

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

DISSERTATION

**Einfluss der Wachstumsfaktoren VEGF und bFGF sowie  
deren Rezeptorblocker auf die Proliferation humaner  
retinaler Pigmentepithelzellen  
in vitro**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
**Doctor medicinae (Dr. med.)**

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

**Stefanie Berndt**

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. Dr. P. Rieck  
2. Prof. Dr. med. K. Engelmann  
3. Priv. Doz. Dr. R. Rosenthal

Datum der Promotion: 24. Februar 2012

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>7</b>
1.1	Anatomie der Retina . . . . .	7
1.2	Ernährung, Perfusion, Innervation der Retina . . . . .	7
1.3	Anatomie und Morphologie des RPEs . . . . .	8
1.4	Funktion und Physiologie des RPEs . . . . .	9
1.4.1	Absorption von Licht . . . . .	9
1.4.2	RPE - ein Transportepithel . . . . .	10
1.4.3	Retinalzyklus . . . . .	11
1.4.4	Phagozytose . . . . .	11
1.4.5	Immunkompetenz . . . . .	12
1.4.6	Sekretorische Aktivität . . . . .	12
1.5	Funktionsstörungen des RPEs . . . . .	13
1.5.1	Störung der Pump- und Schrankenfunktion . . . . .	13
1.5.2	Störung der Regenerationsfähigkeit . . . . .	14
1.5.3	Störung der Stoffwechsel-Phagozytose- und Sekretionsleistung . . . . .	14
1.6	Wachstumsfaktoren . . . . .	15
1.7	Biologie des VEGF . . . . .	16
1.7.1	Entdeckung und Isoformen . . . . .	16
1.7.2	VEGF-Rezeptoren und Signaltransduktion . . . . .	17
1.7.3	Regulationsmechanismus der VEGF-Expression . . . . .	19
1.7.4	Funktionsvielfalt und Vorkommen von VEGF . . . . .	21
1.7.5	Klinische Bedeutung von VEGF . . . . .	22
1.7.6	VEGF und seine Bedeutung im okulären System . . . . .	23

1.7.7	Anti-VEGF-Therapie . . . . .	24
1.8	Biologie des FGF . . . . .	26
1.8.1	Entdeckung und Isoformen . . . . .	26
1.8.2	Darstellung der FGF-Subtypen . . . . .	26
1.8.3	FGF-Rezeptoren und Signaltransduktion . . . . .	26
1.8.4	Funktionsvielfalt und Vorkommen von FGF . . . . .	29
1.8.5	Klinische Bedeutung von FGF . . . . .	29
1.8.6	bFGF im okulären System . . . . .	30
<b>2</b>	<b>Fragestellung und Zielsetzung</b>	<b>32</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>34</b>
3.1	Aufbau der Studie . . . . .	34
3.1.1	Allgemeines . . . . .	34
3.1.2	Versuchsanordnung . . . . .	35
3.2	Das RPE <i>in vitro</i> . . . . .	35
3.3	Etablierung der Zellkultur . . . . .	36
3.4	Enzymatische Isolierung der RPE-Zellen . . . . .	39
3.5	Quantitative Zellzahlbestimmung . . . . .	39
3.6	Detaillierter Versuchsaufbau . . . . .	40
3.6.1	Allgemeines . . . . .	40
3.6.2	Modulation der Zellproliferation durch VEGF . . . . .	41
3.6.3	Modulation der Zellproliferation durch bFGF . . . . .	42
3.6.4	Modulation der Zellproliferation durch Kombination von VEGF und bFGF . . . . .	42
3.7	Modulation der Zellproliferation durch die selektiven Rezeptorblocker SU5416 und SU5402 . . . . .	45
3.7.1	Der VEGF-Rezeptor-2-Kinaseinhibitor III (SU5416) . . . . .	45
3.7.2	Der FGF-Rezeptor-1-Kinaseinhibitor (SU5402) . . . . .	47
3.7.3	Kombinierte Wirkungsmodulation durch SU5416 und SU5402 . . . . .	49
3.8	Statistische Auswertung . . . . .	51

<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>53</b>
4.1	Stimulierung der Zellproliferation . . . . .	53
4.1.1	Berechnungsgrundlage . . . . .	53
4.1.2	Zeitabhängiger Einfluss von VEGF und bFGF auf die Zellproliferation . . . . .	53
4.2	Inhibition der Zellproliferation . . . . .	58
4.2.1	Berechnungsgrundlage . . . . .	58
4.2.2	Zeitabhängiger Einfluss von SU5416 auf die Zellproliferation . . . . .	58
4.2.3	Zeitabhängiger Einfluss von SU5402 auf die Zellproliferation . . . . .	63
4.2.4	Zeitabhängiger Einfluss der Kombination von SU5416 und SU5402 auf die Zellproliferation . . . . .	68
4.3	Selektive Darstellung der Inhibitionseffekte durch SU5416 und SU5402 für die jeweiligen Wachstumsfaktoren . . . . .	73
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>79</b>
5.1	Allgemeines . . . . .	79
5.2	Diskussion der Methodik . . . . .	80
5.2.1	Vorteile dieser Studie . . . . .	80
5.2.2	Statistische Auswertung . . . . .	81
5.3	Diskussion der Ergebnisse . . . . .	83
5.3.1	VEGF- und bFGF-induzierte Effekte auf die Zellproliferation . . . . .	83
5.3.2	Einflussfaktoren auf die Zellproliferation . . . . .	85
5.3.3	Wirkungsmodulation durch SU5416 . . . . .	87
5.3.4	Wirkungsmodulation durch SU5402 . . . . .	90
5.3.5	Wirkungsmodulation durch die kombinierte Anwendung von SU5416 und SU5402 . . . . .	93
5.3.6	Morphologische Modifikationen . . . . .	94
5.4	Schlussfolgerung . . . . .	95
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>97</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>99</b>

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>117</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>121</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>122</b>
<b>Diagrammverzeichnis</b>	<b>123</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>124</b>
<b>Curriculum Vitae</b>	<b>125</b>
<b>Danksagung</b>	<b>126</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Anatomie der Retina

Die Retina ist eine 0,1 bis 0,5 mm dicke Struktur, die einen im histologischen Schnitt gut erkennbaren Schichtenaufbau zeigt. Die einzelnen Netzhautschichten werden im Detail in Abbildung 1.1 skizziert (beginnend von außen nach innen).

Ihre äußere Schicht ist das retinale Pigmentepithel (RPE), das als einschichtige Lage hexagonaler Zellen der Bruchschsche Membran aufsitzt. Die inneren, wesentlich komplexer aufgebauten Schichten der Retina werden als neurosensorische Netzhaut bezeichnet.

Die Photorezeptorschicht setzt sich aufgrund unterschiedlich gebauter Rezeptorfortsätze aus ca. 120 Millionen Stäbchenzellen und ca. 6 - 7 Millionen Zapfenzellen zusammen. Diese retinalen primären Sinneszellen bestehen aus einem Rezeptorpol, der mit dem RPE in Verbindung steht und einem, die Erregung fortleitenden, Axon. Zusätzlich weisen sie regenerationsfähige Außensegmente und permanente Innensegmente auf.

Die Fovea centralis zeigt als Stelle des schärfsten Sehens einen besonderen Aufbau. Als Rezeptoren sind nur Zapfenzellen anzutreffen, die durch einen geringeren Durchmesser ihrer Außenglieder besonders dicht stehen. Histologisch zeigen sich eine Sinnesepithelschicht, Glia- sowie Ganglienzellen.

## 1.2 Ernährung, Perfusion, Innervation der Retina

Die Nährstoffversorgung des RPEs bis zur äußeren retikulären Schicht erfolgt per Diffusion aus der Choriokapillaris. Die inneren zwei Drittel der Retina werden über die Arteria centralis retinae versorgt. Deren weitverzweigtes Gefäßnetz stellt die innere Blut-Retina-Schranke dar. Sie wird über sogenannte „tight junctions“, interzelluläre Verbindungsstellen über Membranproteine der äußersten Zellmembranschichten, der retinalen

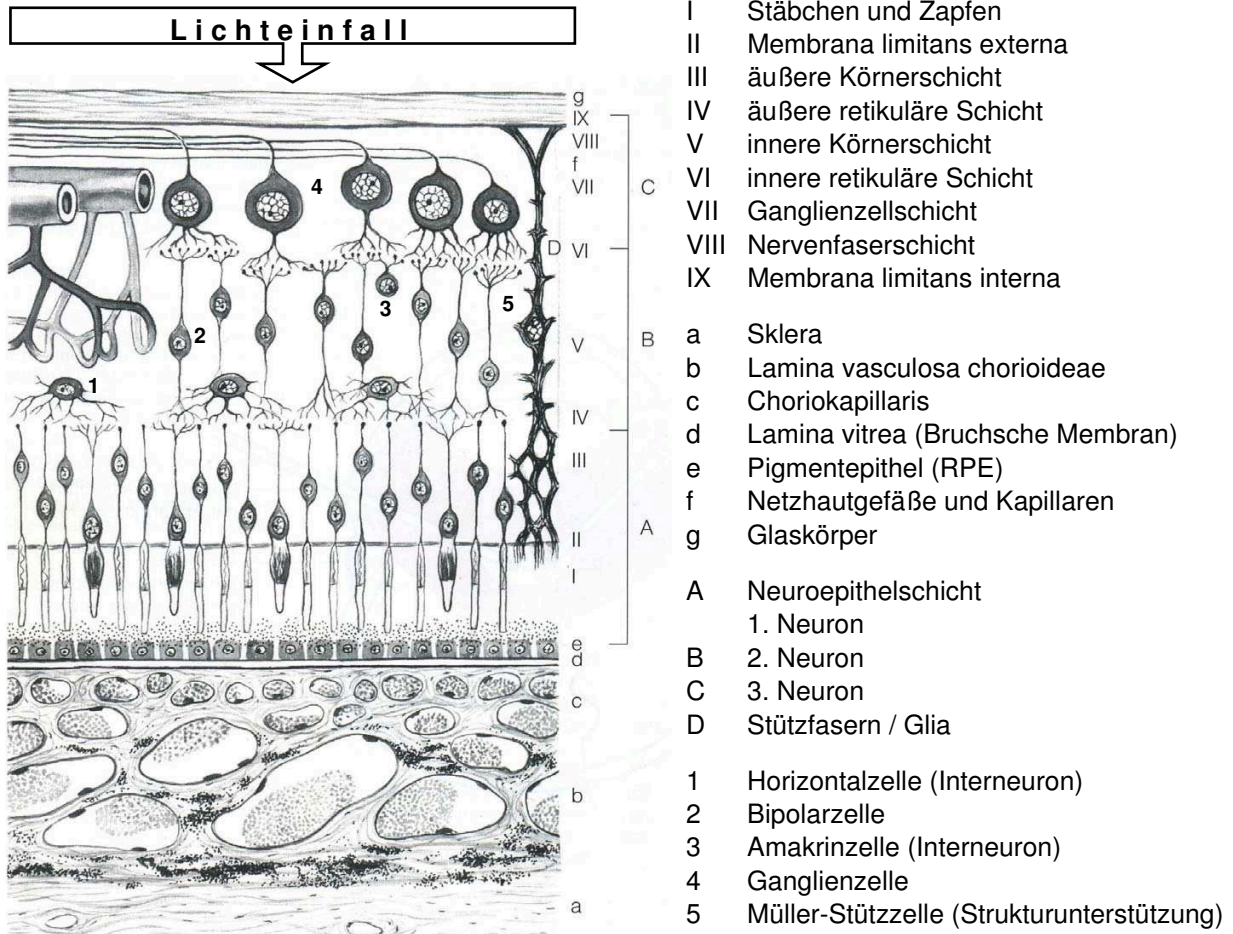


Abbildung 1.1: Schichtaufbau der Retina modifiziert nach Nasemann [101]

Gefäßendothelzellen gebildet. Dadurch wird die Diffusion lediglich kleiner Moleküle aus den Netzhautgefäßen in die Retina garantiert.

Die Retina verfügt über eine effektive Autoregulation der Durchblutung, die durch eine Arteriolenkontraktion weite Blutdruckbereiche abfangen und eine konstante retinale Durchblutung gewährleisten kann. Retinale Pathologien sind aufgrund fehlender Innervation durch Schmerzfasern grundsätzlich schmerzlos.

### 1.3 Anatomie und Morphologie des RPEs

Das RPE kann als Monolayer aus stark pigmentierten, polygonalen Zellen zwischen der neurosensorischen Netzhaut und der Choriokapillaris bezeichnet werden [61]. His-



tologisch ist es ein einschichtiges, isoprismatisches Epithel. Dessen Fortsätze dringen zwischen die Stäbchen und Zapfen und enthalten reichlich Melaningranula. Distal grenzt das RPE mit seiner Basalmembran aus kollagenen und elastischen Fasern an die Bruchsche Membran sowie die fenestrierten, chorioidalen Kapillaren und interagiert als Aktionsfläche zum Blutstrom [20, 129, 131]. RPE-Zellen sind polar ausgerichtet und fungieren als Transportepithel [61]. Diese polare Struktur basiert auf einem unterschiedlichen Proteinmuster der apikalen, der Retina zugewandten Seite und der basalen, der Choriokapillaris zugewandten Seite. Die apikale Zellmembran der RPE-Zellen besitzt zahlreiche Mikrovilli. Hierbei handelt es sich um feine zytoplasmatische, oberflächenvergrößernde Fortsätze von 0,1-2,0  $\mu\text{m}$  Länge, in die die lichtsensitiven Photorezeptoraußensegmente eingebettet sind. Dadurch wird neben der funktionellen Kommunikation zwischen RPE-Zellen und Photorezeptoren auch eine mechanische Kopplung dieser nicht miteinander verwachsenen Schichten gewährleistet. „Tight junctions“ agieren als Verbindungsstücke benachbarter RPE-Zellen. Sie repräsentieren das morphologische Korrelat der äußeren Blut-Retina-Schranke, in dem sie nur niedermolekulare Substanzen von der Chorioidea in die Retina passieren lassen.

### 1.4 Funktion und Physiologie des RPEs

Neben der Fähigkeit zur Lichtabsorption ist eine Vielzahl von Funktionen bekannt, die weit über eine Bildqualitätsverbesserung des optischen Systems hinausgehen [131]. Diese werden im Folgenden detailliert aufgeführt.

#### 1.4.1 Absorption von Licht

Durch ihren Melaningehalt nehmen RPE-Zellen Anteil an der retinalen Signalaufnahme- und -verarbeitung. Dies erfolgt durch Verhinderung von Lichtreflexion, Beeinflussung der Bildauflösung und der Sehschärfe. Die Lichtabsorption dient zum einen der Verbesserung der Qualität des optischen Systems durch Reduktion von Streulicht, zum anderen werden hohe Energiedichten absorbiert. Neben Pigmentgranula in den Melanosomen nehmen weitere Pigmente, wie Lutein und Zeaxanthin, an der Lichtabsorption

im Blaulichtbereich, die insbesondere die Radikalbildung durch Photooxidation fördern, teil [119]. Das RPE verfügt über zahlreiche enzymatische und nichtenzymatische Antioxidanzien sowie Reparaturmechanismen für zerstörte Proteine oder DNA, um gegen die schädliche Radikalwirkung agieren zu können [132]. Eine Erhöhung der Radikalbelastung bei sich gleichzeitig reduzierenden Schutzmechanismen wird kausal mit der Entstehung der altersabhängigen Makuladegeneration (AMD) in Zusammenhang gebracht [132, 64].

### 1.4.2 RPE - ein Transportepithel

Als Repräsentant der Blut-Retina-Schranke vermittelt das RPE den Stoffaustausch zwischen Retina und Blut. Hierbei erfolgt ein, auf die speziellen Bedürfnisse der Photorezeptoren zugeschnittener, selektiver Transport. Aufgrund der hohen Impermeabilität der RPE-Zellverbände wird dieser nur auf transzellulärem Weg verwirklicht. Die Hauptaufgabe des RPEs liegt somit in der Versorgung der Neuroepithelschicht mit Nährstoffen durch Stofftransport von der Lamina choriokapillaris zu den Photorezeptoren. Der Glukosetransport gewährleistet dabei den Energiestoffwechsel, Vitamin A, als all-trans-Retinol, die Erregbarkeitserhaltung der Photorezeptoren. Ungesättigte Omega-3-Fettsäuren, vorrangig Docosahexansäure, sichern die Erneuerung der lichtsensitiven Photorezeptoraußensegmente [132, 18]. Durch seinen Stofftransport übernimmt das RPE eine wichtige Auffüllfunktion, deren Versagen im Extremfall zu retinalen Degenerationen führen kann [132].

Histologisch betrachtet, stellt das RPE die höchste Zelldichte des menschlichen Körpers dar. Es leistet durch seine hohe metabolische Aktivität einen Hauptanteil an der Produktion von Wasser und Laktat [59]. Durch den intraokulären Druck erfolgt zusätzlich ein Wassereinstrom in Richtung Retina. Eine Volumenansammlung zwischen RPE und Photorezeptoren stellt einen Interaktionsverlust beider Gewebe mit visueller Funktionseinschränkung dar. Somit sind die Dehydratation und der gerichtete Transport von Laktat vom subretinalen Raum (apikal) zur Blutseite (basolateral) von entscheidender Bedeutung [87].

### 1.4.3 Retinalzyklus

Der Sehprozess wird durch die Absorption eines Photons mit der isomeren Umformung vom 11-cis-Retinal zum all-trans-Retinal eingeleitet. Retinal wird dabei als Chromophor des Rhodopsin (Sehpurpur, Chromoprotein der Stäbchen und Zapfen) bezeichnet. Das aktivierte Rhodopsin initiiert die Phototransduktionskaskade mit einer Rezeptorpotenzialänderung der Photorezeptoren, setzt all-trans-Retinal frei und beginnt die Wiederaufnahme von 11-cis-Retinal. Da Photorezeptoren nicht zur Bildung von cis-trans-Isomerasen in der Lage sind, muss die Regeneration des all-trans-Retinals über den Retinalzyklus im RPE verwirklicht werden [13]. Der Retinalzyklus beginnt mit der Lokalisierungsänderung des all-trans-Retinals vom Innensegment der Photorezeptoren zum Außensegment. Dort schließt sich die Reduktion zu all-trans-Retinol an. Nach dem Transport zum RPE erfolgt die Bindung an einen Enzymkomplex. Dieser katalysiert den Re-isomerisationsprozess und lässt 11-cis-Retinal als Reaktionsendprodukt entstehen. Es verlässt die RPE-Zelle und wird Richtung Photorezeptor geschleust [132]. Der Retinalzyklus gewährleistet somit eine optimierte Anpassung an die Beleuchtungsintensität.

### 1.4.4 Phagozytose

In der Retina herrscht eine hohe Aktivität photooxidativer Reaktionen. Die lichtempfindlichen Photorezeptoraußensegmente werden dabei toxischen, durch Photooxidation von Lipiden, Lipoproteinen und Retinalabkömmlingen entstehenden Molekülen ausgesetzt. Um die morphologische Integrität der Außensegmente zu gewährleisten, übernimmt das RPE die Entsorgung und Resynthese von zerstörten Spitzen der Photorezeptoraußenglieder, die im zirkadianen Rhythmus der Abschilferung unterliegen. Dies erfolgt über Phagozytose, Metabolisierung und Abtransport über die angrenzende Choriokapillaris [151]. Die Phagozytose setzt beim Menschen beim ersten Lichteinfall am Morgen ein und währt für ca. 60 Minuten [79].

### 1.4.5 Immunkompetenz

Neben seiner Barrierefunktion als Blut-Retina-Schranke besitzt das RPE die Fähigkeit zur Interaktion mit dem Immunsystem. Durch Bildung zahlreicher immunkompetenter Rezeptoren nimmt es aktiv Anteil an der Entstehung des immunprivilegierten intraokulären Raumes [133]. Ein weiteres Merkmal ist die Expression von MHC-Antigenen der Klasse I und II in voller Ausprägung, so dass darüber eine Typisierung vorgenommen werden kann. Zusammenfassend betrachtet können immunregulatorische Mechanismen einerseits passiv durch die Rolle als äußere-Blut-Retina-Schranke, andererseits aktiv durch direkte Interaktion mit Immunzellen durch das RPE realisiert werden [46].

### 1.4.6 Sekretorische Aktivität

Die funktionelle Einheit zwischen Photorezeptoren, RPE und Choriokapillaris wird durch die Sekretion verschiedenster Wachstumsfaktoren (siehe Kapitel 1.6) aufrechterhalten und ermöglicht die Interaktion mit angrenzenden Geweben [132]. Hierbei können drei Hauptgruppen mit unterschiedlichen Funktionsbereichen differenziert werden. In Abbildung 1.2 werden diese graphisch erfasst.

Dem Wachstumsfaktor VEGF kommt dabei eine besondere Bedeutung zu. VEGF wird auf die Seite der Choriokapillaris sezerniert. Bei geringen Sekretionsmengen erhält es die Struktur der chorioidalen Endothelzellen. Im Rahmen pathologischer Prozesse mit erhöhter Sekretionsmenge können Neovaskularisationen ausgelöst werden [132].

Die sekretorische Aktivität des RPEs wird parakrin, d. h. die Substanz wirkt auf benachbarte Zellen/Regionen, oder autokrin, d. h. die Substanz wirkt auf die absondernde Zelle selbst, durch Wachstumsfaktoren reguliert. Dabei werden intrazelluläre tyrosinkinaseabhängige Signalwege durchlaufen, die im wesentlichen durch neuroendokrine  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle umgesetzt werden. Diese scheinen bei der Ausbildung von CNVs (chorioidale Neovaskularisationen) eine Schlüsselfunktion zu übernehmen [115].

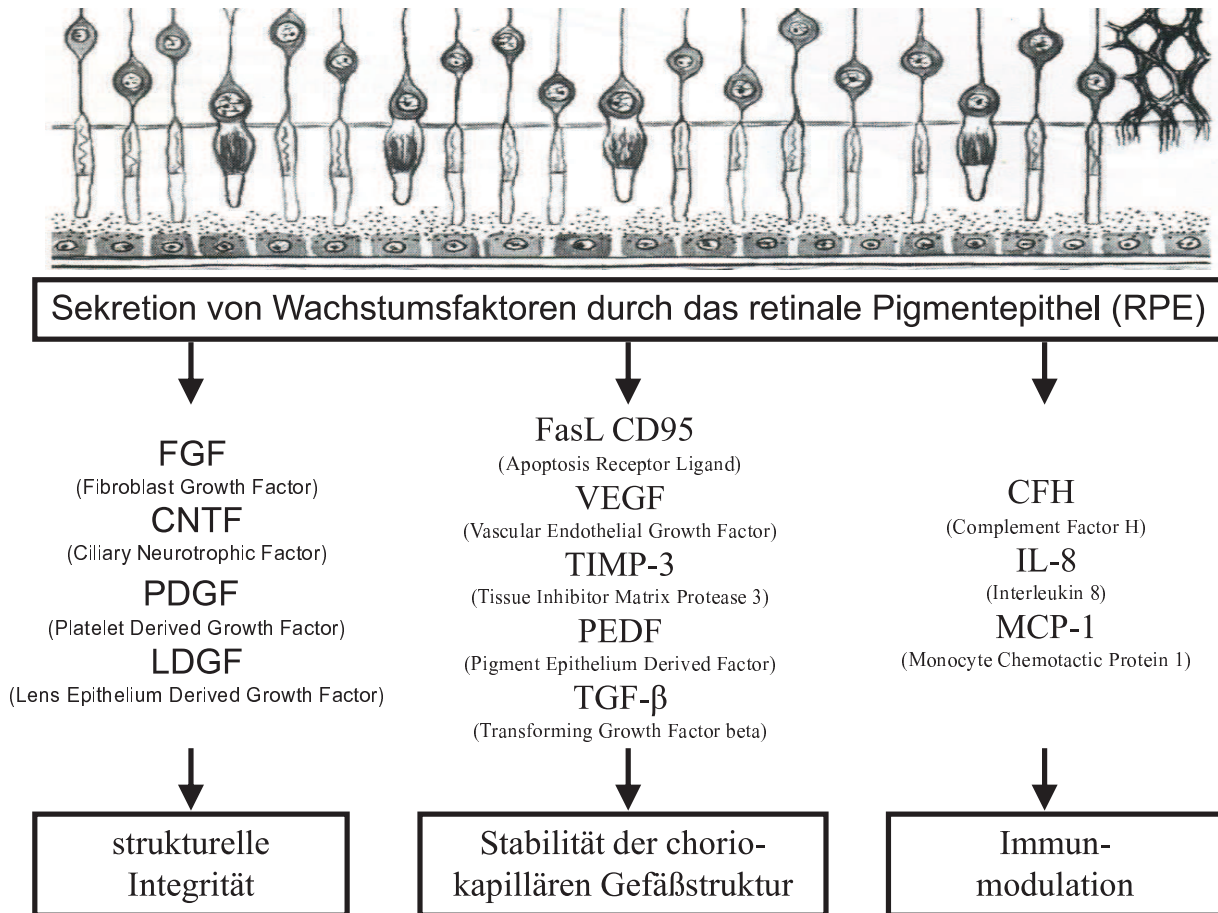


Abbildung 1.2: Sekretion von Wachstumsfaktoren durch das RPE [132, 115]

## 1.5 Funktionsstörungen des RPEs

Die komplexe Physiologie des RPEs ist Grundlage vielfältigster pathophysiologischer retinaler Veränderungen. Eine Reihe von Erblindungsursachen sind bekannt, die auf eine Störung des funktionellen Komplexes von Netz- und Aderhaut zurückzuführen sind und somit den physiologischen Sehprozess unterbrechen [46]. Nachfolgend werden bedeutende Dysfunktionen des RPEs beschrieben.

### 1.5.1 Störung der Pump- und Schrankenfunktion

Das RPE sichert durch seine Pumpfunktion und als Repräsentant der äußeren Blut-Retina-Schranke die Aufrechterhaltung des extrazellulären Ionenmilieus der Photorezeptoren. Durch einen erzeugten Unterdruck entsteht eine Adhäsionskraft zwischen RPE

und Neuroretina. Bei einem Zusammenbruch dieser Mechanismen, z.B. im Rahmen entzündlicher Erkrankungen, akkumuliert Flüssigkeit unter die Netzhaut bzw. das RPE mit Ausbildung eines subretinalen Ödems [46]. Ein gestörtes extrazelluläres Milieu mit veränderten Elektrolytkonzentrationen und Beeinträchtigung der Blut-Retina-Schranke ist die Folge. Eine choriokapilläre Permeabilitätsstörung intensiviert die Flüssigkeitsansammlung.

### 1.5.2 Störung der Regenerationsfähigkeit

Unter physiologischen Bedingungen sind RPE-Zellen nicht teilungsfähig, sie befinden sich im amitotischen Zustand. Krankhafte intraokuläre Prozesse machen eine Zellaktivierung möglich. Beispielsweise können angrenzende RPE-Zellen nach retinaler Laserkoagulation proliferieren und eine Defektfüllung induzieren. Diese aktivierte Wundreaktion kann auch nach Netzhautforamina oder -rissen beobachtet werden [46]. Eine unkontrollierte Reaktionsfähigkeit des RPEs kann allerdings schwerwiegende Komplikationen nach sich ziehen, z. B. die traktive Netzhautablösung und die proliferative Vitreoretinopathie (PVR) [84].

### 1.5.3 Störung der Stoffwechsel-Phagozytose- und Sekretionsleistung

RPE-Zellen müssen zur Sicherung der Phagozytose lichtempfindlicher Photorezeptoraußensegmente und deren Resynthese täglich ca. 7 % ihres Zellvolumens umsetzen. Für eine nicht teilungs- und regenerationsfähige Zelle stellt dies eine extreme Belastung dar, die sich als Lipofuszinakkumulation im RPE-Zytoplasma äußert. Hauptquelle dafür stellen nicht abbaubare Bestandteile der Photorezeptoraußensegmente dar. Die Konzentration von zytoplasmatischem Lipofuszin zeigt mit zunehmendem Alter eine Progredienz [46]. Oxidativer Stress, Rauchen, freie Radikalbildung durch Photooxidation und Mangel an antioxidativen Vitaminen triggern dabei die strukturellen Veränderungen des RPEs. In Kombination mit genetisch prädisponierenden Faktoren wird hier eine Erklärung in der Pathophysiologie der AMD gesehen [118].

Die morphologische und funktionelle Einheit von Photorezeptor, RPE und Choriokapillaris wird durch eine Reihe neuroprotektiver, angiogener sowie angiainhibitorischer Fak-

toren geregelt. Deren Sekretion wird hauptsächlich vom RPE übernommen und dient zusätzlich als „Survivalfaktor“ für die Integrität angrenzender Gewebe (siehe Kapitel 1.4.6) [64]. Gerät dieses Regelwerk in Dysbalance, sind eine Unterversorgung von Photorezeptoren und RPE-Zellen mit pathophysiologischen Reaktionskaskaden die Folge [46, 118].

Eine insuffiziente Sekretion dieser Faktoren im Rahmen einer gestörten RPE-Funktion induziert ein Absterben benachbarter Zellen und kann klinisch als atrophe Form der Makuladegeneration imponieren. Wird hingegen eine überschießende Produktion, insbesondere vasoproliferativ wirksamer Faktoren, z. B. VEGF, veranlasst, kann die Bildung sogenannter CNVs stimuliert werden. Die Sekretionssteigerung wird als Kompensationsmechanismus gewertet, um den retinalen Nährstoffmangel durch Gefäßneubildung auszugleichen [46].

Die pathologische Sekretionsleistung des RPEs stellt seit einigen Jahren einen wichtigen Ansatzpunkt für therapeutische Interventionen im Rahmen einer AMD dar. Hierbei ist insbesondere die intravitreale Anti-VEGF-Therapie zu nennen, die in Kapitel 1.7.7 präzise erläutert wird.

### 1.6 Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren beinhalten eine große Anzahl körpereigener, von verschiedenen Zellen gebildeter Polypeptide, die das Zellwachstum regulieren. Sie induzieren den Übergang der Zellen aus der  $G_0$ - (Ruhephase) bzw.  $G_1$ -Phase (Wachstumsphase) in den Zellzyklus (Periode zwischen zwei Zellteilungen), der in zwei Schritten verläuft. Durch sogenannte Kompetenzfaktoren beginnt die Zellüberführung von der  $G_0$ - in die  $G_1$ -Phase mit anschließender DNA-Synthese (S-Phase) unter dem Einfluss von Progressionsfaktoren. Um eine Rückkehr in den  $G_0$ -Zustand zu vermeiden, ist eine kontinuierliche Stimulation über mehrere Stunden notwendig. In der  $G_1$ -Phase werden sowohl Kompetenzfaktoren als auch Progressionsfaktoren benötigt. In dem sich anschließenden Zellzyklus ist nur noch der Progressionsfaktor anwesend. Tabelle 1.1 gibt einen Überblick über Vertreter der Kompetenz- und Progressionsfaktoren.

Kompetenzfaktoren	Progressionsfaktoren
VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)	INS (Insulin in hohen Konzentrationen)
FGF (Fibroblast Growth Factor)	IGF I/2 (Insulin Like Growth Factor)
TGF- $\alpha$ (Transforming Growth Factor)	
EGF (Epidermal Growth Factor)	
PDGF (Platelet Derived Growth Factor)	

Tabelle 1.1: Übersicht der wichtigsten Kompetenz- und Progressionsfaktoren [109]

Um die gewünschte Wechselwirkung mit der Zielzelle verwirklichen zu können, werden spezifische Membranrezeptoren benötigt, die häufig eine Tyrosinkinaseaktivität aufweisen. Sie besitzen alle eine zytosolische Tyrosinkinasedomäne, während die extrazellulären Domänen von Rezeptor zu Rezeptor große Variationsbreiten zeigen. Die Bindung des Liganden und der damit ausgelösten Autophosphorylierungen an Tyrosylresten des Rezeptorproteins ist allen Rezeptoren gemeinsam. Zusätzlich werden die Tyrosinphosphatreste als Andockstellen für viele andere Proteine benutzt. Nach deren Bindung folgt über eine Kaskade von Proteinkinasen eine Phosphorylierung und dadurch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren. Die sich anschließende Genaktivierung unterstützt die Zellüberführung von der G<sub>1</sub>- in die S-Phase, so dass insgesamt ein genregulatorischer Effekt erzielt wird.

## 1.7 Biologie des VEGF

### 1.7.1 Entdeckung und Isoformen

Der Vaskuläre Endotheliale Wachstumsfaktor („Vascular Endothelial Growth Factor“, VEGF) wurde erstmalig 1983 charakterisiert und zunächst als Vaskulärer Permeabilitätsfaktor (VPF) bezeichnet [122]. Später wurde ein an Endothelzellen vorkommendes und heparinbindendes Protein entdeckt, das sich funktionell und strukturell kongruent zum



VPF-Protein darstellte. Kodiert durch das gleiche Gen wurden VEGF und VPF somit als identisches Protein entschlüsselt [81].

Der Begriff VEGF selbst beschreibt eine multifunktionelle Glykoproteinfamilie, die durch eine unterschiedliche Genlokalisierung auf den Chromosomen in verschiedene Faktoren (VEGF-A, -B, -C, -D und PlGF/„Placental Growth Factor“) unterteilt wird [19, 149]. Daneben existieren noch die verwandten viralen Homologen VEGF-E und das im Schlangengift vorhandene VEGF-F. Das für VEGF-A kodierende Gen kann bei der Entstehung von prä-mRNA in mRNA durch das Herausschneiden der Introns, d. h. nichtkodierender Abschnitte, Proteinvarianten von unterschiedlicher Länge hervorbringen, die als sogenannte Isoformen beschrieben werden. Bisher wurden beim Menschen die Varianten VEGF-A<sub>121</sub>, VEGF-A<sub>145</sub>, VEGF-A<sub>148</sub>, VEGF-A<sub>162</sub>, VEGF-A<sub>165</sub>, VEGF-A<sub>165b</sub>, VEGF-A<sub>183</sub>, VEGF-A<sub>189</sub> und VEGF-A<sub>206</sub> identifiziert. Die Zahlen entsprechen dabei der Anzahl von Aminosäuren im jeweiligen Protein. Die Isoformen VEGF-A<sub>121</sub> sowie VEGF-A<sub>165</sub> sind dabei die am häufigsten exprimierten Proteine. Die einzelnen Isoformen sind durch eine erhebliche biologische Funktionsbreite und Bindungsspezifität gekennzeichnet [19, 90].

### 1.7.2 VEGF-Rezeptoren und Signaltransduktion

Um eine zelluläre Antwort bewirken zu können, muss die Bindung aller Mitglieder der VEGF-Familie an einen VEGF-Rezeptor (VEGFR) erfolgen. Dieser ist vorrangig an der Endothelzellmembran, aber auch an nichtendothelialen Zellen, wie im retinalen Gewebe, zu finden. Es existieren drei verschiedene Rezeptortypen mit unterschiedlichen Affinitäten (VEGFR-1 bis -3). Der Tabelle 1.2 sind deren bedeutendste Expressionsorte und die wichtigsten Funktionsverteilungen zu entnehmen. Neuropilin ist nur als ein Korezeptor zu betrachten [19, 30, 150].

Alle drei Rezeptortypen agieren als Tyrosinkinase und besitzen als monomere Transmembranproteine drei Domänen: eine extrazellulär gelegene Liganden-Bindungsregion, eine eigene Transmembranhelix und die zytoplasmatische Domäne, welche die eigentlichen katalytischen und regulatorischen Sequenzen enthält [19, 89]. Die extra-

zelluläre Region besitzt sieben homologe Immunglobulin-Domänen, intrazellulär finden sich dagegen zwei Tyrosinkinase-Domänen.

Rezeptor	Bindung	Expressionsort	Funktion
VEGFR-1 (Flt-1)	VEGF-A, VEGF-B, PlGF1, PlGF2	vaskuläres Endothel	embryonale Angiogenese
VEGFR-2 (Flk-1 oder KDR)	VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E	hauptsächlich vaskuläres aber auch lymphatisches Endothel	Angiogenese maligner Tumoren
VEGFR-3 (Flt-4)	VEGF-C, VEGF-D	lymphatisches Endothel	Lymphangiogenese
Neuropilin-1 und -2	Isoformen von VEGF-A, VEGF-B,-E,-C und PlGF	vaskuläres und lymphatisches Endothel, Neurone, Tumorzellen, koexprimiert mit VEGFR-1, -2 und -3	Korezeptor für VEGF <sub>165</sub>

Tabelle 1.2: Übersicht der VEGF-Rezeptoren modifiziert nach Birk et al. [19]

Nach VEGF-Bindung folgt ein komplizierter Prozess der Signaltransduktion, welcher derzeit nicht bis ins Detail verstanden ist. Die Rezeptoren dimerisieren, autophosphorylieren sich durch die Tyrosinkinase-Domänen gegenseitig und aktivieren weitere Signalmoleküle. Die phosphorylierten Tyrosylreste des Rezeptors dienen als Erkennungsmerkmale für die Anlagerung von im Zytosol befindlichen Adapterproteinen.

