

Aus der Klinik für Ophthalmologie
(Direktor: Prof. Dr. Johann Roider)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**AUTOREGULATION DER VEGF-SEKRETION
IM RETINALEN PIGMENTEPITHEL**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

JENS LASSEN
aus Niebüll

Kiel 2015

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. J. Roider, Klinik für Ophthalmologie
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. R. Lucius, Anatomisches Institut
Tag der mündlichen Prüfung:	19. September 2016
Zum Druck genehmigt, Kiel, den	25. Juli 2016

gez.: Priv.-Doz. Dr. Felix Treumer
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	3
Tabellenverzeichnis	4
Abkürzungen/Legende	6
1 Einleitung und Grundlagen	7
1.1 Anatomie des Auges und retinales Pigmentepithel.....	7
1.2 Altersabhängige Makuladegeneration	8
1.3 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF).....	9
1.4 VEGF-Rezeptoren	12
1.5 Inhibitoren des VEGF-Signalwegs.....	12
1.5.1 SU 1498	13
1.5.2 Sunitinib.....	14
1.5.3 LY294002	15
1.5.4 Bisindolylmaleimide.....	16
2 Material und Methoden	18
2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	18
2.2 Aderhaut-/RPE-Organkultur	22
2.2.1 Herstellung der Organkultur	22
2.2.2 Kulturbedingungen.....	23
2.2.3 Stimulation und Probengewinnung.....	24
2.2.4 Calceinfärbung.....	25
2.3 RPE-Zellkultur	26
2.3.1 Kulturbedingungen, Kultivierung.....	26
2.3.2 Vermehrung der Zellen	27
2.3.3 Behandlung der RPE-Zellen mit spezifischen Inhibitoren.....	27
2.4 Toxizitätsanalysen	27
2.4.1 Zellkultur und Behandlung der Zellen.....	27
2.4.2 Auswertung mittels MTT-Assay	28
2.5 Herstellung von Gesamtzellysaten und Proteinbestimmung	28
2.5.1 Denaturierende Zellyse.....	28
2.5.2 Proteinbestimmung	29
2.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot.....	30
2.6.1. SDS-Polyacrylamid-Gelenktrophorese.....	30
2.6.2 Western Blot.....	32
2.6.3 Ponceau S-Färbung	34
2.7 VEGF-Enzym-Linked-Immunoabsorbent Assay	35
2.7.1 Testprinzip und Material.....	35
2.7.2 Durchführung des VEGF-ELISA	35
2.7.3 Auswertung	36
2.8 Statistische Auswertung.....	37
3 Ergebnisse	38
3.1 Zytotoxizität der verwendeten Substanzen auf RPE-Zellen	38
3.1.1 MTT-Assay	38
3.1.2 Calceinfärbung	38
3.2 Ergebnisse Organkultur (ELISA)	39

3.2.1 Inhibition des VEGFR-II durch SU 1498	40
3.2.2 Tyrosinkinaseinhibition durch Sunitinib	41
3.2.3 Inhibition der Proteinkinase C durch Bisindolylmaleimide	42
3.2.4 Inhibition der PI3K durch LY294002	43
3.2.5 Inhibition von VEGFR-II und Proteinkinase C durch SU1498 & Bisindolylmaleimide.....	44
3.2.6 Inhibition von VEGFR-II und PI3K durch SU1498 & LY294002	45
3.3 Ergebnisse Western Blot.....	45
3.3.1 Inhibition des VEGFR-II durch SU1498.....	46
3.3.2 Inhibition der Proteinkinase C durch Bisindolylmaleimide	47
3.3.3 Inhibition der PI3-Kinase durch LY294002	48
4 Diskussion	49
4.1 Validität des Modells.....	49
4.2 Modell der Autoregulation von VEGF im retinalen Pigmentepithel	51
4.3 Limitierungen des Modells.....	52
4.4 Klinische Relevanz	53
4.5 Schlussfolgerung.....	54
5 Zusammenfassung	55
Anhang	57
Literaturverzeichnis.....	66
Danksagung	73
Lebenslauf.....	74
Promotion und Veröffentlichungen	74
Erklärung	76

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Funktionen und Aufgaben des retinalen Pigmentepithels.....	8
Abb. 2: Übersicht über Signaltransduktion via VEGFR-II und die beteiligten Proteine. (aus: Ehrlich et al. 2010).....	11
Abb. 3: Strukturformel von SU 1498 (aus: Calbiochem®, Datenblatt SU 1498).....	14
Abb. 4: Strukturformel von Sunitinib (aus: Pfizer Oncology: Sutent® Datenblatt)	15
Abb. 5: Strukturformel von LY294002 (aus: Calbiochem®, Datenblatt LY294002)	16
Abb. 6: Strukturformel von Bisindolylmaleimide (aus: Calbiochem®, Datenblatt Bisindolylmaleimide)	17
Abb. 7: Schematischer Aufbau der Organkultur (aus Miura et al. 2010).	23
Abb. 8: Schematische Darstellung des VEGF-ELISA.....	35
Abb. 9: Calceinfärbungen.	39
Abb. 10: VEGF-Sekretion nach Inhibition des VEGFR-II durch SU 1498 („SU“).	40
Abb. 11: VEGF-Sekretion nach Multityrosinkinaseinhibition durch Sunitinib („Suni“) ..	41
Abb. 12: VEGF-Sekretion nach Inhibition der Proteinkinase C durch Bisindolylmaleimide („Bis“).	42
Abb. 13: VEGF-Sekretion nach Inhibition der PI3-Kinase durch LY294002 („LY“).....	43
Abb. 14: VEGF-Sekretion nach gleichzeitiger Inhibition von VEGFR-II und Proteinkinase C durch SU 1498 („SU“) und Bisindolylmaleimide („Bis“).	44
Abb. 15: VEGF-Sekretion nach gleichzeitiger Inhibition von VEGFR-II und PI3K durch SU 1498 („SU“) und LY294002 („LY“).	45
Abb. 16: VEGF-Expression nach 48h Inhibition des VEGFR-II durch SU 1498 („SU“).	46
Abb. 17: Beispielblot für die Substanz SU1498 nach 48h Stimulation.....	46
Abb. 18: VEGF-Expression nach 48-stündiger Inhibition der PKC durch Bisindolylmaleimide („Bis“).	47
Abb. 19: Beispielblot für die Substanz Bisindolylmaleimide („Bis“) nach 48h Stimulation.....	47
Abb. 20: VEGF-Expr. nach 48h Inhibition der PI3-Kinase durch LY294002 („LY“).....	48
Abb. 21: Beispielblot für die Substanz LY 294992 („LY“) in der Konzentration 2,5µM nach 48h Stimulation.....	48

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verwendete Geräte	18
Tab. 2: Verwendete Chemikalien	19
Tab. 3: Sonstige verwendete Materialien.....	20
Tab. 4: Zusammensetzung des Organkulturmediums	24
Tab. 5: Konzentration der verwendeten Substanzen.....	25
Tab. 6: Zusammensetzung des Zellkulturmediums	26
Tab. 7: Zusammensetzung des Lysispuffers	29
Tab. 8: Zusammensetzung des <i>Sample Buffers</i> für SDS-Gelelektrophoresen	31
Tab. 9: Zusammensetzung des Gelelektrophorese-Laufpuffers (pH 8,3).....	32
Tab. 10: Zusammensetzung der Pufferlösungen für den Western Blot.....	32
Tab. 11: Zusammensetzung der Wasch- und Blockierlösungen für PVDF-Membranen...	33
Tab. 12: Zusammensetzung der Ponceau S-Färbelösung.....	34
Tab. 13: Zytotoxizität von SU1498 auf RPE-Zellen nach 24 Stunden Stimulation.	57
Tab. 14: Zytotoxizität von SU1498 auf RPE-Zellen nach 48 Stunden Stimulation.	57
Tab. 15: Zytotoxizität von Sunitinib auf RPE-Zellen nach 24 Stunden Stimulation.....	57
Tab. 16: Zytotoxizität von Sunitinib auf RPE-Zellen nach 48 Stunden Stimulation.....	57
Tab. 17: Zytotoxizität des PKC-Inhibitors Bisindolylmaleimide auf RPE-Zellen nach 48 Stunden Stimulation	57
Tab. 18: Zytotoxizität des PKC-Inhibitors Bisindolylmaleimide auf RPE-Zellen nach 48 Stunden Stimulation	58
Tab. 19: Zytotoxizität des PI3-Inhibitors LY294002 auf RPE-Zellen nach 24 Stunden Stimulation	58
Tab. 20: Zytotoxizität des PI3-Inhibitors LY294002 auf RPE-Zellen nach 48 Stunden Stimulation.....	58
Tab. 21: Zytotoxizität von SU1498 (10µM) und Bisindolylmaleimide (1µM) auf RPE- Zellen nach 24 Stunden Stimulation.	58
Tab. 22: Zytotoxizität von SU1498 (10µM) und Bisindolylmaleimide (1µM) auf RPE- Zellen nach 48 Stunden Stimulation.	58
Tab. 23: Zytotoxizität von SU1498 (10µM) und LY294002 (25µM) auf RPE-Zellen nach 24 Stunden Stimulation.....	59

