis. *Am J Pathol* 2019; **189**(2): 440-8.
11. Blackburn BJ, Jenkins MW, Rollins AM, Dupps WJ. A Review of Structural and Biomechanical Changes in the Cornea in Aging, Disease, and Photochemical Crosslinking. *Front Bioeng Biotechnol* 2019; **7**: 66.
12. Regenfuss B, Onderka J, Bock F, Hos D, Maruyama K, Cursiefen C. Genetic heterogeneity of lymphangiogenesis in different mouse strains. *Am J Pathol* 2010; **177**(1): 501-10.
13. Regenfuss B, Bock F, Cursiefen C. Corneal angiogenesis and lymphangiogenesis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2012; **12**(5): 548-54.
14. Cursiefen C, Chen L, Borges LP, et al. VEGF-A stimulates lymphangiogenesis and hemangiogenesis in inflammatory neovascularization via macrophage recruitment. *J Clin Invest* 2004; **113**(7): 1040-50.
15. Cursiefen C, Cao J, Chen L, et al. Inhibition of hemangiogenesis and lymphangiogenesis after normal-risk corneal transplantation by neutralizing VEGF promotes graft survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; **45**(8): 2666-73.
16. Chang JH, Gabison EE, Kato T, Azar DT. Corneal neovascularization. *Curr Opin Ophthalmol* 2001; **12**(4): 242-9.
17. Streilein JW, Yamada J, Dana MR, Ksander BR. Anterior chamber-associated immune deviation, ocular immune privilege, and orthotopic corneal allografts. *Transplant Proc* 1999; **31**(3): 1472-5.
18. Cursiefen C, Chen L, Dana MR, Streilein JW. Corneal lymphangiogenesis: evidence, mechanisms, and implications for corneal transplant immunology. *Cornea* 2003; **22**(3): 273-81.
19. Hos D, Le VNH, Hellmich M, et al. Risk of Corneal Graft Rejection After High-risk Keratoplasty Following Fine-needle Vessel Coagulation of Corneal Neovascularization Combined With Bevacizumab: A Pilot Study. *Transplant Direct* 2019; **5**(5): e452.
20. Streilein JW. Ocular immune privilege: therapeutic opportunities from an experiment of nature. *Nat Rev Immunol* 2003; **3**(11): 879-89.
21. Yang JF, Walia A, Huang YH, et al. Understanding lymphangiogenesis in knockout models, the cornea, and ocular diseases for the development of therapeutic interventions. *Surv Ophthalmol* 2016; **61**(3): 272-96.

22. Maruyama K, Li M, Cursiefen C, et al. Inflammation-induced lymphangiogenesis in the cornea arises from CD11b-positive macrophages. *J Clin Invest* 2005; **115**(9): 2363-72.
23. Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, et al. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature* 2015; **523**(7560): 337-41.
24. Cursiefen C, Schlotzer-Schrehardt U, Kuchle M, et al. Lymphatic vessels in vascularized human corneas: immunohistochemical investigation using LYVE-1 and podoplanin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; **43**(7): 2127-35.
25. Ellis LM, Hicklin DJ. VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat Rev Cancer* 2008; **8**(8): 579-91.
26. Bachmann BO, Bock F, Wiegand SJ, et al. Promotion of graft survival by vascular endothelial growth factor a neutralization after high-risk corneal transplantation. *Arch Ophthalmol* 2008; **126**(1): 71-7.
27. Dohlman TH, Omoto M, Hua J, et al. VEGF-trap aflibercept significantly improves long-term graft survival in high-risk corneal transplantation. *Transplantation* 2015; **99**(4): 678-86.
28. Dastjerdi MH, Saban DR, Okanobo A, et al. Effects of topical and subconjunctival bevacizumab in high-risk corneal transplant survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; **51**(5): 2411-7.
29. Gupta AA, Mammo DA, Page MA. Intrastromal bevacizumab in the management of corneal neovascularization: a retrospective review. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2020; **258**(1): 167-73.