Neben der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI<sub>3</sub>-Kinase) und dem GTPase-aktivierenden Protein (GAP) wird die Phospholipase C<sub>γ</sub> (PLC<sub>γ</sub>) gebunden, welche über die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) aus der Zellmembran die second messenger Inositoltriphosphat (InsP<sub>3</sub>) und Diacylglycerin (DAG) generiert [19, 102]. In Anwesenheit von Calcium folgt die Bindung von DAG an die Proteinkinase C (PKC) und katalysiert deren Aktivierung. Die PKC beinhaltet verschiedene intrazelluläre Lokalisationen und vielfältige Enzymaktivitäten [104]. Verschiedenste Wachstumsfaktoren entfalten ihre spezifische Wirkung über eine Aktivierung der PKC. Eine Konformationsänderung der PKC mit Freilegung der katalytischen Domäne induziert eine Substratbindung mit deren Phosphorylierung, die weitere Signalproteine stimuliert.

Die intrazelluläre Signalkette umfasst neben den drei genannten Adapterproteinen (PI<sub>3</sub>-Kinase, GAP, PLC<sub>γ</sub>) ein weiteres wichtiges, als GRB<sub>2</sub> bezeichnetes, Protein. Dieses rekrutiert nach seiner eigenen Bindung an den aktivierten Rezeptor ein, als SOS („son of sevenless“, nach einem verwandten Protein bei *Drosophila*) bezeichnetes, Protein zur Membran und in die unmittelbare Nähe des GTP-bindenden Ras-Proteins. SOS aktiviert Ras durch einen Austausch von GDP gegen GTP. Aktiviertes Ras-GTP ist ein Aktivator einer als Raf bezeichneten Proteinkinase, die das erste Glied einer bedeutsamen Proteinkinase-Kaskade darstellt [82]. Auf diesem sogenannten MAP-Kinase-Weg erfolgt die entsprechende Kinase-Aktivierung durch weitere Phosphorylierungen, die letztlich im Zellkern Transkriptionsfaktoren aktivieren und eine Genexpressionsänderung auslösen können.

Die über die verschiedensten Wege stimulierten Signalproteine induzieren im Folgenden eine gesteigerte vaskuläre Permeabilität, eine erhöhte endotheliale Zellproliferation und -migration sowie das endotheliale Zellüberleben [150, 89, 34].

Interessanterweise existieren Hinweise darauf, dass der VEGFR-1 und VEGFR-2 über verschiedene Eigenschaften der o. g. Signaltransduktion verfügen [139]. Ebenso ist bis heute nicht geklärt, inwieweit die einzelnen Schritte von Zell- zu Zelltyp variieren können. Im okulären System ist durch *in vitro* Untersuchungen an der Serum-induzierten Zellproliferationen humaner RPE-Zellen und an VEGF stimulierten bovinen chorioidalen Endothelzellen die Involvierung des MAP-Kinase-Wegs belegt [61, 134].

### 1.7.3 Regulationsmechanismus der VEGF-Expression

Die VEGF-Produktion unterliegt Regulationsmechanismen, die erregende und hemmende Effekte auf die VEGF-Expression erzeugen. Hierbei spielt das Umgebungsmilieu eine entscheidene Rolle [19]. Die Expression von VEGF kann auf Ebene der Transkription, posttranskriptional oder translational beeinflusst werden [19].

Von besonderer Bedeutung ist die Interaktion mit Zytokinen. Inflammatorische Zytokine wie beispielsweise Interleukin-1- $\alpha$  und - $\beta$ , die in die Pathogenese verschiedenster kardiovaskulärer Erkrankungen involviert sind, aktivieren die VEGF-Expression diverser Zelltypen. Interleukin-4 und -10 sowie IFN inhibieren dagegen die VEGF-Gentran-

skription. Die Abbildung 1.3 zeigt die verschiedenen Effekte unterschiedlichster Zytokine [145, 28, 19]. Zu beachten ist dabei deren pleiotroper Wirkungsmechanismus. In Hinblick auf eine bFGF-induzierte Upregulation von VEGF ist diese an vaskulärer glatter Muskulatur belegt [127].

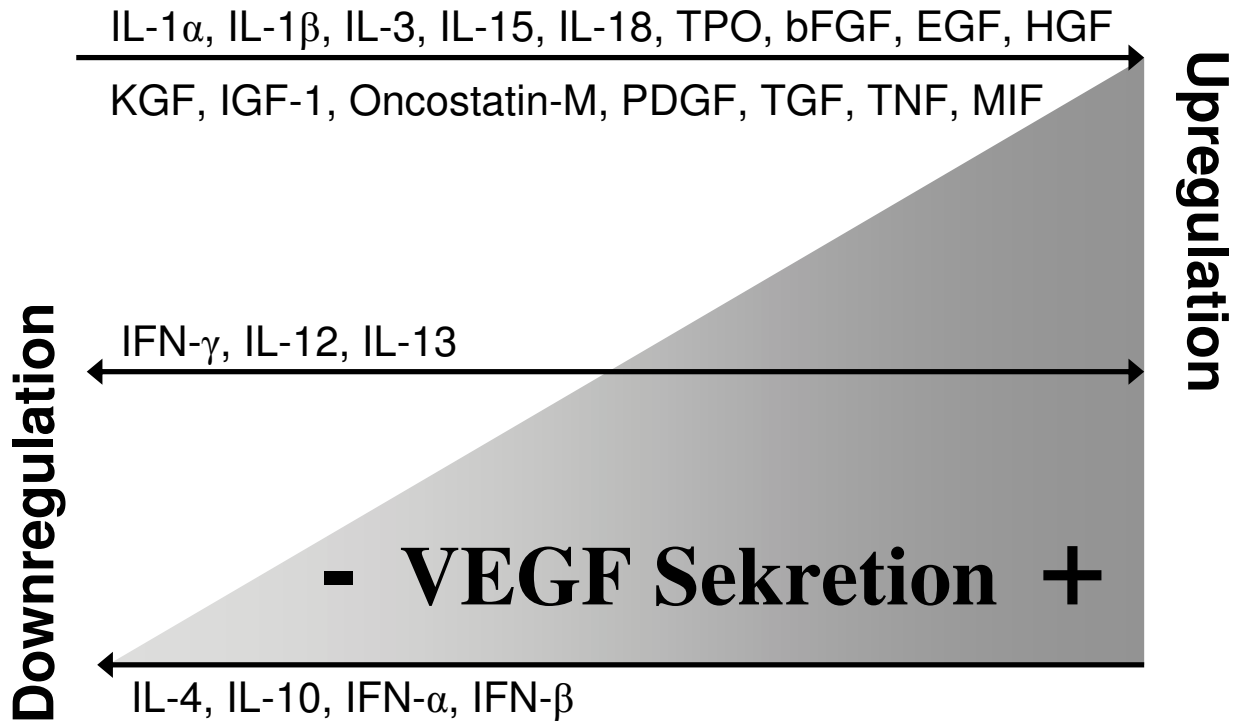


Abbildung 1.3: Up- und Downregulation des VEGFs [19]

Das Auftreten einer Hypoxie *in vitro* und *in vivo* wird als potentester Agonist der VEGF-Induktion gesehen [124]. Dabei produziert die unter Sauerstoffmangel stehende Zelle HIF-1 („Hypoxia Inducible Factor“), welches wiederum die Expression von VEGF auf Transkriptionsebene erhöht und schliesslich die Angiogenese induziert [19, 121]. Dieser Mechanismus ist auch im okulären Zellsystem zu beobachten. In ischämischen retinalen Geweben von Affen konnte ein Anstieg der VEGF-mRNA in Proportion zur Entwicklung von Irisneovaskularisationen detektiert werden [94]. Hierbei wurden überwiegend die Isoformen VEGF<sub>121/165</sub> nachgewiesen. Untersuchungen an humanen ischämischen Retinagewebe erfassen die Korrelnanz von VEGF im Retina-, Glaskörper- und Kammerwasserbereich mit Neovaskularisationen der Retina, Iris und des Nervus opticus [3, 107]. Ebenso existiert eine direkte Beziehung zwischen VEGF-Expression und der Stickstoff-

monoxid (NO)-Produktion. Eine Stimulation wird durch niedrige, eine Inhibition hingegen durch hohe NO-Konzentrationen erreicht [29, 45].

### 1.7.4 Funktionsvielfalt und Vorkommen von VEGF

VEGF agiert als ein Schlüsselmolekül und Stimulator in einem komplexen Angiogenese-Prozess durch Regulation von Wachstum und Erhaltung eines physiologischen Zirkulationssystems [19]. Ein agonistischer Effekt sorgt *in vivo* und *in vitro* für die Aktivierung, Proliferation und Migration sowie Permeabilität von Endothelzellen [19]. Da VEGF in fast allen vaskulären Geweben gefunden werden kann, dient er vermutlich als Stabilisator der vaskulären Homöostase. Unter physiologischen Bedingungen unterliegt die Angiogenese-Kaskade strengen Kontrollmechanismen durch Interaktion angiogener Wachstumsfaktoren wie VEGF, FGF und Angiogenese-Inhibitoren. Bei unkontrollierter Regulation mit Überexpression des VEGF-Proteins, z. B. durch Auftreten einer Hypoxie, wird eine exzessive und insuffiziente Gefäßneubildung stimuliert. Als Konsequenz resultiert eine Ischämie verschiedenster Gewebetypen. Neben dem Wachstum solider Tumoren können auch andere Organmanifestationen mit Zerstörung intakter Gewebeverbände auftreten, z. B. okuläre Erkrankungen wie die diabetische Retinopathie oder AMD.

Ferner reguliert VEGF das Überleben, die Apoptose und Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen sowie die primäre Gefäßentwicklung- und Neubildung endothelialer Zellen. Damit wird ein entscheidender Beitrag zur embryonalen Angiogenese geleistet [19, 16, 100]. Ein weiterer VEGF-assoziiertes Effekt betrifft die Stimulation der Lymphangiogenese und Wirkung als Immunsuppressor. Wie der Name bereits impliziert, werden vorrangig vaskuläres Endothel, aber auch andere nichtendotheliale Zelltypen, wie z. B. Monozyten und Makrophagen, stimuliert [149]. Gaudry et al. und Melder et al. berichteten zusätzlich von einer proinflammatorischen VEGF-Funktion durch Interaktion mit Leukozyten und sogar Thrombozyten [91, 47].

VEGF agiert vorwiegend als parakriner, aber auch als autokriner Faktor. Seine autokrine mitogene Wirkung findet sich bei Interleukin-2-abhängigen Lymphozyten. Für Monozyten, Linseneithelzellen und korneale Endothelzellen, Melanozyten sowie Osteoblasten ist ein autokriner chemotaktischer Effekt beschrieben [149, 31, 93]. Für hu-

mane RPE-Zellen gilt dagegen eine autokrine mitogene und chemotaktische Wirkung. RPE-Zellen sind in der Lage, mRNA zu exprimieren, die für VEGFR-1 und -2 kodieren [56, 57]. Ferner konnten Adamis et al. in humanen RPE-Zellkulturen eine Expression von VEGF<sub>121</sub> sowie VEGF<sub>165</sub> nachweisen [5]. Im physiologischen okulären Gewebe von Affen und Ratten wurde eine VEGF-mRNA-Expression im Bereich der Konjunktiva, Iris, Retina und dem Chorioid-RPE-Komplex detektiert. Als dominante Isoformen sind auch dabei VEGF<sub>121/165</sub> identifiziert worden. Das VEGF-Proteinlevel ist im Chorioid-RPE-Komplex mit 17,39 pg/ml angegeben [75]. In avaskulärem Gewebe wie der Kornea und der Linse konnte nur wenig VEGF gefunden werden. Im Gegensatz dazu berichteten Robinson et al. von einer VEGFR-1- und -2-mRNA-Präsenz im kornealen Stroma und Epithel [3].

Ein Lokalisationsnachweis von VEGFR-1- und -2-mRNA gelang hingegen *in vitro* in der Iris, der Retina und dem Chorioid-RPE-Komplex [75]. Tierexperimentell zeigten retinale Strukturen im Bereich des RPEs, der äußeren Körnerschicht, der inneren Körnerschicht im Bereich der Müllerzellen sowie der Ganglienzellschicht eine Expression von VEGFR-1- und -2-mRNA sowie hohe VEGF-Level. Zwischen den einzelnen Lokalisationen kann genauer differenziert werden. VEGFR-1-mRNA dominiert in der äußeren Körnerschicht und der Ganglienzellschicht, VEGFR-2-mRNA und VEGF vorrangig im Chorioid-RPE-Komplex und der inneren Körnerschicht [113, 75]. Die Anwesenheit von VEGF und seinen Rezeptoren im RPE-Zellsystem lässt vermuten, dass der Wachstumsfaktor in die Integritätserhaltung und die Permeabilitätsregulation des RPEs involviert ist.

### 1.7.5 Klinische Bedeutung von VEGF

Die Angiogenese spielt, gerade im Zusammenhang mit der VEGF-Produktion, eine dominante Rolle in der Pathogenese und Progression verschiedenster Erkrankungen [102]. Bei der Entwicklung neuer Therapiekonzepte kann dabei zwischen einer VEGF aktivierenden, proangiogenetischen oder inhibierenden, antiangiogenetischen Anwendung unterschieden werden [19, 102].

In der Tumorgenese ist die VEGF-Expression eng an die Bildung diverser neoplastischer Zellen gebunden [26, 38]. Gerade deshalb verheißen antiangiogenetische Therapieansätze in der Tumorbehandlung eine vielversprechende Ergänzung zu herkömmlichen Behandlungsstrategien [102, 39].

Die Erforschung proangiogenetischer Therapieformen begann Ende der 90er Jahre, als erstmalig angiogenetische Wachstumsfaktoren zur Behandlung der Arteriosklerose und chronischer Wundheilungsstörungen eingesetzt wurden. Durch verschiedene Studien konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte VEGF-Expression mit einem geringeren Risiko der koronaren Herzerkrankung korreliert [66]. Bis dato ist nicht genau geklärt, inwieweit eine VEGF-Stimulation in die Pathogenese der Arteriosklerose oder peripherer Gefäßerkrankungen eingreifen kann [33, 67].

### 1.7.6 VEGF und seine Bedeutung im okulären System

Neben der Tumorgenese ist die unkontrollierte VEGF-Produktion ein kausaler Faktor vieler okulärer Erkrankungen, insbesondere proliferativer intraokulärer Neovaskularisationssyndrome, wie z. B. AMD, diabetische Retinopathie, Frühgeborenenretinopathie, Neovaskularisationsglaukom [19, 102, 2]. Dabei stellen nicht nur ein unkontrolliertes neovaskuläres Wachstum, sondern auch vaskuläre Leckagen und vitreale Hämorrhagien eine retinale Gefährdung mit entsprechender Visuseinschränkung bis zur Erblindung dar [102]. Ferner übernimmt VEGF eine zentrale Rolle in der Entwicklung und Progression eines Makulaödems [1]. *In vitro* identifizierten Chen et al. VEGF, VEGFR-1 und -2 in humanen RPE-Zellkulturen und epiretinalen Membranen enukleierter Humanbulbi [27]. Auch bei Patienten mit venösen retinalen Gefäßverschlüssen konnten erhöhte intravitreale VEGF-Spiegel, die positiv mit dem Ausmaß des Makulaödems korrelierten, gemessen werden [105].

Primär ist der Wachstumsfaktor im RPE, in Neuronen inklusive Müllerzellen und Ganglienzellen sowie retinalen Kapillarendothelzellen und Perizyten vorzufinden [94, 113]. Seine Sekretion dient vorrangig der Stabilisation choriokapillärer Gefäßstrukturen. VEGF-A nimmt hierbei eine besondere Stellung ein. Es agiert konzentrationsabhängig und wird vom RPE auf die Seite der Choriokapillaris sezerniert. Geringe VEGF-A-Kon-

zentrationen induzieren einen Strukturverlust chorioidaler Endothelzellen. Im Rahmen pathologischer Prozesse ermöglicht eine gesteigerte Sekretionsmenge die Bildung von Neovaskularisationen und greift entsprechend in die Pathophysiologie okulärer Erkrankungen ein [132]. In RPE-Zellen von Ratten induzierte eine VEGF-Überexpression eine gesteigerte Proliferationsrate und Zelldichte [57]. In verschiedenen experimentellen Studien und *in vivo* konnte der Kausalzusammenhang zwischen der VEGF-Expression und okulären Neovaskularisationen auch in kornealen-, retinalen- und chorioidalen Geweben sowie der Iris aufgezeigt werden [11, 4, 6, 77]. Eine Assoziation zwischen VEGF, VEGFR-1 und -2 und chorioidalen Neovaskularisationen ist am humanen Gewebe belegt [83].

Durch den Nachweis einer zusätzlichen proinflammatorischen VEGF-Funktion wird deutlich, dass die Ausbildung von Neovaskularisationen nicht allein durch eine Ischämie oder Hypoxie, sondern auch durch komplexe inflammatorische Prozesse getriggert werden kann [47, 68]. Neben der Stimulation von Neovaskularisationen ist VEGF zur Induktion einer gesteigerten RPE-Permeabilität und somit reduzierten Barrierefunktion befähigt [1, 96]. Der pathogene VEGF-A-Effekt stellt einen wichtigen Ausgangspunkt für die Entwicklung alternativer Behandlungsmethoden proliferativer intraokulärer Neovaskularisationssyndrome dar [102, 68].

### 1.7.7 Anti-VEGF-Therapie

Grundsätzlich existieren vier potentielle Anti-VEGF-Strategien: die VEGF-Ligandenbindung (VEGF Trap), die VEGF-Rezeptorblockierung, Antisense-Oligonukleotide („Aptamer“) sowie die neutralisierende Antikörperbindung [19].

VEGF Trap ist ein rekombinantes Protein. Es bindet alle VEGF-Isoformen und besitzt eine höhere Affinität für VEGF als alle anderen bekannten monoklonalen Antikörper [19]. Als „Aflibercept®“ wird es erfolgreich in der Behandlung von Malignomen erprobt. Im Rahmen einer AMD konnten klinische Ergebnisse die Sicherheit und therapeutische Wirksamkeit des Präparates belegen [103].

VEGF-Rezeptorblocker fungieren als Tyrosinkinaseinhibitoren. Sie konkurrieren um die intrazelluläre ATP-Bindungsdomäne und agieren somit als Kinase-Antagonisten. Kli-



nisch werden sie in der Behandlung von fortgeschrittenen und metastasierten Nierenzellkarzinomen sowie gastrointestinalen Stromatumoren eingesetzt [19, 99]. In der AMD-Behandlung laufen derzeit Phase-II-Studien für „Vatalanib®“ in einer photodynamischen Kombinationstherapie.

Ein Antisense-Oligonukleotid wie „Pegaptanib“ (Macugen®) agiert als „Aptamer“ wie ein Antikörper. Dieser chemisch synthetisierte Nukleinsäurestrang blockiert beim Menschen durch Anlagerung an die Heparinbindungsstelle isoliert VEGF-A<sub>165</sub>. Seit Juni 2006 ist es als Medikament in der Behandlung der exsudativen neovaskulären AMD für die intravitreale Applikation zugelassen [53].

VEGF-Antikörper stellen neben der Anwendung in der Tumorbehandlung eine vielversprechende Therapieoption okulärer Neovaskularisationssyndrome dar. „Bevacizumab“, Avastin®, als ein rekombinanter monoklonaler IgG-1 Antikörper, kann durch seine Bindung an alle VEGF-A-Isoformen eine Aktivitätsinhibierung des VEGFR-1 und -2 induzieren. Eine Zulassung für „Bevacizumab“ besteht für die Behandlung fortgeschrittener, kolorektaler- und nicht kleinzelliger Bronchialkarzinome, des metastasierenden Mamma-karzinoms sowie des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms [19, 140].

Im ophthalmologischen Bereich findet es im „off label use“ Anwendung bei der feuchten Form der AMD. Es existieren eine Vielzahl diverser retrospektiver und prospektiver Studien, die für einen klinisch relevanten therapeutischen Effekt bei einer aktiven CNV im Rahmen einer AMD sprechen [32, 143, 7, 9, 17]. Im Hinblick auf die Behandlung des diabetischen Makulaödems weisen Studien auf eine grundsätzliche Wirksamkeit einer intravitrealen „Bevacizumab“-Therapie hin [92, 52].

„Ranibizumab“, Lucentis® ist ein Fragment eines humanisierten rekombinanten monoklonalen Antikörpers. Er ist gegen VEGF-A gerichtet, bindet mit hoher Affinität an alle Isoformen und verhindert die Interaktion mit seinen Rezeptoren VEGFR-1 und -2. Es stellt eine spezielle Entwicklung für die augenärztliche Anwendung dar, da sein geringeres Molekulargewicht eine leichtere Netzhautpassage erreichen soll. Seit Januar 2007 ist es in der Behandlung der AMD als intravitreale Applikation zugelassen [19]. Die Wirksamkeit des Präparats wurde in der „MARINA-Studie“, „ANCHOR-Studie“ (Phase-III-Studien) sowie in mehreren prospektiven Studien hinreichend belegt [23, 114, 44]. Im

Januar 2011 erfolgte die Zulassung für die Behandlung des diabetischen Makulaödems. Als Grundlage dafür liegen Ergebnisse aus Phase-II und -III Studien vor [88, 35].

## **1.8 Biologie des FGF**

### **1.8.1 Entdeckung und Isoformen**

Der Fibroblasten-Wachstumsfaktor („Fibroblast Growth Factor“, FGF) bezeichnet eine Gruppe aus strukturell verwandten multifunktionellen Ein-Ketten-Polypeptiden, die als FGF-Familie bezeichnet werden. Die ersten Faktoren wurden in den 70er Jahren entdeckt [106]. Man vermutete eine Funktionsbeschränkung ausschließlich auf Fibroblasten, später wurde die Interaktion mit fast allen Zellgruppen deutlich. Heute ist sogar die Existenz von Faktoren ohne Fibroblastenwirkung (FGF-7, -9 und -23) bekannt. Insgesamt differenziert man bis heute 23 Subtypen: FGF-1 bis FGF-23. Deren Gene sind auf verschiedensten Chromosomen lokalisiert. Als Prototypen der FGF-Familie werden FGF-1 (aFGF für azidisch) und FGF-2 (bFGF für basisch) benannt. Die Aminosäuresequenz zwischen aFGF und bFGF ist auffällig homogen. Das bFGF ist jedoch 30-100 mal potenter als aFGF und besitzt ein Molekulargewicht von 18 kDa. Beide bedienen denselben spezifischen Zelloberflächenrezeptor [49].

### **1.8.2 Darstellung der FGF-Subtypen**

Entsprechend der Tabelle 1.3 sind die wichtigsten Subtypen der FGF-Familie aufgeführt, bei denen die Funktionsbestimmungen bekannt sind [106].

### **1.8.3 FGF-Rezeptoren und Signaltransduktion**

FGF vermittelt seine Wirkung indem es in die Zelle aufgenommen wird und direkt im Zellkern eine Veränderung der transkriptionellen Genexpression bewirkt [10]. Zum anderen bindet der Wachstumsfaktor an seinen spezifischen Rezeptor (FGFR) an der Zellmembran verschiedenster Gewebe. Wie VEGF-Rezeptoren sind auch FGF-Rezeptoren Tyrosinkinasen, die nach FGF-Ligandenbindung mittels Autophosphorylierung aktiviert

Gen	Lokalisation	Funktion
FGF-1 (aFGF) (141 AS)	5q31	mitogene Zelleffekte, Initiierung Zellproliferation, -migration und -differenzierung
FGF-2 (bFGF)	4q26-27	mitogene Zelleffekte, Initiierung Zellproliferation, -migration und -differenzierung
FGF-3 (240 AS)	11q13	besondere Bedeutung in der embryonalen Entwicklung
FGF-4 (206 AS)	11q13.3	besondere Bedeutung bei neoplastischen Prozessen
FGF-5 (267 AS)	4q21	besondere Bedeutung in der embryonalen Entwicklung
FGF-6	12q13	besondere Bedeutung bei der Wundheilung
FGF-7	15q15-21.1	besondere Bedeutung für die Epithelzellproliferation
FGF-8	10q24	besondere Bedeutung in der embryonalen Entwicklung
FGF-9	13q11-q12	Proliferationsstimulierung und -aktivierung von Gliazellen im ZNS
FGF-23	12q13.3	wichtiger Regulator des Phosphat- und Vitamin-D-Haushaltes

Tabelle 1.3: Wichtigste Subtypen der FGF-Familie mit Genort und Funktion [106, 128]

werden und intrazellulär eine Signalkaskade mit nachfolgender Genaktivierung induzieren.

Diese Signalkaskade beinhaltet eine Reihe von komplexen, transmembranösen und intrazellulären Prozessen, die ansatzweise bereits bei der VEGF-aktivierten intrazellulären Signalkette beschrieben und bis heute im Detail nicht entschlüsselt sind. Kapitel 1.7.2 gibt einen detaillierten Überblick über die wichtigsten Schritte der Signaltransduktion. Letztlich agiert FGF wie auch VEGF über eine Generierung der PKC und die Aktivierung des MAP-Kinase-Wegs. Folglich katalysiert FGF die Wirkungsfortleitung in den Zellkern mit Transkriptionsänderung und proliferations- sowie migrationsstimulierenden Effekten.

An vaskulären Endothelzellen gibt es Hinweise auf die Kopplung des FGF-Rezeptors an ein G-Protein [117]. Guaninnukleotidbindende Proteine sind zellmembranständige Proteine, die an Zelloberflächenrezeptoren gekoppelt sind und diese mit verschiedenen Effektoren verbinden. Die von den Zelloberflächenrezeptoren kommenden Signale wer-

den in die Zelle weitergeleitet. Insgesamt sind die intrazellulären Signalwege noch relativ ungeklärt und scheinen in Abhängigkeit vom Zelltyp zu variieren.

Der sogenannte „high affinity“ Rezeptor des FGFs selbst unterteilt sich in eine extrazelluläre Region, eine primäre Transmembranhelix und eine intrazelluläre Domäne mit Tyrosinkinase-Aktivität. Der extrazelluläre Anteil besitzt zusätzlich drei immunoglobulin-ähnliche Domänen (D1-D3) und eine Heparinbindungssequenz [106]. Bisher sind vier verschiedene FGF-Rezeptoren detektiert worden: FGFR-1 bis FGFR-4. Durch posttranskriptionale Modifikation der mRNA können FGFR-1 bis -3 in weitere Isoformen unterteilt werden, die jeweils mit „b“ und „c“ bezeichnet werden [106]. FGF-1 weist als einziger Ligand eine Affinität zu allen Rezeptor-Isoformen auf.

*In vitro* sind an humanen RPE-Zellen vier verschiedene Subtypen von bFGF-Rezeptoren mit unterschiedlichen Molekulargewichten identifiziert [73]. In RPE-Zellen wird die Signaltransduktion des FGFR-1 und -2 durch unterschiedliche Wege vermittelt. Die Stimulation des FGFR-1 resultiert in einer veränderten Genexpression, die durch die Expressionsstimulation eines sogenannten c-fos-Gens initiiert wird. Diese fungiert als Aktivator des MAP-Kinase-Wegs. FGFR-2 agiert direkt über eine Stimulierung tyrosinkinase-regulierter L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanäle [116].

Eine wichtige Eigenschaft des Wirkmechanismus von FGF und dessen Verstärkung besteht in der Interaktion und hohen Affinität zu Heparan-Sulfat-Proteoglykanen (HSPGs). Diese „low affinity“-Rezeptoren befinden sich sowohl an der Zelloberfläche als auch in der Extrazellulärmatrix. Der Wachstumsfaktor FGF wurde deshalb früher als heparinbindender Wachstumsfaktor („Heparin Binding Growth Factor“) bezeichnet.

Vor Bindung von FGF an seinen Rezeptor ist die Bindung an HSPGs der Zelloberfläche oder an freies Heparin obligatorisch [147]. Yayon et al. vermuteten, dass die „low affinity“-Rezeptoren akzessorische Moleküle sind, die für die Bildung des FGF-FGFR-Komplexes notwendig sind [147]. Die Funktion dieser Moleküle besteht in einer FGF-Stabilisierung gegen thermische Denaturierung, Proteolyse sowie Affinitäts- und Halbwertszeitsteigerung des FGF-FGFR-Komplexes [106]. Die FGF-Rezeptoranzahl ist abhängig von der Menge des intrazellulär bzw. extrazellulär vorhandenen FGFs im Sinne eines negativen Feedbacks [98].

#### 1.8.4 Funktionsvielfalt und Vorkommen von FGF

FGF agiert als multifunktionales Signalprotein. Er ist an der Migrations-, Proliferations-, Differenzierungs- und Regulationsinduktion des Zellwachstums mesodermaler und neuroektodermaler Herkunft *in vitro* und *in vivo* beteiligt [106]. Auf vaskuläre Endothelzellen, aber auch glatte Muskelzellen, Fibroblasten, Epithelzellen, insbesondere Korneal- und Linsenepithelzellen, sowie cerebrale Gliazellen werden mitogene Zelleffekte ausgeübt [37]. Zusätzlich ist er in die embryonale Entwicklung involviert, die vorrangig durch die Subtypen FGF-3, -5, -8, -15, -17, und -19 realisiert werden [106]. Eine reguläre physiologische Zell- und Gewebedifferenzierung ist ohne FGF-Interaktion nicht möglich. Im adulten Organismus steuert FGF gewebereparative Prozesse, Wundheilungsvorgänge, sowie die Neubildung von Gefäßen [106]. Wahrscheinlich wirkt FGF nicht als zirkulierendes Hormon im Serum, sondern agiert eher als autokriner und parakriner Faktor [14]. Hinsichtlich des basischen FGFs lassen sich detailliertere Angaben machen. Seine Aktivität ist nicht speziesspezifisch, da er für eine Vielzahl von Zellen humanen, murinen und bovinen Ursprungs mitogen wirkt [37]. Primäre RPE-Zellkulturen besitzen die Fähigkeit, bFGF und seine Rezeptoren *in vitro* zu exprimieren [130]. Die Gentranskription wird dabei maßgeblich von der Zelldichte beeinflusst [22]. Der Wachstumsfaktor selbst wird in fast allen Gewebetypen nachgewiesen.

#### 1.8.5 Klinische Bedeutung von FGF

In adulten Geweben und Organen besitzt FGF, insbesondere aFGF und bFGF, eine ausgeprägte Aktivität hinsichtlich der Angiogeneseinduktion. Eine physiologische Angiogenese kann im Sinne eines Reparaturprozesses verstanden werden, der durchblutungsfördernd und wundheilend wirkt. Gerät dieses aus Angiogenese-Agonisten und -Antagonisten bestehende System in Dysbalance, erfolgt eine vermehrte FGF-Expression mit entsprechender Upregulation der FGF-Rezeptoren im Gewebe. Getriggert durch das Auftreten einer Hypoxie und Ischämie resultiert eine insuffiziente Gefäßneubildung, die wiederum Grundlage für ischämische Gewebeszustände, neoplastisches Wachstum und okuläre proliferative Neovaskularisationssyndrome darstellt [106]. Humane RPE-Zellen

weisen eine größere Proliferationsrate nach exogen zugeführtem bFGF auf, wenn sie hypoxischen Zuständen ausgesetzt werden. Diese erhöhte Empfindlichkeit wird durch eine Upregulation der Rezeptordichte an der Oberfläche erklärt [73]. Neben einer Hypoxie ermöglichen auch retinale Schäden, die das RPE oder die Photorezeptorschicht betreffen, eine erhöhte bFGF- und FGFR-1-Genexpression [146].

Klinisch kann zum einen durch eine anti-FGF-Strategie antiangiogenetisch agiert werden, um die Tumorangiogenese und Neovaskularisationen zu inhibieren. Eine Angiogenese-Induktion hingegen wird bei arteriellen Durchblutungsstörungen als therapeutische Option genutzt [74, 138, 37].

### 1.8.6 bFGF im okulären System

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde basisches FGF verwendet, so dass im Folgenden nur zu diesem Subtyp Stellung genommen wird. Im Auge lässt sich bFGF in vielen Kompartimenten nachweisen. Im vorderen Augenabschnitt betrifft dies die Descemetsche Membran der Hornhaut, die somit als physiologischer Speicher für bFGF dient, korneale Endothelzellen sowie den Kammerwasserbereich [112]. Anscheinend besitzen humane korneale Endothelzellen die Fähigkeit, exprimiertes bFGF in der Basalmembran einzulagern und zu speichern. Von dort entfaltet es seine Zellwirkung auf parakrinem Weg [112]. Ebenso deuten Experimente darauf hin, dass bFGF von Strukturen stammt, die an die Vorderkammer grenzen, wie z. B. dem Linsenepithel oder Irismelanozyten [111]. Weiterhin konnte an allen drei Zelltypen der humanen Hornhaut (Epithelzellen, stromale Fibroblasten, Endothelzellen) der Nachweis einer mRNA-Expression für die Kodierung von bFGF-Rezeptoren erbracht werden [112, 141]. bFGF wirkt stimulierend auf die Proliferation kornaler Epithelzellen *in vivo*, stromaler Fibroblasten und kornealer Endothelzellen *in vitro* [112, 62]. Ferner initiiert bFGF die Synthese von Kollagen in bovinen kornealen Endothelzellen *in vitro*, welches als wichtiger Bestandteil der Extrazellulärmatrix abgelagert wird. Diese sorgt für eine unterstützende Funktion in Adhäsion und Proliferation von Endothelzellen.

Im hinteren Kompartiment des Auges übernehmen das RPE und chorioidale Zellen die Sekretion von aFGF und bFGF [120]. Baird et al. identifizierten bFGF erstmalig 1985

in bovinem Retinagewebe [15]. Im retinalen Gewebe ist auch im Bereich der Ganglienzellschicht und inneren Körnerschicht eine Genexpression von bFGF und FGFR-1 detektiert worden [146]. Tierexperimentell konnte eine hohe Bindungsaffinität zu retinalen Membranen aufgezeigt werden [37].

Unter physiologischen Bedingungen unterhält bFGF die strukturelle Integrität und Stabilität der Photorezeptoren. *In vitro* fördert er die Proliferation von RPE-Zellen, aber auch den Erhalt ihres Differenzierungszustands [21, 80]. Ferner agiert er als autokriner Faktor und spezifischer Regulator der RPE-Zellproliferation [120]. Es konnte gezeigt werden, dass vor allem bFGF, aber auch viele andere Wachstumsfaktoren wie VEGF, PDGF und EGF (siehe Kapitel 1.6) die RPE-Zellproliferation *in vitro* stimulieren, ohne gleichzeitig einen Verlust der epithelialen Morphologie herbeizuführen [21, 58, 80].

In Hinblick auf pathologische Prozesse dokumentierten Fredj-Reygrobellet et al. bereits 1991 anhand immunhistochemischer Untersuchungen, dass bFGF in PVR-Membranen und bei der proliferativen diabetischen Retinopathie (PDR) nachzuweisen ist [43]. Auch in CNV-Membranen wurden bFGF und FGFR-1 und -2 von RPE-Zellen exprimiert [12]. Sivalingam et al. verwiesen auf höhere bFGF-Level im Glaskörper bei Patienten mit einer aktiven PDR [125]. bFGF selbst übernimmt eine entscheidende Rolle in der Induktion von Neovaskularisationen, da im Rahmen laserinduzierter sowie AMD-assoziiertes CNVs eine Überexpression von bFGF belegt ist [12, 116, 146, 41, 42]. Neben bFGF sind auch VEGF und seine Rezeptoren in o. g. Lokalisationen präsent. Dies verdeutlicht, dass mehr als ein Wachstumsfaktor im pathophysiologischen Verständnis dieser Erkrankungen berücksichtigt werden muss [42].

## 2 Fragestellung und Zielsetzung

*In vivo* stellt das RPE als Monolayer zwischen neurosensorischer Netzhaut und Choriokapillaris ein mitotisch inaktives Zellgewebe dar. Pathologische Bedingungen können einen Zusammenbruch der vom RPE gebildeten Blut-Retina-Schranke bewirken und einen Übertritt von Serumkomponenten, mit den verschiedensten Wachstumsfaktoren und Zytokinen, in den vitreoretinalen Raum ermöglichen [72]. Daraus resultiert eine RPE-Zellaktivierung, die wiederum eine Zellproliferation auslöst. Diese unphysiologisch gesteigerte Permeabilität der Blut-Retina-Schranke wird nach okulären Traumen, nach Kryotherapien oder Laserkoagulationen sowie einer modifizierten Gefäßintegrität bei diabetischer Retinopathie beschrieben [72]. Hiscott et al. berichteten über eine Beteiligung von RPE-Zellen an der Membranbildung im Rahmen einer PDR [63]. In allen Prozessen ist eine Proliferation und Migration von RPE-Zellen involviert [85]. Weiterhin ist bekannt, dass sich Zellen epiretinaler Membranen bei einer PVR vom RPE oder retinalen Gliazellen herleiten [25]. Es existieren hinreichend Belege dafür, dass Wachstumsfaktoren wie VEGF und bFGF die Migration und Proliferation retinaler Pigmentzellen *in vitro* initiieren und modulieren, aber auch in die Entwicklung zellulärer Traktionsmembranen bei der PVR impliziert sind [72, 37].