Tab. 24: Zytotoxizität von SU1498 (10 μ M) und LY294002 (25 μ M) auf RPE-Zellen nach 48 Stunden Stimulation.....	59
Tab. 25: VEGF-Sekretion der Kontrollkammer (unbehandelt).....	59
Tab. 26: VEGF-Sekretion nach Stimulation mit SU 1498 10 μ M.....	59
Tab. 27: VEGF-Sekretion nach Stimulation mit SU 1498 5 μ M	60
Tab. 28: VEGF-Sekretion der Kontrollkammer (unstimuliert).....	60
Tab. 29: VEGF-Sekretion nach Stimulation mit Sunitinib 1 μ M.....	60
Tab. 30: VEGF-Sekretion nach Stimulation mit Sunitinib 100nM	60
Tab. 31: VEGF-Sekretion der Kontrollkammer (unstimuliert).....	61
Tab. 32: VEGF-Sekretion nach Stimulation mit Bisindolylmaleimide 1 μ M.....	61
Tab. 33: VEGF-Sekretion nach Stimulation mit Bisindolylmaleimide 100nM	61
Tab. 34: VEGF-Sekretion in der Kontrollkammer (unstimuliert).....	61
Tab. 35: VEGF-Sekretion nach Stimulation mit LY294002 25 μ M.....	62
Tab. 36: VEGF-Sekretion nach Stimulation mit LY294002 2,5 μ M.....	62
Tab. 37: VEGF-Sekretion in der Kontrollkammer (unstimuliert).....	62
Tab. 38: VEGF-Sekretion nach gleichzeitiger Stimulation mit SU 1498 10 μ M und Bisindolylmaleimide 1 μ M.....	63
Tab. 39: VEGF-Sekretion in der Kontrollkammer (unstimuliert).....	63
Tab. 40: VEGF-Sekretion nach gleichzeitiger Stimulation mit SU 1498 10 μ M und LY294002 25 μ M	63
Tab. 41: VEGF-Expression nach Stimulation mit SU 1498 10 μ M.....	64
Tab. 42: VEGF-Expression nach Stimulation mit SU 1498 5 μ M	64
Tab. 43: VEGF-Expression nach Stimulation mit Bisindolylmaleimide 1 μ M.....	64
Tab. 44: VEGF-Expression nach Stimulation mit Bisindolylmaleimide 100nM	65
Tab. 45: VEGF-Expression nach Stimulation mit LY294002 25 μ M	65
Tab. 46: VEGF-Expression nach Stimulation mit LY294002 2,5 μ M	65

Abkürzungen/Legende

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AMD	Altersabhängige Makuladegeneration
ATP	Adenosintriphosphat
Bis	Bisindolylmaleimide
C	Celsius
CNV	choroidale Neovaskularisation
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzym link immunosorbent assay</i>
FCS	fetales Kälberserum
H	Stunde
HIF-1	<i>hypoxia-inducible factor 1</i>
kDa	Kilodalton
LY	LY294002
Min	Minute
mRNA	<i>messenger Ribonucleic acid</i>
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NF- κ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
OK	Organkultur
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PDGF	<i>Plateled derived growth factor</i>
Pe	Penicillin
PIGF	<i>Placental growth factor</i>
RPE	Retinales Pigmentepithel
®	Eingetragenes Warenzeichen
scRNA	<i>small cytoplasmic Ribonucleic acid</i>
St	Streptomycin
SA	Standardabweichung
SU	SU 1498
Suni	Sunitinib
Tab.	Tabelle
Tris	Tris-(hydroxymethy-)aminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR	<i>Vascular Endothelial Growth Factor-Rezeptor</i>

1 Einleitung und Grundlagen

1.1 Anatomie des Auges und retinales Pigmentepithel

Das menschliche Auge besteht als kugelförmiger Körper aus drei Schichten. Hierbei handelt es sich um Leder-, Ader- und Netzhaut, die dem Auge seine Integrität verleihen und dem Menschen die visuelle Wahrnehmung seiner Umgebung ermöglichen. Nachdem das Licht durch die Pupille in das Auge eingetreten ist und den aus Hornhaut, Vorderkammer, Linse und Glaskörper bestehenden lichtbrechenden Apparat passiert hat, trifft es auf die Netzhaut des Auges (Retina). Sie ist die innerste der drei Schichten des Auges. Man unterscheidet die lichtunempfindliche Pars caeca retinae und die lichtempfindliche Pars optica, die wiederum aus Pars nervosa und Pars pigmentosa besteht. In der Pars nervosa befinden sich spezialisierte Neuronen, die die Wahrnehmung visueller Reize ermöglichen. Die Pars pigmentosa beheimatet das retinale Pigmentepithel (RPE). Es besteht aus flachem einschichtigem Epithel. Seine Zellen enthalten viel hauptsächlich aus Melanin bestehendes Pigment und sind dadurch schwarz gefärbt. Das RPE liegt direkt zwischen der Aderhaut und der Pars nervosa der Retina. Es umfasst mit seinen Zellausläufern die äußeren Enden der Photorezeptorzellen und hat Kontakt zur Bruch-Membran, mit der gemeinsam es die Blut-Retina-Schranke bildet. Das RPE hat vielfältige Aufgaben, so die Regeneration von Vitamin A, Phagozytose und Stoffaustausch mit den Photorezeptorzellen. Auch für die Ernährung der Rezeptorzellen steht das RPE ein. Eine weitere, im Folgenden genauer erläuterte Aufgabe ist die Produktion von Wachstumsfaktoren wie dem *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) (Strauss 2005, Blauwgeers et al. 1999). Abbildung 1 zeigt vereinfacht Funktionen und Aufgaben des RPE.

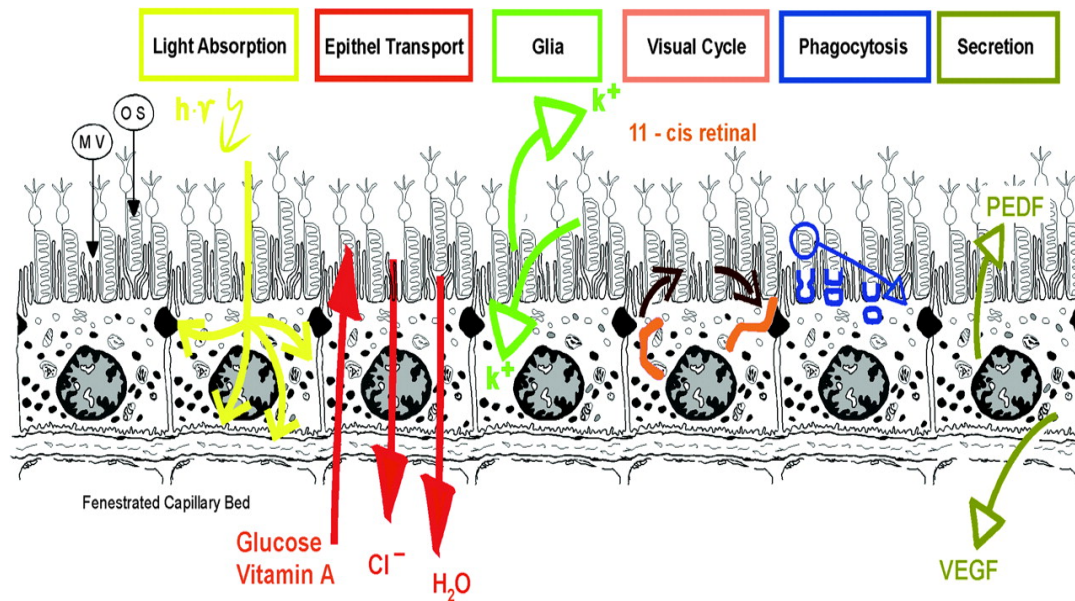


Abb. 1: Funktionen und Aufgaben des retinalen Pigmentepithels

VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*; PEDF: *Pigment Epithelial Derived Factor*; OS: Aussensegmente der Photorezeptorzellen; MV: Microvilli des RPE (aus: Strauss 2005)

1.2 Altersabhängige Makuladegeneration

Die häufigste Ursache für die Erblindung älterer Menschen in der westlichen industrialisierten Welt ist die altersbedingte Makuladegeneration (AMD). Hierbei handelt es sich um eine Augenerkrankung, die besonders in Europa und den Vereinigten Staaten von Amerika weit verbreitet ist. Schätzungen gehen davon aus, dass in der Bundesrepublik Deutschland etwa viereinhalb Millionen Menschen an einer AMD erkrankt sind (Kokotas et. al. 2011; Ziemssen et al. 2006).

Bei der AMD werden zwei unterschiedliche Verlaufsformen unterschieden. So existieren eine trockene und eine feuchte Variante der AMD, die sich in ihrer Pathogenese unterscheiden. Die häufigere Erscheinungsform ist die trockene AMD, die bei etwa 90% aller AMD-Erkrankten vorliegt. Bei der feuchten AMD hingegen, an der etwa 10% aller AMD-Patienten erkrankt sind und die für den Großteil der Erblindungen verantwortlich ist (Moshfeghi und Lewis 2003), kommt es zum Einwachsen von Blutgefäßen der Aderhaut durch die Bruch'sche Membran in den subretinalen Raum. Folge dieser choroidalen Neovaskularisation (CNV) ist ein Sehverlust mit Einschränkung der zentralen Sehkraft und charakteristischen Sehstörungen, so zum Beispiel das Wahrnehmen verzogener Linien beim Betrachten eines Amsler-Netzes (DeWan et al. 2006). Als wichtiger pathogenetischer Faktor bei der Entstehung der feuchten Form der

AMD konnte der *Vascular Endothelial Growth Factor* identifiziert werden (Spilsbury et al. 2000). Jedoch ist es bisher nicht gelungen, ein umfassendes Modell der Krankheitsursache zu finden. Als mögliche Risikofaktoren für die Entstehung einer AMD gelten hohes Alter, gehäuftes familiäres Auftreten, Nikotinabusus und operative Eingriffe bei Katarakt (Chakravarthy et al. 2010).

1.3 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

In dieser Arbeit steht der Faktor VEGF-A im Mittelpunkt des Interesses; er wird daher, wie in der Literatur allgemein üblich, synonym mit dem Begriff „VEGF“ verwendet.

Zur VEGF-Familie gehören die Wachstumsfaktoren VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F und der *Placenta Growth Factor* (Holmes und Zachary 2005, Yamazaki und Morita 2006).