30. Sarah B, Ibtissam H, Mohammed B, Hasna S, Abdeljalil M. Intrastromal Injection of Bevacizumab in the Management of Corneal Neovascularization: About 25 Eyes. *J Ophthalmol* 2016; **2016**: 6084270.
31. Yeung SN, Lichtinger A, Kim P, Amiran MD, Slomovic AR. Combined use of subconjunctival and intracorneal bevacizumab injection for corneal neovascularization. *Cornea* 2011; **30**(10): 1110-4.
32. Dekaris I, Gabric N, Draca N, Pauk-Gulic M, Milicic N. Three-year corneal graft survival rate in high-risk cases treated with subconjunctival and topical bevacizumab. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2015; **253**(2): 287-94.
33. Koenig Y, Bock F, Horn F, Kruse F, Straub K, Cursiefen C. Short- and long-term safety profile and efficacy of topical bevacizumab (Avastin) eye drops against corneal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2009; **247**(10): 1375-82.
34. Bhatti N, Qidwai U, Hussain M, Kazi A. Efficacy of sub-conjunctival and topical bevacizumab in high-risk corneal transplant survival. *J Pak Med Assoc* 2013; **63**(10): 1256-9.
35. Mestanoglu M, Handel A, Cursiefen C, Hos D. Three-year follow-up of high-risk keratoplasty following fine-needle diathermy of corneal neovascularization combined with bevacizumab. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2022; **260**(7): 2383-5.
36. Dohlman TH, McSoley M, Amparo F, et al. Bevacizumab in High-Risk Corneal Transplantation: A Pilot Multicenter Prospective Randomized Control Trial. *Ophthalmology* 2022; **129**(8): 865-79.
37. Hos D, Regenfuss B, Bock F, Onderka J, Cursiefen C. Blockade of insulin receptor substrate-1 inhibits corneal lymphangiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; **52**(8): 5778-85.
38. Niederkorn JY. Immune mechanisms of corneal allograft rejection. *Curr Eye Res* 2007; **32**(12): 1005-16.
39. Vlahakis NE, Young BA, Atakilit A, Sheppard D. The lymphangiogenic vascular endothelial growth factors VEGF-C and -D are ligands for the integrin alpha9beta1. *J Biol Chem* 2005; **280**(6): 4544-52.
40. Mishima K, Watabe T, Saito A, et al. Prox1 induces lymphatic endothelial differentiation via integrin alpha9 and other signaling cascades. *Mol Biol Cell* 2007; **18**(4): 1421-9.
41. Maruyama Y, Maruyama K, Kato Y, et al. The effect of podoplanin inhibition on lymphangiogenesis under pathological conditions. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014; **55**(8): 4813-22.

42. Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev* 1999; **79**(4): 1283-316.
43. Bussolino F, Albini A, Camussi G, et al. Role of soluble mediators in angiogenesis. *Eur J Cancer* 1996; **32A**(14): 2401-12.
44. Singh N, Tiem M, Watkins R, et al. Soluble vascular endothelial growth factor receptor 3 is essential for corneal alymphaticity. *Blood* 2013; **121**(20): 4242-9.
45. Albuquerque RJ, Hayashi T, Cho WG, et al. Alternatively spliced vascular endothelial growth factor receptor-2 is an essential endogenous inhibitor of lymphatic vessel growth. *Nat Med* 2009; **15**(9): 1023-30.
46. Makinen T, Jussila L, Veikkola T, et al. Inhibition of lymphangiogenesis with resulting lymphedema in transgenic mice expressing soluble VEGF receptor-3. *Nat Med* 2001; **7**(2): 199-205.
47. Cursiefen C, Chen L, Saint-Geniez M, et al. Nonvascular VEGF receptor 3 expression by corneal epithelium maintains avascularity and vision. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; **103**(30): 11405-10.