Die funktionelle Einheit zwischen Photorezeptoren, RPE und Choriokapillaris und damit Sicherung des physiologischen Sehprozesses wird durch die sekretorische RPE-Aktivität gewährleistet [132]. Dies beinhaltet die kontrollierte Sekretion von angiogenen Wachstumsfaktoren wie VEGF und FGF, aber auch vieler anderer antiangiogener Faktoren. Eine unbalancierte Freigabe von angiogenen Substanzen resultiert in einer Induktion von Angiogenese, neoplastischen Prozessen sowie Stimulierung okulärer Neovaskularisationssyndrome [19, 102, 2]. Klinisch kann sie sich als AMD manifestieren und stellt die häufigste Ursache einer Erblindung in den westlichen Industrienationen dar. Tierexperimentell konnte die Induktion von CNVs nach intraokulärer Applikati-



on von VEGF an Primaten gezeigt werden [126]. Mit Hilfe immunhistochemischer und -zytochemischer Untersuchungen an CNVs von AMD-Patienten sowie an experimentellen CNV-Tiermodellen gelang der gemeinsame Nachweis von VEGF und bFGF, deren vermehrte Expression im RPE und eine entsprechende Upregulation [41, 76, 12, 42].

Im Hinblick auf die oben erwähnten Aspekte ergab sich für die vorliegende experimentelle Arbeit folgende Aufgabenstellung:

1. Beurteilung des mitogenen Effekts von VEGF und bFGF auf kultivierte humane RPE-Zellen durch quantitative Bestimmung der Zellproliferation unter standardisierten Kulturbedingungen nach 72 und 144 Stunden
2. Beurteilung eines möglichen synergistischen mitogenen Effekts von VEGF und bFGF auf kultivierte humane RPE-Zellen durch quantitative Bestimmung der Zellproliferation unter standardisierten Kulturbedingungen nach 72 und 144 Stunden
3. Beurteilung des inhibitorischen Effekts von selektiven VEGF- (SU5416) und FGF-Rezeptorblockern (SU5402) auf das Wachstum kultivierter humaner RPE-Zellen durch quantitative Bestimmung der Zellproliferation unter standardisierten Kulturbedingungen nach 72 und 144 Stunden
4. Beurteilung eines möglichen synergistischen inhibitorischen Effekts von selektiven VEGF- (SU5416) und FGF-Rezeptorblockern (SU5402) auf das Wachstum kultivierter humaner RPE-Zellen durch quantitative Bestimmung der Zellproliferation unter standardisierten Kulturbedingungen nach 72 und 144 Stunden

Gegenstand der Arbeit war die Untersuchung der Wachstumsregulation humaner RPE-Zellen unter dem Einfluss von speziellen Wachstumsfaktoren (VEGF, bFGF) und deren mitogener Aktivitätsvergleich. Hierbei wurde der potentielle Effekt der selektiven VEGF- und FGF-Rezeptorblocker SU5416 und SU5402 auf die Zellproliferation beleuchtet und deren Inhibitionskraft auf VEGF- und bFGF-assoziierte Interaktionen differenziert. Größtes Interesse galt dabei einem möglichen wechselseitigen Trigger- und Regulationseffekt beider Wachstumsfaktoren. Zusammenfassend sollte die Frage geklärt werden, inwieweit Effektormoleküle existieren und agieren, um die Proliferationsprozesse humaner RPE-Zellen *in vitro* zu regulieren.

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Aufbau der Studie**

#### **3.1.1 Allgemeines**

Die vorliegende experimentelle Studie beinhaltete eine Untersuchung an 32 humanen Spenderbulbi der Hornhautbank Berlin (Augenklinik am Campus Virchow der Charité - Universitätsmedizin Berlin). Die Entnahme des Spendermaterials erfolgte bei Vorliegen des schriftlichen Einverständnisses der Verstorbenen oder Angehörigen und gemäß den gesetzlichen Richtlinien zur Organspende. Die untersuchten Humanbulbi umfassten ein Spendenalter von 15 bis 77 Jahren ( $57 \pm 16,4$  Jahren). Die post mortem Zeiten bis zur Präparation lagen zwischen 6 und 24,2 Stunden ( $18,9 \pm 4,9$  Stunden).

Ein-/Ausschlusskriterien für die Verwendung der Spenderbulbi wurden bereits durch die geltenden Bestimmungen zur Organspende festgelegt. Dabei spielte die Todesursache der Spender keine Rolle, sofern intraokuläre Erkrankungen, Entzündungen oder Traumata ausgeschlossen werden konnten. Um genetische Unterschiede zu minimieren, wurde nur Spendermaterial der kaukasischen Bevölkerung verwendet. Alle im Folgenden genannten Arbeitsschritte hinsichtlich Präparation, Zellmaterialgewinnung, Kultivierung und experimenteller Versuchsansätze wurden zum Erlernen und Intensivieren der Arbeitstechniken zuerst an bovinen Bulbi durchgeführt und später unter optimierten Bedingungen auf humanes Zellmaterial übertragen. Ein fachgerechter und effizienter Umgang mit dem humanen Spendermaterial wurde somit gewährleistet.

#### 3.1.2 Versuchsanordnung

Anhand von *in vitro* Versuchen sollte die quantitative, zeitabhängige, proliferationsmodulierende Wirkung (nach 72 und 144 Stunden) von VEGF, bFGF sowie VEGF und bFGF in Kombination auf humane RPE-Zellen beleuchtet werden.

Dabei spielte im Rahmen mitogener Effekte auch ihr synergistisches Verhalten eine Rolle. Nachdem die Zellproliferation durch die Wachstumsfaktoren VEGF und bFGF zeitabhängig quantifiziert wurde, war die Wirkungsmodulation unter Zugabe selektiver Rezeptorblocker (VEGF- und FGF-Rezeptorblocker SU5416 und SU5402) Gegenstand der Untersuchung. Es erfolgte die Bestimmung der quantitativen Zellproliferation unter dem Einfluss von SU5416, SU5402 sowie deren Kombination.

Insgesamt entstanden dadurch vier Versuchsreihen mit je einer Kontrolle. Dabei war eine Konzentrationsstabilität der ausgesäten Zellen und supplementierten Substanzen gewährleistet.

#### 3.2 Das RPE *in vitro*

Die Kultivierung okulärer Zellen ist allein aufgrund der Größe des Auges eine anspruchsvolle Aufgabe. Zudem ist die initial isolierbare Zellmenge nur gering. Im Regelfall ist nur eine post mortem Zellgewinnung möglich, wodurch die Vitalität beeinträchtigt und die Zellzahl weiter gesenkt wird. RPE-Zellen gelten zudem als *in vivo* terminal differenziert und post mitotisch, so dass eine Proliferation *in vitro* einen atypischen Zustand darstellt. Dabei besteht die Möglichkeit, dass die Zellen entdifferenzieren oder transdifferenzieren und somit ihre ursprünglichen Merkmale und Eigenschaften verlieren. So entsprechen RPE-Zellen in höheren Passagen und mit zunehmendem Alter einem fibroblastoiden bis hin zu einem myoiden Phänotyp [136]. *In vivo* werden solche metaplastischen RPE-Veränderungen auch bei diversen Krankheitsbildern beobachtet, wie bei der PVR. Unter optimierten und ausgearbeiteten Zellkulturbedingungen kann dies jedoch verhindert werden. Erste Versuche zur Kultivierung von RPE-Zellen wurden bereits in den sechziger Jahren durchgeführt. Albert et al. beschrieben 1972 detailliert das Wachstumsverhalten von Chorioidea-Explantaten in Kultur [8]. 1991 entwickelte Pfeffer ein spezielles

Kulturmedium für RPE-Zellen, welches in zwei Varianten, entweder zur Förderung der Proliferation oder zur Förderung der Zelldifferenzierung, eingesetzt werden konnte [110]. Die in der Literatur beschriebenen Verfahren verdeutlichen, dass bereits die Wahl des Kulturgrundmediums (Basalmedium) und des Serums sowie deren Konzentration einen entscheidenden Einfluss auf die Vitalität, Morphologie und das Wachstum der RPE-Zellen ausüben. Eine 1:1 Mediummischung aus Ham'S F12 und Medium 199 bewies sich als optimales Medium für adhärent wachsende okuläre Zellen [36]. Weitere hinzugefügte Substanzen, die eine Proliferation und/oder Funktion der RPE-Zellen beeinflussen können, sind zum Beispiel Bicarbonat, Vitamin A, Pyruvat sowie Hormone wie Insulin, Hydrocortison und Transferrin [36, 78]. Bis heute existiert jedoch keine einheitliche oder standardisierte Methode zur RPE-Zellkultivierung.

### **3.3 Etablierung der Zellkultur**

Die humanen Spenderbulbi wurden innerhalb von 6 Stunden post mortem enukleiert und gelangten spätestens nach 24,2 Stunden in das Labor der Augenklinik am Campus Virchow der Charité - Universitätsmedizin Berlin. Dort wurden sie unter fließendem Wasser und anschließend für fünf Minuten in Polyvidon-Jodlösung dekontaminiert. Anschließend erfolgte die Spülung für weitere fünf Minuten in Natriumthiosulfat-Pufferlösung zur Titration des Jods. Zuletzt wurden die Bulbi für fünf Minuten in PBS-Pufferlösung („Phosphate Buffered Saline Solution“, phosphatgepufferte Kochsalzlösung, Merck, Darmstadt, Deutschland) gewaschen.

Es folgte die Präparation des vorderen Augenabschnittes. Mit Hilfe eines Skalpell wurde die Sklera entlang des Korneaskleralringes in 2-3 mm Limbusabstand zirkulär durchtrennt. Die Korneaskleralscheibe ließ sich nun wie ein Uhrglas abheben und wurde isoliert in PBS-Pufferlösung gelagert. Unter Fixierung des Bulbus mit einer Pinzette und leichtem Druck auf den Bulbuskörper konnten die Iris, der Ziliarkörper, die Linse und auch Anteile des hinteren Augenabschnittes wie Glaskörper und neurosensorische Retina vorsichtig disseziert werden. Die Entfernung erfolgte mittels einer Pinzette unter leichtem Zug an den jeweiligen Bulbusstrukturen. Nun wurde der Bulbusbecher mit

Schere und Pinzette in vier Einzelteile zerschnitten. Die sorgfältige mechanische Ablösung der restlichen Retinaanteile von der Sklera schloss sich an. Um die Zellbeteiligung anliegender Strukturen wie der Lamina vitrea und Chorioidea gering zu halten, wurde das gewonnene Retinahäutchen zweimal sorgfältig in PBS-Pufferlösung gewaschen. Anschliessend erfolgte die Zerteilung in kleinere Kompartimente und gleichmässige Umsetzung in 6-Loch-Kulturschalen (Falcon, Becton & Dickinson Comp., New Jersey, USA). Das Zellgewebe wurde dann in 4 ml eines Kollagenasegemisches (Typ IA und IV, 1:1, 0,5 mg/ml, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) für 16 Stunden unter 5 % CO<sub>2</sub> bei 37 °C inkubiert. Da in der extrazellulären Matrix von RPE-Zellen Kollagene, insbesondere Typ I und IV, zu finden sind, wurde eine Mischung der entsprechenden Enzyme gewählt, um eine schonende Art der Zellisolierung anzuwenden. Ein Stoppen der enzymatischen Reaktion wurde durch die Zugabe von jeweils 3 ml des 1:1 Basalmediumgemisches, bestehend aus Medium 199 (Earle, ohne L-Glutamine, Biochrom AG, Deutschland) und Medium Ham's F 12 (ohne L-Glutamine, Biochrom AG, Deutschland) und 10 % fetales Kälberserum (FCS, „Fetal Calf Serum“, Gibco BRL, Paisley, Schottland) erzielt. Zuvor wurden die Kulturschalen schonend geschwenkt, um ein Ablösen der RPE-Zellen von der Bruchschichten Membran zu begünstigen. Die Entfernung der verbliebenen Retinahäutchen und die Zentrifugation (10 Minuten bei 1000 U/min und 15 °C) der gewonnenen Zellsuspension folgten. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 4 ml komplettiertem Kulturmedium und 10 % FCS resuspendiert und gleichmässig wiederholt auf eine 6-Loch-Zellkulturplatte verteilt. Pro Well wurden die Zellen mit 2 ml Kulturmedium versorgt, das sich wie folgt zusammensetzte:

- 50 ml Medium 199 (Earle, ohne L-Glutamine, Biochrom AG, Deutschland)
- 50 ml Medium Ham's F 12 (ohne L-Glutamine, Biochrom AG, Deutschland)
- 0,1 ml Gentamicin (50 µg/ml, Gibco BRL, Paisley, Schottland)
- 0,0125 ml Amphotericin B (2,5 µg/ml, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- 1 ml Natriumpyruvat (1 mM, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- 0,01 ml Insulin (1 µg/ml, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- 0,5 ml HEPES mit pH=7,2 (1 M, Serva, Feinbiochemica, Heidelberg)

- 10 ml / 5 ml / 2 ml / 0,1 ml FCS (10 % / 5 % / 2 % / 0,1 %, fetales Kälberserum, „Fetal Calf Serum“, Gibco BRL, Paisley, Schottland)

Nach der Herstellung wurde das komplettierte Kulturmedium steril filtriert und bei 4 °C gelagert. Lichtmikroskopisch konnten Zellverbände und freischwimmende RPE-Zellen detektiert werden. Ein Mediumwechsel wurde erstmalig nach vier Tagen und im Folgenden alle zwei Tage durchgeführt. Um einen routinemäßigen Überblick über den jeweiligen Vitalitätszustand und die Morphologie der Zellen zu erhalten, wurde vor und nach jedem Mediumwechsel eine Begutachtung mittels Phasenkontrastmikroskop durchgeführt. Der supplementierte Serumanteil reduzierte sich langsam von 10 % über 5 % auf 2 % FCS. Die schrittweise Herabsetzung des Serumanteils ermöglichte den Zellen, ihren Stoffwechsel zu reduzieren. Um ein Überleben der RPE-Zellen zu gewährleisten, wurden alle Versuchsansätze mit 0,1 % FCS versetzt. Bei der Lagerung unter 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C wuchsen die Zellen bis zur Konfluenz heran.

Im Rahmen der bovinen Zellkultivierung inkubierten die gewonnenen RPE-Zellen anfangs in einem differenzierten Kulturmedium. Es bestand aus folgenden Supplementen:

- 100 ml DMEM (Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium, GIBCO BRL, Paisley, Schottland)
- 0,1 ml Gentamicin (50 µg/ml, Gibco BRL, Paisley, Schottland)
- 1 ml L-Glutamin (200 mM, Biochrom AG, Deutschland)
- 1 ml Penicillin/Streptomycin (10000 µg/ml Biochrom AG, Deutschland)
- 2,5 ml HEPES mit pH=7,2 (1 M, Serva, Feinbiochemica, Heidelberg)
- 10 ml / 5 ml / 2 ml / 0,1 ml FCS (10 % / 5 % / 2 % / 0,1 %, fetales Kälberserum, „Fetal Calf Serum“, Gibco BRL, Paisley, Schottland)

Nach wiederholten bovinen Zellkulturansätzen wurde lichtmikroskopisch deutlich, dass das erstgenannte Kulturmedium einen deutlich positiveren Effekt auf das kulturelle Zellwachstum ausübte und eine schnellere Zellkonfluenz sowie Proliferationsförderung hervorbrachte. Aufgrund der Überlegenheit erfolgte dessen Einsatz bei allen Arbeitsschritten an humanem Zellgewebe.

### 3.4 Enzymatische Isolierung der RPE-Zellen

Nach spätestens 14 Tagen konnte die Subkultivierung durch Passagierung der Primärkultur durchgeführt werden. Dazu wurde das Kulturmedium abpipetiert und jedes Loch der Kulturschale mit 2 ml PBS-Pufferlösung sowie 1 ml PBS/EDTA-Pufferlösung gewaschen. Um ein enzymatisches Aufbrechen der Zellgrenzen und Ablösen der RPE-Zellen vom Boden zu ermöglichen, inkubierten die Zellen für 5 Minuten bei 37 °C in 100 µl Trypsin auf 1 ml PBS-EDTA je Loch (Trypsin-EDTA (0,05 %/0,02 %), Seromed, Biochrom AG, Berlin, Deutschland). Nach vorsichtigem Beklopfen der Lochschale wurden die abgelösten Zellen in einem 15 ml Falcon-Röhrchen aufgenommen und zum Stoppen der Trypsinaktivität mit der 10-fachen Menge (bezogen auf die Trypsinmenge) an Medium 199 und Medium Ham's F 12 (komplettiert) und 10 % FCS versetzt. Zum Trennen des Überstandes wurde für 10 Minuten bei 1000 U/min, 15 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 500 µl Medium 199 und Medium Ham's F 12 sowie in 5 % FCS resuspendiert. Dieses stand dann für die Zellzählung zur Verfügung.

### 3.5 Quantitative Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels Hämocytometer (Neubauer-Zählkammer). Dessen Anwendung wird im Folgenden beschrieben.

Nach Reinigen der Zählkammer sowie des dazugehörigen Deckglases mit 70 %igem Ethanol folgte ein leichtes Anfeuchten und Auflegen des Deckglases. Der Auffüllung der Zählkammer durch die Zellsuspension schloss sich die Zellauszählung unter dem Mikroskop (10-fach Objektiv, Carl Zeiss Jena) mit Phasenkontrasteinrichtung an. Die Füllung der Kammer vollzog sich durch Ansetzen der Pipette an der Zählkammerkante. Entstehende Kapillarkräfte beförderten dabei die Zellsuspension in den Zwischenraum von Deckglas und Kammer.

Die Neubauerkammer selbst besteht aus neun Quadrern. Die im Mikroskop sichtbare Fläche entspricht einem Quadrat mit einer Fläche von 1 mm<sup>2</sup>. Bei einer Tiefe von 0,1 mm resultiert ein Volumen von 0,1 µl. Ein Quadrat wurde bei einer 100-fachen Vergrößerung vom Betrachter gut erfasst. Zur Erleichterung des Auszählens dienten horizontale und

vertikale Hilfslinien. Es war zu berücksichtigen, dass auf den Linien befindliche Zellen nicht doppelt gezählt wurden. Die Berechnung der Zellzahl beinhaltete die Auszählung von mindestens vier Quadraten, die Errechnung des Mittelwertes und das Multiplizieren mit  $10^4$ , so dass sich die Zellkonzentration pro ml ergab. Die Gesamtzellzahl konnte dann aus dem Produkt des Volumens der Zellsuspension und der Zellzahl pro ml ermittelt werden. Auf mögliche Fehlerquellen durch unkorrekte oder mangelhafte Durchmischung der Zellsuspension, auf einen adäquaten Zellsuspensionsverdünnungsfaktor sowie auf eine Über- oder Unterfüllung der Zählkammer musste geachtet werden.

## 3.6 Detaillierter Versuchsaufbau

### 3.6.1 Allgemeines

Für alle Versuchsansätze standen konfluente, humane RPE-Zellen der ersten Passage mit erniedrigtem Serumanteil (0,1 % FCS) als Versuchsmaterial zur Verfügung. Höhere Passagen wurden nicht verwendet, um die Gefahr einer möglichen Entdifferenzierung oder Transdifferenzierung der RPE-Zellen durch die Zellkultivierung gering zu halten. Unter Berücksichtigung der jeweiligen Zellkonzentrationen konnten pro Loch einer 12-Loch-Zellkulturplatte (Falcon, Becton & Dickinson Comp., New Jersey, USA)  $1 \times 10^4$  RPE-Zellen ausgesät werden. Für jede Zelllinie wurden mindestens zwei, bei ausreichend zur Verfügung stehendem Material maximal sechs, Löcher für die Kontrollen und pro Testsubstanz befüllt. Diese wiederum wurden mit je 1 ml Kulturmedium und 2 % FCS versetzt. Die Kultivierung der ersten Passage erfolgte für 24 Stunden unter 5 %  $\text{CO}_2$  und 37 °C, wonach ein stabiler Zellverband mit Bodenbewachsung der Kulturschale gesichert war. Der Experimentansatz wurde zu diesem Zeitpunkt begonnen.

Zum Nachweis der Zellproliferationsentwicklung durch exogene Stimulation wurden die Wachstumsfaktoren VEGF und bFGF und deren Kombination in standardisierten Konzentrationen für definierte Zeiten auf den Zellen belassen. Entsprechend ist für den Nachweis selektiver Wachstumsinhibitoren (SU5416, SU5402) verfahren worden. Die Proliferation wurde durch die Zellzählung mittels Hämocytometer beurteilt (siehe Kapitel 3.5). Der Versuchsabbruch erfolgte nach 72 Stunden und 144 Stunden Inkubation mit



nachfolgender Fotodokumentation (100-fache Vergrößerung) und Zellzählung. Vor der quantitativen Zellzahlbestimmung wurden die Zellen enzymatisch isoliert. Das in Kapitel 3.4 dokumentierte Trypsin-EDTA-Verfahren kam auch hier zum Aufbrechen der Zellgrenzen zur Anwendung. Nach Zentrifugation stand ein resuspendiertes Pellet für die Zellzählung zur Verfügung. Während der Inkubationszeit von 72 Stunden unterblieb ein Wechsel des Kulturmediums. Für den Zellansatz mit 144 Stunden Versuchsdauer wurde dieser jedoch nach drei Tagen mit 0,1 % FCS durchgeführt und die Applikation der Wachstumsfaktoren sowie deren Inhibitoren wiederholt.

Die Konzentrationen und Inkubationszeiten der verwendeten Substanzen kongruierten mit bereits veröffentlichten Daten, die unter ähnlichen Bedingungen erhoben wurden [61, 72, 136, 37]. Toxische Effekte auf humane RPE-Zellen sollten somit verhindert werden. Zur Unterscheidung vitaler von avitalen Zellen wurde nach Versuchsabbruch und vor Zellauszählung der Trypanblau-Test (0,1 %, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) eingesetzt. Zur Färbung wurden 100  $\mu$ l Trypanblau auf 500  $\mu$ l Zellsuspension pipettiert und nach einer Minute Einwirkzeit unter der Zählkammer begutachtet. Da Trypanblau durch defekte Zellmembranen in das Zytosol avitaler Zellen dringt, erschienen diese tiefblau. Vitale Zellen stellten sich ungefärbt dar. Bei der Zellzählung wurden somit nur vitale Zellen berücksichtigt.

In den folgenden Kapiteln werden die Anwendungsbesonderheiten der verwendeten Substanzen verifiziert.

#### **3.6.2 Modulation der Zellproliferation durch VEGF**

Anhand von *in vitro* Versuchen sollte die zeitabhängige Wirkung von VEGF bei Konzentrationsstabilität humaner RPE-Zellen auf die Zellproliferation beleuchtet werden. 24 Stunden nach Aussaat der ersten Zellpassage erfolgte ein Mediumwechsel. Das Kulturmedium, supplementiert mit 2 % FCS, wurde abpipettiert, jedes Loch der Zellkulturschale vorsichtig zweimal mit 2 ml PBS-Pufferlösung gewaschen und mit komplettiertem Kulturmedium und 0,1 % FCS versetzt. Auf ein serumfreies Kulturmedium wurde verzichtet, um ein Basalüberleben der Zellen zu gewährleisten. Weiterhin wurde ein insulinfreies Medium gewählt. Eine insulinabhängige proliferations- und funktionsmodulierende Wirkung

auf RPE-Zellen sollte somit ausgeschlossen werden. Die Auffüllung der Wells wurde erneut mit jeweils 1 ml durchgeführt. Nach erfolgtem Mediumwechsel konnte nun jeweils 1  $\mu$ l rekombinantes humanes VEGF<sub>121</sub> pro Well (5 ng/ml, Molekulargewicht 28 kDa, R & D Systems, Minneapolis, U.S.A.) appliziert werden. Zuvor erfolgte die Herstellung der o. g. Konzentration durch Lösung in 1 ml PBS-Pufferlösung und 0,1 % FCS. Die folgenden Arbeitsschritte sind der Abbildung 3.1 zu entnehmen.

#### **3.6.3 Modulation der Zellproliferation durch bFGF**

Neben der Wirkungsmodulation durch VEGF sollte *in vitro* die zeitabhängige Wirkung von bFGF bei Konzentrationsstabilität humaner RPE-Zellen auf die Zellproliferation untersucht werden. Grundsätzlich korrespondierten die Arbeitsschritte mit denen beim VEGF-Versuchsaufbau (siehe Kapitel 3.6.2). Ein Mediumwechsel vollzog sich 24 Stunden nach Aussaat der ersten Zellpassage. Der zweimaligen Spülung mit PBS-Pufferlösung schloss sich die Wellfüllung mit komplettiertem Kulturmedium und 0,1 % FCS an. Auch hier kam ein insulinfreies Medium zum Einsatz. Jedem Well der Zellkulturplatte wurde anschließend 1  $\mu$ l bFGF (1 ng/ml, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) appliziert. Zuvor musste die entsprechende Konzentration durch Lösung in 1 ml PBS-Pufferlösung und 0,1 % FCS gebrauchsfertig hergestellt werden. Der weitere Versuchsablauf ist in der schematischen Darstellung in Abbildung 3.1 skizziert.

#### **3.6.4 Modulation der Zellproliferation durch Kombination von VEGF und bFGF**

Die vorliegende Arbeit beinhaltete die zeitabhängige Beurteilung der RPE-Zellproliferation unter Einfluss der spezifischen Wachstumsfaktoren VEGF und bFGF. Dabei spielte im Rahmen mitogener Effekte auch ihr synergistisches Verhalten eine Rolle. Diesbezüglich sollte eine Aussage über die quantitative Zellproliferation durch Einsatz einer Kombination beider Faktoren getroffen werden. Nach Zellaussaat und Kultivierung für 24 Stunden erfolgte ein Austausch von 2 % FCS durch insulinfreies und 0,1 % FCS-haltiges Medium, wie bereits in den Kapiteln 3.6.2 und 3.6.3 beschrieben. Im kombinierten Einsatz beider Faktoren wurden die bereits erwähnten Konzentrationen der Substanzen unverändert angewendet. Nach Addition von 5 ng/ml VEGF<sub>121</sub> pro Well wurde 1 ng/ml bFGF zusätzlich

appliziert, allerdings mit einer zeitlichen Verzögerung von zwei Stunden. Die Inkubationszeiten wurden erst nach bFGF-Zugabe gemessen. Das methodische Vorgehen ist in Abbildung 3.1 dargestellt.

Bei Vorversuchen an bovinen RPE-Zellen wurde bei gleichem Versuchsaufbau eine Konzentrationserhöhung beider Wachstumsfaktoren initiiert. Nach Applikation der doppelten Konzentration VEGF<sub>121</sub> (10 ng/ml), der fünffachen Konzentration bFGF (5 ng/ml) sowie der zeitverzögerten Kombination von VEGF<sub>121</sub> (10 ng/ml) und bFGF (5 ng/ml, Zusatzung zwei Stunden später) konnten nach 72 sowie 144 Stunden Inkubation und wiederholter Zellzählung mittels Hämocytometer keine erhöhten Proliferationsraten im Vergleich zur Ausgangskonzentration der Wachstumsfaktoren errechnet werden. In Folge wurden alle Arbeitsschritte auf die Konzentration von 5 ng/ml VEGF<sub>121</sub> und 1 ng/ml bFGF für humanes Zellgewebe festgesetzt.

## Proliferationsmodulation durch VEGF, bFGF und deren Kombination

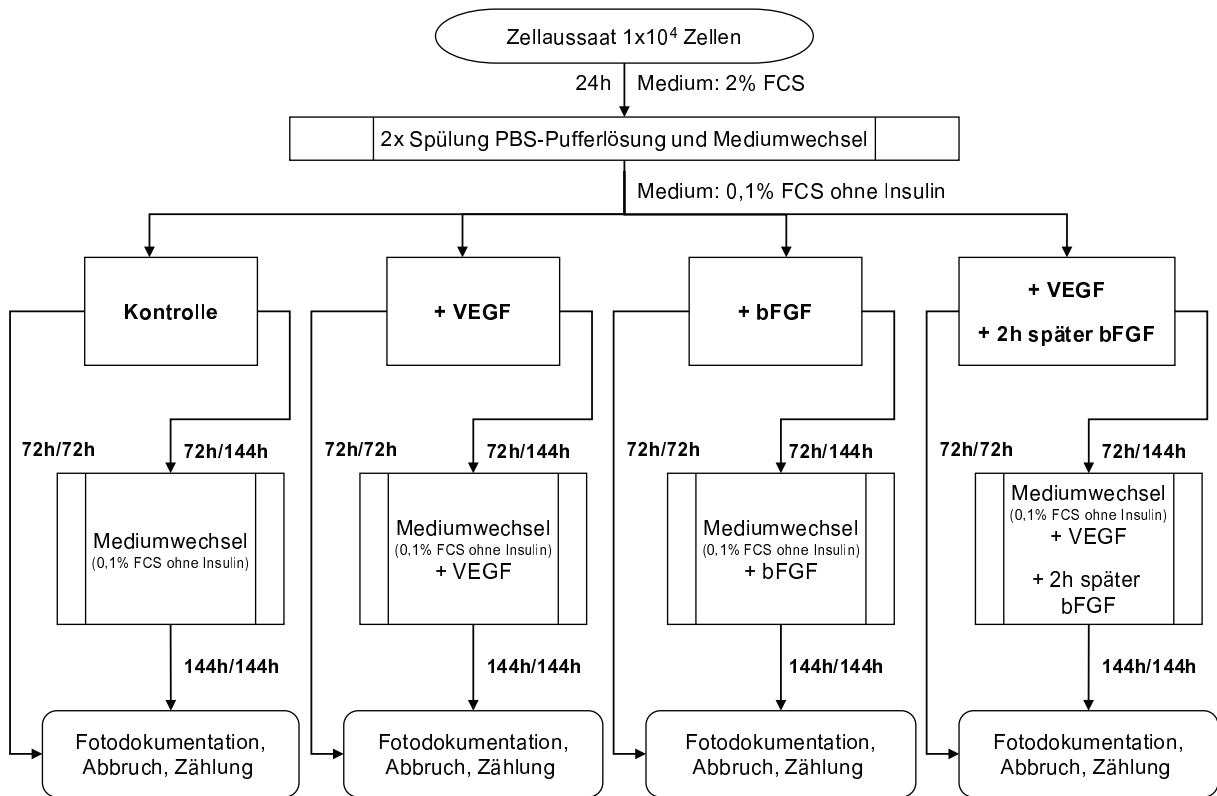


Abbildung 3.1: Schema für den Versuchsansatz: Proliferation unter VEGF (5 ng/ml), bFGF(1 ng/ml) und deren Kombination

## 3.7 Modulation der Zellproliferation durch die selektiven Rezeptorblocker SU5416 und SU5402

### 3.7.1 Der VEGF-Rezeptor-2-Kinaseinhibitor III (SU5416)

Nach der chemischen Nomenklatur lautet die exakte Bezeichnung für den VEGF-Rezeptor-2-Kinaseinhibitor SU5416 3-[(2,4-Dimethylpyrrol-5-yl)methylidene]-indolin-2-one.

Die VEGF- und bFGF-induzierten proliferationsmodulierenden Effekte wurden unter dem Einfluss von SU5416 zeitabhängig getestet. SU5416 gilt als ein synthetisch hergestelltes und zellpermeables Molekül. Es blockiert selektiv durch Konkurrenz mit ATP die Tyrosinkinase des VEGF-Rezeptors-2 und PDGF-Rezeptors.

Hierzu musste das Kulturmedium 24 Stunden nach Aussaat abpipettiert, mit PBS-Pufferlösung zweimalig gespült und mit komplettiertem Kulturmedium ohne Insulin und 0,1 % FCS aufgefüllt werden. Der Testansatz mit 1 ml Kulturmedium wurde anschließend mit 1  $\mu$ l SU5416 (247,52 ng/ $\mu$ l, Merck Bioscience, Darmstadt, Deutschland) pro Well versetzt. Zuvor fand die Lösung von 1 mg der Wirksubstanz SU5416 in 4 ml DMSO (Dimethylsulfoxide, Merck Bioscience, Darmstadt, Deutschland) statt. Dessen Entfernung erfolgte nach vier Stunden Inkubation über einen Mediumwechsel und eine Wellfüllung mit jeweils 1 ml komplettiertem Medium (inklusive 0,1 % FCS ohne Insulinzusatz). Analog zu den bereits beschriebenen Versuchsansätzen schloss sich die Applikation von jeweils VEGF, bFGF sowie deren Kombination entsprechend angegebener Konzentrationen an. Der Versuchsansatz endete erstmalig nach 72 Stunden mit Fotodokumentation und Zellzählung. Für die 144 Stunden Inkubationszeit wurden ein Mediumwechsel nach 72 Stunden und die wiederholte Applikation aller oben beschriebenen Substanzen durchgeführt. Der Versuch wurde nach 144 Stunden ebenso mit Fotodokumentation und Zellzählung beendet. Die schematische Darstellung bietet eine detaillierte Auflistung aller durchgeführten Versuchsreihen (siehe Abbildung 3.2).

## Proliferationsmodulation durch VEGF, bFGF und deren Kombination unter Zugabe von SU5416

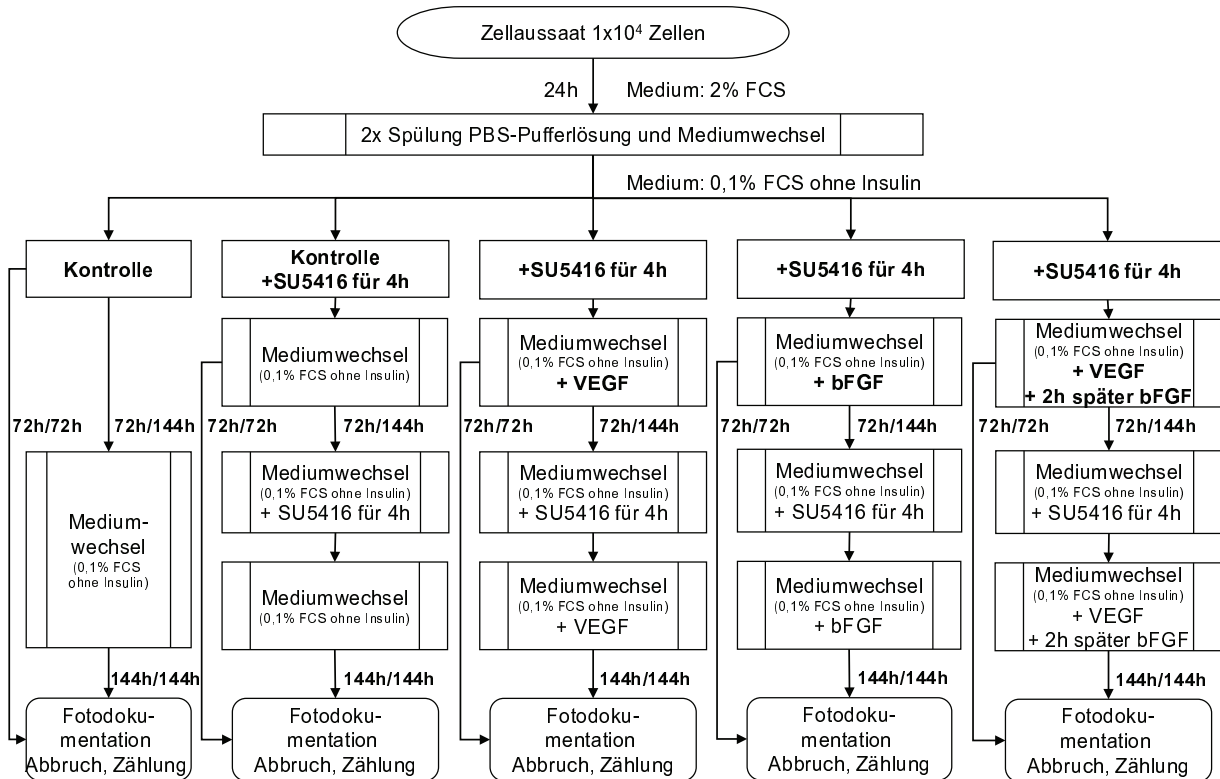


Abbildung 3.2: Schema für den Versuchsansatz: Proliferation unter VEGF (5 ng/ml), bFGF (1 ng/ml) und deren Kombination nach Zusatz von SU5416 (247,52 ng/ $\mu$ l)

### 3.7.2 Der FGF-Rezeptor-1-Kinaseinhibitor (SU5402)

Nach der chemischen Nomenklatur lautet die exakte Bezeichnung für den FGF-Rezeptor-1-Kinaseinhibitor SU5402 3-[3-(2-Carboxyethyl)-4-methylpyrrol-2-methylidenyl]-2-indolinone.

SU5402 ist ein synthetisierter und spezifischer Tyrosinkinaseinhibitor des FGF-Rezeptors-1. Als Kinaseantagonist konkurriert er wie SU5416 um die intrazelluläre ATP-Bindungsdomäne und inhibiert die Autophosphorylierung des FGF-Rezeptors-1. Die proliferationsmodulierenden Effekte von SU5402 auf die VEGF- und/oder bFGF-induzierten Proliferationsstimulationen wurden zeitabhängig untersucht.