VEGF wird eine zentrale Rolle im Pathomechanismus bei der choroidalen Neovaskularisation im Rahmen der feuchten AMD zugeschrieben. Ebenso scheint VEGF eine Rolle bei der Ausbildung eines Makulaödems bei Patienten mit diabetischer Retinopathie zu haben und ist an Venenverschlüssen im Bereich des Auges beteiligt (Kinnunen et al. 2011; Scholl et al. 2010).

VEGF hat elementare Bedeutung bei der Ausbildung neuer Blutgefäße (Ferrara 2009). In der Retina ist VEGF dabei unabdingbar für die Ausbildung der retinalen und choroidalen Vaskularisation (Stone et al. 1995, Marneros et al. 2005, Klettner 2014). Auch beim erwachsenen Menschen hat VEGF im Bereich der Retina wichtige Funktionen, so zum Beispiel als Überlebensfaktor für Endothelzellen und die Unterstützung der Funktion der Choroidea (Gerber et al. 1998; Saint-Geniez et al. 2009). Das RPE wird unter dem Einfluss von autokrin sezerniertem VEGF vor oxidativem Stress geschützt und sein Zellüberleben gefördert (Byeon et al. 2010).

VEGF ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 45 Kilodalton (kDa). Das Gesamtmolekül besteht aus zwei Untereinheiten von je 23 kDa (Ferrara und Henzel 1989). Durch alternatives Spleißen entstehen verschiedene Isoformen des VEGF-Moleküls, die sich in der Anzahl ihrer Aminosäuren und geringfügig im Molekulargewicht unterscheiden (Tischer et al. 1991). Im retinalen Gewebe entsteht fast ausschließlich die Isoform VEGF₁₆₅, in wesentlich geringerem Maße auch VEGF₁₂₁. (Kim et al. 1999). Die Verteilung der Expression hängt von verschiedenen Faktoren ab, so

beispielsweise von oxidativem Stress (Klettner und Roider 2009), Hypoxie (Shweiki et al. 1992) und Zytokinkonzentration (Naginei et al. 2011). Bildungsort des VEGF in der Retina ist in erster Linie das RPE (Strauss 2009, Blauwgeers et al. 1999). Dieses befindet sich als einschichtige Zellschicht im Bereich zwischen der Retina neuronalis und der Choroidea. Es liegt somit der Bruch'schen Membran direkt auf. Wichtigste Aufgabe des RPE ist die Versorgung der Photorezeptorzellen (Strauss 2005). Es gibt Hinweise, dass das RPE und Choriokapillaris, welche die gefäßführende Schicht der Aderhaut darstellt, mittels parakriner Sekretion ihr Verhalten gegenseitig beeinflussen (Blauwgeers et al. 1999).

Der größte Teil des vom RPE sezernierten VEGF wird unter normalen Bedingungen nach basolateral und somit in Richtung der gefäßführenden Choriokapillaris abgegeben; die hier sezernierte Menge übersteigt die apikale um den Faktor zwei bis sechs (Blauwgeers 1999). Unter hypoxischen Bedingungen, wie sie lokal in der Pathogenese der AMD vorkommen, steigt die VEGF-Sekretion nach basolateral im Vergleich zum apikalen Zellpol bis auf den Faktor zehn an (Blauwgeers 1999). Das RPE selbst übt auf die Choroidea, insbesondere aber auf die Choriokapillaris einen überlebensfördernden Effekt aus. Hierbei scheint das nach basolateral sezernierte VEGF eine Schlüsselrolle zu spielen (Blauwgeers et al. 1999). Die Choroidea selbst hat die Aufgabe, die Blutversorgung der äußeren Augenschichten sicherzustellen und ist an der mechanischen Integrität des Augapfels beteiligt (Monnot und Zheng 2013).

In der Vergangenheit konnte an Endothelzellen gezeigt werden, dass VEGF seine eigene Expression verstärken kann, indem das Molekül auf den *Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF-1)*, der einen Transkriptionsfaktor von VEGF darstellt, Einfluss nimmt (Deudero et al. 2008). Als weitere Hinweise darauf, dass autoregulatorische Wirkungsmechanismen durch VEGF selbst bestehen, gilt, dass exogenes VEGF die Expression von VEGF in Endothelzellen verstärkt (Knizetova et al. 2008). Zudem konnte gezeigt werden, dass nach Neutralisierung von VEGF im Rahmen einer Behandlung mit den VEGF-spezifischen Antagonisten Bevacizumab und Ranibizumab auch die VEGF-Expression selbst sank. Somit gibt es Hinweise, dass durch die Therapie der AMD mit den vorgenannten Antagonisten nicht nur eine dosisabhängige Neutralisierung des VEGF selbst, sondern auch eine Unterdrückung der VEGF-Expression erfolgt (Klettner und Roider 2008, Kernt et al. 2011, Heiduschka et al., 2007).

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Regulation von Sekretion und Expression von VEGF im RPE, die auf verschiedenen Wegen und Ebenen geschieht (Josko et al. 2004): es existieren rezeptorvermittelte Wirkungen, unter anderem durch Wachstumsfaktoren wie TGF- β 2, die zu einer ausgeprägten Steigerung der VEGF-Expression führen (Bian et al. 2007). Molekulare Mechanismen, um diese Feinabstimmung beeinflussen zu können, sind zum einen Transkriptionsfaktoren, die die Expression des VEGF-Gens steuern, indem sie in ihrer Funktion als Protein an den Promotor des VEGF-Gens binden und dadurch die Transkription in scRNA induzieren (Josko et al. 2004, Pages et al. 2005). Ein weiterer Regulationsmechanismus sind Proteinkinasen, die eine Bedeutung für die Stabilität der posttranskriptional entstandenen mRNA besitzen und somit ebenfalls an der Regulation der VEGF-Expression beteiligt sind (Pages et al. 2000). Welche Signaltransduktionskaskade im einzelnen durch die Zelle genutzt wird um die VEGF-Sekretion zu steigern, ist abhängig vom Stimulus. Über die Regulierung der konstitutiven VEGF-Sekretion im Auge ist bisher nur wenig bekannt; lediglich die Wege, durch die die Sekretion beeinflusst werden kann, sind durch die oben beschriebenen Mechanismen in Teilen verstanden.

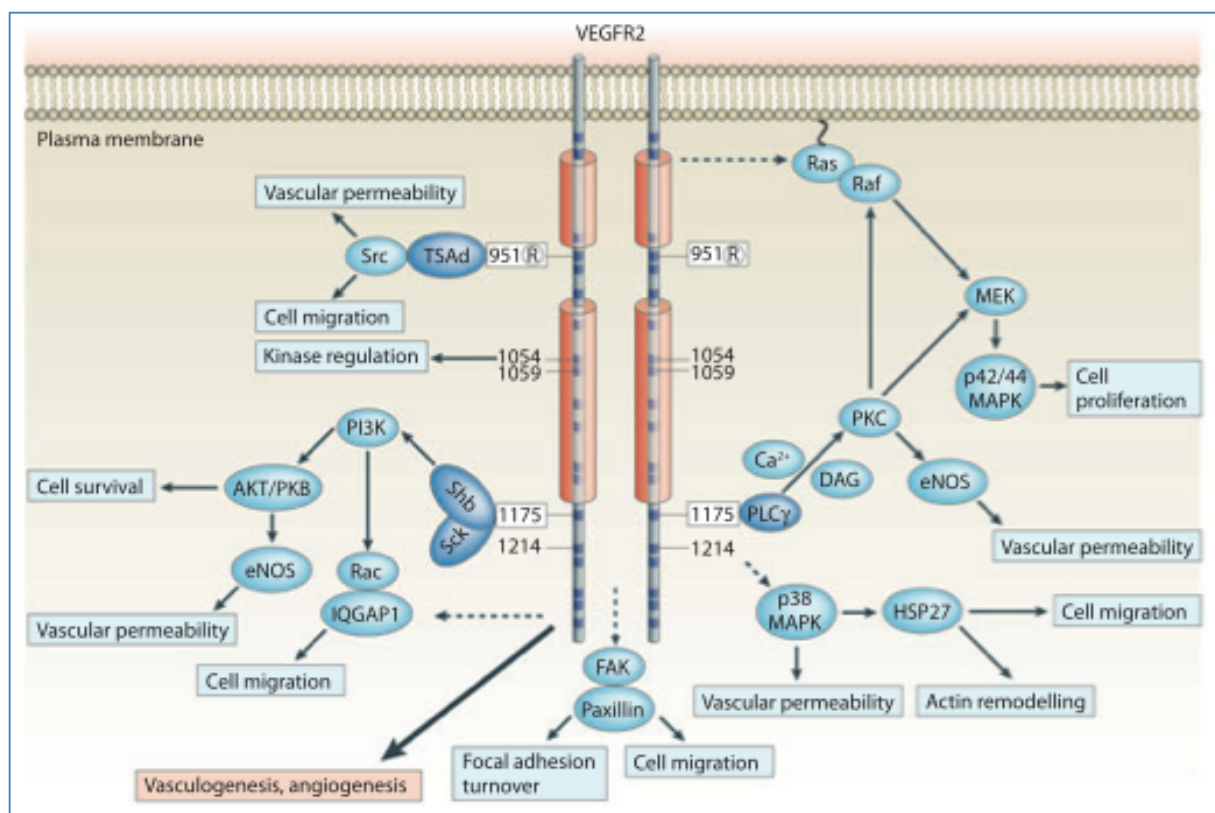


Abb. 2: Übersicht über Signaltransduktion via VEGFR-II und die beteiligten Proteine. (aus: Ehrlich et al. 2010).