48. Emami-Naeini P, Dohlman TH, Omoto M, et al. Soluble vascular endothelial growth factor receptor-3 suppresses allosensitization and promotes corneal allograft survival. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2014; **252**(11): 1755-62.
49. Troyanovsky B, Levchenko T, Mansson G, Matvijenko O, Holmgren L. Angiostatin: an angiostatin binding protein that regulates endothelial cell migration and tube formation. *J Cell Biol* 2001; **152**(6): 1247-54.
50. Tarui T, Miles LA, Takada Y. Specific interaction of angiostatin with integrin alpha(v)beta(3) in endothelial cells. *J Biol Chem* 2001; **276**(43): 39562-8.
51. Chen S, Mienaltowski MJ, Birk DE. Regulation of corneal stroma extracellular matrix assembly. *Exp Eye Res* 2015; **133**: 69-80.
52. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997; **88**(2): 277-85.
53. Faye C, Moreau C, Chautard E, et al. Molecular interplay between endostatin, integrins, and heparan sulfate. *J Biol Chem* 2009; **284**(33): 22029-40.
54. Su J, Stenbjorn RS, Gorse K, et al. Target-derived matricryptins organize cerebellar synapse formation through alpha3beta1 integrins. *Cell Rep* 2012; **2**(2): 223-30.
55. Bix G, Iozzo RV. Matrix revolutions: "tails" of basement-membrane components with angiostatic functions. *Trends Cell Biol* 2005; **15**(1): 52-60.
56. Mundel TM, Kalluri R. Type IV collagen-derived angiogenesis inhibitors. *Microvasc Res* 2007; **74**(2-3): 85-9.
57. Cursiefen C, Masli S, Ng TF, et al. Roles of thrombospondin-1 and -2 in regulating corneal and iris angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; **45**(4): 1117-24.
58. Lawler J. The functions of thrombospondin-1 and-2. *Curr Opin Cell Biol* 2000; **12**(5): 634-40.
59. Watanabe K, Hasegawa Y, Yamashita H, et al. Vasohibin as an endothelium-derived negative feedback regulator of angiogenesis. *J Clin Invest* 2004; **114**(7): 898-907.
60. Heishi T, Hosaka T, Suzuki Y, et al. Endogenous angiogenesis inhibitor vasohibin1 exhibits broad-spectrum antilymphangiogenic activity and suppresses lymph node metastasis. *Am J Pathol* 2010; **176**(4): 1950-8.
61. Xu Y, Yuan L, Mak J, et al. Neuropilin-2 mediates VEGF-C-induced lymphatic sprouting together with VEGFR3. *J Cell Biol* 2010; **188**(1): 115-30.
62. Tang XL, Sun JF, Wang XY, Du LL, Liu P. Blocking neuropilin-2 enhances corneal allograft survival by selectively inhibiting lymphangiogenesis on vascularized beds. *Mol Vis* 2010; **16**: 2354-61.
63. Grimaldo S, Yuen D, Theis J, Ng M, Ecoiffier T, Chen L. MicroRNA-184 Regulates Corneal Lymphangiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015; **56**(12): 7209-13.
64. Oghumu S, Bracewell A, Nori U, et al. Acute pyelonephritis in renal allografts: a new role for microRNAs? *Transplantation* 2014; **97**(5): 559-68.

65. Hong YK, Detmar M. Prox1, master regulator of the lymphatic vasculature phenotype. *Cell Tissue Res* 2003; **314**(1): 85-92.
66. Hong YK, Harvey N, Noh YH, et al. Prox1 is a master control gene in the program specifying lymphatic endothelial cell fate. *Dev Dyn* 2002; **225**(3): 351-7.
67. Wigle JT, Harvey N, Detmar M, et al. An essential role for Prox1 in the induction of the lymphatic endothelial cell phenotype. *EMBO J* 2002; **21**(7): 1505-13.
68. Kazenwadel J, Michael MZ, Harvey NL. Prox1 expression is negatively regulated by miR-181 in endothelial cells. *Blood* 2010; **116**(13): 2395-401.