Kapitel 3.7.1 erläuterte bereits die Inkubation mit dem selektiven VEGF-Rezeptor-2-Inhibitor. Beim Einsatz von SU5402 wurde ein adäquater Versuchsaufbau mit stabiler Wirkkonzentration aller anderen eingesetzten Supplemente gewählt. Somit schloss sich dem 24 Stunden nach Zellaussaat durchgeführten Mediumwechsel mit komplettiertem Kulturmedium, 0,1 % FCS und Insulinverzicht, eine vierstündige Inkubation mit SU5402 an. Dazu wurden die Zellen mit jeweils 1  $\mu\text{l}$  SU5402 pro Well (5  $\mu\text{g}/\text{ml} \hat{=} 20 \mu\text{M}/\mu\text{l}$  Merck Bioscience, Darmstadt, Deutschland) versetzt. Der Inhibitor wurde vor seinem Einsatz mit 500  $\mu\text{g}$  in 100  $\mu\text{l}$  DMSO gelöst. Es folgte die Entfernung des Rezeptorblockers mittels Mediumwechsel und Behandlung der Zellen mit jeweils VEGF, bFGF und deren Kombination. Die komplettierten Testsubstanzen inkubierten erneut für jeweils 72 und 144 Stunden. Die Details sind der Abbildung 3.3 zu entnehmen.

## Proliferationsmodulation durch VEGF, bFGF und deren Kombination unter Zugabe von SU5402

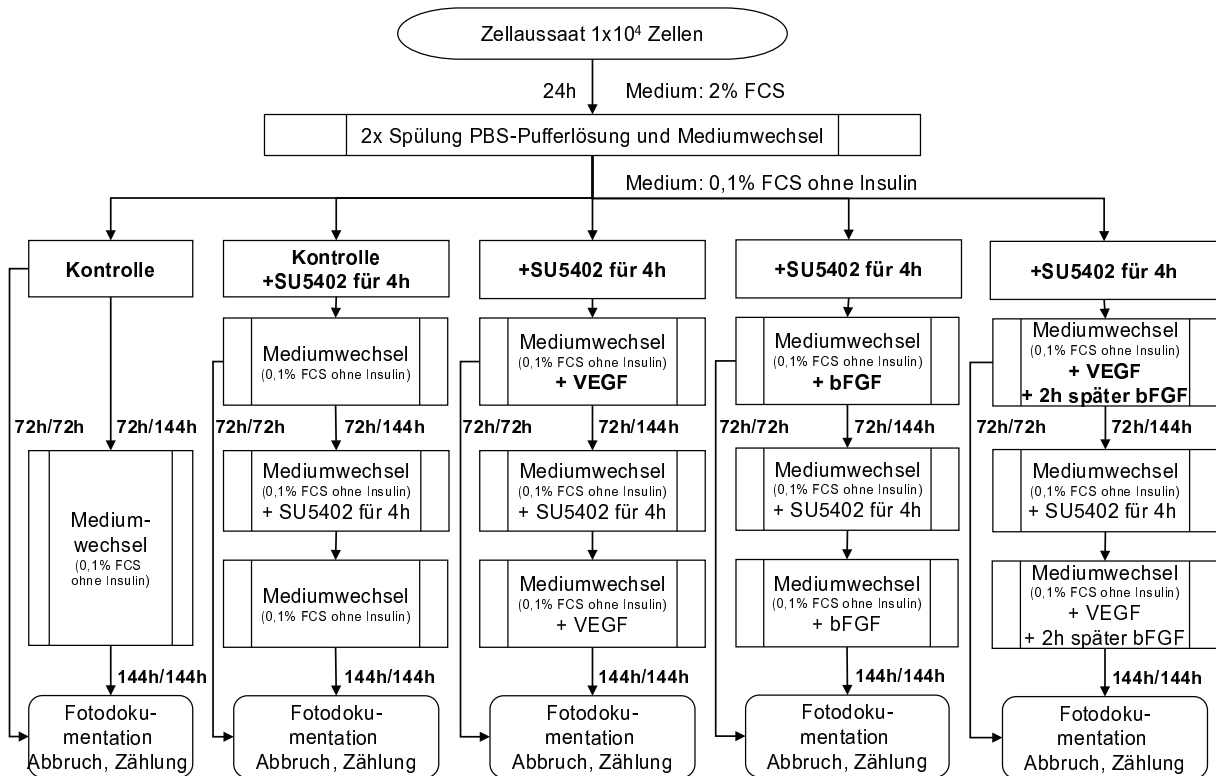


Abbildung 3.3: Schema für den Versuchsansatz: Proliferation unter VEGF (5 ng/ml), bFGF (1 ng/ml) und deren Kombination nach Zusatz von SU5402 (5  $\mu\text{g/ml} \hat{=} 20 \mu\text{M}/\mu\text{l}$ )



### 3.7.3 Kombinierte Wirkungsmodulation durch SU5416 und SU5402

Um eine Einschätzung hinsichtlich einer zeitabhängigen, konzentrationsstabilen Proliferationsmodulation durch den gemeinsamen Einsatz von SU5416 und SU5402 geben zu können, wurde grundsätzlich auf die gleichen Arbeitsschritte zurückgegriffen, die in den Kapiteln 3.7.1 und 3.7.2 dargelegt sind. Eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse sollte damit gewährleistet werden.

24 Stunden nach Zellaussaat wurde ein Mediumwechsel mit 0,1 % FCS und Insulinverzicht durchgeführt. Es folgte die Zellversorgung mit jeweils 1  $\mu\text{l}$  SU5416 (247,52 ng/ $\mu\text{l}$ ) und zwei Stunden später zusätzlich mit jeweils 1  $\mu\text{l}$  SU5402 (5  $\mu\text{g}/\text{ml} \hat{=} 20 \mu\text{M}/\mu\text{l}$ ) pro Well. Ein Mediumwechsel wiederholte sich nach vier Stunden Inkubationszeit mit nachfolgender Supplementierung der genannten Wachstumsfaktoren bei analogen Konzentrationen. Beim kombinierten Einsatz von VEGF und bFGF musste wiederholt die zeitverzögerte Applikation des bFGFs berücksichtigt werden. Die Inkubationszeiten von 72 und 144 Stunden wurden ebenso eingehalten. Die Abbildung 3.4 dokumentiert die Versuchsreihen.

## Proliferationsmodulation durch VEGF, bFGF und deren Kombination unter Zugabe von SU5416 und SU5402

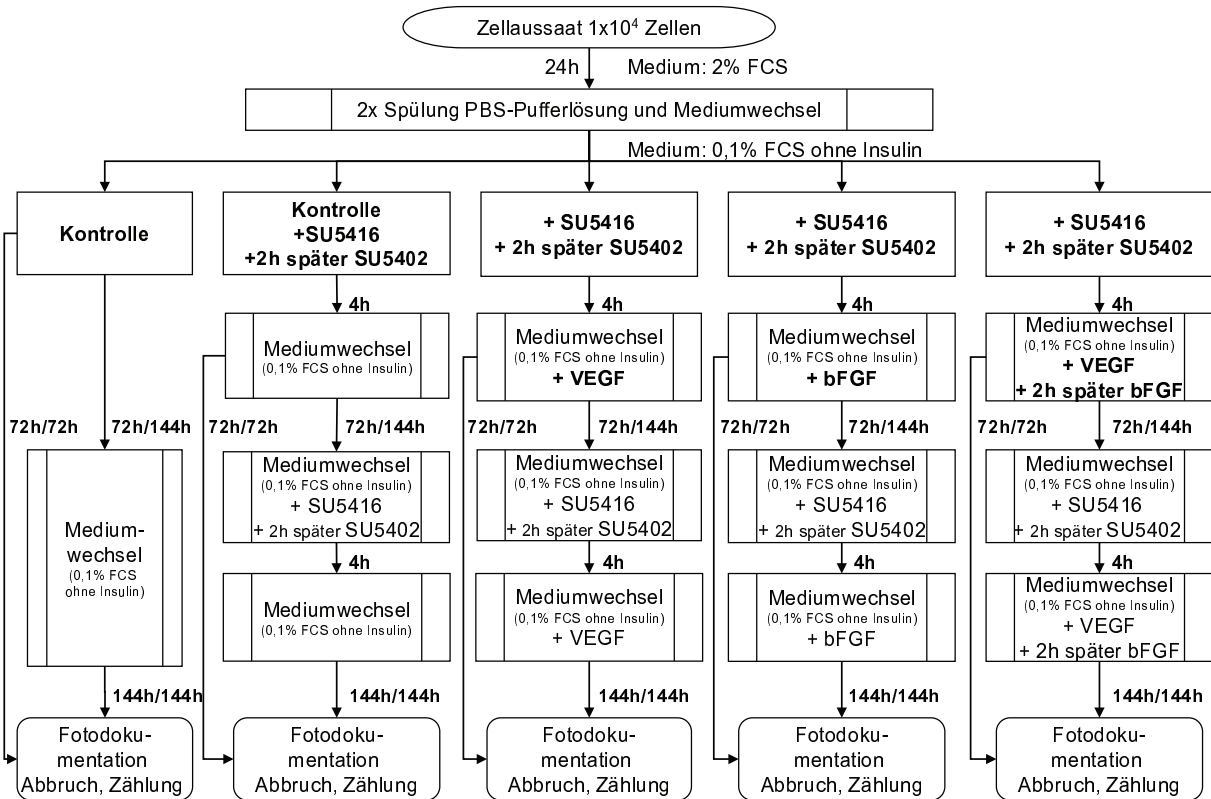


Abbildung 3.4: Schema für den Versuchsansatz: Proliferation unter VEGF (5 ng/ml), bFGF (1 ng/ml) und deren Kombination nach Zusatz von SU5416 (247,52 ng/μl) und SU5402 (5 μg/ml  $\hat{=}$  20 μM/μl)

### 3.8 Statistische Auswertung

Aus mindestens zwei separaten Versuchsreihen pro Versuchsansatz, d. h. unterschiedlichen Zelllinien, erfolgte, je nach Verfügbarkeit des humanen Spendermaterials, jeweils mindestens zwei mal, höchstens sechs mal die Zellkultivierung pro Testsubstanz und Kontrolle. Über die Zellauszählung pro Loch wurden daraus der Mittelwert sowie die Standardabweichung (SD) ermittelt. Da maximal vier separate Versuchsreihen durchgeführt wurden, betrug der nach dem Studienplan höchstmögliche Stichprobenumfang  $n=24$  für jeden Versuchsansatz. Die tatsächlich resultierenden Stichprobenumfänge für die verschiedenen Versuchsansätze differieren jedoch, da nach Versuchsabbruch (vor Zellzählung) eine Vitalitätskontrolle mittels Trypanblau-Test erfolgte und es dadurch zur Reduktion des verwertbaren Materials kam (siehe Kapitel 3.6.1).

Da sämtliche Versuchsreihen der vier Versuchsansätze unabhängig voneinander waren, kam für die statistische Analyse der  $t$ -Test für zwei unabhängige Stichproben zur Anwendung. Es sollte die Nullhypothese  $H_0 : \mu_x = \mu_y$  gegen die zweiseitige Alternative, Wachstum bzw. Regredienz,  $H_1 : \mu_x \neq \mu_y$  getestet werden. Dazu wurden anhand der Mittelwerte und den Varianzen, d. h. die Quadrate der Standardabweichung, der zu vergleichenden Stichproben die Prüfgröße  $t$  und der  $p$ -Wert für das Signifikanzniveau 5 % berechnet. Die Nullhypothese wurde verworfen, wenn der  $p$ -Wert  $< 0,05$  war. Die Signifikanzniveaus wurden bei  $p < 0,05$  als signifikant<sup>(\*)</sup>, bei  $p < 0,01$  als hoch signifikant<sup>(\*\*)</sup> und bei  $p < 0,001$  als äußerst signifikant<sup>(\*\*\*)</sup> klassifiziert.

Um einen selektiven direkten Vergleich zwischen den vier Versuchsansätzen zu ermöglichen, wurden die Kontrollen dieser Ansätze (Zellproliferation unbehandelter Zellgruppen nach 72 Stunden) sowie deren Standardabweichungen gemittelt und dadurch ein, für jeden Ansatz spezifischer Korrekturfaktor errechnet. Anschließend erfolgte die statistische Analyse ebenfalls zunächst mit dem  $t$ -Test.

Da es sich bei dieser selektiven Gegenüberstellung des korrigierten absoluten Wachstums um einen multiplen Test handelt, wurde zusätzlich die Bonferroni-Korrektur verwendet. Hierbei wurde entsprechend der Anzahl der durchzuführenden Tests ein neues Signifikanzniveau  $\alpha^*$  entsprechend der Formel  $\alpha^* = \frac{\text{Signifikanzniveau } \alpha}{\text{Anzahl der Tests}}$  berechnet. Da al-

le Analysen jeweils drei Vergleiche beinhalteten, betrug das neue Signifikanzniveau  $\alpha^*$  für alle Vergleiche 0,0167. Somit wurden alle mit dem  $t$ -Test ermittelten  $p$ -Werte einer erneuten Prüfung unterzogen.

Microsoft® Excel 2000 diente zur Berechnung o. g. Prüfgrößen und Erstellung der Diagramme. Die dem  $t$ -Test zu Grunde liegende Formel wurde in Microsoft Excel hinterlegt und die zu vergleichenden Werte für jeden Vergleich manuell editiert. Die Auswahl des  $t$ -Tests und der Bonferroni-Korrektur als statistische Verfahren erfolgte mit Hilfe des statistischen Büros Dr. U. Gauger.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Stimulierung der Zellproliferation

#### 4.1.1 Berechnungsgrundlage

Die Berechnung der relativen Zellproliferation unter Zugabe der Wachstumsfaktoren basierte auf folgender Grundlage:

Die Zellproliferation unbehandelter Zellen nach 72 Stunden diene als Kontrollgruppe (siehe Abbildung 3.1). Für die Berechnung aller relativen Werte wurde sie als Bezugsgröße (100 %) festgesetzt.

Zum Ausschluss durch das Kulturgrundmedium bzw. die Reaktionsbedingungen bedingter Störfaktoren erfolgte nach 144 Stunden zusätzlich die erneute Bestimmung der Zellproliferation in der Gruppe der unbehandelten Zellen. Diese wurde jedoch nicht in die Berechnungen des relativen Wachstums einbezogen.

#### 4.1.2 Zeitabhängiger Einfluss von VEGF und bFGF auf die Zellproliferation

Tabelle 4.1 zeigt das durchschnittliche absolute Wachstum der Kontrollen und Versuchsreihen, deren Standardabweichungen und Stichprobenumfänge sowie ggf. bestehende Signifikanzen ( $p$ -Wert nach  $t$ -Test für ungepaarte Stichproben). Dem Diagramm 4.1 ist die relative Zellproliferation nach 72 und 144 Stunden zu entnehmen. Das Diagramm 4.2 dokumentiert hingegen das mittlere absolute Zellwachstum  $\pm$  einfache Standardabweichung in Form von Fehlerbalken.

Bei den unbehandelten Zellen der Kontrolle war nach 144 Stunden ein stabiler Zellwert (108 % Zellproliferation) ohne Nachweis einer statistischen Signifikanz ( $p = 0,162$ ) zu verzeichnen.

Eine 72-stündige Inkubationszeit mit VEGF (5 ng/ml) zeigte mit einer Zellproliferation von 108 % einen analogen Effekt im Vergleich zur unbehandelten Zellgruppe ohne eine signifikante quantitative Auswirkung ( $p = 0,182$ ) auf die Zellproliferation. Nach 144 Stunden setzte eine zeitverzögerte Wirkung ein. Die Steigerung der Zellproliferation auf 199 % war äußerst signifikant ( $p < 0,001$ ).

BFGF (1 ng/ml) hingegen induzierte bereits nach 72 Stunden gegenüber der Kontrolle eine äußerst signifikante Proliferationssteigerung auf 147 % ( $p < 0,001$ ). Die Wachstumsstimulierung wurde nach 144 Stunden sogar auf 253 % Zellproliferation äußerst signifikant gesteigert ( $p < 0,001$ ).

Die kombinierte Anwendung beider Wachstumsfaktoren (VEGF 5 ng/ml und bFGF 1 ng/ml) bewirkte eine äußerst signifikante Zunahme der Proliferation bereits nach 72 Stunden auf 190 % ( $p < 0,001$ ). Ein vergleichbarer proliferationsstimulierender Effekt fand sich in der VEGF-Gruppe, allerdings zeitverzögert nach 144 Stunden Versuchsdauer. Eine 144-stündige Inkubation wies insgesamt die deutlichste Proliferationssteigerung mit einer äußersten Signifikanz auf (313 %,  $p < 0,001$ ).

Durch die Supplementierung der Wachstumsfaktoren konnte neben der Proliferationsstimulation lichtmikroskopisch auch eine morphologische Beeinflussung an RPE-Zellen beobachtet werden, die nach verlängerter Versuchsdauer eine Progredienz aufwies.

Die Zugabe von bFGF förderte eine Formänderung vom polygonalen bis hin zu einem spindelförmigen Zelltyp mit Verlust der epithelialen Morphologie (in Abbildung 4.1 mit Pfeilen gekennzeichnet). Weiterhin wurde eine Reduktion des zytoplasmatischen Melaningehalts erkennbar. Die Zellproliferationsstimulierung, vorzugsweise bei der Anwendung von bFGF und dem kombinierten Einsatz beider Wachstumsfaktoren, spiegelte sich in der ausgeprägten Zelldichte und Zusammenhalt der Zellen in Form eines konfluenten Zellrasens wider.

O. g. Morphologiemodifikationen waren nach VEGF-Applikation nur vereinzelt oder gar nicht detektierbar. Die kombinierte Anwendung beider Wachstumsfaktoren hingegen schien eine forcierte Induktion des beschriebenen Phänomens auszulösen. Die Abbildung 4.1 gibt fotodokumentiert die entsprechenden Veränderungen wieder.

## 4 Ergebnisse

Zeit	mittleres absolutes Wachstum x 10 <sup>4</sup> Zellen	SD <sup>(+)</sup>	n <sup>(++)</sup>	p-Wert <sup>(+++)</sup> : mittleres absolutes Wachstum zur Kontrolle nach	
				72h	144h
<b>Kontrollen</b>					
72h	0,773	0,114	16	-	-
144h	0,835	0,117	13	0,162	-
<b>VEGF</b>					
72h	0,836	0,142	15	0,182	-
144h	1,54	0,466	17	<0,001 (***)	<0,001 (***)
<b>bFGF</b>					
72h	1,14	0,3	19	<0,001 (***)	-
144h	1,956	0,403	19	<0,001 (***)	<0,001 (***)
<b>VEGF + bFGF</b>					
72h	1,473	0,286	20	<0,001 (***)	-
144h	2,417	0,492	20	<0,001 (***)	<0,001 (***)
+ Standardabweichung der absoluten Proliferation					
++ Stichprobenumfang					
+++ p-Wert berechnet mit dem t-Test für ungepaarte Stichproben					
* p < 0,05 signifikant, ** p < 0,01 hoch signifikant, *** p < 0,001 äußerst signifikant					

Tabelle 4.1: Statistische Analyse der Wachstumsmodulation unter VEGF, bFGF und deren Kombination

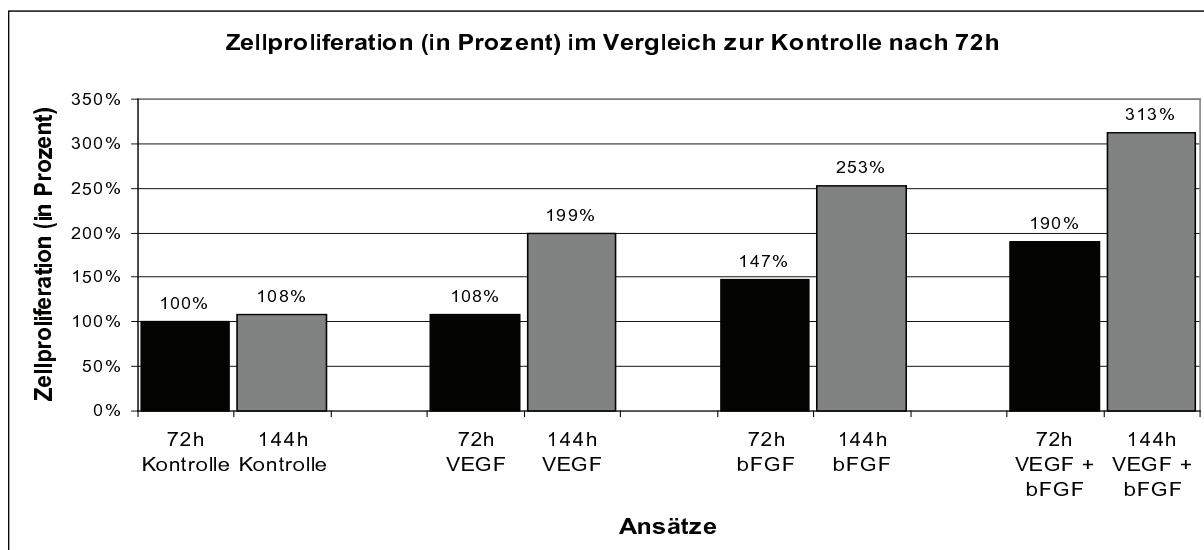


Diagramm 4.1: Zeitabhängige relative Wachstumsmodulation durch VEGF, bFGF und deren Kombination

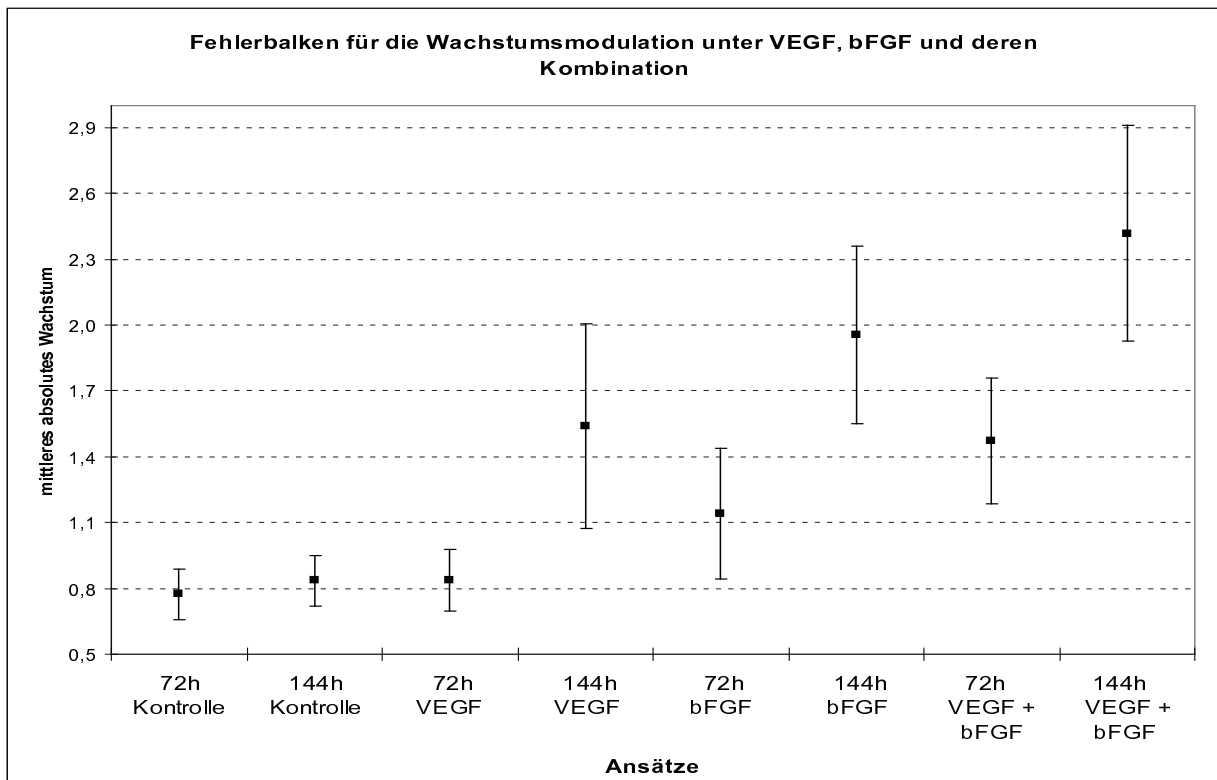


Diagramm 4.2: Fehlerbalken für die zeitabhängige absolute Wachstumsmodulation durch VEGF, bFGF und deren Kombination



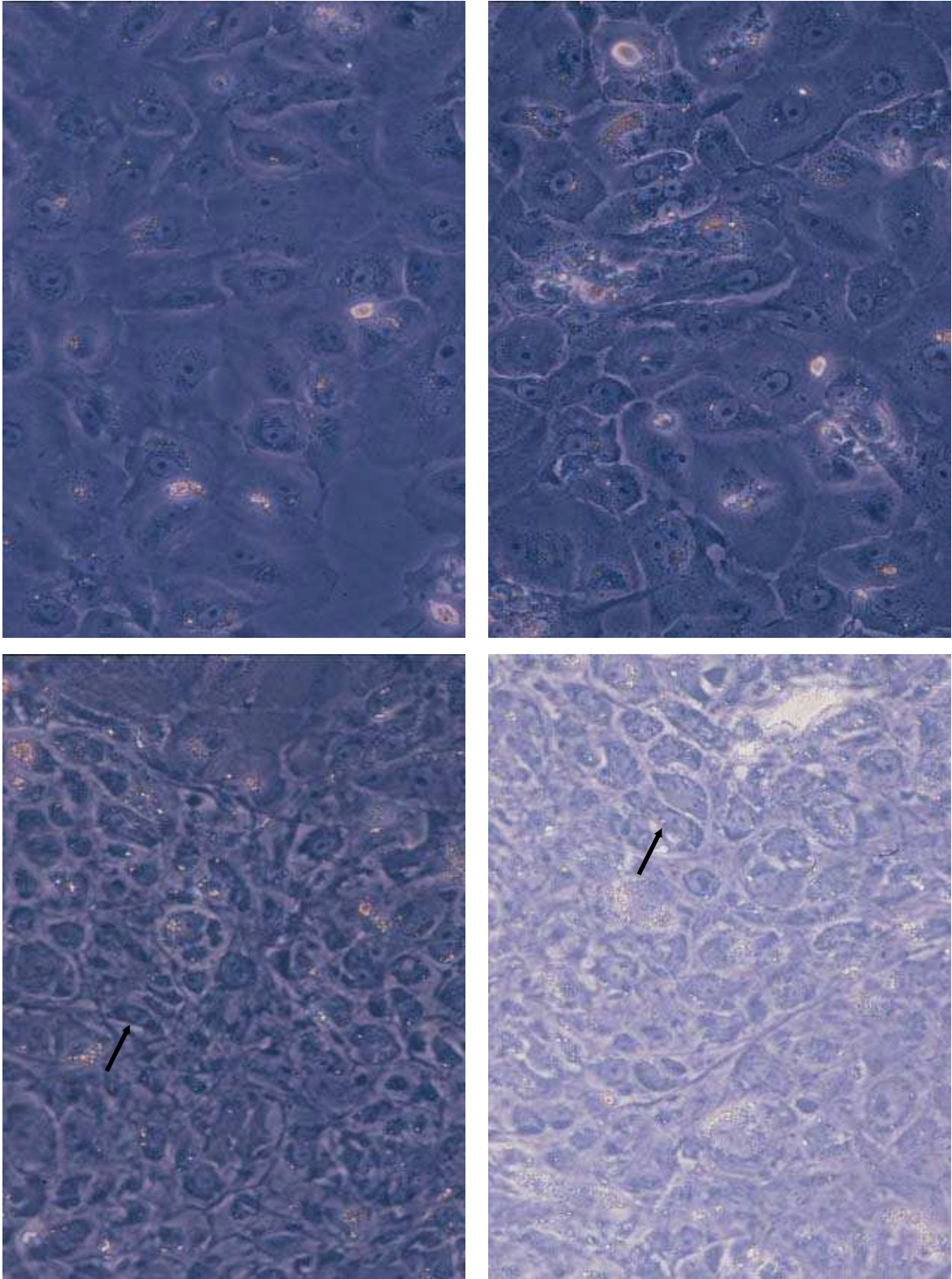


Abbildung 4.1: Morphologische Veränderungen nach 144 h Inkubation, 100-fache Vergrößerung

**oben links:** Kontrollgruppe, **oben rechts:** VEGF,  
**unten links:** bFGF, **unten rechts:** VEGF+bFGF

## 4.2 Inhibition der Zellproliferation

### 4.2.1 Berechnungsgrundlage

Die Ermittlung des relativen Wachstums erfolgte analog zu den Ausführungen für die Stimulation der Zellproliferation (siehe Kapitel 4.1.1).

Zum Ausschluss endogen bedingter Proliferationsmodifikationen kam in den jeweiligen Versuchsansätzen eine weitere Versuchsreihe zum Einsatz. Dabei erfolgte die Zugabe des entsprechenden Blockers (Applikation von SU5416, SU5402 und deren Kombination) auf eine unbehandelte Zellgruppe, d. h. ohne Zugabe von VEGF und/oder bFGF (siehe Abbildungen 3.2 bis 3.4).

### 4.2.2 Zeitabhängiger Einfluss von SU5416 auf die Zellproliferation

Tabelle 4.2 gibt die durchschnittlichen absoluten Wachstumswerte der jeweiligen Versuchsreihen nach 72 und 144 Stunden Inkubationszeit wieder. Weiterhin sind die entsprechenden Standardabweichungen, Stichprobenumfänge und ggf. Signifikanzen aufgeführt. Dem Diagramm 4.3 ist die relative Zellproliferation nach 72 und 144 Stunden zu entnehmen. Das mittlere absolute Zellwachstum  $\pm$  einfache Standardabweichung wird in Form von Fehlerbalken im Diagramm 4.4 erfasst.

In der Kontrollgruppe war nach 144 Stunden kein signifikanter proliferationsstimulierender Effekt sichtbar (98 %,  $p = 0,75$ ).

Ein ähnliche Beobachtung konnte bei den unbehandelten Zellen mit Zugabe von SU5416 gemacht werden. Es fand sich zeitabhängig weder nach 72 Stunden noch nach 144 Stunden eine signifikante Proliferationssteigerung (92 %/92 %,  $p = 0,397/p = 0,378$ ) im Vergleich zur Kontrolle.

Für die mit VEGF inkubierten Zellen war nach SU5416-Applikation ebenso keine Zellproliferationssteigerung sichtbar. Nach 72 Stunden lag die Proliferationsrate mit fehlender Signifikanz bei 94 % ( $p = 0,17$ ). Auch die Inkubation von 144 Stunden brachte keine signifikante Modifikation der Proliferationsrate (95 %,  $p = 0,237$ ). Der Zellwert stagnierte trotz verlängerter Kultivierung etwa auf Kontrollniveau.

Trotz Zugabe von SU5416 konnte bei mit bFGF kultivierten Zellen ein äußerst signifikanter proliferationsstimulierender Effekt nachgewiesen werden (144 % Zellproliferation nach 72 Stunden,  $p < 0,001$ ). Nach doppelter Inkubationszeit (144 Stunden) wurde die Proliferation äußerst signifikant auf 157 % angehoben ( $p < 0,001$ ).

Bei mit VEGF und bFGF (kombiniert) behandelten Zellen galten trotz SU5416-Applikation ebenso signifikante Zellproliferationsraten. Ein maximal stimulierender Effekt trat bereits nach 72 Stunden auf (164 % Zellproliferation), der nach doppelter Kultivierung auf 152 % leicht reduziert wurde. Beide Parameter zeigten mit  $p$ -Werten  $< 0,001$  äußerste Signifikanzen. Die Proliferationsstimulation nach 144 Stunden dieser Versuchsreihe war nahezu mit der, unter Inkubation mit bFGF und SU5416, identisch (152 % vs. 157 %).

Lichtmikroskopisch induzierte die applizierte Substanz SU5416 eine Veränderung der Zellmorphologie, die jedoch nur eine mäßige Ausprägung zeigte.

Bei der jeweils isolierten Supplementierung von VEGF und bFGF war das vermehrte Auftreten leicht vergrößerter RPE-Zellen auffallend (in Abbildung 4.2 mit Pfeilen gekennzeichnet). Der kombinierte Einsatz beider Wachstumsfaktoren ließ dieses Phänomen nicht erkennen. Der Melaniningehalt des Zytoplasmas zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe keine Regredienz, wie nach alleiniger Applikation der Wachstumsfaktoren in Abbildung 4.1 beobachtet werden konnte. Eine mit SU5416 assoziierte Proliferationsinhibierung der RPE-Zellen äußerte sich in einer deutlichen Zelldichtereduktion. Die Abbildung 4.2 verdeutlicht die genannten Veränderungen.