1.4 VEGF-Rezeptoren

Für die in 1.2 beschriebenen Wirkungen ist das VEGF-Molekül auf das Vorhandensein spezifischer Rezeptoren auf den Zielzellen angewiesen. Bekannt sind der VEGF-Rezeptor I (VEGFR-I, auch bezeichnet als *fms-like receptor tyrosin kinase*, de Vries et al. 1992), sowie der VEGF-Rezeptor II (VEGFR-II, auch bezeichnet als *kinase-insert domain containing receptor* (KDR), Terman et al. 1992). Dem VEGFR-II wird dabei im Wesentlichen die Aufgabe der Angiogenese zugeschrieben, während der VEGFR-I VEGF extrazellulär binden und so dessen Wirkung negativ im Sinne eines Regulators beeinflussen kann (Kendall und Thomas 1993). VEGFR-I hat darüber hinaus auch nicht-negative Wirkungen; so steuert der Rezeptor beispielsweise die Bildung des Gefäßlumens in der Vaskulogenese sowohl bei gesundem als auch bei maligne entartetem Zellwachstum (Lutton et al. 2004). VEGF selbst besitzt dabei eine höhere Affinität zum VEGFR-I als zum VEGFR-II (Waltenberger et al. 1994). Auf molekularer Ebene gehören die Rezeptoren zur Familie der Rezeptortyrosinkinasen und sind überwiegend in der Zellmembran lokalisiert (Terman et al., de Vries et al. 1992). Beide Rezeptoren bestehen aus drei unterschiedlichen Domänen, im Einzelnen: eine extrazelluläre Domäne, die wiederum aus sieben immunoglobulin-ähnlichen Domänen aufgebaut ist, eine Transmembrandomäne und eine intrazelluläre Domäne (Yarden und Ullrich, 1998). Bindet extrazelluläres VEGF an seinen Rezeptor, so dimerisieren diese Rezeptormoleküle. Nachfolgend erfolgt eine Autophosphorylierung der intrazellulären Tyrosinkinasedomänen. Hierauf folgt eine intrazelluläre Signaltransduktionskaskade (Cadena und Gill 1992). Für eine Reihe von Signalmolekülen konnte bereits eine Aktivierung durch VEGFR-I und VEGFR-II nachgewiesen werden. So stellen die phosphorylierten Tyrosinreste Tyr1213 und Tyr1333 Bindungsstellen für verschiedene Adaptermoleküle da, hierin eingeschlossen die regulierende Untereinheit p85 der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3-K) (Cunningham et al. 1995). Eine weitere wichtige Rolle in der Signaltransduktion kommt der Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) zu, die wiederum den Raf1-MEK-ERK-Signalweg anstößt (Matsumoto und Claesson-Welsh, 2001).

1.5 Inhibitoren des VEGF-Signalwegs

In der modernen Ophthalmologie nimmt die Behandlung der AMD mit *Biologicals* einen wichtigen Platz ein. Mit dem humanisierten Fab-Antikörperfragment Ranibizumab

(Lucentis®, Fa. Novartis) und dem humanisierten vollständigen Antikörper Bevacizumab (Avastin®, Fa. Roche) stehen spezifische, direkt gegen das Molekül VEGF gerichtete Substanzen zur Anwendung am Auge (im Falle von Avastin® als *Off-label-use*) zur Verfügung (Ferrara et al. 2006, Muller et al. 1998). Eine weitere Therapieoption, die im November 2011 in den USA zur Behandlung der feuchten AMD zugelassen wurde, stellt Aflibercept (Eylea®) dar. Seit 2012 ist die Substanz auch zur Behandlung des kolorektalen Karzinoms zugelassen. Aflibercept bindet VEGF-A und PlGF als "falscher Rezeptor" und inaktiviert sie, sodass die Wirkungen auf die eigentlichen Zielzellen nicht mehr vermittelt werden können (Sharma et al. 2013, Browning et al. 2012). Aufgrund der bereits erwähnten entscheidenden Rolle, die VEGF bei der Angiogenese zukommt, stehen somit noch relativ junge Therapieoptionen zur Verfügung, die unmittelbar Einfluss auf einen entscheidenden Pathomechanismus der Erkrankungsentstehung nehmen. Beide Substanzen werden direkt intravitreal injiziert (Meyer 2008) mit dem Ziel, die zum Sehverlust führende CNV in ihrem Fortschreiten zu verlangsamen (Holz et al. 2006).

In dieser Arbeit wurden verschiedene Substanzen verwendet, die im Gegensatz zu Ranibizumab und Bevacizumab nicht gegen das VEGF-Molekül selbst wirken, sondern in die VEGF-vermittelte Signaltransduktion eingreifen. Wie bereits erwähnt, gehören VEGF-Rezeptoren zur Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren (Terman et al. 1992, de Vries et al. 1992). Mittels Tyrosinkinaseinhibitoren kann diese Signaltransduktion somit verändert werden. Diese Substanzen entfalten ihre Wirkung, indem sie die Übertragung von Phosphatresten von hochenergetischen Verbindungen, z.B. Adenosintriphosphat (ATP), auf andere Proteine unterbinden. Hierdurch wird die Signalweiterleitung in der Zelle unterbunden (Gotink und Verheul 2010).

1.5.1 SU 1498

SU 1498 ist ein Tyrosinkinaseinhibitor, der spezifisch gegen VEGFR-II gerichtet ist. Es zeigte sich, dass SU 1498 das VEGF-vermittelte Wachstum von Astrozytomen zu vermindern mag (Knizetova et al. 2008). Zudem hat eine Hemmung der Signaltransduktion durch SU 1498 einen regulatorischen Einfluss auf die Neubildung und Permeabilität von Blutgefäßen (Strawn 1996).

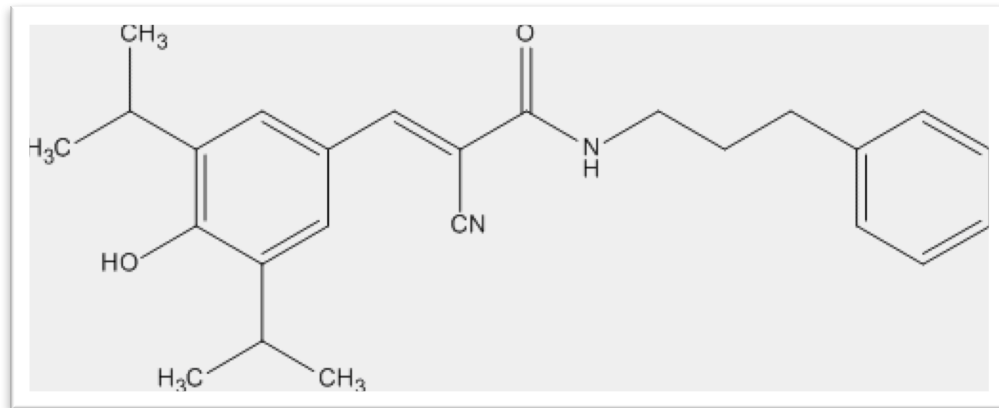


Abb. 3: Strukturformel von SU 1498 (aus: Calbiochem®, Datenblatt SU 1498)

1.5.2 Sunitinib

Bei dem zweiten, in dieser Arbeit verwendeten Tyrosinkinaseinhibitor, handelt es sich um Sunitinib (Sutent®, Fa. Pfizer). Sunitinib findet unter anderem Verwendung in der Behandlung des metastasierten Nierenzellkarzinoms (Motzer et al. 2006) und von gastrointestinalen Stromatumoren (Campanella et al. 2012). Als Typ I-Tyrosinkinaseinhibitor erkennt Sunitinib aktive Formen der Kinasen und blockiert deren ATP-Bindungsstelle (Zhang et al. 2009). Sunitinib ist im Gegensatz zu SU 1498 keineswegs spezifisch für den VEGFR-II, sondern inhibiert als Multityrosinkinaseinhibitor die Signaltransduktionswege von VEGFR-I, VEGFR-II und VEGFR-III, des Platelet-derived growth factors (PDGF) und vieler anderer Tyrosinkinasen (Faivre et al. 2007, Mendel et al. 2003).

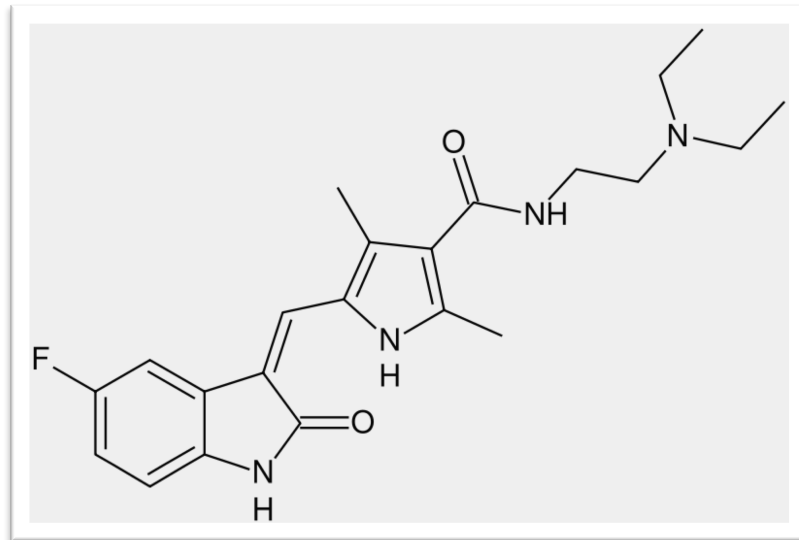


Abb. 4: Strukturformel von Sunitinib (aus: Pfizer Oncology: Sutent® Datenblatt)

1.5.3 LY294002

Nach Bindung von VEGF an den jeweiligen VEGF-Rezeptor und der dadurch ausgelösten Autophosphorylierung der intrazellulären Tyrosinkinasedomänen erfolgt die Signaltransduktion innerhalb der Zellen über verschiedene Signalmoleküle. In dieser Arbeit wurde LY294002 verwendet; ein Hemmstoff der Phosphoinositol-3-Kinase, die eines der erwähnten Signalmoleküle im VEGF-Pathway darstellt. PI3-Kinasen werden in allen eukaryontischen Zellen exprimiert. Sie vermitteln Zellwachstum, Zellproliferation und die Differenzierung von Zellen. Die Aufgabe der PI3-Kinasen ist die Phosphorylierung von Phospholipiden in der Zellmembran, wodurch an diesen Orten weitere Proteine binden und aktiv werden können (Wymann und Pirola 1998). In Tumorgewebe sind PI3-Kinasen häufig überaktiv und vermitteln schnelles Tumorstadium. Ihnen wird die Funktion eines Protoonkogens zugeschrieben. Aus diesem Grund sind sie Gegenstand aktueller Forschung (Chalhoub und Baker 2009). LY294002 (2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4) ist ein potenter Inhibitor von PI3-Kinasen. In den hier verwendeten Konzentrationen inhibiert er zuverlässig die PI3-Kinasen, während andere Moleküle wie die Proteinkinase C, PI4-Kinasen, oder MAP-Kinasen in ihrer Funktion nicht beeinträchtigt werden (Vlahos et al., 1994).