69. Sun B, Ding Y, Jin X, Xu S, Zhang H. Long non-coding RNA H19 promotes corneal neovascularization by targeting microRNA-29c. *Biosci Rep* 2019; **39**(5).
70. Nakao S, Maruyama K, Zandi S, et al. Lymphangiogenesis and angiogenesis: concurrence and/or dependence? Studies in inbred mouse strains. *FASEB J* 2010; **24**(2): 504-13.
71. Rohan RM, Fernandez A, Udagawa T, Yuan J, D'Amato RJ. Genetic heterogeneity of angiogenesis in mice. *FASEB J* 2000; **14**(7): 871-6.
72. Regenfuss B, Dreisow ML, Hos D, Masli S, Bock F, Cursiefen C. The Naive Murine Cornea as a Model System to Identify Novel Endogenous Regulators of Lymphangiogenesis: TRAIL and rtPA. *Lymphat Res Biol* 2015; **13**(2): 76-84.
73. Abu-Toamih Atamni HJ, Iraqi FA. Efficient protocols and methods for high-throughput utilization of the Collaborative Cross mouse model for dissecting the genetic basis of complex traits. *Animal Model Exp Med* 2019; **2**(3): 137-49.
74. Lander ES, Botstein D. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 1989; **121**(1): 185-99.
75. Bock F, Onderka J, Hos D, Horn F, Martus P, Cursiefen C. Improved semiautomatic method for morphometry of angiogenesis and lymphangiogenesis in corneal flatmounts. *Exp Eye Res* 2008; **87**(5): 462-70.
76. Sarangarajan R, Apte SP. Melanization and phagocytosis: implications for age related macular degeneration. *Mol Vis* 2005; **11**: 482-90.
77. Flint J, Valdar W, Shifman S, Mott R. Strategies for mapping and cloning quantitative trait genes in rodents. *Nat Rev Genet* 2005; **6**(4): 271-86.
78. Yang H, Bell TA, Churchill GA, Pardo-Manuel de Villena F. On the subspecific origin of the laboratory mouse. *Nat Genet* 2007; **39**(9): 1100-7.
79. Roberts A, Pardo-Manuel de Villena F, Wang W, McMillan L, Threadgill DW. The polymorphism architecture of mouse genetic resources elucidated using genome-wide resequencing data: implications for QTL discovery and systems genetics. *Mamm Genome* 2007; **18**(6-7): 473-81.
80. Collin R, Balmer L, Morahan G, Lesage S. Common Heritable Immunological Variations Revealed in Genetically Diverse Inbred Mouse Strains of the Collaborative Cross. *J Immunol* 2019; **202**(3): 777-86.
81. Threadgill DW, Miller DR, Churchill GA, de Villena FP. The collaborative cross: a recombinant inbred mouse population for the systems genetic era. *ILAR J* 2011; **52**(1): 24-31.
82. Mathes WF, Kelly SA, Pomp D. Advances in comparative genetics: influence of genetics on obesity. *Br J Nutr* 2011; **106** Suppl 1: S1-10.
83. Collaborative Cross C. The genome architecture of the Collaborative Cross mouse genetic reference population. *Genetics* 2012; **190**(2): 389-401.
84. Threadgill DW, Churchill GA. Ten years of the collaborative cross. *G3 (Bethesda)* 2012; **2**(2): 153-6.
85. Weerasekera LY, Balmer LA, Ram R, Morahan G. Characterization of Retinal Vascular and Neural Damage in a Novel Model of Diabetic Retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015; **56**(6): 3721-30.
86. Blacher S, Detry B, Bruyere F, Foidart JM, Noel A. Additional parameters for the morphometry of angiogenesis and lymphangiogenesis in corneal flat mounts. *Exp Eye Res* 2009; **89**(2): 274-6.

87. Broman KW, Gatti DM, Svenson KL, Sen S, Churchill GA. Cleaning Genotype Data from Diversity Outbred Mice. *G3 (Bethesda)* 2019; **9**(5): 1571-9.