## 4 Ergebnisse

Zeit	mittleres absolutes Wachstum x 10 <sup>4</sup> Zellen	SD(+)	n(++)	p-Wert(+++): mittleres absolutes Wachstum zur Kontrolle nach	
				72h	144h
<b>Kontrollen</b>					
72h	0,967	0,109	4	-	-
144h	0,946	0,063	4	0,75	-
<b>Kontrollen + Blocker SU5416</b>					
72h	0,888	0,038	2	0,397	-
144h	0,885	0,114	5	0,378	0,401
<b>VEGF + Blocker SU5416</b>					
72h	0,908	0,041	9	0,17	-
144h	0,915	0,046	9	0,237	0,335
<b>bFGF + Blocker SU5416</b>					
72h	1,391	0,092	6	<0,001 (***)	-
144h	1,514	0,136	8	<0,001 (***)	<0,001 (***)
<b>VEGF + bFGF + Blocker SU5416</b>					
72h	1,586	0,23	9	<0,001 (***)	-
144h	1,467	0,131	9	<0,001 (***)	<0,001 (***)

+ Standardabweichung der absoluten Proliferation  
 ++ Stichprobenumfang  
 +++ p-Wert berechnet mit dem t-Test für ungepaarte Stichproben  
 \* p < 0,05 signifikant, \*\* p < 0,01 hoch signifikant, \*\*\* p < 0,001 äußerst signifikant

Tabelle 4.2: Statistische Analyse der Wachstumsmodulation unter VEGF, bFGF und deren Kombination nach Zusatz von SU5416

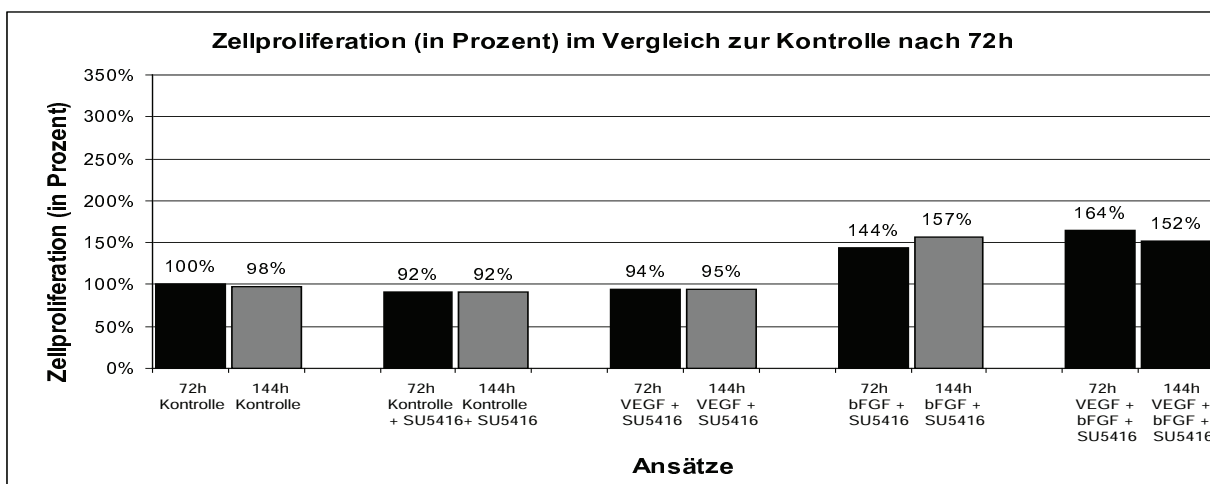


Diagramm 4.3: Zeitabhängige relative Wachstumsmodulation unter VEGF, bFGF und deren Kombination nach Zusatz von SU5416

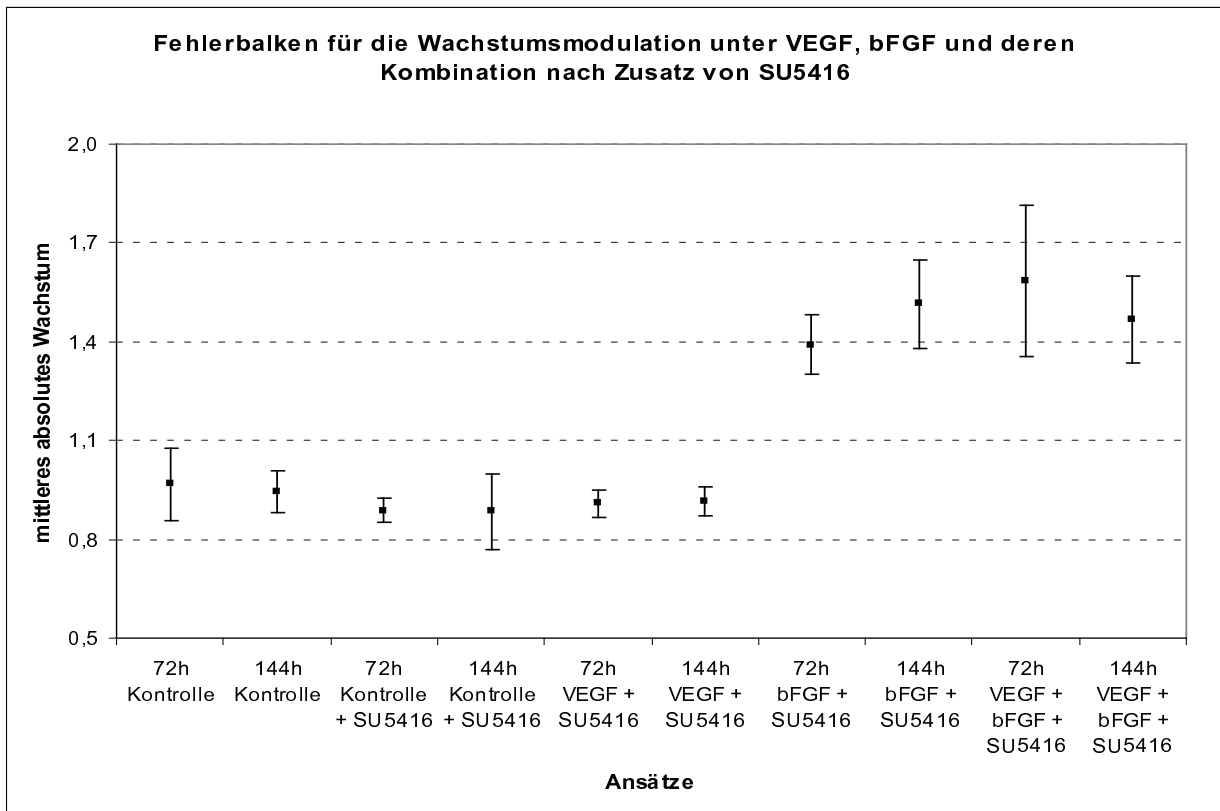


Diagramm 4.4: Fehlerbalken für die zeitabhängige absolute Wachstumsmodulation unter VEGF, bFGF und deren Kombination nach Zusatz von SU5416

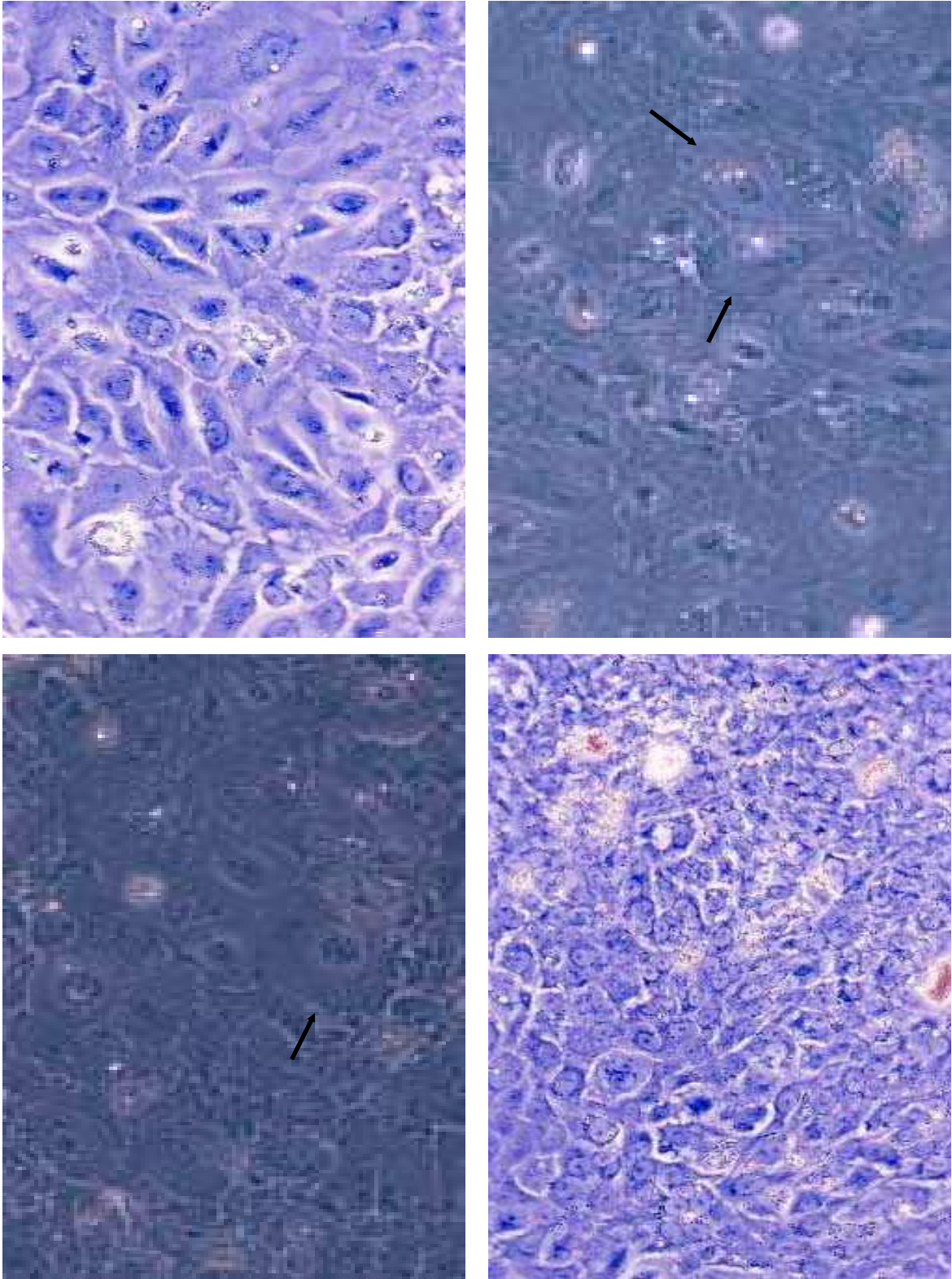


Abbildung 4.2: Morphologische Veränderungen nach 144 h Inkubation mit SU5416, 100-fache Vergrößerung

**oben links:** Kontrollgruppe, **oben rechts:** SU5416+VEGF,

**unten links:** SU5416+bFGF, **unten rechts:** SU5416+VEGF+bFGF

### 4.2.3 Zeitabhängiger Einfluss von SU5402 auf die Zellproliferation

Tabelle 4.3 und Diagramm 4.5 stellen das durchschnittliche absolute und relative Wachstum, die Standardabweichungen, Stichprobenumfänge und ggf. Signifikanzen tabellarisch und graphisch dar. Diagramm 4.6 erfasst hingegen das mittlere absolute Zellwachstum  $\pm$  einfache Standardabweichung in Form von Fehlerbalken.

Bei der Kontrollgruppe war nach 144 Stunden keine signifikante Zellproliferation sichtbar (104 %,  $p = 0,688$ ).

Für die Versuchsreihe der unbehandelten Zellen (ohne Wachstumsfaktoren) mit Zugabe von SU5402 bestand nach 72 und 144 Stunden Versuchsdauer kein signifikanter proliferationssteigernder Effekt (101 %,  $p = 0,895$  und 102 %,  $p = 0,786$ ).

Nach Applikation von SU5402 zeigte sich bei durch VEGF stimulierten Zellen nach 72 Stunden eine nicht signifikante Proliferationsrate von 101 % ( $p = 0,878$ ). Im Vergleich hierzu betrug die Zuwachsrate unter alleiniger VEGF-Applikation 108 % ( $p = 0,182$ , siehe Tabelle 4.1 und Diagramm 4.1). Zeitverzögert konnte nach doppelter Kultivierungszeit (144 Stunden) eine hoch signifikante Proliferation auf 133 % ( $p < 0,01$ ) verzeichnet werden.

Mit bFGF kultivierte Zellen reagierten trotz Zugabe des spezifischen Inhibitors (SU5402) mit einer hoch signifikanten Steigerung der Zellproliferation in Bezug auf eine 72-stündige Inkubationszeit (119 %,  $p < 0,01$ ). Nach der doppelten Zeit ließ sich eine weitere Proliferationszunahme mit äußerster Signifikanz (126 %,  $p < 0,001$ ) erkennen. Nach SU5402-Applikation fand sich bei jeweils mit VEGF und bFGF stimulierten Zellen nach 144 Inkubationszeit eine ähnliche Proliferationsrate (133 %/126 %).

Mit VEGF und bFGF in Kombination inkubierte Zellen zeigten trotz Anwendung von SU5402 eine Proliferationsstimulierung. Nach 72 Stunden wurde eine äußerst signifikante Zunahme auf 143 % ( $p < 0,001$ ) gegenüber des Kontrollniveaus sichtbar. Die verlängerte Versuchsdauer von 144 Stunden konnte mit einer Proliferation von 149 % ( $p < 0,001$ ) keine gravierende Steigerung erzielen (143 % vs. 149 %,  $p < 0,001$  vs.  $p < 0,001$ ).

Morphologische Zellmodifikationen konnten nach Zugabe von SU5402 detektiert werden. Diese waren annähernd mit denen nach SU5416-Applikation vergleichbar.

Die verstärkte Herabsetzung des Zellproliferationsniveaus im Vergleich zur Anwendung mit SU5416 wurde in einer aufgelockerten Zellstruktur mit partiellem Verlust des Zellzusammenhalts deutlich. Teilweise verloren Zellkörper ihre polygonale Ausgangsform und entwickelten langgestreckte spindelförmige Phänotypen mit zarten Zytoplasmaausläufen (in Abbildung 4.3 mit Pfeilen gekennzeichnet). Diese phänotypische Modifizierung betraf vorrangig isoliert mit VEGF sowie bFGF behandelte RPE-Zellen. Die Abbildung 4.3 gibt o. g. Veränderungen fotodokumentiert wieder.



Zeit	mittleres absolutes Wachstum x 10 <sup>4</sup> Zellen	SD <sup>(+)</sup>	n <sup>(++)</sup>	p-Wert <sup>(+++)</sup> : mittleres absolutes Wachstum zur Kontrolle nach	
				72h	144h
<b>Kontrollen</b>					
72h	0,963	0,144	6	-	-
144h	0,998	0,093	6	0,688	-
<b>Kontrollen + Blocker SU5402</b>					
72h	0,972	0,075	6	0,895	-
144h	0,981	0,07	6	0,786	0,728
<b>VEGF + Blocker SU5402</b>					
72h	0,975	0,097	5	0,878	-
144h	1,279	0,12	6	<0,01 <sup>(**)</sup>	<0,01 <sup>(**)</sup>
<b>bFGF + Blocker SU5402</b>					
72h	1,144	0,066	8	<0,01 <sup>(**)</sup>	-
144h	1,216	0,102	10	<0,001 <sup>(***)</sup>	<0,001 <sup>(***)</sup>
<b>VEGF + bFGF + Blocker SU5402</b>					
72h	1,375	0,119	9	<0,001 <sup>(***)</sup>	-
144h	1,439	0,108	9	<0,001 <sup>(***)</sup>	<0,001 <sup>(***)</sup>
<sup>+</sup> Standardabweichung der absoluten Proliferation <sup>++</sup> Stichprobenumfang <sup>+++</sup> p-Wert berechnet mit dem t-Test für ungepaarte Stichproben * p < 0,05 signifikant, ** p < 0,01 hoch signifikant, *** p < 0,001 äußerst signifikant					

Tabelle 4.3: Statistische Analyse der Wachstumsmodulation unter VEGF, bFGF und deren Kombination nach Zusatz von SU5402

## 4 Ergebnisse

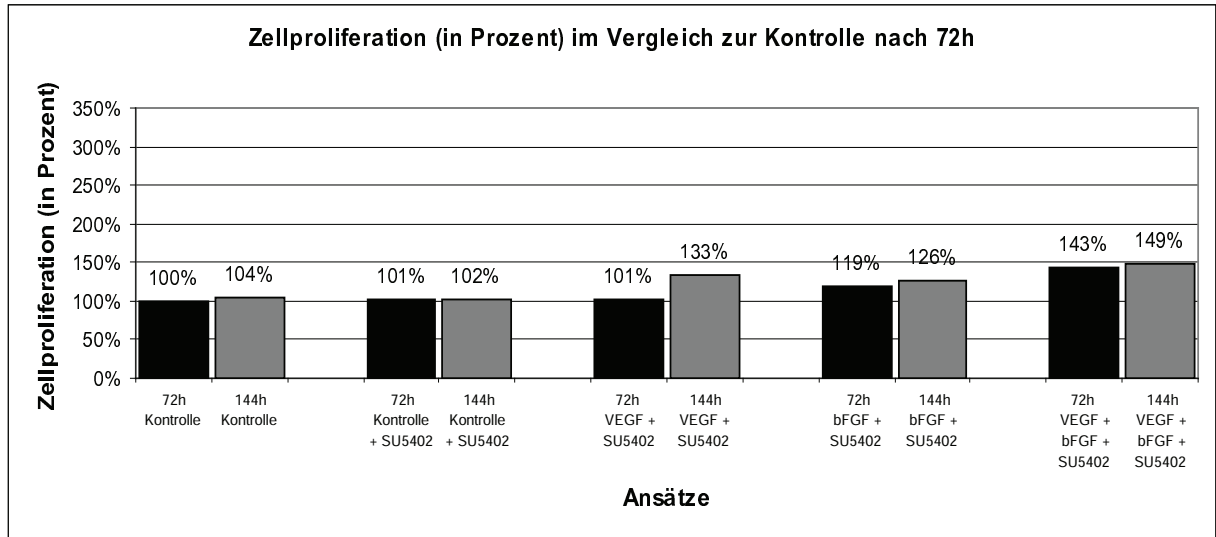


Diagramm 4.5: Zeitabhängige relative Wachstumsmodulation unter VEGF, bFGF und deren Kombination nach Zusatz von SU5402

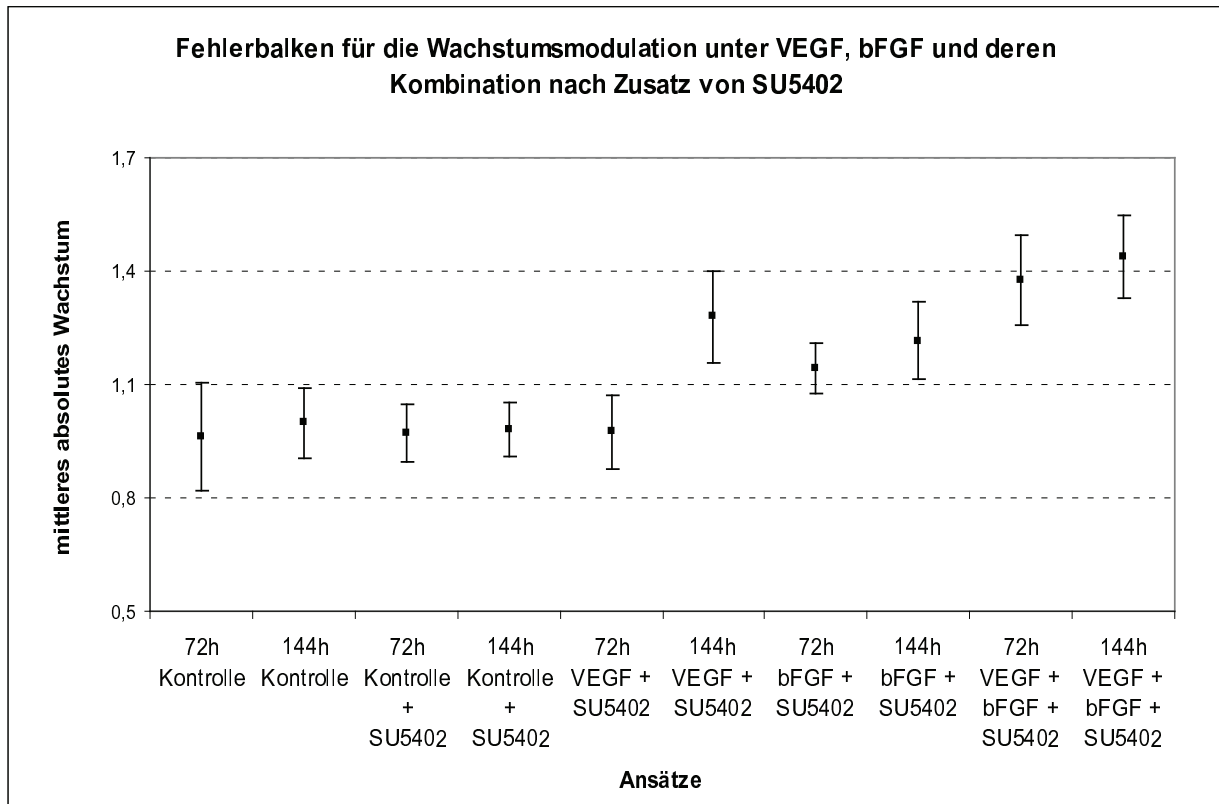


Diagramm 4.6: Fehlerbalken für die zeitabhängige absolute Wachstumsmodulation unter VEGF, bFGF und deren Kombination nach Zusatz von SU5402

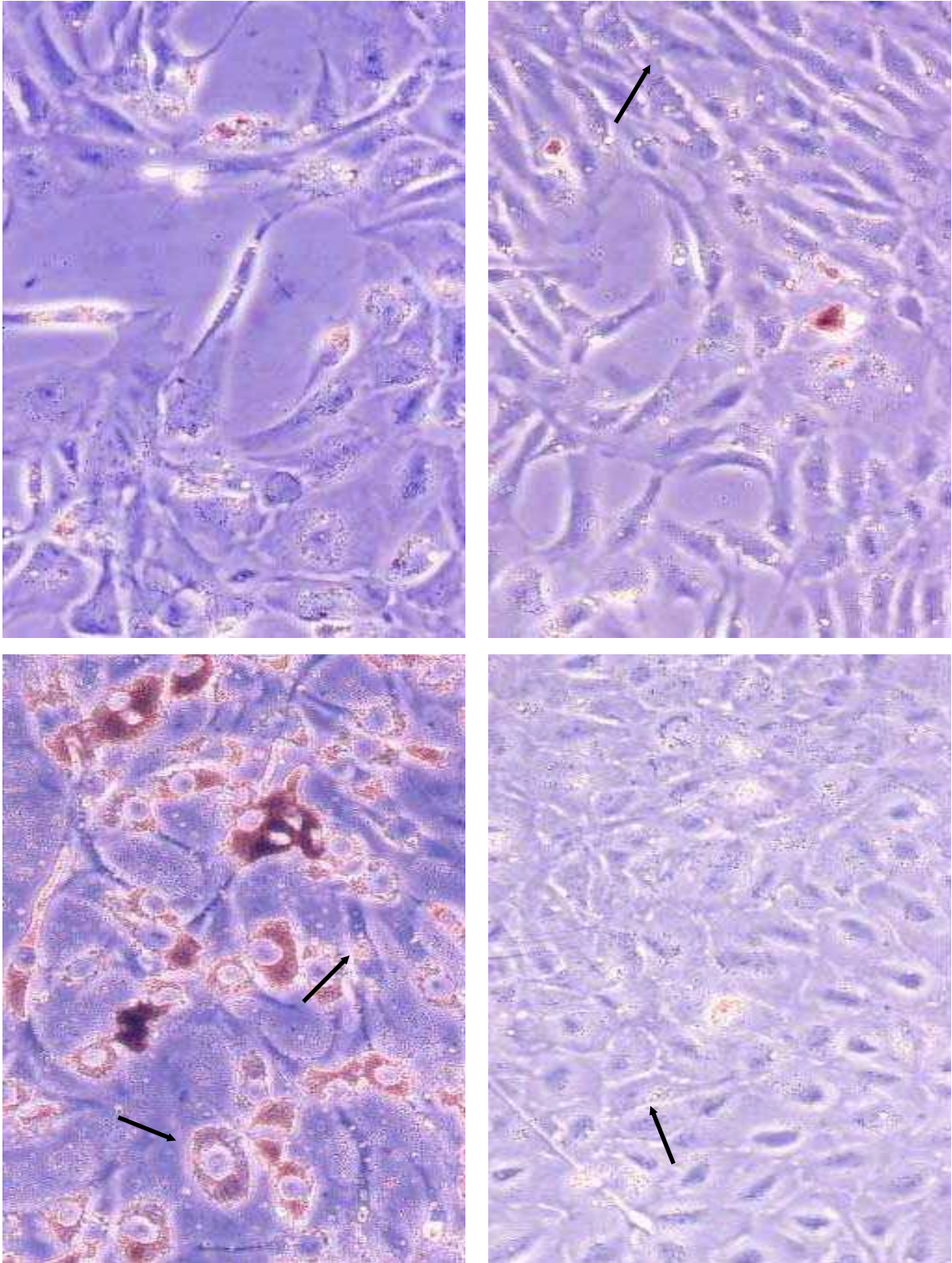


Abbildung 4.3: Morphologische Veränderungen nach 144 h Inkubation mit SU5402, 100-fache Vergrößerung

**oben links:** Kontrollgruppe, **oben rechts:** SU5402+VEGF,  
**unten links:** SU5402+bFGF **unten rechts:** SU5402+VEGF+bFGF

### 4.2.4 Zeitabhängiger Einfluss der Kombination von SU5416 und SU5402 auf die Zellproliferation

Tabelle 4.4 und Diagramm 4.7 fassen die entsprechenden durchschnittlichen absoluten und relativen Werte, Standardabweichungen, Stichprobenumfänge sowie ggf. Signifikanzen zusammen. Das mittlere absolute Zellwachstum  $\pm$  einfache Standardabweichung wird graphisch in Diagramm 4.8 illustriert.

Die RPE-Zellen der Kontrollgruppe zeigten nach 144-stündiger Versuchsdauer keine signifikante Proliferation (98 %,  $p = 0,762$ ).

Bei der Versuchsreihe unbehandelter Zellen (ohne Wachstumsfaktoren) mit Zugabe beider Rezeptorblocker war weder nach 72 Stunden, noch nach 144 Stunden Versuchsdauer eine signifikante Proliferation erkennbar (94 % vs. 93 %,  $p = 0,125$  vs.  $p = 0,142$ ).

Die kombinierte Applikation von SU5416 und SU5402 induzierte bei VEGF-stimulierten Zellen einen Rückgang der Proliferationsrate auf Kontrollniveau für beide Inkubationszeiten. Bei einer nicht signifikanten Zellproliferation von 93 % bzw. 92 % ( $p = 0,17/p = 0,228$ ) war auch bei diesem Ansatz kein proliferationsstimulierender Effekt nachweisbar.

Bei mit bFGF kultivierten Zellen fanden sich nach Zugabe beider selektiver Blocker (SU5416 und SU5402) keine signifikanten Proliferationsunterschiede hinsichtlich einer 72- bzw. 144-stündigen Versuchsdauer (101 % vs. 103 %,  $p = 0,79$  vs.  $p = 0,112$ ).

Die kombinierte Zugabe von SU5416 und SU5402 konnte bei den mit beiden Wachstumsfaktoren (VEGF und bFGF) stimulierten RPE-Zellen keinen Proliferationszuwachs induzieren. Weder eine 72-stündige Inkubation, noch eine doppelte Versuchsdauer zeigte einen Anstieg der Zellproliferation (98 %/97 %). Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte, ohne erkennbare Signifikanzen, nur das Kontrollniveau erreicht werden ( $p = 0,411/p = 0,513$ ).

Zusammenfassend lässt sich für diesen Versuchsansatz sagen, dass eine kombinierte Applikation der selektiven Inhibitoren SU5416 und SU5402 keine RPE-Zellproliferation zur Folge hatte. Weder die Inkubationsdauer noch die zuvor applizierten stimulierenden Agenzien (VEGF und/oder bFGF) hatten einen signifikanten Einfluss.

Eine kombinierte Anwendung beider Rezeptorblocker SU5416 und SU5402 verursachte ebenso zellmorphologische Modifikationen. Wie bei der isolierten Anwendung

von SU5416, war ein vereinzelt Auftreten vergrößerter Zellkörper zu erkennen (in Abbildung 4.4 mit Pfeilen gekennzeichnet). Ebenso wurden ausgeprägte zelluläre Formänderungen von polygonalen Ausgangsformen bis zu spindelförmigen, langgestreckten Zellkörpern (in Abbildung 4.4 mit Pfeilen gekennzeichnet) induziert. In deutlich geringerer Ausprägung ist diese Veränderung bereits nach Zugabe der einzelnen Wachstumsfaktoren (siehe Kapitel 4.1.2 und Abbildung 4.1) sowie nach SU5402-Applikation (siehe Kapitel 4.2.3 und Abbildung 4.3) beobachtet worden.

Hauptsächlich zeigte sich eine reduzierte Ausbildung eines konfluenten Zellrasens. Interzelluläre Kontakte und somit der Zusammenhalt des Zellverbandes wurden gelockert, so dass eine deutliche Zelldichtereduktion erkennbar war. Die Abbildung 4.4 veranschaulicht die entsprechenden morphologischen Phänomene.

## 4 Ergebnisse

Zeit	mittleres absolutes Wachstum x 10 <sup>4</sup> Zellen	SD <sup>(+)</sup>	n <sup>(++)</sup>	<i>p</i> -Wert <sup>(+++)</sup> : mittleres absolutes Wachstum zur Kontrolle nach	
				72h	144h
<b>Kontrollen</b>					
72h	1,078	0,047	4	-	-
144h	1,053	0,151	5	0,762	-
<b>Kontrollen + Blocker SU5416 und SU5402</b>					
72h	1,009	0,012	2	0,125	-
144h	1,004	0,046	2	0,142	0,686
<b>VEGF + Blocker SU5416 und SU5402</b>					
72h	1,004	0,089	6	0,17	-
144h	0,988	0,13	6	0,228	0,462
<b>bFGF + Blocker SU5416 und SU5402</b>					
72h	1,088	0,063	7	0,79	-
144h	1,109	0,009	7	0,112	0,341
<b>VEGF + bFGF + Blocker SU5416 und SU5402</b>					
72h	1,057	0,034	7	0,411	-
144h	1,051	0,07	7	0,513	0,976

+ Standardabweichung der absoluten Proliferation  
 ++ Stichprobenumfang  
 +++ *p*-Wert berechnet mit dem *t*-Test für ungepaarte Stichproben  
 \* *p* < 0,05 signifikant, \*\* *p* < 0,01 hoch signifikant, \*\*\* *p* < 0,001 äußerst signifikant

Tabelle 4.4: Statistische Analyse der Wachstumsmodulation unter VEGF, bFGF und deren Kombination nach Zusatz von SU5416 und SU5402

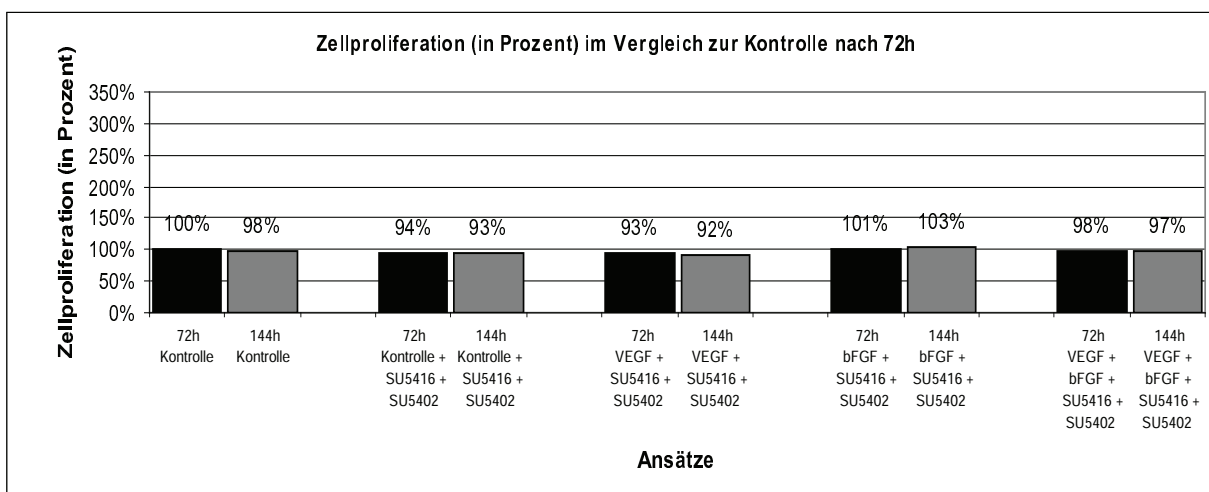


Diagramm 4.7: Zeitabhängige relative Wachstumsmodulation unter VEGF, bFGF und deren Kombination nach Zusatz von SU5416 und SU5402

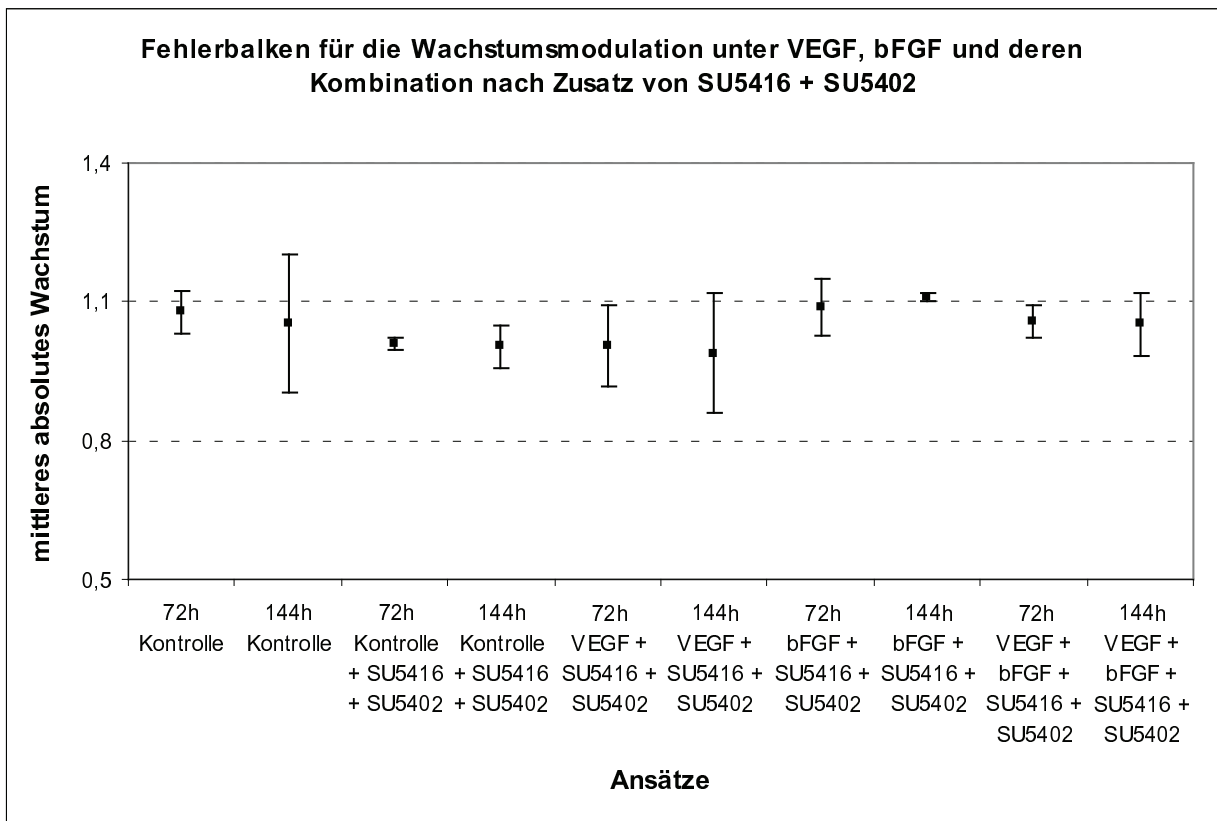


Diagramm 4.8: Fehlerbalken für die zeitabhängige absolute Wachstumsmodulation unter VEGF, bFGF und deren Kombination nach Zusatz von SU5416 und SU5402

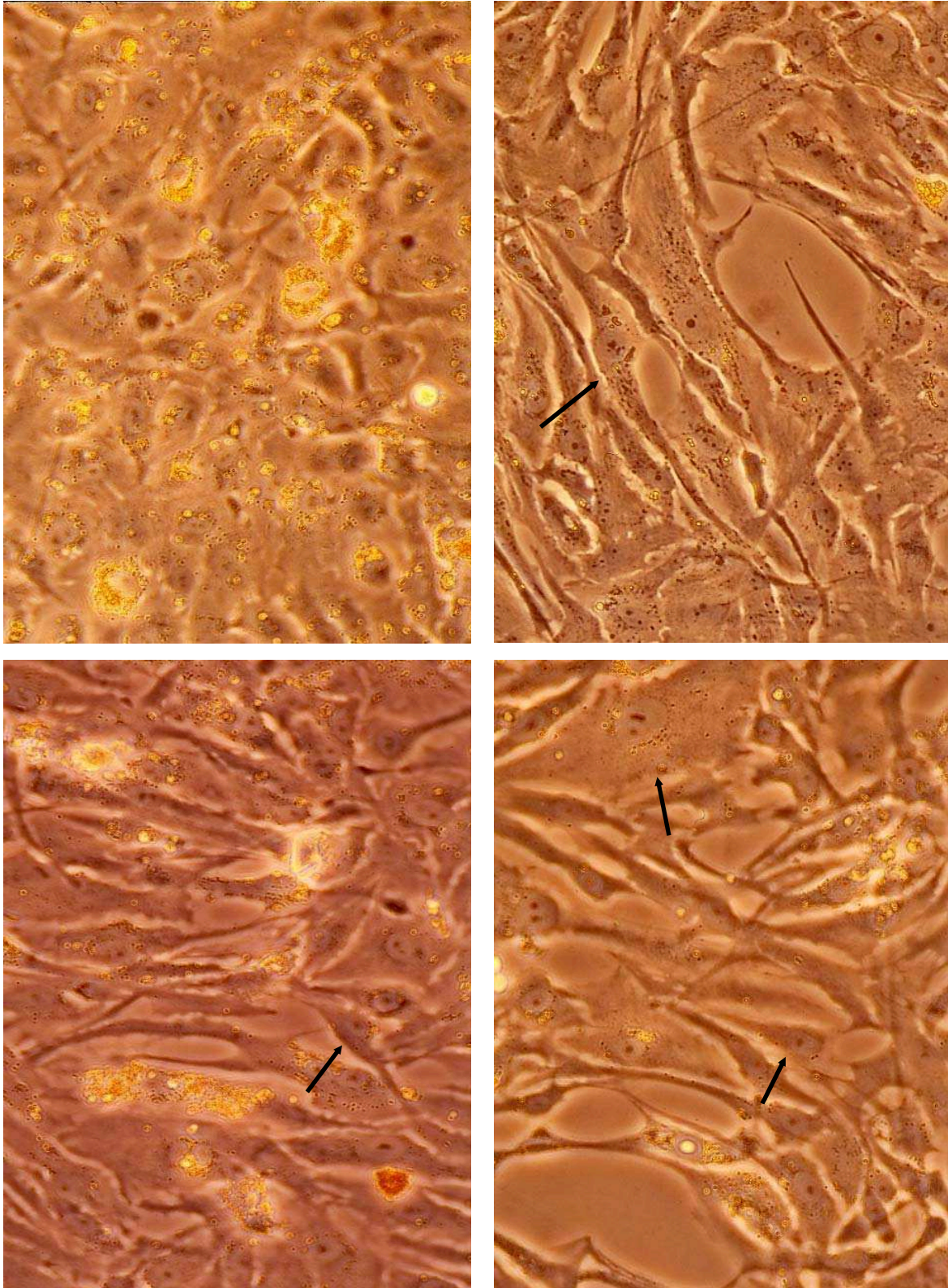


Abbildung 4.4: Morphologische Veränderungen nach 144 h Inkubation mit SU5416 und SU5402, 100-fache Vergrößerung  
**oben links:** Kontrollgruppe, **oben rechts:** SU5416+SU5402+VEGF,  
**unten links:** SU5416+SU5402+bFGF, **unten rechts:** SU5416+SU5402+VEGF+bFGF



### 4.3 Selektive Darstellung der Inhibitionseffekte durch SU5416 und SU5402 für die jeweiligen Wachstumsfaktoren

Die mitogene Aktivität von VEGF, bFGF und deren Kombination sowie die Inhibitionseffekte der jeweiligen Rezeptorblocker (SU5416, SU5402 sowie deren Kombination) soll selektiv für jeden einzelnen Wachstumsfaktor dargestellt werden.