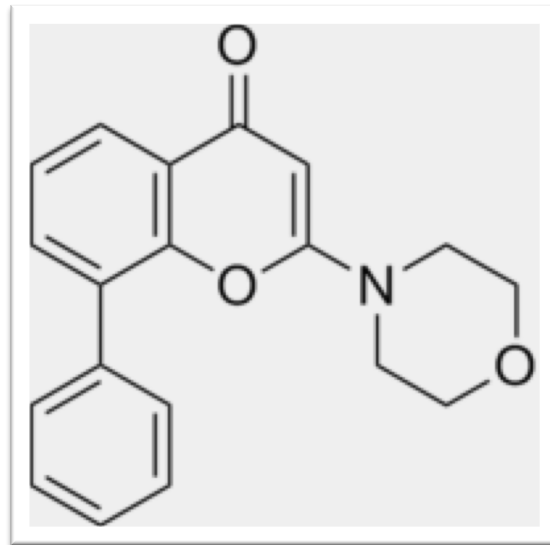


Abb. 5: Strukturformel von LY294002 (aus: Calbiochem®, Datenblatt LY294002)

1.5.4 Bisindolylmaleimide

Der Proteinkinase C (PKC) kommt ebenfalls eine wichtige Rolle in der VEGF-Transduktion zu. Mitglieder der PKC-Familie vermitteln eine Reihe von Signalen, die aus Ligandenbindung an Zelloberflächenrezeptoren für Neurotransmitter, Hormone und Wachstumsfaktoren resultieren. Durch die Übertragung von Phosphatgruppen auf Serin- und Threoningruppen untergeordneter Enzyme werden diese in ihrem Aktivitätsgrad kontrolliert. Die Aktivierung der PKC selbst geschieht durch Calcium, das nach vorhergehender Aktivierung der Phospholipase C aus dem sarkoplasmatischen Retikulum in das Zytosol strömt (Nishizuka 1992). Die PKC hat Bedeutung bei der Regulation des zellulären Wachstums. Bei Patienten mit Diabetes mellitus liegt durch ständig erhöhte Plasma-Glukosekonzentrationen eine Aktivierung der PKC vor. Hierdurch werden Gefäßproliferation und -permeabilität gesteigert. Hieraus folgen Gefäßschäden an der Retina. Aus diesem Grund sind PKC-Hemmstoffe möglicherweise in der Lage, bei Diabetikern Schäden am Auge vorzubeugen (Joy et al., 2005). Bisindolylmaleimide sind Hemmstoffe der Proteinkinase C. Chemisch handelt es sich um indolsubstituierte Maleinsäureimide. In dieser Arbeit wurde Bisindolylmaleimide (auch bezeichnet als GF 109203X) als Hemmstoff der PKC verwendet. Es inhibiert reversibel die ATP-Bindungsstelle des Enzyms und hemmt dadurch zuverlässig dessen Funktion (Toullec et al. 1991)

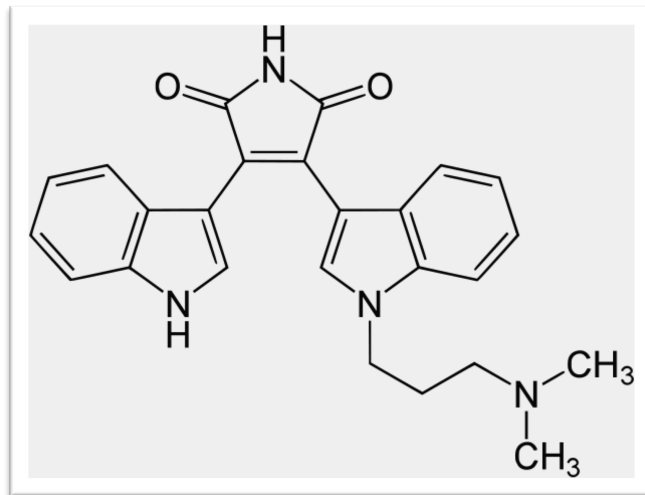


Abb. 6: Strukturformel von Bisindolylmaleimide (aus: Calbiochem®, Datenblatt Bisindolylmaleimide)

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Tab. 1: Verwendete Geräte

Geräte	Ggf. Bezeichnung	Firma	Herkunft
Absorptions-Reader	ELx800	BioTek Instruments GmbH	Bad Friedrichshall
Abzüge	Antair BS	A. Sternkopf GmbH	Lübeck
	Abzug Systemlabor	Köttermann GmbH & Co. KG	Uetze/Hänigsen
Brutschrank		Labotect	Göttingen
Bio-Imaging-System	MF-ChemiBis	Biotep® GmbH	Jahnsdorf
Falcon-Röhrchen	Centrifuge Tubes	VWR	Pennsylvania, USA
Gelkammersystem	Mini-Protean®	Bio-Rad Laboratories GmbH	München
	Tetra-cell		
Glasplatten für Gelelektrophorese	Mini-Protean®	Bio-Rad Laboratories GmbH	München
	Glass Plates		
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf AG	Hamburg
Magnetrührer		IKA®-Werke GmbH & Co. KG	Staufen
Mikroskop	Axiovert 100	Zeiss	Hennigsdorf
Organkulturkammer	Perfusion culture container	Minucells and Minutissue Vertriebs GmbH	Bad Abbach
pH-meter	Microprocessor pH-Meter	Hanna Instruments Deutschland GmbH	Kehl
Photometer	Spectronic Genesys	Thermo Electron Corporation	Erlangen
Pinzette	Pinzette BD 314	Aesculap AG	Tuttlingen
Pipetten	Eppendorf Research®	Eppendorf AG	Hamburg
Pipettierhilfe	Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte	Eberstadt
Pumpe	IPC Ismatec	IDEX Corporation	Gattbrugg, Schweiz
Rasierklinge		Plano GmbH	Wetzlar
Reaktionsgefäße	Safe-Lock 1,5ml	Eppendorf AG	Hamburg
Ringsysteme für Organkultur	Perdusin Minusheets	Minucells and Minutissue Vertriebs GmbH	Bad Abbach
Schere	Schere 545A	Hermle Labortechnik GmbH	Wehingen
Schlauchsysteme Organkultur	Ismatec	IDEX Corporation	Glattbrugg, Schweiz

Skalpell	Rasierklinge T585	Plano GmbH	Wetzlar
Saugpumpen	Vacusaft comfort	Integra Biosciences AG	Zizers, Schweiz
Schüttler	Rocking platform	VWR	Pennsyl- vania, USA
Semi-Dry Blotter	Semi-Dry Blotting System	C.B.S.Scientific Company	Kalifornien, USA
Streifenwasher	ELx50	BioTek Instruments GmbH	Bad Friedrichs- hall
Stromversorgungs- gerät	Electrophoresis- power-supply	Consort nv	Belgien, Turnhout
Ultraschallgerät	Vibra cell	Sonics & Material	Connecticut, USA
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries	New York, USA
Waage		Kern&Sohn GmbH	Balingen
Wärmeplatte	Typ 12501	Medax GmbH & Co.KG	Neumünster
Zellkulturschalen	Nunclon™	Nunc A/S	Roskilde, Dänemark
	ΔSurface		
Zellschaber	Zellschaber	Sarstedt AG & Co	Nümbrecht
Zentrifugen	Sorvall ST40	Thermo Fisher Scientific	Dreieich
	Centrifuge 5414	Eppendorf AG	Hamburg
	Heraeus Fresco 17	Thermo Electron Corporation	Erlangen

Tab. 2: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Bezeichnung	Firma	Herkunft
Acrylamid	30% Acrylamide/ Bis Solution	Bio-Rad Laboratories GmbH	München
Methanol	Methanol	Merck KGaA	Darmstadt
Ethanol	Ethanol 99%	Büfa Chemikalien GmbH & Co. KG	Hude
APS	Ammonium-peroxodisulfat	Merck KGaA	Darmstadt
Bromphenol- blau	Bromphenolblau	Merck KGaA	Darmstadt
Calcein	Calcein AM 1mg	Anaspec	Freemont, USA
DMSO	Dimethylsulfoxid	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
Mercapto- ethanol	2-Mercaptoentanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim
NaCl	Natriumchlorid	Merck KGaA	Darmstadt
Säuren	Salzsäure 25 %	Carl Roth GmbH & Co.	Karlsruhe

		KG	
SDS	Natrium-dodecylsulfat	Merck KGaA	Darmstadt
TEMED	Tetramethyl-ethylendiamin	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
TRIS	Trizma® Base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim
	Trizma®Hydro-chloride		
Tween	Tween-20	Merck KGaA	Darmstadt
Magermilchpulver	Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe

Tab. 3: Sonstige verwendete Materialien

Sonstige Materialien	Bezeichnung	Firma	Herkunft
Antikörper	Anti β -Actin	Rockland Immunochemicals Inc.	Pennsylvania, USA
	Rabbit Antibody		
	VEGF (A-20):	Santa Cruz Biotechnology	Kalifornien, USA
	sc-152 Antibody		
	Anti-rabbit IgG	Cell Signaling Technology	Frankfurt am Main
HRP-linked			
Aqua bidest	Ampuwa® Spüllösung	Fresenius Kabi	Bad Homburg
Betaisodona		Mundipharma GmbH	Limburg
BSF	Bovine Serum Fetal	Linaris Biologische Produkte GmbH	Wertheim-Bettingen
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glucose	PAA Laboratories GmbH	Pasching, Österreich
ECL-Reagenz	Chemiluminescent HRP Substrate	Millipore Corporation	Massachusetts, USA
Filterpapier	Whatmanfilter	Macherey-Nagel	Düren
Größenmarker	Roti®-Mark	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
	Precision Plus Protein	Bio-Rad Lab. GmbH	München
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	PAA Laboratories GmbH	Pasching, Österreich

Inhibitoren	Calbiochem® SU1498	Merck KGaA	Darmstadt
	Calbiochem® Bisindolylmaleimide	Merck KGaA	Darmstadt
	Calbiochem® LY 294002	Merck KGaA	Darmstadt
	Sunitinib	Tocris Bioscience	Missouri, USA
Membranen	Polyvinyliden-fluorid (PVDF)- Membran	Millipore	Massachu- setts, USA
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung	PAA Laboratories GmbH	Pasching, Österreich
Pe/St	Penicillin/ Streptomycin	PAA Laboratories GmbH	Pasching, Österreich
	Phosphatase Inhibitor	Phosphatase-Inhibitor Cocktail 2	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ponceaurot	Ponceaurot S	Serva Electrophoresis GmbH	Steinheim Heidelberg
Porcine	Porcine Serum	PAA Laboratories	Pasching, Österreich
Proteinase- inhibitor	Proteaseinhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim
Proteinassay	Biorad Proteinassay	Bio-Rad Laboratories GmbH	München
Sample buffer	4x SDS Sample Buffer	Merck KGaA	Darmstadt
Sodium Pyruvat	Sodium pyruvate	PAA Laboratories GmbH	Pasching, Österreich
Trypanblau	Trypan blue	Biochrom AG	Berlin
Trypsin		PAA Laboratories GmbH	Pasching, Österreich
Trypsin- EDTA		PAA Laboratories GmbH	Pasching, Österreich

VEGF-ELISA KIT	Quantikine®	R&D Systems GmbH, Inc.	Minneapolis, USA
-------------------	-------------	---------------------------	---------------------

2.2 Aderhaut-/RPE-Organkultur

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass eine RPE/Aderhaut-Organkultur als *in vivo*-System für die Durchführung von Experimenten zur Untersuchung der VEGF-Sekretion geeignet ist (Miura et al. 2010, Klettner und Roider 2008). Diese Organkultur besteht aus porciner Aderhaut und RPE, die als Gewebekblock in einer speziellen Halterung fixiert sind, kontinuierlich bei einer Temperatur von 37°C gehalten und von einem speziell zusammengesetzten Organkulturmedium umflossen werden, um die Zellen möglichst lang vital zu halten.

2.2.1 Herstellung der Organkultur

Zur Herstellung der Organkultur wurden die Augen frisch geschlachteter Schweine verwendet, die zwei bis vier Stunden nach Eukleation präpariert wurden. Während dieser Zeit erfolgte eine durchgehende Kühlung der Augen. Das anhängende Gewebe (Muskeln, Fett) wurde entfernt und der Sehnervenstumpf auf ca. 1 mm Restlänge gekürzt. Die Bulbi wurden sodann umgehend in antiseptische Lösung (Betasisodona®-Lösung, 1:4 in NaCl) gegeben. Nach zwei Minuten Einwirkzeit wurden die Augen aus dem Antiseptikum entfernt und in eine 4 °C kalte NaCl-Lösung gegeben, wo sie bis zur Präparation verblieben.

Als erster Präparationsschritt erfolgte die Entfernung des vorderen Augenabschnitts mittels einer Rasierklinge. Anschließend wurden Linse und Glaskörper unter Schonung der Retina entfernt. Nach seitlichem Einschneiden des hinteren Augenabschnittes wurden Choroidea und Retina gemeinsam in einem Gewebsverbund mit Pinzette und Schere von der Sklera entfernt. Das RPE blieb hierbei in seiner ursprünglichen Form intakt. Das so entstandene RPE-Choroidea-Gewebsstück wurde in einem Ringsystem mit Unter- und Oberseite fixiert. Überschüssiges Gewebe wurde anschließend entfernt, sodass sich in jedem Ring ein 9 mm durchmessendes Gewebestück befand. Nun erfolgte die vorsichtige Entfernung der Retina mit einer Pinzette, wobei streng darauf geachtet wurde, das RPE nicht zu berühren oder zu verletzen.

Die entstandenen Ringe wurden in 37°C warmem Organkulturmedium (s.u.) gelagert, bis jeweils sechs der Ringe parallel und gleichsam ausgerichtet in eine Organkulturkammer (Minucells and Minutissue, Bad Abbach) eingespannt wurden.

2.2.2 Kulturbedingungen

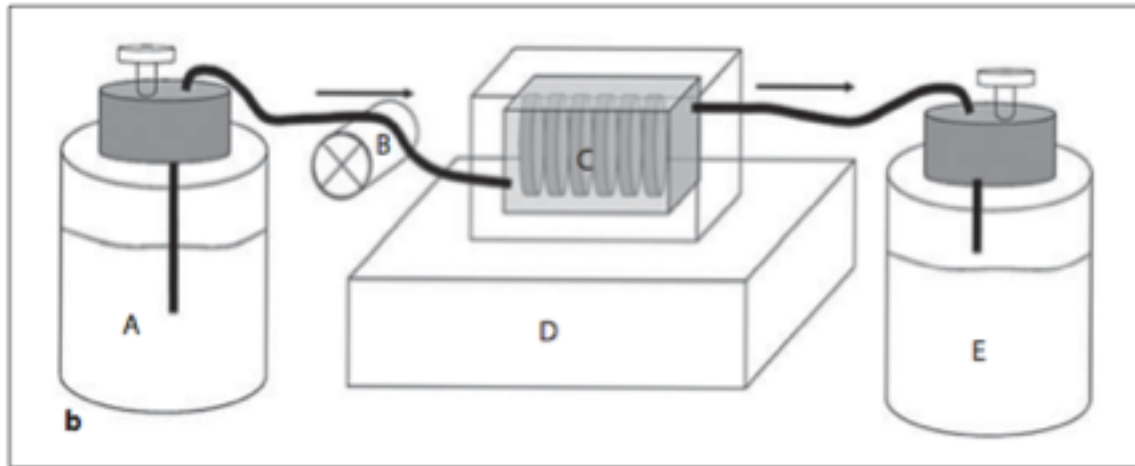


Abb. 7: Schematischer Aufbau der Organkultur (aus Miura et al. 2010).

A: Organkulturmedium (inkl. Inhibitor), B: Pumpe, C: Kammer mit Geweberingen, D: Heizplatte, E: Flasche mit verbrauchtem Organkulturmedium

Die Organkulturkammern befanden sich während der gesamten Versuchsdauer auf einer Heizplatte bei 37°C. Mittels einer Pumpe wurde jede Kammer ständig mit Organkulturmedium durchströmt. Das Organkulturmedium wurde jeweils am Tag der Präparation der Organkultur neu hergestellt und in vorher bei 105 °C autoklavierte Flaschen (Sarstedt AG, Nümbrecht) abgefüllt. Die Flaschen wurden bei 4 °C gekühlt in einer Styroporbox gelagert. Aus diesen Flaschen wurde das Medium mit einer Fließgeschwindigkeit von 2,5 ml/h herausgepumpt und in den auf der Heizplatte verlaufenden Schläuchen erwärmt. Das Medium trat dann auf einer Seite der Kammer in diese ein, durchströmte den Kammerinhalt mit den Ringen und verließ die Kammer auf deren anderer Seite. Am Ende des Schlauchsystems wurde das Medium in bereitgestellten Flaschen aufgefangen. Der Gasaustausch erfolgte mittels Diffusion über die Silikonschläuche. pH und CO₂ im verwendeten Organkulturmedium wurden durch die Verwendung von HEPES stabilisiert. Die beständige Perfusion des Gewebes erlaubt ein Gleichgewicht der Substanzen, derer die Organkultur ausgesetzt ist (Minuth et al. 1999).

Tab. 4: Zusammensetzung des Organkulturmediums

Inhaltsstoff	Konzentration / Menge
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; PAA, Cölbe)	500ml
Ham F12 Medium (PAA)	500ml
Penicilin/Streptomycin - Lösung	1%
Sodium-pyruvat	110 mg/ml
Porcine-Serum (PAA)	10%
HEPES	25mM

2.2.3 Stimulation und Probengewinnung

Die Präparation und der Aufbau der Organkultur erfolgte an Tag 1. An Tag 2 wurde keinerlei Manipulation vorgenommen. Miura et al. konnten zeigen, dass sich die VEGF-Sekretion an Tag 3 stabilisiert hat; daher erfolgte an Tag 3 die Stimulation der Organkultur mit der jeweiligen Substanz. Dazu wurde die Substanz in der entsprechenden Konzentration dem Organkulturvorrat zugegeben, sodass die Organkultur in den Kammern von diesem Zeitpunkt an durch den stetigen Fluss des Mediums der Substanz ausgesetzt war.