88. Broman KW, Gatti DM, Simecek P, et al. R/qt2: Software for Mapping Quantitative Trait Loci with High-Dimensional Data and Multiparent Populations. *Genetics* 2019; **211**(2): 495-502.
89. Cox A, Ackert-Bicknell CL, Dumont BL, et al. A new standard genetic map for the laboratory mouse. *Genetics* 2009; **182**(4): 1335-44.
90. Soller M, Abu-Toamih Atamni HJ, Binenbaum I, Chatziioannou A, Iraqi FA. Designing a QTL Mapping Study for Implementation in the Realized Collaborative Cross Genetic Reference Population. *Curr Protoc Mouse Biol* 2019; **9**(4): e66.
91. Jin SC, Furey CG, Zeng X, et al. SLC12A ion transporter mutations in sporadic and familial human congenital hydrocephalus. *Mol Genet Genomic Med* 2019; **7**(9): e892.
92. Del-Aguila JL, Li Z, Dube U, et al. A single-nuclei RNA sequencing study of Mendelian and sporadic AD in the human brain. *Alzheimers Res Ther* 2019; **11**(1): 71.
93. Dorman A, Baer D, Tomlinson I, Mott R, Iraqi FA. Genetic analysis of intestinal polyp development in Collaborative Cross mice carrying the Apc (Min/+) mutation. *BMC Genet* 2016; **17**: 46.
94. Iraqi FA, Athamni H, Dorman A, et al. Heritability and coefficient of genetic variation analyses of phenotypic traits provide strong basis for high-resolution QTL mapping in the Collaborative Cross mouse genetic reference population. *Mamm Genome* 2014; **25**(3-4): 109-19.
95. Abiola O, Angel JM, Avner P, et al. The nature and identification of quantitative trait loci: a community's view. *Nat Rev Genet* 2003; **4**(11): 911-6.
96. Yang J, Bakshi A, Zhu Z, et al. Genetic variance estimation with imputed variants finds negligible missing heritability for human height and body mass index. *Nat Genet* 2015; **47**(10): 1114-20.
97. Iraqi F. Fine mapping of quantitative trait loci using advanced intercross lines of mice and positional cloning of the corresponding genes. *Exp Lung Res* 2000; **26**(8): 641-9.
98. Churchill GA, Airey DC, Allayee H, et al. The Collaborative Cross, a community resource for the genetic analysis of complex traits. *Nat Genet* 2004; **36**(11): 1133-7.
99. Molenhuis RT, Bruining H, Brandt MJV, et al. Modeling the quantitative nature of neurodevelopmental disorders using Collaborative Cross mice. *Mol Autism* 2018; **9**: 63.
100. Atamni HJ, Mott R, Soller M, Iraqi FA. High-fat-diet induced development of increased fasting glucose levels and impaired response to intraperitoneal glucose challenge in the collaborative cross mouse genetic reference population. *BMC Genet* 2016; **17**: 10.
101. Keele GR, Crouse WL, Kelada SNP, Valdar W. Determinants of QTL Mapping Power in the Realized Collaborative Cross. *G3 (Bethesda)* 2019; **9**(5): 1707-27.
102. Watanabe H, Numata K, Ito T, Takagi K, Matsukawa A. Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains. *Shock* 2004; **22**(5): 460-6.
103. Saul MC, Philip VM, Reinholdt LG, Center for Systems Neurogenetics of A, Chesler EJ. High-Diversity Mouse Populations for Complex Traits. *Trends Genet* 2019; **35**(7): 501-14.
104. Dickson PE, Miller MM, Calton MA, et al. Systems genetics of intravenous cocaine self-administration in the BXD recombinant inbred mouse panel. *Psychopharmacology (Berl)* 2016; **233**(4): 701-14.