Diese direkte Gegenüberstellung ermöglicht eine genauere Darstellung der Ergebnisse aus den Tabellen 4.1 bis 4.4 und fasst sie graphisch für das VEGF und/oder bFGF aus den vier entsprechenden Versuchsansätzen zusammen. Die Wirkungsmodulation der supplementierten Substanzen wurde dabei ebenso zeitabhängig auf die Zellproliferation humaner RPE-Zellen beurteilt.

Um einen selektiven direkten Vergleich zwischen den vier durchgeführten Versuchsansätzen zu ermöglichen, wurden die Kontrollen aller vier Versuchsansätze (Zellproliferation unbehandelter Zellgruppen nach 72 Stunden) sowie deren Standardabweichungen gemittelt. Aus diesem arithmetischen Mittel wurde für jeden einzelnen Versuchsansatz ein ansatzspezifischer Korrekturfaktor errechnet. Entsprechend des Faktors korrigierten sich die Werte für das absolute Zellwachstum und die Standardabweichungen, so dass mit Hilfe des *t*-Tests (siehe Kapitel 3.8) auf Signifikanzen geprüft werden konnte. Da es sich hierbei um einen multiplen Test handelt, wurde mit der Methode nach Bonferroni ein neues, adjustiertes Signifikanzniveau bestimmt, um den kumulierenden  $\alpha$  - Fehler zu korrigieren.

Die Diagramme 4.9 bis 4.11 erfassen entsprechend selektiv für jeden einzelnen Wachstumsfaktor und deren Kombination die korrigierte absolute mittlere Zellproliferation  $\pm$  korrigierte einfache Standardabweichung sowie deren Interaktionen mit SU5416 und SU5402 als Fehlerbalken. Zusätzlich weisen sie jeweils die Signifikanzniveaus (ermittelt mit dem *t*-Test) sowie die Signifikanzen nach der Adjustierung mit der Bonferroni-Korrektur aus.

Im Diagramm 4.9 ist erkennbar, dass zwischen dem durch VEGF induzierten Zellwachstum und nach Applikation seines selektiven Rezeptorblockers SU5416 ein hoch signifikanter Unterschied nach 72 Stunden besteht ( $p < 0,01$ ). Nach Verlängerung der

Inkubationsdauer auf 144 Stunden (für beide Parameter) ist eine Zunahme auf ein äußerstes Signifikanzniveau sichtbar ( $p < 0,001$ ). Der SU5402-Zusatz hingegen induzierte im Vergleich zur VEGF-Wirkung nach 72 Stunden keine signifikanten Veränderungen ( $p = 0,302$ ). Nach doppelter Inkubationszeit zeigte sich zeitverzögert jedoch ein hoch signifikanter Unterschied ( $p < 0,01$ ). Zwischen dem VEGF-Effekt und der Supplementierung beider Inhibitoren fand sich nach 72 Stunden keine signifikante Veränderung, dennoch war eine Trendentwicklung deutlich ( $p = 0,064$ ). Allerdings förderte eine Verdoppelung der Versuchsdauer einen signifikanten Unterschied auf ein äußerstes Niveau ( $p < 0,001$ ).

Weiterhin ist die selektive Darstellung für bFGF und dessen Wirkungsmodulationen dokumentiert (Diagramm 4.10). Sie lässt erkennen, dass nach 72 Stunden zwischen bFGF-Wirkung und SU5416-Applikation kein Signifikanznachweis gelingt ( $p = 0,769$ ). Der Zusatz des selektiven Rezeptorblockers SU5402 hingegen unterstützte eine signifikant geringere Zellproliferation ( $p = 0,01$ ). Eine äußerst signifikante Reduktion des Zellwachstums im Vergleich zur bFGF-Induktion trat nach Applikation beider Rezeptorinhibitoren auf ( $p < 0,001$ ). Nach einer Versuchsdauer von 144 Stunden bewegte sich der Unterschied zwischen bFGF-assoziiierter Zellproliferation und deren Wirkungsmodulation durch SU5416 und/oder SU5402 auf einem äußerst signifikanten Niveau ( $p < 0,001$ ).

Zudem veranschaulicht Diagramm 4.11 die ermittelten Signifikanzen, die zwischen der kombinierten Anwendung beider Wachstumsfaktoren und SU5416 sowie SU5402 existieren. Nach einer Inkubationsdauer von 72 Stunden ergab sich zwischen der Zellproliferationsstimulierung durch die kombinierte Applikation der Wachstumsfaktoren und der Proliferationsreduktion durch den selektiven Rezeptorblocker SU5416 ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,018$ ). Ferner wurde eine Signifikanzsteigerung auf ein äußerstes Niveau durch die Supplementierung von SU5402 und den kombinierten Einsatz beider Rezeptorblocker nach 72 Stunden erzielt ( $p < 0,001$ ). Für die doppelte Inkubation von 144 Stunden galt, dass sowohl nach Zusatz von SU5416, SU5402 und deren Kombination eine äußerst signifikante Inhibierung der Zellproliferation im Vergleich zur durch VEGF und bFGF (kombiniert) assoziierten Proliferationsstimulierung bestimmt werden konnte ( $p < 0,001$ ).

Mit Ausnahme der Gegenüberstellung von VEGF und bFGF (in Kombination) nach Zusatz von SU5416 nach 72 Stunden (siehe Diagramm 4.11) hielten alle mit dem  $t$ -Test bestimmten Signifikanzen der Bonferroni-Korrektur stand.

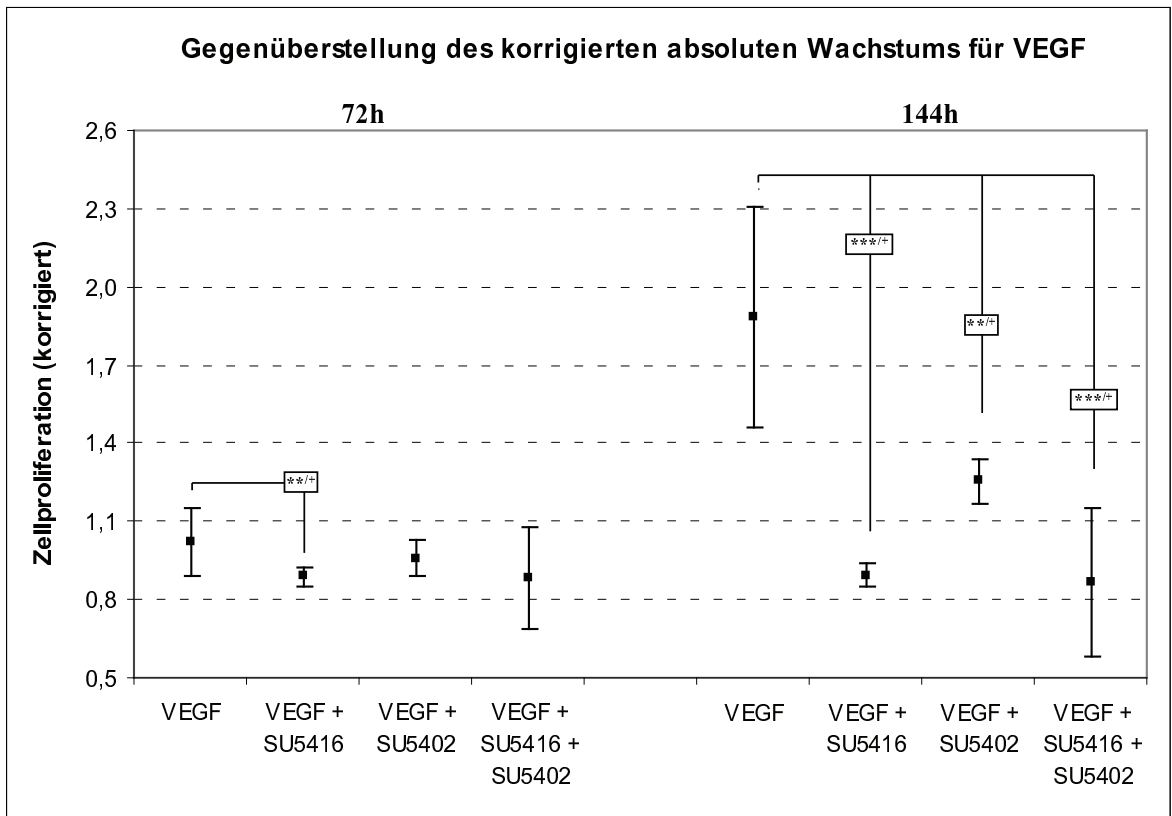


Diagramm 4.9: Selektive zeitabhängige Gegenüberstellung der absoluten Proliferation für VEGF

\* / \*\* / \*\*\* Signifikanzniveaus nach t-Test, + signifikant nach Bonferroni-Korrektur

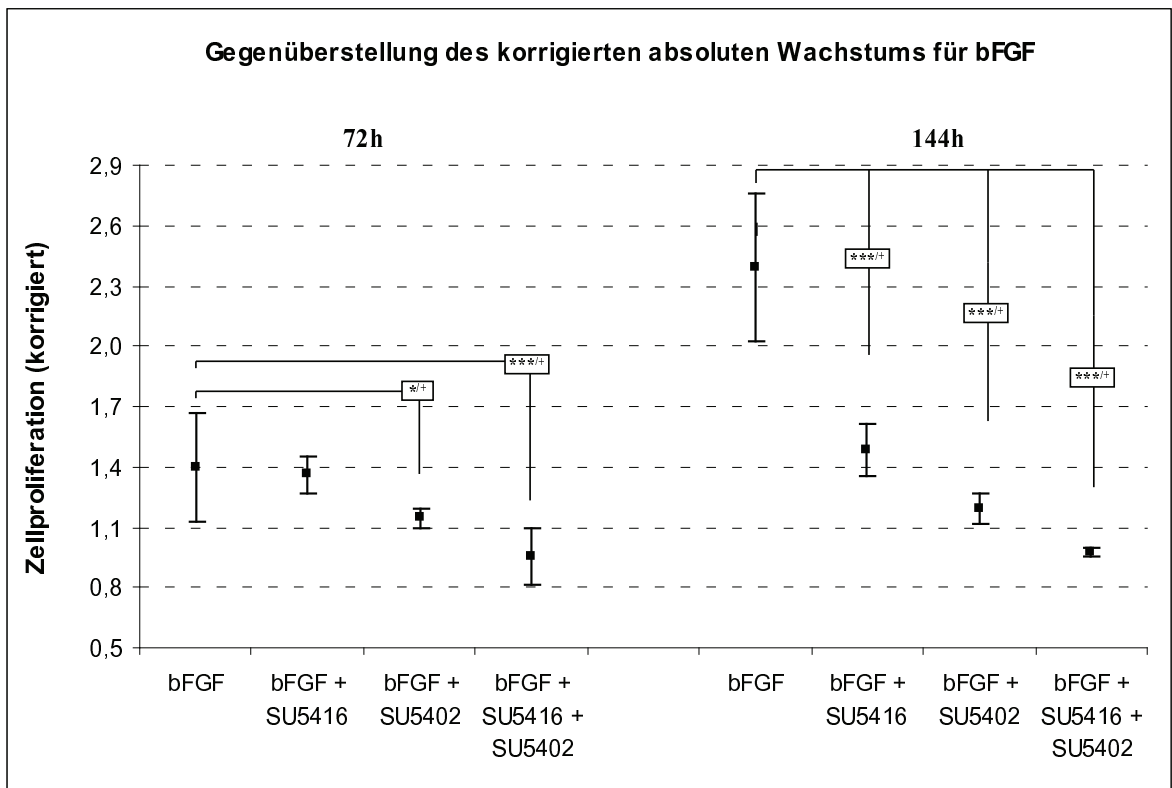


Diagramm 4.10: Selektive zeitabhängige Gegenüberstellung der absoluten Proliferation für bFGF

\* / \*\* / \*\*\* Signifikanzniveaus nach t-Test, + signifikant nach Bonferroni-Korrektur

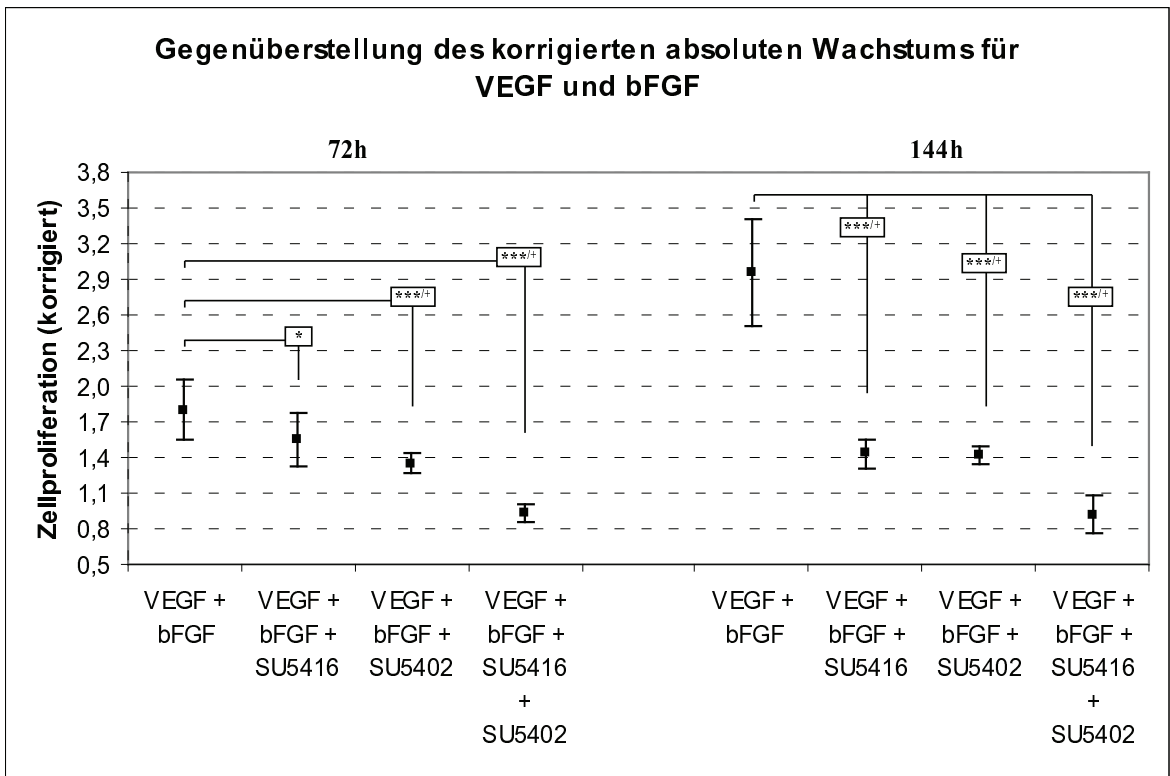


Diagramm 4.11: Selektive zeitabhängige Gegenüberstellung der absoluten Proliferation für VEGF und bFGF

\* / \*\* / \*\*\* Signifikanzniveaus nach t-Test, + signifikant nach Bonferroni-Korrektur

## 5 Diskussion

### 5.1 Allgemeines

Die Zellproliferation von RPE-Zellen spielt eine entscheidende Rolle in der Pathogenese diverser okulärer Erkrankungen des hinteren Augenabschnitts, z. B. bei der proliferativen Vitreoretinopathie (PVR) und proliferativen diabetischen Retinopathie (PDR) [86]. Wachstumsfaktoren, insbesondere VEGF und bFGF, sind in die Entwicklung, Modulation und Progression dieser Erkrankungen involviert [72]. Zusätzlich wird ihnen eine proangiogenetische Wirkung zugeschrieben. Die gemeinsame Lokalisation und Hochregulation von VEGF und bFGF bei chorioidalen Neovaskularisationen (CNVs) bei AMD-Patienten unterstreicht deren besondere Bedeutung im okulären System. Ferner könnte es als Ansatzpunkt weiterer Therapieoptionen verstanden werden [41, 76].

Ziel dieser experimentellen Studie war es, die Wachstumsregulation kultivierter, humaner RPE-Zellen unter dem Einfluss von VEGF und bFGF zeitabhängig zu untersuchen. Dabei sollten Modulationseffekte durch die Wirkung selektiver VEGF- bzw. FGF-Rezeptorblocker (SU5416/SU5402) quantifiziert werden.

*In vivo* existiert ein komplexes Netzwerk verschiedenster Wachstumsfaktoren. Deren biologische Aktivitäten sind nicht isoliert, sondern durch Interaktionen gekennzeichnet, zu betrachten. Im okulären System wird bis heute nur ein kleiner Bruchteil dieser wechselseitigen Beziehungen verstanden. Folglich wurde die Frage nach einem möglichen additiven Regulationseffekt beider Wachstumsfaktoren aufgeworfen.

## 5.2 Diskussion der Methodik

### 5.2.1 Vorteile dieser Studie

Die vorliegende Arbeit war eine experimentelle Studie an kultivierten, humanen RPE-Zellen. Die Verwendung humanen Zellgewebes reduzierte den Unterschied zwischen den *in vitro* herrschenden Bedingungen und *in vivo*-Verhältnissen. Die geringen post mortem Zeiten von minimal 6 bis maximal 24,2 Stunden ( $18,9 \pm 4,9$  Stunden) gewährleisteten eine zügige Zellgewinnung mit bestmöglichem Vitalitätserhalt der RPE-Zellen. Durch die große Altersspanne der Spender von 15 bis 77 Jahren ( $57 \pm 16,4$  Jahren) konnten ein breites Mischkollektiv und somit RPE-Zellen verschiedensten Alters berücksichtigt werden. Um Störfaktoren, die auf ethnische Einflüsse zurückzuführen sind, zu minimieren, wurde nur Zellgewebe von Spendern kaukasischer Herkunft verwendet.

RPE-Zellen gelten *in vivo* als terminal differenziert und amitotisch. Um diesen Zustand zu imitieren, erfolgte die Durchführung aller Versuchsansätze mit Zellpassagen erster Ordnung. Durch Verzicht auf höhere Passagen sollten Dedifferenzierungsvorgänge, morphologische Veränderungen sowie der Verlust ursprünglicher Merkmale und Eigenschaften begrenzt werden, denen die Zellen durch Kultivierung unterliegen.

Bei allen Versuchsreihen kam ein Kulturmedium mit einem minimalen Serumanteil von 0,1 % FCS zum Einsatz. Seren sind stets undefinierte Naturprodukte wechselnder Zusammensetzung mit schwankendem Gehalt an Inhaltsstoffen. Neben dem bekannten FCS können auch Seren von älteren Kälbern, vom Schwein und Pferd, anderen Spezies sowie vom Menschen verwendet werden. Sie liefern der Zellkultur Hormone, Wachstumsfaktoren, Bindungsproteine und Anheftungsfaktoren, zahlreiche zur Synthese benötigte Aminosäuren, anorganische Salze, Spurenelemente sowie Puffer- und Neutralisationssysteme, z. B. Albumin oder Immunglobuline. Andererseits können Seren toxische Stoffe wie z. B. Umweltgifte, unerwünschte Mikroorganismen wie Viren, Bakterien und Pilze sowie deren Antikörper und Toxine enthalten. Bei der Serum-Anwendung müssen qualitative und quantitative Schwankungen der Nährmedienbestandteile berücksichtigt werden. Für die meisten Zellzüchtungen gilt der Zusatz von Serum heute dennoch als der einfachste, effektivste und meist auch wirtschaftlichste Weg, gut wachsende Zell-



kulturen zu erhalten. Das Serum selbst muss jedoch als unphysiologische Flüssigkeit betrachtet werden. Durch den reduzierten FCS-Anteil von 0,1 % sollte die Gefahr, die Wirksamkeit der applizierten Testsubstanzen durch unbekannte Serumbestandteile zu beeinflussen, minimiert und eine wachstumsfördernde Serumwirkung ausgeschlossen werden. Es konnte ein Milieu erzeugt werden, das dem der RPE-Zellen *in vivo* ähnelt, den postmitotischen Zustand von RPE-Zellen imitiert und ein Zellüberleben auch nach 144 Stunden Inkubation gewährleistet. Zur Sicherung eines vitalen Zellstatus wurde auf komplette Serumfreiheit verzichtet.

Diese Thematik wurde auch von Hecquet et al. in einer experimentellen Studie an humanen RPE-Zellen aufgegriffen. Die Inkubation mit 0,1 % FCS konnte keinen Effekt auf die Zellproliferation nachweisen, aber ein Zellüberleben auch nach sechs Tagen ermöglichen. Die alleinige Kultivierung ohne Serumzusatz induzierte hingegen den Zelltod [61]. Dies korrespondiert mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. In jedem der vier Versuchsansätze fand sich in der Gruppe der unbehandelten Zellen nach 144 Stunden keine signifikante Zellproliferationsstimulierung (siehe Tabellen 4.1 bis 4.4 und Diagramme 4.1 bis 4.8). Der Erhalt der Zellvitalität konnte durch den Trypanblau-Test bestätigt werden.

Bei allen vier Versuchsansätzen wurde bei der Wahl des Kulturmediums grundsätzlich auf eine Insulinsupplementierung verzichtet. Bereits 1996 wiesen Sobottka et al. darauf hin, dass Hormone wie Insulin, Transferrin oder Hydrocortison die Proliferation und Funktionen von RPE-Zellen beeinflussen können [137]. Insulin selbst gilt als ein bekanntes, wachstumsstimulierendes Agens verschiedenster Zellarten *in vitro*. In dieser Arbeit wurde es dem Kulturgrundmedium nur bis zum Zeitpunkt des Experimentansatzes zugesetzt (siehe Kapitel 3.3). Es sollte die Etablierung der Zellkultur und Ausbildung eines konfluenten Zellrasens fördern. Während der Durchführung der Versuchsansätze diente der Insulinverzicht dem Erhalt RPE-typischer Charakteristika und dem Ausschluss einer möglichen insulininduzierten Zellproliferationsstimulierung.

### 5.2.2 Statistische Auswertung

Wie bereits unter Kapitel 3.8 erläutert, wurde für die statistische Analyse der *t*-Test verwendet. Da alle Versuchsreihen der vier Versuchsansätze Stichprobenunabhängigkeit

aufwiesen, bot sich anhand der Methode die Möglichkeit, die Nullhypothese gegen die zweiseitige Alternative (Zellproliferation bzw. Zellrückgang) zu prüfen. Es konnte geklärt werden, ob sich das arithmetische Mittel in zwei Stichproben signifikant unterscheidet. Zur Berechnung mussten das jeweilige arithmetische Mittel, Standardabweichungen und Stichprobenumfänge der zu vergleichenden Versuchsreihen berücksichtigt werden. Kritisch sind hierbei die entsprechenden Varianzen der genannten Parameter zu bewerten. Diese waren veränderliche Größen und wiesen demnach keine reine Homogenität auf. Entsprechend richtete sich der Signifikanznachweis streng nach deren Varianzbreiten.

Der Versuchsaufbau umfasste vier Versuchsansätze mit den jeweiligen Versuchsreihen. Diesen wurde ansatzspezifisch eine Kontrolle, d. h. die unbehandelte Zellgruppe nach 72 Stunden Inkubation, zugeordnet. Den Tabellen 4.1 bis 4.4 ist zu entnehmen, dass das absolute Zellwachstum der jeweiligen Kontrollgruppe für jeden Versuchsansatz gewissen Schwankungen unterlag. Diese sind durch die Anwendung unterschiedlicher Zelllinien und die leicht differierenden Kulturbedingungen, z. B. unterschiedliche Chargen der Kulturmediensubstanzen, zu erklären. Diese Inhomogenität zeigte sich sogar nach Anwendung des  $t$ -Tests durch einen teilweise signifikanten Unterschied zwischen den ansatzspezifischen Kontrollgruppen. Damit ein selektiver Vergleich zwischen den vier Ansätzen realisiert werden konnte, mussten die differenten Kontrollgruppen berücksichtigt werden.

Dazu wurden die Kontrollen und die dazugehörigen Standardabweichungen aller vier Versuchsansätze gemittelt und aus dem arithmetischen Mittel ein ansatzspezifischer Korrekturfaktor für jeden der vier Versuchsansätze berechnet. Dieser korrigierte die Werte für das absolute Zellwachstum sowie die Standardabweichung. Somit konnten bestehende Signifikanzen zwischen den vier Versuchsansätzen ermittelt werden. Dies erscheint insofern problematisch, da nicht nur das arithmetische Mittel, die Standardabweichung und Stichprobenumfänge, sondern gerade der o. g. Korrekturfaktor maßgeblich den Signifikanznachweis beeinflussten.

Da dieser selektive direkte Vergleich zwischen den vier Versuchsansätzen eine multivariate Analyse darstellte, wurden die mit dem  $t$ -Test errechneten Signifikanzen mit der Methode nach Bonferroni korrigiert. Dem kumulierenden  $\alpha$ -Fehler wurde somit entge-

gengewirkt und die mit dem *t*-Test ermittelten Signifikanzen (mit Ausnahme der selektiven Gegenüberstellung von VEGF + bFGF nach Zusatz von SU5416 nach 72 Stunden, siehe Diagramm 4.11) erhärtet.

### 5.3 Diskussion der Ergebnisse

#### 5.3.1 VEGF- und bFGF-induzierte Effekte auf die Zellproliferation

Der Einfluss der beiden Wachstumsfaktoren VEGF und bFGF auf verschiedene Zellarten ist in der Literatur hinreichend diskutiert worden. Die Frage nach deren Wirkungen auf das Verhalten von RPE-Zellen *in vitro* ist Gegenstand zahlreicher Studien. Arbeiten an bovinen und humanen RPE-Zellkulturen besagen, dass VEGF und bFGF die Fähigkeit zur Zellproliferationsstimulierung besitzen. Einige von ihnen werden im Folgenden genauer betrachtet.

Die Arbeitsgruppe um Esser analysierte den mitogenen Effekt von bFGF an bovinen RPE-Zellen *in vitro* zeit- und dosisabhängig. Die Autoren konnten unter 20 ng/ml bFGF einen maximalen Stimulationseffekt nach drei Inkubationstagen erfassen. Zudem dokumentierten sie das stärkste Zellwachstum bei einer Konzentration von 80 ng/ml bFGF bezogen auf den dritten Versuchstag und einen 15 %igen FCS-Serumzusatz [37].

Hecquet et al. zeigten an humanen RPE-Zellen *in vitro*, dass eine Konzentration von 5 ng/ml VEGF und 1 ng/ml bFGF unter 0,1 % FCS einen maximalen proliferationsfördernden Effekt induzieren kann. Dieser setzte bei beiden Wachstumsfaktoren zeitverzögert nach sechs Inkubationstagen ein. Dabei wies bFGF eine deutlich stärkere Wirkung als VEGF auf. Die kombinierte Anwendung von VEGF, bFGF, PDGF und EGF hingegen zeigte eine stärkere proliferationsstimulierende Aktivität als die Wirkung jedes einzelnen Wachstumsfaktors, so dass die Existenz eines synergistischen Effekts angenommen wurde [61].

An humanen RPE-Zellen sind positive synergistische Effekte bereits zwischen PDGF und EGF, PDGF und bFGF, PDGF und IGF-1 sowie EGF und bFGF belegt [80, 71]. Im Hinblick auf VEGF und bFGF ist ein Synergismus an mikrovaskulären Endothelzellen, bovinen Kapillarendothelzellen sowie bovinen retinalen Kapillarendothelzellen *in vi-*

tro beschrieben worden [108, 60, 51]. Auch Frank et al. implizierte einen möglichen Synergismus beider Wachstumsfaktoren durch den gemeinsamen Nachweis an CNV-Membranen bei AMD-Patienten und im murinen Gewebe [41].

Andere Autoren fanden vergleichbare Ergebnisse. Humane RPE-Zellkulturen zeigten unter 1 % FCS-Serumzusatz dosisabhängig bei jeweils 10 ng/ml VEGF sowie bFGF die stärkste Zellproliferationsstimulierung. bFGF war mit einer höheren Zellzahl deutlich potenter als VEGF. Signifikant synergistische Effekte, verglichen mit den jeweiligen Effekten der einzelnen Wachstumsfaktoren, konnten nach Kombination von PDGF und bFGF beobachtet werden. Die kombinierte Anwendung von VEGF und bFGF hingegen erbrachte keine signifikante Steigerung der Zellproliferation im Vergleich zur Einzelanwendung [72]. Nach ausführlicher Literaturrecherche sind weitere Untersuchungen, die einen möglichen Synergismus zwischen VEGF und anderen Wachstumsfaktoren an humanen RPE-Zellkulturen beleuchten, bisher nicht vorzuweisen.

Die vorliegenden Ergebnisse wurden mit rekombinatem humanen VEGF-A<sub>121</sub> und bovinem basischen FGF in der Zellkultur ermittelt und bestätigen die positiven Effekte der Wachstumsfaktoren. Der Einsatz von bFGF induzierte bereits nach 72 Stunden eine äußerst signifikante Zellproliferation, die nach doppelter Versuchsdauer auf ein 2,5-faches Niveau im Vergleich zur Kontrollgruppe angehoben wurde (147 %,  $p < 0,001$  vs. 253 %,  $p < 0,001$ , siehe Tabelle 4.1, Diagramm 4.1). VEGF führte zeitverzögert ebenso zur Zellproliferationsanregung, erreichte aber nicht annähernd hohe Zellzahlen wie bFGF (108 %,  $p = 0,182$  vs. 199 %,  $p < 0,001$ , siehe Tabelle 4.1, Diagramm 4.1).

Korrespondierend zu anderen Autoren können beide Wachstumsfaktoren als zeitabhängiger Stimulus der RPE-Zellproliferation angesehen werden, wobei bFGF deutlich potenter agierte. Die Kombination von VEGF und bFGF ließ, ebenso zeitabhängig, mit einer, verglichen zur Kontrollgruppe, um mehr als den Faktor drei erhöhten Zellproliferation die stärkste Wachstumsstimulierung erkennen. Dies kann als Hinweis für die Existenz eines additiven Effekts zwischen VEGF und bFGF verstanden werden. Inwieweit die Wachstumsfaktoren befähigt sind, den jeweils anderen Wachstumsfaktor triggern zu können, wird nachfolgendend diskutiert.

Beide Wachstumsfaktoren verfügen über einen Tyrosinkinaserzeptor, der nach Auto-phosphorylierung über die Aktivierung der PKC und des MAP-Kinase-Wegs komplexe transmembranöse und intrazelluläre Prozesse generiert. Der MAP-Kinase-Weg ist auch bei einer durch Serum induzierten RPE-Zellproliferation an humanem Gewebe involviert und spielt eine Schlüsselrolle in der Kontrolle der RPE-Zellproliferation [61]. Dies könnte als Ansatzpunkt für einen positiven synergistischen Effekt zwischen beiden Wachstumsfaktoren dienen. Möglicherweise begünstigt die Nutzung gleichartiger Signalwege eine Affinitätsänderung oder Phosphorylierung vergleichbarer Rezeptoren. Zur genauen Verifizierung der molekularen Mechanismen, die vielfältige Erklärungsmodelle liefern, sind weitere Studien erforderlich.

### 5.3.2 Einflussfaktoren auf die Zellproliferation

In obigen Ausführungen wird deutlich, dass in der Literatur divergente dosis- und zeitabhängige Angaben existieren. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass das Zellverhalten in Zellkulturen differiert. Multiple Faktoren wie Alter des Bulbuspenders, post mortem Zeiten, Art der Zellgewinnung und Etablierung der Zellkultur, supplementierte Kulturmedien und -substrate mit verschiedenen Konzentrationen, verwendeter Serumanteil im Kulturmedium sowie die verwendete Zellpassage üben einen entscheidenden Einfluss auf das Resultat aus. Diese Parameter wurden in o. g. Studien unterschiedlich gewählt, so dass eine direkte Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit denen der vorliegenden Arbeit kaum möglich erscheint. Dies kann als Erklärung dienen, warum Kaven et al. [72] bezüglich der kombinierten Anwendung von VEGF und bFGF divergente Ergebnisse im Vergleich zur vorliegenden Studie erzielten.

Die Angaben über die optimalen Wirkkonzentrationen beider Wachstumsfaktoren schwankten in der Literatur zwischen 5-10 ng/ml für VEGF und 1-100 ng/ml für bFGF. Eine Stimulation der Zellproliferation boviner RPE-Zellen wurde bereits bei einer Konzentration von 0,01 ng/ml bFGF beschrieben [37]. Diese Spannbreite ist u. a. auf unterschiedlich hohe Serumanteile im Kulturmedium zurückzuführen. Ferner könnte diese Diskrepanz durch einen „Shift“ der Rezeptoraffinitäten durch differente Kulturbedingungen erklärt werden. Studien an humanen kornealen Endothelzellen verdeutlichten, dass

die Anwesenheit von Serum im Kulturmedium den Bedarf an bFGF herabsetzt [50, 65]. Hierbei muss auf den essentiellen Zusammenhang zwischen der VEGF- und bFGF-Aktivität und applizierter Serumkonzentration hingewiesen werden. Die Abwesenheit von Serum supprimiert proliferative Aktivitäten. Burke et al. konnten beobachten, dass bovine und humane RPE-Zellen unter Serumfreiheit keinerlei Stimulation der DNA-Synthese zeigten [24]. In *in vitro* Experimenten boviner RPE-Zellen induzierte eine Serumkonzentration von 1-5 % ein deutlich geringeres Zellwachstum nach bFGF-Applikation als ein Serumanteil von 10 % oder mehr [37]. Folglich ist die Effektivität der Wachstumsfaktoren u. a. vom Serumgehalt des Kulturmediums abhängig [120]. So vermutete man im Serum existierende Kofaktoren, die zur Potenzierung des VEGF- und bFGF-Effekts befähigt sind [37].

Um additive Effekte auf die Wachstumsfaktoren und Wirkungsmodulationen durch Serumbestandteile zu vermeiden, verwendete die vorliegende Studie einen minimierten FCS-Serumanteil von 0,1 %. Die unbehandelte Zellgruppe zeigte nach 144 Stunden Inkubation selektiv für jeden der vier Versuchsansätze keine signifikante Zunahme der Zellproliferation, so dass FCS in einer Konzentration von 0,1 % keine proliferationsfördernde Wirkung zugeschrieben werden konnte (siehe Tabellen 4.1 bis 4.4 und Diagramme 4.1 bis 4.7). Somit wurde deutlich, dass die erfasste Zellproliferationsstimulierung durch die Wachstumsfaktoren selbst und nicht durch den FCS-Serumzusatz induziert wurde.

Neben dem Serumanteil im Kulturmedium beeinflussen verschiedene Additiva, z. B. Insulin, Glukokortikoide, entscheidend die durch VEGF- und bFGF-vermittelte Aktivität. An kornealen Endothelzellen konnte nach Insulinzugabe eine intensivierete bFGF-Wirkung auf das Zellwachstum nachgewiesen werden [50]. Die vorliegende Arbeit wählte einen Insulinverzicht während der Durchführung aller Versuchsansätze, um mögliche synergistische Effekte auf die Wachstumsfaktoren auszuschließen.

Unter Berücksichtigung differierender Zellkulturbedingungen mit direkter Einflussnahme auf das Zellverhalten und Zellüberleben auf Grund o. g. variabler Parameter ist diesbezüglich kritisch anzumerken, dass in dieser Arbeit die tatsächlich resultierenden Stichprobenumfänge für die jeweiligen Versuchsansätze von denen, nach dem Studienplan

maximal möglichen Stichprobenumfängen, differieren. Durch die vor Zellzählung durchgeführte Trypanblau-Test-Vitalfärbung der kultivierten RPE-Zellen kam es zur Reduktion des verwertbaren Materials. So wird sichtbar, dass die Versuchsansätze Kontrolle + SU5416 (72 Stunden, siehe Tabelle 4.2) sowie die Kontrolle + SU5416 + SU5402 (72 und 144 Stunden, siehe Tabelle 4.4) jeweils nur zwei Stichproben umfassen. Die Aussagekraft ist limitiert. Es muss jedoch darauf verwiesen werden, dass diese Werte nicht als Bezugsgröße oder Berechnungsgrundlage für die Wirkungsmodulation der entsprechenden Testsubstanzen verwendet wurden. Auf eine erneute Durchführung dieser Ansätze wurde bei limitierter Verfügbarkeit des humanen Spendermaterials verzichtet.

### 5.3.3 Wirkungsmodulation durch SU5416

Da VEGF durch seine Funktionsvielfalt eine zentrale Rolle in der Pathogenese okulärer Erkrankungen spielt, entwickelte sich die Frage, wie die VEGF-vermittelten Effekte moduliert und/oder inhibiert werden könnten. VEGFR-2 (KDR/Flk-1) wird dabei als der Rezeptor verstanden, der im vaskulären Endothel maßgeblich die VEGF-induzierten Signale wie vaskuläre Hyperpermeabilität und angiogene Eigenschaften, inklusive Mitogenität, Proliferation und chemotaktische Aktivität, vermittelt. Zusätzlich übernimmt er die Regulation der MAP-Kinase-Aktivität, die von entscheidender Bedeutung in der Signaltransduktion der VEGF-stimulierten vaskulären Endothelzellproliferation ist [144]. Auch die DNA-Synthese in VEGF-stimulierten humanen venösen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) wird vorrangig durch den VEGFR-2 vermittelt [70]. Zusätzlich korreliert die mitogene VEGF-Aktivität an retinalen Kapillarendothelzellen mit dem Umfang der VEGFR-2-Expression [60]. Folglich kam der selektive VEGFR-2-Inhibitor SU5416 zum Einsatz.