Zusätzlich wurden die Organkulturkammern kurz geöffnet, das in ihnen enthaltene Organkulturmedium mit einer sterilen 5ml-Spritze (B. Braun, Melsungen) abpunktiert und in ein 15 ml-Falcon (Eppendorf, Hamburg) überführt. Dem entnommenen Medium wurde die Substanz nun ebenfalls in der entsprechenden Konzentration hinzugegeben. Daraufhin wurde das Medium-Substanz-Gemisch erneut unter sterilen Bedingungen in die Spritze aufgezogen und in die jeweilige Kammer zurückgegeben. Während der Zeit, in der die Kammer geöffnet war, wurde die Pumpe ausgeschaltet. Dadurch, dass die jeweiligen Substanzen sowohl in die Ausgangsflaschen des Mediums, als auch direkt in die Kammern gegeben wurde, wurde gewährleistet, dass die RPE-Aderhaut-Organkultur direkt ab Beginn des Experiments (0h) der Wirkung der Substanz ausgesetzt war.

Um die Wirkung der Substanzen auf die VEGF-Sekretion des RPE feststellen zu können, wurde unmittelbar vor Stimulation der Organkultur, 6 Stunden, 24 Stunden und 48 Stunden nach Stimulation das Organkulturmedium, das die jeweilige Kammer durchströmt hatte, aufgefangen und gesammelt. Dazu wurde das Ende des Schlauchsystems von der Auffangflasche diskonnektiert und in ein 15 ml-Falcon (Sarstedt AG, Nümbrecht) gehängt, in das das austretende Medium für 60 Minuten

hineinfließt. Während der Probennahme wurde das Medium auf 4 °C gekühlt. Anschließend wurde ca. 1 ml dieses Mediums in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) überführt. Dieses wurde für 5 Minuten bei 13.000 U/min bei 4 °C zentrifugiert und anschließend unter Aussparung eines ggf. abgesetzten Pellets, das aus im Medium mitgeschwemmten Zellen bestand, in ein neues steriles 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt. Dieses wurde anschließend bei -20 °C eingefroren.

Bei der Stimulation der Kammern wurde jeweils mindestens eine Kammer unbehandelt belassen, um die natürlich sezernierte VEGF-Menge unter unstimulierten Bedingungen im Medium messen zu können. Um vergleichbare Bedingungen herstellen zu können, wurde jedoch auch diese Kammer zum Zeitpunkt 0h geöffnet, das enthaltene Medium abpunktiert, in ein Falcon gegeben und anschließend zurück in die Kammer überführt. Im verwendeten Organkulturmedium selbst war kein VEGF enthalten.

Tab. 5: Konzentration der verwendeten Substanzen

Name der Substanz	Konzentration
SU1498	10µM
SU1498	5µM
Sunitinib	1µM
Sunitinib	100nM
Bisindolylmaleimide	1µM
Bisindolylmaleimide	100nM
LY 294002	25µM
LY 294002	2,5µM
SU1498 & Bisindolylmaleimide	10µM & 1µM
SU1498 & LY 294002	10µM & 25µM

2.2.4. Calceinfärbung

Um nachzuweisen, dass die Zellen der PRE-/Aderhaut-Organkultur keiner toxischen Wirkung durch die verwendeten Inhibitoren unterliegen, wurde ein Calceinfärbung zum Vitalitätsnachweis durchgeführt. Calcein ist eine fluoreszierende Substanz, die nur von vitalen Zellen über die Zellmembran ins Zytosol transportiert werden kann. Mittels Fluoreszenzmikroskop kann somit anhand der Zellmorphologie erkannt werden, ob es sich um vitale oder avitale Zellen handelt. Hierzu wurde die Organkultur nach Beendigung des Experiments an Tag 5 für 20 Minuten im Brutschrank bei 37°C in einer Calcein-Organokultur-Lösung (1:100, Calcein AM AnaSpec, Fremont, CA, USA.

Ausgangslösung 1 mg) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte bei Zimmertemperatur die Betrachtung unter dem Mikroskop. Alle Arbeitsschritte wurden im Dunkeln durchgeführt.

2.3 RPE-Zellkultur

2.3.1 Kulturbedingungen, Kultivierung

Aus den Augen frisch geschlachteter Schweine wurde im Labor eine RPE-Zellkultur hergestellt. Dazu wurden die Augen zwei bis vier Stunden nach Eukleation zunächst von den äußeren Augenmuskeln und anderem anhängenden Gewebe befreit. Anschließend erfolgte die Inkubation in Betaisodona®-Lösung (im Verhältnis 1:3 mit NaCl) mit nachfolgender Überführung in 4 °C kalte sterile Natriumchloridlösung. Daraufhin wurde der vordere Augenabschnitt mit einer Rasierklinge entfernt. Nachdem auch Linse und Glaskörper entfernt wurden, wurde der verbliebene Augenbecher mit erwärmter phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gefüllt, sodass die Retina von der Choroidea abpräpariert werden konnte. Nun wurde der Augenbecher mit Trypsin gefüllt und für fünf Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Austausch des Trypsins gegen Trypsin-EDTA erfolgte eine weitere Inkubation bei 37 °C für 45 Minuten. Danach wurden die RPE-Zellen von der Bruch'schen Membran gespült und in Zellkulturmedium gegeben, bevor sie zweimalig bei 900 U/min für die Dauer von fünf Minuten zentrifugiert wurden. Nach Resuspension in Zellkulturmedium erfolgte die Aussaat in Zellkulturschalen (60 mm) und die Anzucht bei 37 °C in einem Luftgemisch mit 5 % CO₂-Anteil. Das Zellkulturmedium wurde alle drei Tage gewechselt.

Tab. 6: Zusammensetzung des Zellkulturmediums

Inhaltsstoff	Konzentration / Menge
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; PAA, Cölbe)	500ml
fetales Kälberserum (fetal calf serum, FCS)	10%
Penicilin/Streptomycin - Lösung	1%
Sodium-pyruvat	110 mg/ml
Porcine-Serum (PAA)	10%
HEPES	25mM

2.3.2 Vermehrung der Zellen

Zur Vermehrung der RPE-Zellen wurden diese mit warmer PBS-Lösung gewaschen. Nach anschließender Inkubation der Zellen in Trypsin-EDTA bei 37 °C für 5 Minuten wurden sie mit einem Zellschaber von der Kulturschale gelöst, um sie nun, in Zellkulturmedium aufgenommen, für fünf Minuten bei 900 U/min zu zentrifugieren. Die Zellen wurden dann mit 3ml frischem Zellkulturmedium in neue Zellkulturschalen ausgesät. Die Zellen wurden in den Generationen P0 bis F3 angezogen, wobei Zellmorphologie und -intaktheit mit einem Lichtmikroskop überprüft wurden.

2.3.3 Behandlung der RPE-Zellen mit spezifischen Inhibitoren

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die RPE-Zellkultur mit spezifischen Inhibitoren behandelt. Die applizierte Konzentration der Inhibitoren ist in Tabelle 5 aufgeführt.

Nachdem unter dem Lichtmikroskop die morphologische Intaktheit der Zellen festgestellt wurde, erfolgte zunächst eine Erneuerung des Zellkulturmediums in allen zum Versuch gehörenden Schalen. Hierbei wurden jeweils 3 ml Zellkulturmedium verwendet. Anschließend wurden die Inhibitoren zugegeben und die Zellkulturschale vorsichtig geschwenkt, um den Inhibitor gleichmäßig im Medium zu verteilen. Die Zellen wurden dann für 48 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.4 Toxizitätsanalysen

2.4.1 Zellkultur und Behandlung der Zellen

Zur Untersuchung der eventuellen Toxizität der verwendeten Inhibitoren wurden RPE-Zellkulturen in der Generation F3 genutzt. Nachdem unter dem Lichtmikroskop kontrolliert wurde, dass die Zellen ihrer natürlichen Morphologie entsprechen, wurde das Zellkulturmedium durch 2 ml frische identische Lösung ersetzt. Danach erfolgte die Hinzugabe des zu untersuchenden Inhibitors in der in Tabelle 5 angegebenen Konzentration. Pro Messreihe wurde eine Zellkulturschale unbehandelt belassen, wengleich auch bei dieser das Zellkulturmedium gegen neue Lösung ausgetauscht wurde. Nach vorsichtigem Schwenken der Zellkulturschale zur Durchmischung von Medium und Inhibitor erfolgte die Inkubation für 48 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂.

2.4.2 Auswertung mittels MTT-Assay

Das Zellüberleben nach Behandlung mit dem jeweiligen Inhibitor wurde mittels des Methyl-Thiazolyl-Tetrazolium-(MTT)Assay untersucht. Nur vitale Zellen reduzieren hierbei das gelbe Tetrazoliumsalz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid zu violetter Formazan, welches anschließend photometrisch nachgewiesen werden kann. Da die Reaktion an die Anwesenheit von vitalen Zellen gebunden ist, kann diese Untersuchungsmethode als Zytotoxizitätstest verwendet werden. Hierzu wurde 48 Stunden nach der beschriebenen Stimulation der Zellen das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen anschließend mit PBS gewaschen. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 1 ml MTT, das zuvor in phenolfreiem DMEM gelöst wurde. Nun wurden die Zellen für zwei Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit erfolgte das Absaugen des Überstandes aus den Zellkulturschalen und die Hinzugabe von 500 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) für 5 Minuten. Während dieser Dauer wurden die Zellkulturschalen auf einem Schüttler bewegt (80 U/min). 50 µl des Überstandes jeder Schale wurden nun gemeinsam mit 100 µl sterilem DMSO in eine maschinenlesbare 96-well-Platte pipettiert, um anschließend die Absorption der Proben bei $\lambda = 550$ nm zu messen. Der Anteil der überlebenden Zellen wurde nun mit den unstimuliert belassenen Zellen verglichen, deren Überleben mit 100% berechnet wurde. Zur Berechnung der Signifikanz wurde ein t-test verwendet.