105. Sanchez-Roige S, Fontanillas P, Elson SL, et al. Genome-Wide Association Studies of Impulsive Personality Traits (BIS-11 and UPPS-P) and Drug Experimentation in up to 22,861 Adult Research Participants Identify Loci in the CACNA1I and CADM2 genes. *J Neurosci* 2019; **39**(13): 2562-72.
106. Gralinski LE, Ferris MT, Aylor DL, et al. Genome Wide Identification of SARS-CoV Susceptibility Loci Using the Collaborative Cross. *PLoS Genet* 2015; **11**(10): e1005504.
107. Ferris MT, Aylor DL, Bottomly D, et al. Modeling host genetic regulation of influenza pathogenesis in the collaborative cross. *PLoS Pathog* 2013; **9**(2): e1003196.
108. Philip VM, Sokoloff G, Ackert-Bicknell CL, et al. Genetic analysis in the Collaborative Cross breeding population. *Genome Res* 2011; **21**(8): 1223-38.

109. Abu-Toamih Atamni HJ, Ziner Y, Mott R, Wolf L, Iraqi FA. Glucose tolerance female-specific QTL mapped in collaborative cross mice. *Mamm Genome* 2017; **28**(1-2): 20-30.
110. Binenbaum I, Atamni HA, Fotakis G, et al. Container-aided integrative QTL and RNA-seq analysis of Collaborative Cross mice supports distinct sex-oriented molecular modes of response in obesity. *BMC Genomics* 2020; **21**(1): 761.
111. Shorter JR, Odet F, Aylor DL, et al. Male Infertility Is Responsible for Nearly Half of the Extinction Observed in the Mouse Collaborative Cross. *Genetics* 2017; **206**(2): 557-72.
112. Schroedl F, Kaser-Eichberger A, Schlereth SL, et al. Consensus statement on the immunohistochemical detection of ocular lymphatic vessels. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014; **55**(10): 6440-2.
113. Nakao S, Zandi S, Faez S, Kohno R, Hafezi-Moghadam A. Discontinuous LYVE-1 expression in corneal limbal lymphatics: dual function as microvalves and immunological hot spots. *FASEB J* 2012; **26**(2): 808-17.
114. Wade CM, Kulbokas EJ, 3rd, Kirby AW, et al. The mosaic structure of variation in the laboratory mouse genome. *Nature* 2002; **420**(6915): 574-8.
115. Frazer KA, Eskin E, Kang HM, et al. A sequence-based variation map of 8.27 million SNPs in inbred mouse strains. *Nature* 2007; **448**(7157): 1050-3.
116. Yuen D, Leu R, Sadovnikova A, Chen L. Increased lymphangiogenesis and hemangiogenesis in infant cornea. *Lymphat Res Biol* 2011; **9**(2): 109-14.
117. Liang P, Hong JW, Ubukata H, et al. Increased density and diameter of lymphatic microvessels correlate with lymph node metastasis in early stage invasive colorectal carcinoma. *Virchows Arch* 2006; **448**(5): 570-5.
118. Alabi E, Hutchings N, Bizheva K, Simpson T. Relationship between vessel diameter and depth measurements within the limbus using ultra-high resolution optical coherence tomography. *J Optom* 2018; **11**(1): 57-65.
119. Horstmann J, Schulz-Hildebrandt H, Bock F, et al. Label-Free In Vivo Imaging of Corneal Lymphatic Vessels Using Microscopic Optical Coherence Tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2017; **58**(13): 5880-6.
120. Palme C, Ahmad S, Romano V, et al. En-face analysis of the human limbal lymphatic vasculature. *Exp Eye Res* 2020; **201**: 108278.
121. Hatami N, Buttner C, Bock F, et al. Cystathionine beta-synthase as novel endogenous regulator of lymphangiogenesis via modulating VEGF receptor 2 and 3. *Commun Biol* 2022; **5**(1): 950.
122. Svenson KL, Gatti DM, Valdar W, et al. High-resolution genetic mapping using the Mouse Diversity outbred population. *Genetics* 2012; **190**(2): 437-47.