Als SU5416 wird ein synthetischer, zellpermeabler, selektiver, ATP-kompetitiver VEGF-Rezeptor-2- und weniger potenter PDGF-Rezeptor-Tyrosinkinaseinhibitor verstanden. Er konkurriert um die intrazelluläre ATP-Bindungsdomäne und inhibiert die Phosphorylierung der Rezeptor-Tyrosinkinase. *In vitro* und in tierexperimentellen Modellen konnte aufgezeigt werden, dass SU5416 als ein potenter Inhibitor der VEGF-abhängigen Mitogenese und Migration humaner Endothelzellen und der Tumorangio-genese verschie-

denster Zelltypen agiert [40, 123, 148, 113]. Der Effekt auf das okuläre Zellsystem ist bis dato allerdings weitgehend unbekannt.

*In vitro* konnten Takeda et al. zeigen, dass SU5416 an kultivierten bovinen chorioidalen Endothelzellen dosisabhängig die VEGF-induzierte KDR-Phosphorylierung (VEGFR-2) sowie eine ERK-Phosphorylierung (MAP-Kinase-Weg) als Teile der Signaltransduktionskette signifikant inhibiert. Nach intraperitonealer Injektion gelang an tierexperimentellen, laserinduzierten CNVs der Nachweis eines signifikant antiangiogenetischen Effekts [134]. Untersuchungen von Ablonczy et al. dokumentierten *in vitro* die Wirkung von SU5416 an porcinen, primären RPE-Zellen sowie einer humanen ARPE-19-Zelllinie. Durch seine Inhibitionskraft konnten die Autoren belegen, dass eine VEGFR-2-Aktivierung, apikal am RPE gelegen, den VEGF-induzierten Zusammenbruch der RPE-Barierefunktion vermittelt [1]. SU5416 ist auch an morphologischen Veränderungen beteiligt. Murine, tierexperimentelle Studien zeigten nach subkutaner Injektion eine signifikante Verschmälerung retinalen Gewebes im Bereich der inneren Körnerschicht, inneren retikulären Schicht und Ganglienzellschicht. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass neben Müllerzellen auch andere retinale Zelltypen VEGF-abhängig agieren. Ferner konnte die Inhibierung retinaler Gefäßentwicklung neonatalen Gewebes, retinal induzierter Neovaskularisationen sowie des VEGF-aktivierten MAP-Kinase-Wegs in Müllerzellen beobachtet werden [113].

In Anlehnung an diese Ergebnisse interessierte die Frage, ob SU5416 eine mögliche Beteiligung an der Zellproliferationsregulierung humaner RPE-Zellen *in vitro* besitzt. An dieses Thema orientierte Untersuchungen sind nach ausführlicher Literaturrecherche bisher nicht vorzuweisen.

Nach SU5416-Applikation stagnierte der Zellwert von VEGF-inkubierten Zellen für beide Inkubationszeiten mit jeweils 94 % bzw. 95 % Zellproliferation auf Kontrollniveau ( $p = 0,17/p = 0,237$ , siehe Tabelle 4.2 und Diagramm 4.3). Im Vergleich zur alleinigen VEGF-Wirkung zeigte sich anfangs (72 Stunden) eine hoch signifikante, in der verlängerten Versuchsdauer eine äußerst signifikante Reduktion der Zellproliferation (siehe Diagramm 4.9). Demnach besitzt SU5416 die Potenz, VEGF-proliferationsfördernde Effekte vollständig zu inhibieren. SU5416 gilt als ein selektiver VEGFR-2-Inhibitor. Durch



seine Inhibitionskraft erscheint der VEGFR-2 maßgeblich in den Prozess der Zellproliferation involviert. Es existieren allerdings Hinweise auf eine gleichzeitige Hemmung des VEGFR-1 [1, 113, 48, 69]. Dies gibt Anlass zur Vermutung, dass auch der VEGFR-1 eine Rolle in der Zellproliferationsregulierung humaner RPE-Zellen spielen könnte. Neben dem VEGFR-2 ist seine Beteiligung bereits an der Migration VEGF-stimulierter HUVE Zellen belegt [70].

Nach SU5416-Applikation erzielten überraschenderweise bFGF-inkubierte Zellen nur noch eine 1,5-fache Stimulierung im Vergleich zur Kontrollgruppe (157 %,  $p < 0,001$ , siehe Tabelle 4.2 und Diagramm 4.3). Die durch bFGF maximal induzierte 2,5-fache Zellproliferation (253 %,  $p < 0,001$ , siehe Tabelle 4.1 und Diagramm 4.1) wurde nach SU5416-Präinkubation äußerst signifikant reduziert (siehe Diagramm 4.10). Dieser inhibitorische Effekt war allerdings nur zeitverzögert (144 Stunden) zu beobachten. Er könnte ein Hinweis darauf sein, dass SU5416 nicht selektiv an VEGF-Rezeptoren agiert. Fong et al. widerlegten jedoch diesen Aspekt. So wurden Rezeptor-Tyrosinkinasen anderer Wachstumsfaktoren wie EGF, IGF oder bFGF selbst bei Konzentrationen von 100  $\mu\text{M}$  nicht affektiert [40].

Untersuchungen von Guerrin et al. untermauern ein anderes Erklärungsmodell. *In vitro* verwiesen die Autoren auf eine durch VEGF induzierte Expression des FGFR-1 in RPE-Zellen, die eine erhöhte Sensitivität zu bFGF ermöglichte [57]. Möglicherweise triggerte endogen synthetisiertes VEGF durch eine Upregulation der bFGF-Rezeptoren zeitverzögert die durch bFGF vermittelte Zellproliferation, wodurch ein synergistischer Effekt realisiert wurde. Durch eine entsprechende Inhibierung von endogenem VEGF ging diese additive Wirkung verloren und resultierte in einer verminderten Zellproliferation. Warum endogenes VEGF an Zellen der Kontrollgruppe mit oder ohne SU5416-Präinkubation keine signifikante Veränderung der Zellproliferation zeigte, lässt sich damit erklären, dass keine ausreichenden Konzentrationen erreicht wurden, um suffizient die Zellproliferation *in vitro* zu beeinflussen (siehe Diagramm 4.3). Dieses Modell kann auf weitere Ergebnisse dieser Studie übertragen werden.

Die kombinierte VEGF- und bFGF-Wirkung konnte durch den Einsatz von SU5416 anfangs (72 Stunden) signifikant ( $p = 0,018$ ), zeitverzögert (144 Stunden) äußerst si-

gnifikant ( $p < 0,001$ ) inhibiert werden (siehe Diagramm 4.11). Die Signifikanz nach 72 Stunden konnte nach Durchführung der Bonferroni-Korrektur nicht bestätigt werden. Im Vergleich zur Kontrollgruppe wurden nur noch 164 % bzw. 152 % Zellproliferation (jeweils  $p < 0,001$ ) erreicht (siehe Tabelle 4.2 und Diagramm 4.3). Es wäre denkbar, dass SU5416 endogenes wie auch exogenes VEGF inhibierte und somit einen reduzierten Triggereffekt auf bFGF ausübte. Die fehlende Interaktion beider Wachstumsfaktoren resultierte folglich in einer reduzierten Zellproliferation, die hauptsächlich zeitverzögert zum Tragen kommt.

### 5.3.4 Wirkungsmodulation durch SU5402

Im Gegensatz zu aFGF besitzt bFGF die Fähigkeit, die Zellproliferation humaner RPE-Zellkulturen zeit- und dosisabhängig *in vitro* zu stimulieren [120]. Ferner muss der Wachstumsfaktor maßgeblich in dem pathophysiologischen Verständnis multipler okulärer Erkrankungen berücksichtigt werden. Die vorliegende Studie sollte die Möglichkeit zur Inhibierung oder Modulierung bFGF-assoziiierter Effekte thematisieren.

Da FGFR-1 eine hohe Bindungsaffinität zu bFGF besitzt, kam der spezifische FGFR-1-Blocker SU5402 zur Anwendung. SU5402 charakterisiert einen synthetisierten Tyrosinkinaseinhibitor, der nach Zellpenetration um die intrazelluläre ATP-Bindungsdomäne des katalytischen Kerns des FGF-Rezeptors konkurriert und deren Autophosphorylierung inhibiert. Weiterhin wird er als schwacher Hemmstoff des PDGF-Rezeptors verstanden [97]. Mögliche durch SU5402 provozierte Interaktionen im okulären Zellsystem, insbesondere im RPE, sind in der Literatur nur vereinzelt diskutiert worden. Durch seinen Einsatz an einer humanen RPE-Zelllinie (ARPE19) gelang Rosenthal et al. der Nachweis, dass zwei unterschiedliche Signaltransduktionswege für FGFR-1 und -2 existieren [116]. Wormstone et al. demonstrierten seine Inhibitionskraft auf die Zelldichte und bFGF-Sekretion humaner Linsenzellen *in vitro*. Die Autoren verdeutlichten die Involvement einer FGFR-1-Aktivierung in das Zellwachstum, so dass bFGF als autokriner Regulator verstanden werden kann [142].

Im Hinblick auf diese Ergebnisse verfolgte die vorliegende Studie die Frage, ob auch Auswirkungen auf durch VEGF und/oder bFGF induzierte, proliferationsfördernde Effekte humaner RPE-Zellen zu erwarten sind.

Die Präinkubation mit SU5402 ermöglichte, zeitabhängig potenziert, eine signifikante (72 Stunden) bzw. äußerst signifikante (144 Stunden) Inhibierung der bFGF-Wirkung im Bezug zum alleinigen bFGF-Wachstum (siehe Diagramm 4.10). Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte dennoch eine hoch signifikante (119 %,  $p < 0,01$ , 72 Stunden) bzw. äußerst signifikante (126 %,  $p < 0,001$ , 144 Stunden) Proliferationsstimulierung beobachtet werden (siehe Tabelle 4.3, Diagramm 4.5). Im Gegensatz zur maximal erzielten bFGF-Wirkung von 253 % Zellproliferation (144 Stunden, siehe Diagramm 4.1) wurden nur noch 126 % (144 Stunden, siehe Diagramm 4.5) erreicht. Dies belegt, dass eine FGFR-1-Inhibition die bFGF-abhängige Zellproliferationsstimulierung humaner RPE-Zellen zeitabhängig reduzieren kann. FGFR-1 ist somit maßgeblicher Bestandteil des Signalweges, der die Zellproliferation humaner RPE-Zellen reguliert. Eine vollständige Inhibierung wurde nicht erzielt. Ursächlich wären neben der FGFR-1-Aktivierung die Beteiligung zusätzlicher Regulationsmechanismen oder eine unzureichende Konzentrationsapplikation des Blockers zu diskutieren.

Als FGFR-1-Inhibitor übte SU5402 auch auf VEGF-behandelte Zellen einen wachstumshemmenden Effekt aus. Dieser setzte zeitverzögert nach 144 Stunden Inkubation ein und reduzierte die Zellproliferation von 199 % auf 133 % hinsichtlich des relativen Wachstums (siehe Diagramm 4.1 und 4.5). Im Vergleich zur alleinigen VEGF-Wirkung war eine zeitverzögerte hoch signifikante Zellproliferationsreduktion erkennbar ( $p < 0,01$ , siehe Diagramm 4.9). Folglich muss die Selektivität des Rezeptorblockers überdacht werden. Diesbezüglich dokumentierten Mohammadi et al., dass SU5402 als ein selektiver FGFR-1-Inhibitor die Tyrosinkinaseaktivität des Insulin- und EGF-Rezeptors nicht tangieren kann [97]. Ob Interaktionen mit einem VEGF-Rezeptor existieren, wurde in der Literatur bis dato nicht diskutiert.

Einen anderen Erklärungsansatz liefern *in vitro* Untersuchungen von Stavri et al. und Tsai et al., die bFGF die Fähigkeit zuschrieben, die VEGF-Expression an humanen Tumor- sowie glatten Muskelzellen potenzieren zu können [127, 135]. Auch an ande-

ren Zelltypen ist dies belegt worden. An einer RPE-Zellkultur wurde, durch bFGF induziert, eine gesteigerte VEGF-Sekretion mittels aktivierter neurosensitiver L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$  Kanäle demonstriert. Die erhöhte intrazelluläre Calcium-Konzentration triggerte folglich die VEGF-Freigabe [116]. Weiterhin zeigte sich an retinalen Kapillarendothelzellen, dass bFGF die VEGFR-2-mRNA-Expression zeit- und dosisabhängig sowie die VEGF-Genexpression stimulieren kann. In diesen Prozess schienen die Proteinkinase C und der MAP-Kinase-Weg involviert [60]. Diese Ergebnisse können hypothetisch auf die vorliegende Studie übertragen werden. Möglicherweise inhibierte die Addition des Rezeptorblockers zeitverzögert endogen synthetisiertes bFGF und somit den additiven Effekt zwischen beiden Wachstumsfaktoren. Die fehlende Upregulation der VEGF-Expression und/oder Sekretion und seiner Rezeptoren zeigte sich in einer verminderten VEGF-Wirkung auf die Zellproliferation. Die endogene bFGF-Konzentration schien dagegen zu gering zu sein, um direkt proliferationsfördernde Effekte auslösen zu können. So wurden die Kontrollgruppen mit und ohne SU5402-Präinkubation nicht tangiert (siehe Diagramm 4.5).

Diese Hypothese bestätigt sich durch weitere Ergebnisse. SU5402 inhibierte ebenso den proliferationsfördernden Effekt durch die Kombination von VEGF und bFGF. Für beide Inkubationszeiten wurde, wenn auch äußerst signifikant, nur noch eine ca. 1,5-fache Stimulation im Vergleich zur Kontrollgruppe erzielt (143 %/ 149 %, jeweils  $p < 0,001$ , siehe Tabelle 4.3 und Diagramm 4.5). Bezogen auf das absolute, kombinierte Wachstum von VEGF und bFGF war jeweils eine äußerst signifikante Inhibierung sichtbar (siehe Diagramm 4.11). SU5402 blockierte demnach endogen und exogen vorhandenes bFGF und inhibierte zusätzlich den auf VEGF ausgeübten Triggereffekt. Bezogen auf die kombinierte Anwendung von VEGF und bFGF agierte SU5402 mit 143 % bzw. 149 % Zellproliferation (siehe Diagramm 4.5) leicht potenter als SU5416 mit 164 % bzw. 152 % Zellproliferation (siehe Diagramm 4.3).

### 5.3.5 Wirkungsmodulation durch die kombinierte Anwendung von SU5416 und SU5402

Hinsichtlich der gemeinsamen Präinkubation von SU5416 und SU5402 wurde die Frage verfolgt, ob ein möglicher synergistischer inhibitorischer Effekt auf die Zellproliferation humaner RPE-Zellen existiert. Die bestehende Literatur lieferte diesbezüglich keinen Hinweis.

Die kombinierte Applikation beider Rezeptorblocker erlaubte keine signifikante Stimulation der Zellproliferation. Unabhängig von der Inkubationszeit oder zuvor applizierten Wachstumsfaktoren stagnierte der Zellwert für alle Versuchsreihen auf Kontrollniveau (siehe Tabelle 4.4 und Diagramm 4.7). Im Vergleich zum kombinierten, relativen Wachstum nach Applikation beider Wachstumsfaktoren (190 % /313 % Zellproliferation, siehe Diagramm 4.1) konnten nur noch 98 % /97 % Zellproliferation erreicht werden (siehe Diagramm 4.7). Bezogen auf das absolute kombinierte Wachstum von VEGF und bFGF wurden für beide Versuchszeiten eine äußerst signifikante Inhibierung erzielt (jeweils  $p < 0,001$ , siehe Diagramm 4.11). Die kombinierte Anwendung beider Rezeptorblocker schaltete demnach, endogen und/oder exogen induzierte synergistische Effekte zwischen VEGF und bFGF aus und bestätigte die Existenz einer additiven Wechselwirkung. Erneut wird die Beteiligung des VEGFR-2 und FGFR-1 an der Zellproliferationsregulation humaner RPE-Zellen belegt. Diese Aspekte werden zusätzlich durch folgende Ergebnisse unterstrichen. Der alleinigen Präinkubation mit SU5402 gelang keine vollständige Inhibierung des proliferationsfördernden bFGF-Effekts (siehe Diagramm 4.5). Erst durch die kombinierte Applikation mit dem VEGFR-2-Inhibitor konnte eine komplette proliferationshemmende Wirkung erzielt werden (siehe Diagramm 4.7). Wie oben bereits beschrieben, kommen zwei Erklärungsansätze in Betracht. Zum einen geht durch die Blockade endogen synthetisierten VEGFs ein positiver Triggereffekt auf bFGF verloren. Zum anderen kann endogen blockiertes VEGF nicht, durch bFGF induziert, upreguliert werden. Letzlich ergibt sich die Frage, welches Erklärungsmodell *in vivo* zum Tragen kommt. Die vorliegende Studie kann diesbezüglich keine Aussage treffen.

### 5.3.6 Morphologische Modifikationen

Nachweislich fördert bFGF nicht nur die zelluläre Proliferation und Migration, sondern beeinflusst auch deren Morphologie. Bovine korneale Endothelzellen verloren nach einer *in vitro* Behandlung mit bFGF ihre hexagonale bis polygonale Form zugunsten einer langgestreckten, fibroblastenähnlichen Form mit zarten Zytoplasmaausläufern [50, 55]. RPE-Zellen von Molchen zeigten nach bFGF-Inkubation die Ausbildung von langgestreckten, neuronenähnlichen Fortsätzen sowie einen Melaningranulaverlust [95]. Ferner gelten RPE-Zellen als postmitotisch, so dass die Proliferation *in vitro* einen atypischen Zustand darstellt. Dabei besteht die Möglichkeit, dass die Zellen dedifferenzieren und ihre ursprünglichen Merkmale verlieren. Solche Dedifferenzierungsvorgänge manifestieren sich in morphologischen Zellveränderungen, so dass Zellen höherer Passagen und zunehmenden Alters einem fibroblastoiden Phänotyp entsprechen [136]. Der Verlust ihrer Pigmentierung ist bei Erreichen der Zellkonfluenz ebenso beschrieben [54].

Auch die Wahl der Mediumkomponenten, des Serums sowie deren Konzentrationen haben nachweislich einen entscheidenden Einfluss auf die Vitalität, Morphologie und Wachstum der Zellen. Bei einer Reduktion des Serumanteils müssen zelluläre Veränderungen in Betracht gezogen werden, die die Morphologie, den Karyotyp oder auch Oberflächenmarker betreffen. Dies ist für die vorliegende Studie insofern relevant, da bei Beginn der Versuchsansätze der FCS-Serumanteil auf 0,1 % reduziert wurde. O. g. Veränderungen werden durch die in Kapitel 4.1 und 4.2 dokumentierten Beobachtungen bestätigt. Diese können auch auf die Wirkung von VEGF übertragen werden, allerdings in geringerer Ausprägung. Außerdem waren morphologische Modifikationen trotz Applikation der jeweiligen Rezeptorblocker (SU5416/SU5402) auffällig.

## 5.4 Schlussfolgerung

Die vorliegende experimentelle Studie ist hinsichtlich des Proliferationsverhaltens humaner RPE-Zellen sowie methodischer Strukturen mit den Daten anderer Autoren vergleichbar. Mit Hilfe der statistischen *t*-Test-Analyse für zwei unabhängige Stichproben sowie der multiplen Testung unter Anwendung der Bonferroni-Korrektur wurde für VEGF und bFGF signifikant nachgewiesen, dass beide als potente, zeitabhängige Stimuli der RPE-Zellproliferation verstanden werden können. bFGF konnte dabei eine stärkere Wirkung zugeschrieben werden. Korrespondierend zu den Ergebnissen bereits existierender Studien bestätigte sich eine synergistisch mitogene Aktivität zwischen beiden Wachstumsfaktoren *in vitro*. Die Applikation beider Rezeptorblocker (SU5416 bzw. SU5402) verdeutlichte deren Inhibitionspotential, VEGF- und/oder bFGF-induzierte proliferationsfördernde Effekte signifikant zu reduzieren und stellt einen Ansatzpunkt zur therapeutischen Intervention dar. SU5402 agierte hierbei potenter als SU5416. Ferner konnte die maßgebliche Beteiligung von VEGFR-2 sowie FGFR-1 an der Zellproliferationsregulierung humaner RPE-Zellen *in vitro* belegt werden.

Trotz Selektivität zeigten beide Rezeptorblocker Interaktionen mit Zellen, die mit dem jeweils anderen Wachstumsfaktor inkubiert wurden. Ein Erklärungsmodell hierfür bietet die Vorstellung, dass im Rahmen der additiven Wechselwirkung zwischen VEGF und bFGF die Upregulation des einen Wachstumsfaktors durch den jeweils anderen, endogen synthetisierten, realisiert wird. Deren Inhibierung resultierte folglich in einem Verlust des Triggereffekts mit reduzierter Zellproliferation. Die vorliegenden Ergebnisse geben Hinweis darauf, dass neben VEGF auch bFGF die Fähigkeit besitzt, den jeweils anderen Wachstumsfaktor *in vitro* triggern zu können. Diese Assoziation wurde auch an anderen Zellkulturmodellen diskutiert [57, 127, 135, 116, 60].

Aufgrund des Studiendesigns und Versuchsaufbaus dieser Arbeit konnte keine Verifizierung der molekularen Mechanismen vorgenommen werden, die eine Aufschlüsselung der zu Grunde liegenden intrazellulären Signalwege an RPE-Zellen erlaubt. Diesbezüglich bleibt unbeantwortet, ob ein zwischen VEGF und bFGF existierender Synergismus in Form eines wechselseitigen Triggereffekts über eine gesteigerte Expression/Sekretion

der Wachstumsfaktoren und ihrer Rezeptoren und/oder eine modifizierte Rezeptoraffinität reguliert wird. Unter Berücksichtigung, dass *in vitro* Untersuchungen nicht unmittelbar auf den menschlichen Organismus übertragen werden können, repräsentiert die vorliegende Studie nur einen Teil der Regulationsmechanismen humaner RPE-Zellen in Anwesenheit von VEGF und bFGF im Hinblick auf das Proliferationsverhalten. Zur weiteren Verifizierung des Einflusses beider Wachstumsfaktoren auf das okuläre retinale Zellsystem sind zusätzliche Studien angeraten, welche die komplexen zellulären sowie molekularen Mechanismen analysieren.



## 6 Zusammenfassung

Das menschliche retinale Pigmentepithel (RPE) umfasst *in vivo* ein amitotisches Zellgewebe. Pathologische Prozesse resultieren in einer RPE-Zellaktivierung, die sich als Zellproliferation präsentiert. Wachstumsfaktoren wie VEGF und bFGF initiieren und modulieren dabei maßgeblich die Zellproliferation von RPE-Zellen *in vitro* und *in vivo*. Während hinreichend Belege existieren, dass beide Wachstumsfaktoren bedeutsame Mediatoren okulärer Erkrankungen darstellen, werden die zu Grunde liegenden, zellulären Mechanismen nur unzureichend verstanden.

Die vorliegende experimentelle Arbeit fokussierte die Regulationsmechanismen von RPE-Zellen in Anwesenheit beider Wachstumsfaktoren bezüglich des Proliferationsverhaltens *in vitro*. Den Schwerpunkt stellte die Differenzierung möglicher Interaktionen zwischen VEGF und bFGF sowie potentieller Inhibitionskräfte spezifischer Rezeptorblocker (SU5416/SU5402) dar.

Als Versuchsmaterial dienten humane RPE-Zellen erster Passage in der Zellkultur. Die Beurteilung der Wirkungsmodulationen entsprechender Agenzien erfolgte zeitabhängig über die Berechnung der Zellproliferation mittels Zellzählung.

Die Basisdaten der vorliegenden Arbeit hinsichtlich des Studiendesigns, applizierter Additiva und deren Konzentrationsangaben sind mit Studien anderer Autoren vergleichbar.

Durch die Anwendung des *t*-Tests für zwei unabhängige Stichproben sowie im Rahmen der multiplen Testung unter Anwendung der Bonferroni-Korrektur konnte signifikant belegt werden, dass VEGF und bFGF die Proliferation humaner RPE-Zellen *in vitro* zeitabhängig stimulieren und regulieren. bFGF konnte dabei die stärkere Wirkung zugeschrieben werden. Ferner lieferten die Ergebnisse Hinweise für die Existenz eines synergistisch mitogenen Effektes zwischen beiden Wachstumsfaktoren.

Mittels Präinkubation konnten die Rezeptorblocker SU5416 bzw. SU5402 die, VEGF- bzw. bFGF-assoziierten, proliferationsfördernden Effekte *in vitro* zeitabhängig signifikant reduzieren. Eine auf Kontrollniveau stagnierende Zellproliferation wurde durch den kombinierten Einsatz beider Inhibitoren vermittelt. Dies könnte als Ansatzpunkt für die Entwicklung alternativer Behandlungsstrategien okulärer Pathologien verstanden werden, in denen VEGF und/oder bFGF involviert sind. Möglicherweise stellt die pharmakologische Intervention mittels synthetischer Agenzien wie SU5416 oder SU5402 einen therapeutischen Vorteil oder eine Ergänzung gegenüber herkömmlichen Therapieoptionen dar.

Neben ihrer spezifischen Inhibitionskraft zeigten beide Rezeptorblocker eine unselektive Wirkung auf Zellen, die mit dem jeweils anderen Wachstumsfaktor inkubiert wurden. Ein Erklärungsmodell für dieses beobachtete Phänomen basiert auf der Vorstellung, dass die synergistische Wirkung zwischen VEGF und bFGF über einen wechselseitigen Triggereffekt realisiert wird, an dem endogen synthetisierte wie auch exogene Wachstumsfaktoren beteiligt sind. Welche intrazellulären und molekularen Mechanismen hierbei zu Grunde liegen, kann die vorliegende Arbeit nicht verifizieren. Unter Berücksichtigung bereits existierender Studien kann eine wechselseitige Upregulation über eine gesteigerte Sekretionsmenge und/oder vermehrte Expression des Wachstumsfaktors und seines Rezeptors sowie modifizierte Rezeptoraffinitäten vermutet werden.

Die vorliegenden Ergebnisse könnten dazu beitragen, die komplexen, *in vivo* existierenden Interaktionen verschiedener Wachstumsfaktoren im Rahmen okulärer Pathologien besser zu verstehen und einen Bruchteil eines umfassenden Netzwerkes widerzuspiegeln.

Hierbei ist zu beachten, dass das Zellverhalten *in vitro* von dem *in vivo* differiert, da in Zellkulturen multiple Faktoren das Resultat beeinflussen können. Weiterführende Untersuchungen müssen dahin zielen, die proliferationsinhibitorischen Kapazitäten synthetischer Agenzien wie SU5416 und SU5402 auf die *in vivo* Situation zu übertragen und zu optimieren. Ferner sollte ein Fokus künftiger Studien die Evaluierung und Quantifizierung beteiligter Signaltransduktionswege, molekularer Mechanismen und möglicher Regulationssysteme im okulären retinalen Zellsystem sein.

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] ABLONCZY, Z. ; CROSSON, C.E.: VEGF modulation of retinal pigment epithelium resistance. In: *Exp Eye Res* 85 (2007), S. 762–771
- [2] ADAMIS, A.P. ; AIELLO, L.P. ; D'AMATO, R.A.: Angiogenesis and ophthalmic disease. In: *Angiogenesis* 3 (1999), S. 9–14
- [3] ADAMIS, A.P. ; MILLER, J.W. ; BERNAL, M.T. ; ET AL.: Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. In: *Am J Ophthalmol* 15 (1994), S. 445–450
- [4] ADAMIS, A.P. ; SHIMA, D.T. ; TOLENTINO, M.J. ; ET AL.: Inhibition of vascular endothelial growth factor prevents retinal ischemia-associated iris neovascularization in a nonhuman primate. In: *Arch Ophthalmol* 114 (1996), S. 66–71
- [5] ADAMIS, A.P. ; SHIMA, D.T. ; YEO, K.T. ; ET AL.: Synthesis and secretion of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human retinal pigment epithelial cells. In: *Biochem Biophys Res Commun* 193 (1993), S. 631–638
- [6] AIELLO, L.P. ; PIERCE, E.A. ; FOLEY, E.D. ; ET AL.: Suppression of retinal neovascularization in vivo by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins. In: *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 92 (1995), S. 10457–10461
- [7] AISENBREY, S. ; ZIEMSEN, F. ; VÖLKER, M. ; ET AL.: Intravitreal bevacizumab (Avastin) for occult choroidal neovascularization in age-related macular degeneration. In: *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 245 (2007), S. 941–948
- [8] ALBERT, D.M. ; TSO, M.O. ; RABSON, A.S.: In vitro growth of pure cultures of retinal pigment epithelium. In: *Arch Ophthalmol* 88 (1988), S. 63–69

- [9] ALGVERE, P. V. ; STEEN, B. ; SEREGARD, S. ; KVANTA, A.: A prospective study on intravitreal bevacizumab (Avastin) for neovascular age-related macular degeneration of different durations. In: *Acta Ophthalmol* 86 (2008), S. 482–489
- [10] AMALRIC, F. ; BOUCHE, G. ; BONNET, H. ; ET AL.: Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) in the nucleus: Translocation process and targets. In: *Biochem Pharmacol* 47 (1994), S. 111–115
- [11] AMANO, S. ; ROHAN, R. ; KUROKI, M. ; TOLENTINO, M. ; ADAMIS, A.P.: Requirement for vascular endothelial growth factor in wound-and inflammation-related corneal neovascularization. In: *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39 (1998), S. 18–22
- [12] AMIN, R. ; PUKLIN, J.E. ; FRANK, R.N.: Growth factor localization in choroidal neovascular membranes of age-related macular degeneration. In: *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35 (1994), S. 3178–3188
- [13] BAEHR, W. ; WU, S.M. ; BIRD, A.C. ; PALCZEWSKI, K.: The retinoid cycle and retina disease. In: *Vis Res* 43 (2003), S. 2957–2958
- [14] BAIRD, A. ; BOHLEN, F.: Fibroblast growth factors. In: SPORN, M.B. (Hrsg.) ; ROBERTS, A.B. (Hrsg.): *In Peptide Growth Factors and Their Receptors I*. Springer Verlag Berlin, 1991, S. 369–418
- [15] BAIRD, A. ; ESCH, F. ; GOSPODAROWICZ, D. ; GUILLEMIN, R.: Retina- and eye-derived endothelial cell growth factors: partial molecular characterization and identity with acidic and basic fibroblast growth factors. In: *Biochemistry* 24 (1985), S. 7855–7860
- [16] BALDWIN, M.E. ; STACKER, S.A. ; ACHEN, M.G.: Molecular control of lymphangiogenesis. In: *Bioessays* 24 (2002), S. 1030–1040
- [17] BASHSHUR, Z.F. ; HADDAD, Z.A. ; SCHAKAL, A. ; JAAFAR, R.F. ; SAAB, M. ; NOUREDDIN, B.N.: Intravitreal bevacizumab for treatment of neovascular age-related macular degeneration: a one-year prospective study. In: *Am J Ophthalmol* 145 (2008), S. 249–256

- [18] BAZAN, N.G. ; GORDON, W.C. ; RODRIGUEZ DE TURCO, E.B.: Docosahexaenoic acid uptake and metabolism in photoreceptors: retinal conservation by an efficient retinal pigment epithelial cell-mediated recycling process. In: *Adv Exp Med Biol* (1992), S. 295–306
- [19] BIRK, D.M. ; BARBATO, J. ; MUREEBE, L. ; CHAER, R.A.: Current insights on the biology and clinical aspects of VEGF regulation. In: *Vasc Endovascular Surg* 42 (2008/2009), S. 517–530
- [20] BOK, D.: The retinal pigment epithelium: A versatile partner in vision. In: *J Cell Sci Suppl* 17 (1993), S. 189–195
- [21] BOST, L.M. ; AOTAKI-KEEN, A.E. ; HJELMELAND, L.M.: Cellular adhesion regulates bFGF gene expression in human retinal pigment epithelial cells. In: *Exp Eye Res* 58 (1994), S. 545–552
- [22] BOST, L.M. ; HJELMELAND, L.M.: Cell density regulates differential production of bFGF transcripts. In: *Growth Factors* 9 (1993), S. 195–203
- [23] BROWN, D.M. ; KAISER, P.K. ; MICHELS, M. ; ET AL.: Ranibizumab versus verteporfin for neovascular age-related macular degeneration. In: *N Engl J Med* 355 (2006), S. 1432–1444
- [24] BURKE, J.M.: Stimulation of DNA synthesis in human and bovine RPE by peptide growth-factors: the response to TNF-alpha and EGF is dependent upon culture density. In: *Curr Eye Res* 8 (1989), S. 1279–1286
- [25] CAMPOCHIARO, P.A.: Pathogenic mechanisms in proliferative vitreoretinopathy. In: *Arch Ophthalmol* 115 (1997), S. 237–241
- [26] CARDONES, A.R. ; BANEZ, L.L.: VEGF inhibitors in cancer therapy. In: *Curr Pharm Des* 12 (2006), S. 387–394
- [27] CHEN, Y.S. ; VINOES, S.A. ; CAMPOCHIARO, P.A.: Simultaneous expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor in epiretinal membranes. In: *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37 (1996), S. 120

- [28] CHO, M.L. ; JUNG, Y.O. ; MOON, Y.M.: Interleukin-18 induces production of vascular endothelial growth factor in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via AP-1-dependent pathways. In: *Immunol Lett* 103 (2006), S. 159–166
- [29] CIANCHI, F. ; CORTESINI, C. ; FANTAPPIE, O. ; ET AL.: Inducible nitric oxide synthase expression in human colorectal cancer: correlation with tumor angiogenesis. In: *Am J Pathol* 162 (2003), S. 793–801
- [30] CLAESSION-WELSH, L.: Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. In: *Biochem Soc Trans* 31 (2003), S. 20–24
- [31] CLAUSS, M. ; GERLACH, M. ; GERLACH, H. ; ET AL.: Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. In: *J Exp Med* 172 (1990), S. 1535–1545
- [32] CLEARY, C.A. ; JUNGKIM, S. ; RAVIKUMAR, K. ; KELLIHER, C. ; ACHESON, R.W. ; HICKEY-DWYER, M.: Intravitreal bevacizumab in the treatment of neovascular age-related macular degeneration, 6-and 9-month results. In: *Eye* 22 (2008), S. 82–86
- [33] COUFFINHAL, T. ; KEARNEY, M. ; WITZENBICHLER, B. ; ET AL.: Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF) in normal and atherosclerotic human arteries. In: *Am J Pathol* 150 (1997), S. 1673–1685
- [34] CROSS, M.J. ; CLAESSION-WELSH, L.: FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. In: *Trends Pharmacol Sci* 22 (2001), S. 201–207
- [35] ELMAN, M.J. ; AIELLO, L.P. ; BECK, R.W. ; ET AL.: Randomized trial evaluating ranibizumab plus prompt or deferred laser or triamcinolone plus prompt laser for diabetic macular edema. In: *Ophthalmology* 117 (2010), S. 1064–1077
- [36] ENGELMANN, K. ; FRIEDL, P.: Optimization of culture conditions for human corneal endothelial cells in vitro. In: *In Vitro Cell Dev Biol* 25 (1989), S. 1065–1072

- [37] ESSER, P. ; WELLER, M. ; BRESGEN, M. ; HEIMANN, K. ; WIEDEMANN, P.: The effects of basic fibroblast growth factor on bovine retinal pigment epithelium in vitro. In: *German J Ophthalmol* 1 (1992), S. 58–61
- [38] FERRARA, N.: Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. In: *Endocr Rev* 25 (2004), S. 581–611
- [39] FOLKMAN, J.: Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. In: *Semin Oncol* 29 (2002), S. 15–18
- [40] FONG, T.A. ; SHAWVER, L.K. ; SUN, L. ; ET AL.: SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization and growth of multiple tumor types. In: *Cancer Res* 59 (1999), S. 99–106
- [41] FRANK, R.N.: Growth factors in age-related macular degeneration: pathogenic and therapeutic implications. In: *Ophthalmol Res* 29 (1997), S. 341–353
- [42] FRANK, R.N. ; AMIN, R.H. ; ELIOTT, D. ; PUKLIN, J.E. ; ABRAMS, G.W.: Basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor are present in epiretinal and choroidal neovascular membranes. In: *Am J Ophthalmol* 122 (1996), S. 393–403
- [43] FREDJ-REYGRABELLET, D. ; BAUDOUIN, C.H. ; NEGRE, F. ; CARUELLE, J.P. ; GASTAUD, P. ; LAPALUS, P.: Acidic FGF and other growth factors in preretinal membranes from patients with diabetic retinopathy and proliferative vitreoretinopathy. In: *Ophthalmic Res* 23 (1991), S. 154–161
- [44] FUNG, A.E. ; LALWANI, G.A. ; ROSENFELD, P.J. ; ET AL.: An optical coherence tomography-guided, variable dosing regimen with intravitreal ranibizumab (Lucentis) for neovascular age-related macular degeneration. In: *Am J Ophthalmol* 143 (2007), S. 566–583