123. Churchill GA, Gatti DM, Munger SC, Svenson KL. The Diversity Outbred mouse population. *Mamm Genome* 2012; **23**(9-10): 713-8.

7. Anhang

7.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Die verschiedenen Schichten der Hornhaut.....	11
Abbildung 2 Limbale Übergangszone zwischen der physiologischerweise avaskulären Hornhaut und physiologischerweise vaskularisierten Bindehaut.	12
Abbildung 3 Der Immunreflexbogen.....	15
Abbildung 4 Die VEGF-Familie	17
Abbildung 5 QTL-Analyse mit Peak auf Chromosom 7.....	25
Abbildung 6 Die Collaborative Cross Linien.....	26

Abbildung 7 Definition des Bereichs von Interesse	36
Abbildung 8 Markierung der Gefäße	37
Abbildung 9: Gefäßneusprossungen.....	38
Abbildung 10 Gefäßverzweigungen	38
Abbildung 11: Gefäßendpunkte	39
Abbildung 12 Immunfluoreszenzaufnahmen der Flachpräparate	42
Abbildung 13 Gesamtfläche der Hornhaut	43
Abbildung 14 Anteilige Lymphgefäßfläche in Prozent.....	46
Abbildung 15 Korrelation der morphometrischen Parameter Gefäßendpunkte, Gefäßverzweigungen und Gefäßneusprossungen mit dem Parameter Gefäßfläche in %... ..	47
Abbildung 16 Anzahl an Gefäßendpunkte pro mm ² der CC-Linie mit C57BL/6 als Referenz.	49
Abbildung 17 Anzahl an Gefäßverzweigungen pro mm ² der CC-Linie mit C57BL/6 als Referenz.....	51
Abbildung 18 Anzahl an Gefäßneusprossungen pro mm ² der CC-Linie mit C57BL/6 als Referenz.....	53
Abbildung 19 Durchmesser des limaben Gefäßes in mm der CC-Linie mit C57BL/6 als Referenz.....	55
Abbildung 20: Abhängigkeit des Gefäßdurchmessers von der Anteiligen Gefäßfläche	56
Abbildung 21 QTL-Analyse der CC-Linien	57
Abbildung 22 QTL-Analyse mit Locus auf Chromosom 17 bei 55,2 cM.....	58
Abbildung 23 Zusammensetzung und Einsatzbereich verschiedener Populationen von Inzuchtmäusen. ¹⁰³	63
Abbildung 24 Gruppierung der CC-Linien nach morphometrischen Parametern der Lymphgefäße	71

7.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Ausrüstung	30
Tabelle 2 Chemikalien und Medien.....	30
Tabelle 3 Verbrauchsmaterialien.....	31
Tabelle 4 Primäre Antikörper für die Färbung der Flachpräparate.....	31
Tabelle 5 Sekundäre Antikörper für die Färbung der Flachpräparate	31
Tabelle 6 Software für die Erstellung, Bearbeitung und Auswertung der Bilder	32
Tabelle 7 Die Tabelle zeigt die Mittelwerte und Standardabweichung der erhobenen Parameter „Anteilige Gefäßfläche“, „Gesamtfläche der Hornhaut“, „Gefäßneusprossungen pro mm ² “,	

„Gefäßverzweigungen pro mm ² “, „Gefäßendpunkte pro mm ² “ und „Gefäßdurchmesser des limbalen Gefäßes“	44
Tabelle 8 Spitzen des LOD-Score.....	58
Tabelle 9 Morphometrische Parameter der CC-Linien mit der größten anteiligen Lymphgefäßfläche.....	68

8. Vorabveröffentlichungen von Ergebnissen

Thomas Clahsen, Christian Büttner, Niloofar Hatami, Felix Nüst, Tim Gabriel, André Reis, Claus Cursiefen; Genetic variability of lymphangiogenesis in Collaborative Cross mice: a powerful tool to identify novel endogenous regulators of lymphangiogenesis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2021;62(8):896.