- [45] GALLO, O. ; MASINI, E. ; MORBIDELLI, L. ; ET AL.: Role of nitric oxide in angiogenesis and tumor progression in head and neck cancer. In: *J Natl Cancer Inst* 90 (1998), S. 587–596
- [46] GAMULESCU, M.A. ; RENNER, A.B. ; HELBIG, H.: Clinical manifestations of functional disturbances of the retinal pigment epithelium. In: *Ophthalmologe* 106 (2009), S. 305–310
- [47] GAUDRY, M. ; BREGERIE, O. ; ANDRIEU, V. ; EL BENNA, J. ; POCIDALO, M.A. ; HAKIM, J.: Intracellular pool of vascular endothelial growth factor in human neutrophils. In: *Blood* 90 (1997), S. 4153–4161
- [48] GLASS, C.A. ; HARPER, S.J. ; BATES, D.O.: The anti-angiogenic VEGF isoform VEGF165b transiently increases hydraulic conductivity, probably through VEGF receptor 1 in vivo. In: *J Physiol* 572 (2006), S. 243–257
- [49] GOSPODAROWICZ, D.: Isolation and characterization of acidic and basic fibroblast growth factor. In: *Methods Enzymol* 147 (1987), S. 106–119
- [50] GOSPODAROWICZ, D. ; MESCHER, A.L. ; BIRDWELL, C.: Stimulation of corneal endothelial cell proliferations in vitro by fibroblast and epidermal growth factors. In: *Exp Eye Res* 25 (1977), S. 75–89
- [51] GOTO, F. ; GOTO, K. ; WEINDEL, K. ; FOLKMAN, J.: Synergistic effects of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on the proliferation and cord formation of bovine capillary endothelial cells within collagen gels. In: *Lab Invest* 69 (1993), S. 508–517
- [52] GOYAL, S. ; LAVALLEY, M. ; SUBRAMANIAN, M.L.: Meta-analysis and review on the effect of bevacizumab in diabetic macular edema. In: *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 249 (2011), S. 15–27
- [53] GRAGODAS, E.S. ; ADAMIS, A.P. ; CUNNINGHAM, E.T. ; FEINSOD, M. ; GUYER, D.R.: VEGF-Inhibition study in ocular neovascularization clinical trial group: Pe-



- gaptanib for neovascular age-related macular degeneration. In: *N Engl J Med* 351 (2004), S. 2805–2816
- [54] GRISANTI, S. ; ESSER, P. ; SCHRAERMAYER, U.: Retinal pigment epithelial cells: autocrine and paracrine stimulation of extracellular matrix contraction. In: *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 235 (1997), S. 587–598
- [55] GU, X. ; SEONG, G.J. ; LEE, Y.G. ; KAY, E.P.: Fibroblast growth factor 2 uses distinct signaling pathways for cell proliferation and cell shape changes in corneal endothelial cells. In: *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37 (1996), S. 2326–2334
- [56] GUERRIN, M. ; MOUKADIRI, H. ; CHOLLET, P. ; ET AL.: Vasculotropin/vascular endothelial growth factor is an autocrine growth factor for human retinal pigment epithelial cells cultured in vitro. In: *J Cell Physiol* 164 (1995), S. 385–394
- [57] GUERRIN, M. ; SCOTET, E. ; MALECAZE, F. ; HOUSSAINT, E. ; PLÖUET, J.: Over-expression of vascular endothelial growth factor induces cell transformation in cooperation with fibroblast growth factor 2. In: *Oncogene* 14 (1997), S. 463–471
- [58] HACKETT, S.F. ; SCHOENFELD, C.L. ; FREUND, J. ; GOTTSCH, J.D. ; BHARGARVE, S. ; CAMPOCHIARO, P.A.: Neurotrophic factors, cytokines and stress increase expression of basic fibroblast growth factor in retinal pigmented epithelial cells. In: *Exp Eye Res* 64 (1997), S. 865–873
- [59] HAMANN, S.: Molecular mechanisms of water transport in the eye. In: *Int Rev Cytol* 215 (2002), S. 395–431
- [60] HATA, Y. ; ROOK, S.L. ; AIELLO, L.P.: Basic fibroblast growth factor induces expression of VEGF receptor KDR through a protein kinase C and p44/p42 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. In: *Diabetes* 48 (1999), S. 1145–1155
- [61] HECQUET, C. ; LEFEVRE, G. ; VALTINK, M. ; ENGELMANN, K. ; MASCARELLI, F.: Activation and role of MAP kinase-dependent pathways in retinal pigment epithelial

- cells: ERK and RPE cell proliferation. In: *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43 (2002), S. 3091–3098
- [62] HECQUET, C. ; MORISSET, S. ; LORANS, G. ; PLOUET, J. ; ADOLPHE, M.: Effects of acidic and basic fibroblast growth factor on the proliferation of rabbit corneal cells. In: *Curr Eye Res* 9 (1990), S. 429–433
- [63] HISCOTT, P. ; GRAY, R. ; GRIERSON, I. ; GREGOR, Z.: Cytokeratin-containing cells in proliferative diabetic retinopathy membranes. In: *Brit J Ophthalmol* 78 (1994), S. 219–222
- [64] HOLZ, F.G. ; PAULEIKHOFF, D. ; KLEIN, R. ; BIRD, A.C.: Pathogenesis of lesions in late age-related macular disease. In: *Am J Ophthalmol* 137 (2004), S. 504–510
- [65] HOPPENREIJS, V.P. ; PELS, E. ; VRENSSEN, G.F. ; TREFFERS, W.F.: Basic fibroblast growth factor stimulates corneal endothelial cell growth and endothelial wound healing of human corneas. In: *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35 (1994), S. 931–944
- [66] HOWELL, W.M. ; ALI, S. ; ROSE-ZERILLI, M.J. ; YE, S.: VEGF polymorphisms and severity of atherosclerosis. In: *J Med Genet* 42 (2005), S. 485–490
- [67] INOUE, M. ; ITOH, H. ; UEDA, M. ; ET AL.: Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human coronary atherosclerotic lesions: possible pathophysiological significance of VEGF in progression of atherosclerosis. In: *Circulation* 98 (1998), S. 2108–2116
- [68] ISHIDA, S. ; USUI, T. ; YAMASHIRO, K. ; ET AL.: VEGF164-mediated inflammation is required for pathological, but not physiological, ischemia-induced retinal neovascularization. In: *J Exp Med* 198 (2003), S. 483–489
- [69] ITOKAWA, T. ; NOKIHARA, H. ; NISHIOKA, Y. ; ET AL.: Antiangiogenic effect by SU5416 is partly attributable to inhibition of Flt-1 receptor signaling. In: *Mol Cancer Ther* 5 (2002), S. 295–302

- [70] KANNO, S. ; ODA, N. ; ABE, M. ; ET AL.: Roles of two VEGF receptors, Flt-1 and KDR, in the signal transduction of VEGF effects in human vascular endothelial cells. In: *Oncogene* 19 (2000), S. 2138–2146
- [71] KAVEN, C. ; AMANN, J. ; SPRAUL, C.W. ; LANG, G.K. ; LANG, G.E.: Synergistic effect of IGF-1 and PDGF on the migration of RPE cells in vitro. In: *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39 (1998), S. 734
- [72] KAVEN, C.W. ; SPRAUL, C.W. ; ZAVAZAVA, N.K. ; LANG, G.K. ; LANG, G.E.: Growth factor combinations modulate human retinal pigment epithelial cell proliferation. In: *Current Eye Res* 20 (2000), S. 480–487
- [73] KHALIQ, A. ; JARVIS-EVANS, J. ; MCLEOD, D. ; BOULTON, M.: Oxygen modulates the response of the retinal pigment epithelium to basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor by receptor regulation. In: *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37 (1996), S. 436–443
- [74] KHURANA, R. ; SIMONS, M.: Insights from angiogenesis trials using fibroblast growth factor for advanced arteriosclerotic disease. In: *Trends Cardiovasc Med* 13 (2003), S. 116–122
- [75] KIM, I. ; RYAN, A.M. ; ROHAN, R. ; ET AL.: Constitutive expression of VEGF, VEGFR-1, and VEGFR-2 in normal eyes. In: *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 (1999), S. 2115–2121
- [76] KLIFFEN, M. ; SHARMA, H.S. ; MOOY, C.M. ; KERKVLIT, S. ; DE JONG, P.T.: Increased expression of angiogenic growth factors in age-related maculopathy. In: *Br J Ophthalmol* 81 (1997), S. 154–162
- [77] KRZYSTOLI, M.G. ; AFSHARI, M.A. ; ADAMIS, A.P. ; ET AL.: Prevention of experimental choroidal neovascularization with intravitreal anti-vascular endothelial growth factor antibody fragment. In: *Arch Ophthalmol* 120 (2002), S. 338–346

- [78] KURTZ, M.J. ; EDWARDS, R.B.: Influence of bicarbonate and insulin on pigment synthesis by cultured adult human retinal pigment epithelial cells. In: *Exp Eye Res* 53 (1991), S. 681–684
- [79] LAVAIL, M.M.: Rod outer segment disk shedding in rat retina: relationship to cyclic lighting. In: *Science* 194 (1976), S. 1071–1074
- [80] LESCHEY, K.H. ; HACKETT, S.F. ; SINGER, J.H. ; CAMPOCHIARO, P.A.: Growth factor responsiveness of human retinal pigment epithelial cells. In: *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31 (1990), S. 839–846
- [81] LEUNG, D.W. ; CACHIANES, G. ; KUANG, W.J. ; GOEDDEL, D.V. ; FERRARA, N.: Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. In: *Science* 246 (1989), S. 1306–1309
- [82] LÖFFLER, G.: Endokrine Gewebe I: Grundlagen der endokrinen Regulation von Lebensvorgängen. In: G.LÖFFLER (Hrsg.) ; PETRIDES, P.E. (Hrsg.): *Biochemie und Pathobiochemie. 5. Auflage.* Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1997, S. 780
- [83] LOPEZ, P.F ; SIPPY, B.D. ; LAMBERT, H.M. ; THACH, A.B. ; HINTON, D.R.: Transdifferentiated retinal pigment epithelial cells are immunoreactive for vascular endothelial growth factor in surgically excised age-related macular degeneration-related choroidal neovascular membranes. In: *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37 (1996), S. 855–868
- [84] MACHEMER, R.: Proliferative vitreoretinopathy (PVR): a personal account of its pathogenesis and treatment. Proctor lecture. In: *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29 (1988), S. 1771–1783
- [85] MACHEMER, R.: Proliferative Vitreoretinopathy (PVR): a personal account of its management and treatment. In: HEIMANN, K. (Hrsg.) ; WIEDEMANN, P. (Hrsg.): *Proliferative Vitreoretinopathy.* Kaden, Heidelberg, Germany, 1989, S. 3–15

- [86] MANDELCORN, M.S. ; MACHEMER, R. ; FINEBERG, E. ; HERSCH, S.B.: Proliferation and metaplasia of intravitreal pigment epithelium cell autotransplants. In: *Am J Ophthalmol* 80 (1975), S. 227–237
- [87] MARMOR, M.F.: Mechanisms of fluid accumulation in retinal edema. In: *Doc Ophthalmol* 97 (1999), S. 239–249
- [88] MASSIN, P. ; BANDELLO, F. ; GARWEG, J.G. ; ET AL.: Safety and efficacy of ranibizumab in diabetic macular edema (RESOLVE study): a 12-month, randomized, controlled, double-masked, multicenter phase II study. In: *Diabetes Care* 33 (2010), S. 2399–2405
- [89] MATSUMOTO, T. ; CLAEISSON-WELSH, L.: VEGF receptor signal transduction. In: *Sci STKE* (2001), S. RE21
- [90] MATTEI, M.G. ; BORG, J.P. ; ROSNET, O. ; MARME, D. ; BIRNBAUM, D.: Assignment of vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta growth factor (PLGF) genes to human chromosome 6p12-p21 and 14q24-q31 regions, respectively. In: *Genomics* 32 (1996), S. 168–169
- [91] MELDER, R.J. ; KOENIG, G.C. ; WITWER, B.P. ; SAFABAKHSH, N. ; MUNN, L.L. ; JAIN, R.K.: During angiogenesis, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor regulate natural killer cell adhesion to tumor endothelium. In: *Nat Med* 2 (1996), S. 992–997
- [92] MICHAELIDES, M. ; KAINES, A. ; HAMILTON, R.D. ; ET AL.: A prospective randomized trial of intravitreal Bevacizumab or laser therapy in the management of diabetic macular edema (BOLT study) 12-month data: report 2. In: *Ophthalmology* 117 (2010), S. 1078–1086
- [93] MIDY, V. ; PLOUËT, J.: Vasculotropin/vascular endothelial growth factor induces differentiation in cultured osteoblasts. In: *Biochem Biophys Res Commun* 199 (1994), S. 380–386

- [94] MILLER, J.W. ; ADAMIS, A.P. ; SHIMA, D.T. ; ET AL.: Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is temporally and spatially correlated with ocular angiogenesis in a primate model. In: *Am J Pathol* 145 (1994), S. 574–584
- [95] MITSUDA, S. ; YOSHII, C. ; IKEGAMI, Y. ; ARAKI, M.: Tissue interaction between the retinal pigment epithelium and the choroid triggers retinal regeneration of the newt *Cynops pyrrhogaster*. In: *Dev Biol* 280 (2005), S. 122–32
- [96] MIYAMOTO, N. ; DE KOZAK, Y. ; NORMAND, N. ; ET AL.: PIGF-1 and VEGFR-1 pathway regulation of the external epithelial hemato-ocular barrier. A model for retinal edema. In: *Ophthalmic Res* 40 (2008), S. 203–7
- [97] MOHAMMADI, M. ; MCMAHON, G. ; SUN, L. ; ET AL.: Structures of the tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor in complex with inhibitors. In: *Science* 276 (1997), S. 955–960
- [98] MOSCATELLI, D.: High and low affinity binding sites for basic fibroblast growth factor on cultured cells: Absence of a role for low affinity binding in the stimulation of plasminogen activator production by bovine capillary endothelial cells. In: *J Cell Physiol* 131 (1987), S. 123–130
- [99] MOTZER, R.J. ; HUTSON, T.E. ; TOMCZAK, P. ; ET AL.: Sunitinib versus interferon alfa in metastasis renal-cell-carcinoma. In: *N Engl Med* 356 (2007), S. 115–124
- [100] NAGY, J.A. ; VASILE, E. ; FENG, D. ; ET AL.: Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. In: *J Exp Med* 196 (2002), S. 1497–1506
- [101] NASEMANN, J.: Netzhaut. In: SACHSENWEGER, M. (Hrsg.): *Augenheilkunde*. Hippokrates Verlag Stuttgart, 1994, S. 292
- [102] NG, Y.S. ; KRILLEKE, D. ; SHIMA, D.T.: VEGF function in vascular pathogenesis. In: *Exp Cell Res* 312 (2006), S. 527–537
- [103] NGUYEN, Q.D. ; SHAH, S.M. ; HAFIZ, G. ; ET AL.: A phase I trial of an IV-administered vascular endothelial growth factor trap for treatment in patients with

- choroidal neovascularization due to age-related macular degeneration. In: *Ophthalmology* 113 (2006), S. 1521–1522
- [104] NISHIZUKA, Y.: The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. In: *Nature* 334 (1988), S. 661–665
- [105] NOMA, H. ; MINAMOTO, A. ; FUNATSU, H. ; ET AL.: Intravitreal levels of vascular endothelial growth factor and interleukin-6 are correlated with macular edema in branch retinal vein occlusion. In: *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 244 (2006), S. 309–315
- [106] ORNITZ, D.M. ; ITOH, N.: Fibroblast growth factors. In: *Genome Biol* 2 (2001), S. 3005.1–3005.12
- [107] PE'ER, J. ; SHWEIKI, D. ; ITIN, A. ; HEMO, I. ; GNESSIN, H. ; KESHET, E.: Hypoxia-induced expression of vascular endothelial growth factor by retinal cells is a common factor in neovascularizing ocular diseases. In: *Lab Invest* 72 (1995), S. 638–645
- [108] PEPPER, M.S. ; FERRARA, N. ; ORCI, L. ; MONTESANO, R.: Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. In: *Biochem Biophys Res Commun* 189 (1992), S. 824–831
- [109] PETRIDES, P.E.: Tumorgewebe. In: G.LÖFFLER (Hrsg.) ; PETRIDES, P.E. (Hrsg.): *Biochemie und Pathobiochemie. 5. Auflage.* Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1997, S. 1092
- [110] PFEFFER, B.A.: Improved methodology for cell culture of human and monkey retinal pigment epithelium. In: *Prog Retina Res* 10 (1991), S. 251–291
- [111] PLOUET, J. ; GOSPODAROWICZ, D.: Iris-derived melanocytes contain a growth factor that resembles basic fibroblast growth factor. In: *Exp Eye Res* 51 (1990), S. 519–529

- [112] RIECK, P. ; OLIVER, L. ; ENGELMANN, K. ; FUHRMANN, G. ; HARTMANN, C. ; COU-TOIS, Y.: The role of exogenous/endogenous basic growth factor (FGF2) and transforming growth factor beta (TGFbeta-1) on human corneal endothelial cells proliferation in vitro. In: *Exp Cell Res* 220 (1995), S. 36–46
- [113] ROBINSON, G.S. ; JU, M. ; SHIH, S.C. ; ET AL.: Nonvascular role for VEGF: VEGFR-1, 2 activity is critical for neural retinal development. In: *FASEB J* 15 (2001), S. 1215–1217
- [114] ROSENFELD, P.J. ; BROWN, D.M. ; HEIER, J.S. ; ET AL.: Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. In: *N Engl J Med* 355 (2006), S. 1419–1431
- [115] ROSENTHAL, R. ; HEIMANN, H. ; AGOSTINI, H. ; MARTIN, G. ; HANSEN, L.L. ; STRAUSS, O.: Ca<sup>2+</sup>-channels in retinal pigment epithelial cells regulate vascular endothelial growth factor secretion rates in health and disease. In: *Mol Viss* 13 (2007), S. 443–456
- [116] ROSENTHAL, R. ; MALEK, G. ; SALOMON, N. ; ET AL.: The fibroblast growth factor receptors, FGFR-1 and FGFR-2, mediate two independent signalling pathways in human retinal pigment epithelial cells. In: *Biochem Biophys Res Commun* 337 (2005), S. 241–247
- [117] SA, G. ; FOX, P.L.: Basic fibroblast growth factor-stimulated endothelial cell movement is mediated by a pertussis toxin-sensitive pathway regulating phospholipase A2 activity. In: *J Biol Chem* 269 (1994), S. 3219–3225
- [118] SCHOLL, H.P. ; FLECKENSTEIN, M. ; CHARBEL ISSA, P. ; KEILHAUER, L. ; HOLZ, F.G. ; WEBER, B.H.: An update on the genetics of age-related macular degeneration. In: *Mol Vis* 13 (2007), S. 196–205
- [119] SCHUTT, F. ; PAULEIKHOFF, D. ; HOLZ, E.G.: Vitamins and trace elements in age-related macular degeneration. Current recommendations, based on the results of the AREDS study. In: *Ophthalmologe* 99 (2002), S. 301–303



- [120] SCHWEGLER, J.S. ; KNORZ, M.C. ; AKKOYUN, I. ; LIESENHOFF, H.: Basic, not acidic fibroblast growth factor stimulates proliferation of cultured human retinal pigment epithelial cells. In: *Mol Vis.* 3 (1997), S. 195–203
- [121] SCOTT, P.A. ; GLEADLE, J.M. ; BICKNELL, R. ; HARRIS, A.L.: Role of the hypoxia sensing system, acidity and reproductive hormones in the variability of vascular endothelial growth factor induction in human breast carcinoma cell lines. In: *Int J Cancer* 75 (1998), S. 706–712
- [122] SENGER, D.R. ; GALLI, S.J. ; DVORAK, A.M. ; PERRUZI, C.A. ; HARVEY, V.S. ; DVORAK, H.F.: Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. In: *Science* 219 (1983), S. 983–985
- [123] SHAHEEN, R.M. ; DAVIS, D.W. ; LIU, W. ; ET AL.: Antiangiogenic therapy targeting the tyrosine kinase receptor for vascular endothelial growth factor receptor inhibits the growth of colon cancer liver metastasis and induces tumor and endothelial cell apoptosis. In: *Cancer Res* 59 (1999), S. 5412–5416
- [124] SHWEIKI, D. ; ITIN, A. ; SOFFER, D. ; KESHET, E.: Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. In: *Nature* 359 (1992), S. 843–845
- [125] SIVALINGAM, A. ; KENNEY, J. ; BROWN, G.C. ; BENSON, W.E. ; DONOSO, L.: Basic fibroblast growth factor levels in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. In: *Arch Ophthalmol* 108 (1990), S. 869–872
- [126] SPILSBURY, K. ; GARRETT, K.L. ; SHEN, W.Y. ; CONSTABLE, I.J. ; RAKOCZY, P.E.: Overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the retinal pigment epithelium leads to the development of choroidal neovascularisation. In: *Am J Pathol* 157 (2000), S. 135–144
- [127] STAVRI, G.T. ; ZACHARY, I.C. ; BASKERVILLE, P.A. ; MARTIN, J.F. ; ERUSALIMSKY, J.D.: Basic fibroblast growth factor upregulates the expression of vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells. Synergistic interaction with hypoxia. In: *Circulation* 92 (1995), S. 11–14

- [128] STEGMANN, T.J.: FGF-1, a human growth factor in the induction of neoangiogenesis. In: *Expert Opin Investig Drugs* 7 (1998), S. 2011–2015
- [129] STEINBERG, R.H.: Interactions between the retinal pigment epithelium and the neural retina. In: *Doc Ophthalmol* 60 (1985), S. 327–346
- [130] STERNFELD, M.D. ; ROBERTSON, J.E. ; SHIPLEY, G.D. ; TSAI, J. ; ROSENBAUM, J.T.: Cultured human retinal pigment epithelial cells express basic fibroblast growth factor and its receptor. In: *Curr Eye Res* 10 (1989), S. 1029–1037
- [131] STRAUSS, O.: The retinal pigment epithelium in visual function. In: *Physiol Rev* 85 (2005), S. 845–881
- [132] STRAUSS, O.: The role of retinal pigment epithelium in visual functions. In: *Ophthalmologie* 106 (2009), S. 299–304
- [133] STREILEIN, J.W. ; MA, N. ; WENKEL, H. ; NG, T.F. ; ZAMIRI, P.: Immunobiology and privilege of neuronal retina and pigment epithelium transplants. In: *Vision Res* 42 (2002), S. 487–495
- [134] TAKEDA, A. ; HATA, Y. ; SHIOSE, S. ; ET AL.: Suppression of experimental choroidal neovascularization utilizing KDR selective receptor tyrosine kinase inhibitor. In: *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 241 (2003), S. 765–772
- [135] TSAI, J.C. ; GOLDMAN, C.K. ; GILLESPIE, G.Y.: Vascular endothelial growth factor in human glioma cell lines: induced secretion by EGF, PDGF-BB, and bFGF. In: *J Neurosurg* 82 (1995), S. 864–873
- [136] VALTINK, M. ; ENGELMANN, K. ; STRAUSS, O. ; ET AL.: Physiological features of primary cultures and subcultures of human retinal pigment epithelial cells before and after cryopreservation for cell transplantation. In: *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 237 (1999), S. 1001–1006
- [137] VENTURA, A.C. ; BÖHNKE, M. ; LÖLIGER, C. ; KÜHNEL, P. ; WINTER, R. ; ENGELMANN, K.: HLA-typing of donor corneas with extended post mortem time. In: *Ophthalmologie* 93 (1996), S. 262–267

- [138] WAGONER, L.E. ; MERRILL, W. ; JACOBS, J. ; ET AL.: Angiogenesis protein therapy with human fibroblast growth factor (FGF-1): Results of a phase I open label, dose escalation study in subjects with CAD not eligible for PCI or CABG. In: *Circulation* 116 (2007), S. 443
- [139] WALTENBERGER, J. ; CLAESSION-WELSH, L. ; SIEGBAHN, A. ; SHIBUYA, M. ; HELDIN, C.H.: Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. In: *J Biol Chem* 269 (1994), S. 26988–26995
- [140] WILLETT, C.G. ; BOUCHER, Y. ; DI TOMASO, E. ; ET AL.: Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivasular effects in human rectal cancer. In: *Nat Med* 10 (2004), S. 145–147
- [141] WILSON, S.E. ; WALKER, J.W. ; CHWANG, E.L. ; HE, Y.G.: Hepatocyte growth factor, keratinocyte growth factor, their receptors, fibroblast growth factor receptor-2, and the cells of the cornea. In: *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34 (1993), S. 2544–2561
- [142] WORMSTONE, I.M. ; DEL RIO-TSONIS, K. ; MCMAHON, G. ; ET AL.: FGF: an auto-crine regulator of human lens cell growth independent of added stimuli. In: *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42 (2001), S. 1305–1311
- [143] WU, L. ; MARTINEZ-CASTELLANOS, M.A. ; QUIROZ-MERCADO, H. ; ET AL.: Twelve-month safety of intravitreal injections of bevacizumab (Avastin): results of the Pan-American Collaborative Retina Study Group (PACORES). In: *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 246 (2008), S. 81–87
- [144] WU, L.W. ; MAYO, L.D. ; DUNBAR, J.D. ; ET AL.: Utilization of distinct signalling pathways by receptors for vascular endothelial cell growth factor and other mitogens in the induction of endothelial cell proliferation. In: *J Biol Chem* 275 (2000), S. 5096–5103
- [145] XIE, K. ; WEI, D. ; SHI, Q. ; HUANG, S.: Constitutive and inducible expression and regulation of vascular endothelial growth factor. In: *Cytokine Growth Factor Rev* 15 (2004), S. 297–324

- [146] YAMAMOTO, C. ; OGATA, N. ; MATSUSHIMA, M. ; ET AL.: Gene expressions of basic fibroblast growth factor and its receptor in healing of rat retina after laser photocoagulation. In: *Jpn J Ophthalmol* 40 (1996), S. 480–490
- [147] YAYON, A. ; KLAGSBRUN, M. ; ESKO, J.D. ; LEDER, P.H. ; ORNITZ, D.M.: Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. In: *Cell* 64 (1991), S. 841–848
- [148] YEE, K.W. ; O'FARRELL, A.M. ; SMOLICH, B.D. ; ET AL.: SU5416 and SU5614 inhibit kinase activity of wild-type and mutant FLT3 receptor tyrosine kinase. In: *Blood* 100 (2002), S. 2941–2949
- [149] YLÄ-HERTTUALA, S. ; RISSANEN, T.T. ; VAJANTO, I. ; HARTIKAINEN, J.: Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. In: *J Am Coll Cardiol* 49 (2007), S. 1015–1026
- [150] ZACHARY, I. ; GLIKI, G.: Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. In: *Cardiovasc Res* 49 (2001), S. 568–581
- [151] ZINN, K. ; MARMOR, M.F.: In: *The retinal pigment epithelium*. Harvard University Press, Cambridge, 1979, S. 761–771

## Abkürzungsverzeichnis

### Maßeinheiten:

°C	Grad Celsius, Maßeinheit Temperatur
d	<i>dies</i> , Tag, Maßeinheit Zeit
h	<i>hora</i> , Stunde, Maßeinheit Zeit
kDa	Kilodalton, Maßeinheit Molekulargewicht
l	Liter, Maßeinheit Volumen
M	Molar, Maßeinheit Stoffmengenkonzentration
mM	Millimolar, Maßeinheit Stoffmengenkonzentration
mg	Milligramm, Maßeinheit Masse
min	Minute, Maßeinheit Zeit
ml	Milliliter, Maßeinheit Volumen
mm	Millimeter, Maßeinheit Länge
µg	Mikrogramm, Maßeinheit Masse
µl	Mikroliter, Maßeinheit Volumen
µM	Mikromolar, Maßeinheit Stoffmengenkonzentration
ng	Nanogramm, Maßeinheit Masse
pH	<i>potentia Hydrogenii</i> , pH-Wert, negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
U	Unit, Maßeinheit für enzymatische Aktivität

### Abkürzungen in alphabetischer Reihenfolge:

AMD	altersabhängige Makuladegeneration
AS	Aminosäuren
bzw.	beziehungsweise
CFH	<i>Complement Factor H</i> , Komplementfaktor H
CNTF	<i>Ciliary Neurotrophic Factor</i> , Ziliarer Neurotrophischer Wachstumsfaktor
CNV	chorioidale Neovaskularisation
CO <sub>2</sub>	chemische Formel für Kohlendioxid
d. h.	das heißt
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
EGF	<i>Endothelial Growth Factor</i> , Endothelialer Wachstumsfaktor
ERK	<i>Extracellular Signal Regulated Kinase</i> , extrazellulär regulierte Kinase
et al.	<i>et alii</i> bzw. <i>et aliae</i> , und andere
FasL CD95	<i>Apoptosis Receptor Ligand</i> , Ligand für den Apoptoserezeptor Fas
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> , fetales Kälberserum
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i> , Fibroblastenwachstumsfaktor
FGFR	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i> , Fibroblastenwachstumsfaktorrezeptor
GDP	Guanosindiphosphat
ggf.	gegebenenfalls
GTP	Guanosintriphosphat
HIF	<i>Hypoxia Inducible Factor</i> , hypoxieinduzierter Faktor
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i> , Hepatozytenwachstumsfaktor
IFN	Interferon
IgG, IgM, IgA	Immunglobuline
IGF	<i>Insulin Like Growth Factor</i> , insulinähnlicher Wachstumsfaktor

IL-1 bis 18	Interleukin-1 bis -18, Zytokine, von Leukozyten sezernierte Kommunikationsproteine
KGF	<i>Keratinocyte Growth Factor</i> , Keratinozytenwachstumsfaktor
LDGF	<i>Lens Epithelium Derived Growth Factor</i> , vom Linsenepithel gebildeter Wachstumsfaktor
MAP-Kinase	mitogen aktivierte Proteinkinase
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
MIF	Migrationsinhibierender Faktor
mRNA	<i>messenger Ribonucleic acid</i> , messenger Ribonukleinsäure
NO	chemische Formel für Stickstoffmonoxid
o. g.	oben genannt
paVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i> , von Blutplättchen freigesetzter Wachstumsfaktor
PEDF	<i>Pigment Epithelium Derived Factor</i> , neurotrophes, neuroprotektives und antiangiogenes Protein des Pigmentepithels
PDR	proliferative diabetische Retinopathie
PKC	Proteinkinase C
PIGF	<i>Placental Growth Factor</i> , plazentarer Wachstumsfaktor
PVR	proliferative Vitreoretinopathie
Raf	<i>Rapidly Growing Fibrosarcoma</i> , Proteinkinase des MAP-Kinase-Wegs
Ras	<i>Rat Sarcoma</i> , Proto-Onkogen, Proteinkinase des MAP-Kinase-Wegs
RPE	retinales Pigmentepithel
SD	standard deviation, Standardabweichung
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i> , Transformierender Wachstumsfaktor
TIMP-3	<i>Tissue Inhibitor Matrix Protease 3</i> , Protease-3-Inhibitor

TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> , Tumor Nekrose Faktor
TPO	Thrombopoeitin
u. a.	unter anderem
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> , Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor
VEGFR	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i> , Rezeptor für den Vaskulären Endothelialen Wachstumsfaktor
VPF	Vaskulärer Permeabilitätsfaktor
vs.	versus
z. B.	zum Beispiel



## Abbildungsverzeichnis

1.1	Schichtaufbau der Retina modifiziert nach Nasemann [101] . . . . .	8
1.2	Sekretion von Wachstumsfaktoren durch das RPE [132, 115] . . . . .	13
1.3	Up- und Downregulation des VEGFs [19] . . . . .	20
3.1	Schema für den Versuchsansatz: Proliferation unter VEGF, bFGF und deren Kombination . . . . .	44
3.2	Schema für den Versuchsansatz: Proliferation unter VEGF, bFGF und deren Kombination nach Zusatz von SU5416 . . . . .	46
3.3	Schema für den Versuchsansatz: Proliferation unter VEGF, bFGF und deren Kombination nach Zusatz von SU5402 . . . . .	48
3.4	Schema für den Versuchsansatz: Proliferation unter VEGF, bFGF und deren Kombination nach Zusatz von SU5416 und SU5402 . . . . .	50
4.1	Morphologische Veränderungen nach 144 h Inkubation . . . . .	57
4.2	Morphologische Veränderungen nach 144 h Inkubation mit SU5416 . . . . .	62
4.3	Morphologische Veränderungen nach 144 h Inkubation mit SU5402 . . . . .	67
4.4	Morphologische Veränderungen nach 144 h Inkubation mit SU5416 und SU5402 . . . . .	72

## Tabellenverzeichnis

1.1	Übersicht der wichtigsten Kompetenz- und Progressionsfaktoren [109] . .	16
1.2	Übersicht der VEGF-Rezeptoren modifiziert nach Birk et al. [19] . . . . .	18
1.3	Wichtigste Subtypen der FGF-Familie mit Genort und Funktion [106, 128]	27
4.1	Statistische Analyse der Wachstumsmodulation unter VEGF, bFGF und deren Kombination . . . . .	55
4.2	Statistische Analyse der Wachstumsmodulation unter VEGF, bFGF und deren Kombination nach Zusatz von SU5416 . . . . .	60
4.3	Statistische Analyse der Wachstumsmodulation unter VEGF, bFGF und deren Kombination nach Zusatz von SU5402 . . . . .	65
4.4	Statistische Analyse der Wachstumsmodulation unter VEGF, bFGF und deren Kombination nach Zusatz von SU5416 und SU5402 . . . . .	70

## Diagrammverzeichnis

4.1	Zeitabhängige relative Wachstumsmodulation durch VEGF, bFGF und deren Kombination . . . . .	55
4.2	Fehlerbalken für die zeitabhängige absolute Wachstumsmodulation durch VEGF, bFGF und deren Kombination . . . . .	56
4.3	Zeitabhängige relative Wachstumsmodulation unter VEGF, bFGF und deren Kombination nach Zusatz von SU5416 . . . . .	60
4.4	Fehlerbalken für die zeitabhängige absolute Wachstumsmodulation unter VEGF, bFGF und deren Kombination nach Zusatz von SU5416 . . . . .	61
4.5	Zeitabhängige relative Wachstumsmodulation unter VEGF, bFGF und deren Kombination nach Zusatz von SU5402 . . . . .	66
4.6	Fehlerbalken für die zeitabhängige absolute Wachstumsmodulation unter VEGF, bFGF und deren Kombination nach Zusatz von SU5402 . . . . .	66
4.7	Zeitabhängige relative Wachstumsmodulation unter VEGF, bFGF und deren Kombination nach Zusatz von SU5416 und SU5402 . . . . .	70
4.8	Fehlerbalken für die zeitabhängige absolute Wachstumsmodulation unter VEGF, bFGF u. deren Kombination nach Zusatz von SU5416 + SU5402 .	71
4.9	Selektive zeitabhängige Gegenüberstellung der absoluten Proliferation für VEGF . . . . .	76
4.10	Selektive zeitabhängige Gegenüberstellung der absoluten Proliferation für bFGF . . . . .	77
4.11	Selektive zeitabhängige Gegenüberstellung der absoluten Proliferation für VEGF und bFGF . . . . .	78

## **Eidesstattliche Erklärung**

„Ich, Stefanie Berndt, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Einfluss der Wachstumsfaktoren VEGF und bFGF sowie deren Rezeptorblocker auf die Proliferation humaner retinaler Pigmentepithelzellen in vitro selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, 11. September 2011

Stefanie Berndt

## **Curriculum Vitae**

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

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Peter Wolfgang Rieck für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas. Neben wertvollen Anregungen hat er durch seinen jederzeit gewährten Rat und seine engagierte wissenschaftliche Unterstützung diese Arbeit ermöglicht.

Für die praktische Begleitung und Hilfestellung im Zellkulturlabor danke ich Frau Sylvia Metzner. Durch ihre Kompetenz und stetige Hilfsbereitschaft wurde sie ein wichtiger Begleiter in allen Fragen der Laborarbeit.

Frau Christine Jaeckel danke ich für die Bereitstellung des Zellmaterials.

Ein weiterer Dank geht an Herrn Dr. U. Gauger für seine geduldige und zielorientierte Hilfestellung im Rahmen der statistischen Auswertung.

Ein herzlicher Dank richtet sich an meine Familie, insbesondere an meine Schwester Anja Berndt für Ihren unumstrittenen Scharfsinn. Ich danke ihnen sehr für ihre Liebe, Geduld und unermüdete Unterstützung in allen Lebenslagen.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen Freunden, vor allem Herrn Dr. Christian Stahl bedanken, die durch ihren aufmunternden Humor und ihre motivierende Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Schließlich möchte ich Herrn Matthias Hesse danken, der durch bedingungsloses Engagement, seine Liebe und Verständnis, andauernd konstruktive Kritik sowie unverzichtbare fachliche Kompetenz die Vollendung meiner Promotion ermöglichte und mit dem ich bis heute unsere gemeinsamen Träume leben darf.

Berlin, den 11. September 2011

Stefanie Berndt