2.5 Herstellung von Gesamtzelllysaten und Proteinbestimmung

2.5.1 Denaturierende Zellyse

Um Expression und Aktivität der mit den jeweiligen Inhibitoren behandelten Zellen untersuchen zu können, wurden Gesamtzelllysate hergestellt.

Hierzu wurde nach 48-stündiger Inkubation der stimulierten Zellen im Brutschrank das Nährmedium abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen einmalig mit PBS gewaschen. Nun wurden 800 µl PBS in jede Zellkulturschale pipettiert. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen jetzt vorsichtig vom Boden der Schale gelöst, bis sie im PBS frei schwammen. Anschließend erfolgte die Überführung in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß. Die Reaktionsgefäße wurden nun für 15 Sekunden abzentrifugiert, um anschließend das überstehende PBS abzusaugen. Das RPE-Zellpellet verblieb am Boden des Reaktionsgefäßes. Darauf folgend wurde die Zellen in 80 µl Lysispuffer resuspendiert

und anschließend für fünf Minuten im Heizblock bei 95 °C erhitzt. Danach wurde die Probe mit 2 mal 5 Ultraschallstößen lysiert. Hierauf folgte die Zentrifugation bei 13.000 U/min bei 4°C. Der Überstand wurde anschließend in neue Reaktionsgefäße überführt und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

Tab. 7: Zusammensetzung des Lysispuffers

Inhaltsstoff	Konzentration / Menge
SDS	2%
Tris (pH 7,4)	20mM
Phosphataseinhibitor-Cocktail	1%
Proteaseinhibitor-Cocktail	1%

2.5.2 Proteinbestimmung

Um die Proben später für die Gelelektrophorese in der gleichen Menge auftragen zu können, musste der Proteingehalt jeder einzelnen Probe bekannt sein. Hierzu wurde das Verfahren nach Bradford (*Bradford' colorimetic assay*, 1976) angewandt, das darauf beruht, dass Proteine mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 Bindungen eingehen. Dabei kommt es zu einem Wechsel des Absorptionsmaximums der Lösung von 465 nm auf 595 nm, welches photometrisch bestimmt werden kann.

Der Versuch wurde in Plastikküvetten durchgeführt. Zunächst wurde dafür dem in der denaturierenden Zellyse gewonnenen Zellüberstand 2 µL entnommen und in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, um dort im Verhältnis 1:50 mit Aqua bidest. verdünnt zu werden. 20 ml dieser Proteinlösung wurden in die Plastikküvette pipettiert und dort mit 1 ml BioRAD Protein-Assay zusammengebracht. Die *BioRAD Protein-Assay*-Lösung wurde vor dem Versuch im Verhältnis 1:5 mit Aqua bidest. verdünnt. Die Plastikküvette wurde sodann um die Reaktion zu starten kurz mit einem Vortex vermischt und für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die photometrische Messung der Extinktion der Probe bei $\lambda=595$ nm gegen einen Leerwert aus 1 ml verdünnter BioRAD Protein-Assay-Lösung mit 20 ml Aqua bidest. gemessen. Die Proteinkonzentration der Probe [K(P)] wurde aus der Extinktion der Probe [E(P)] und der des Standards [E(S)] sowie der Proteinkonzentration des Standards [K(S)] nach der Lambert-Eaton-Gleichung berechnet.

2.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

2.6.1. SDS-Polyacrylamid-Gelenktrophorese

Das bei der denaturierenden Zellyse gewonnene Proteingemisch wurde mittels einer Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) aufgetrennt. Hierbei macht man sich zunutze, dass die Proteine nach der Behandlung mit SDS denaturiert sind und zu ihrem Molekulargewicht proportional negative Ladungen tragen. Die Proteine können so mittels eines elektrischen Feldes in einem Acrylamidgel ihrer Größe nach aufgetrennt werden.

Zum Nachweis des VEGF₁₆₅-Proteins wurden ein 2%-SDS-Polyacrylamid-Sammelgel und ein 15%-SDS-Polyacrylamid-Trenngel verwendet. Bei der Herstellung dieser beiden Gelabschnitte wurden Acrylamidmonomere mit Bis-acrylamid polymerisiert. Diese Reaktion wurde durch Ammoniumpersulfat (10%) katalysiert und durch N,N,N,N-Tetramethylethylenediamin (TEMED) gestartet.

Beide Gelabschnitte waren miteinander verbunden. Die Dicke des Elektrophoresegels betrug 0,75 mm. Im Sammelgel wurden die Proben zu einer Bande komprimiert und anschließend im Trenngel aufgetrennt.

Zur Herstellung der Gele wurden die Mini-Protean® Glass Plates des Mini-Protean® Tetra-cell-Gelkammersystems (BioRAD, München) verwendet. Diese Glasplatten wurden mit Aqua dest. und 70% Ethanol gereinigt, bevor sie in eine vertikale Halterung eingespannt wurden. Zunächst wurden nun die einzelnen Bestandteile des Trenngels in einem 15ml-Falcon zusammengeführt. Nachdem die Polymerisation der Gelbestandteile im Falcon durch die Zugabe von TEMED startete, wurde der Falconinhalt mit einer 5ml-Einmalpipette schnell zwischen die Glasplatten gegeben, hierbei wurde am oberen Ende der Glasplatten etwa zwei Zentimeter Platz belassen, der später mit dem Sammelgel aufgefüllt wurde. Um einen geraden Übergang zwischen Trenn- und Sammelgel herstellen zu können, wurden auf das noch flüssige Trenngel einige Tropfen Aqua bidest. gegeben. Danach konnte das Gel in seiner Halterung geschwenkt werden, so dass es sich in einer geraden horizontalen Ebene verteilte. Nach Auspolymerisation des Trenngels wurde das Aqua bidest. wieder entfernt. Die Bestandteile des Sammelgels wurden nun in einem 15 ml-Falcon zusammenpipettiert und die Polymerisation wiederum durch die Zugabe von TEMED gestartet. Das Sammelgel wurde mit ebenfalls mit einer 5 ml-Einmalpipette auf das mittlerweile feste Trenngel aufpipettiert. Ein

Kamm wurde in das Sammelgel eingesteckt um Taschen für die spätere Probenauftragung auszusparen.

Tab. 8: Zusammensetzung des *Sample Buffers* für SDS-Gelelektrophoresen

Inhaltsstoff	Konzentration / Menge
Tris (pH 6,8)	312,5mM
SDS	10%
2-Mercapto-Ethanol	10%
Glycerol	50%
Bromphenolblau	einige Kristalle

Die Proteinlösung wurde vor dem Auftragen in die Taschen mit Aqua bidest. so verdünnt, dass in einer Probe stets 10 µg Proteingehalt vorhanden waren. Des Weiteren wurden jeder Probe 3 µl Probenpuffer (*sample buffer*) hinzugefügt; das Probengesamtvolumen betrug insgesamt 12 µl. Die Probe wurde nun für fünf Minuten bei 95 °C im Heizblock inkubiert und anschließend in die Taschen des Sammelgels aufgetragen. Zusätzlich wurde in eine Tasche ein Molekulargewichtsmarker aufgetragen, um dann im Western Blot das Molekulargewicht der sichtbaren Banden ablesen zu können. Hierbei handelte es sich um Roti®-Mark (Carl Roth GmbH & Co. KG) oder Precision Plus Protein Kaleidoscope® (BioRAD, München). Die Elektrophorese wurde nun mit 12mA (je Gel), 150 V und 150 W für 30 Minuten gestartet. Während dieser Zeit bildeten die Proben im Sammelgel eine Bande und durchliefen dieses. Nachfolgend wurde die Stromstärke auf 24 mA je Gel erhöht; die Spannung betrug weiterhin 150V, die Leistung 150 W, Dauer eine Stunde. Während dieser Zeit erfolgte die Auftrennung der Proben im Trenngel.

Tab. 9: Zusammensetzung des Gelelektrophorese-Laufpuffers (pH 8,3)

Inhaltsstoff	Konzentration / Menge
Tris	25mM
Glycin	192mM
SDS	0,10%

2.6.2 Western Blot

Die Überführung der Proteine aus dem Polyacrylamid-Gel auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran, (Immobilon™ P 1500, Millipore, Eschborn)) erfolgte in einer *semi-dry-blot*-Apparatur. Folgende Puffer wurden bei der Übertragung der Proteine benutzt:

Tab. 10: Zusammensetzung der Pufferlösungen für den Western Blot

Puffer	Inhaltsstoff	Menge/Konzentration
<i>Kathodenpuffer</i>	Tris	25nM
	Aminhexansäure	40nM
	SDS	0,01%
	Methanol	20%
<i>Anodenpuffer 1</i>	Tris	30nM
	Methanol	20%
<i>Anodenpuffer 2</i>	Tris	300nM
	Methanol	20%

Nachdem die Proteine in der SDS-Page im Trenngel aufgetrennt wurden, wurden das Gel aus den Glasplatten und das Sammelgel entfernt. Das Trenngel wurde wenige Minuten im Kathodenpuffer gelagert. Die Blotting-Membran wurde nun für drei Minuten in Methanol aktiviert. Das Methanol wurde anschließend binnen zwei Minuten in Aqua bidest. ausgewaschen und die Membran sodann in Anodenpuffer 1 gelagert. Die Whatman-Filter wurden mit Pufferlösung getränkt und der Blot folgendermaßen auf einer vorher mit Aqua dest. und 70% Ethanol gereinigten Glasplatte aufgebaut: 6 Lagen Filterpapier (Anodenpuffer 2), 3 Lagen Filterpapier (Anodenpuffer 1), aktivierte PVDF-Membran, SDS-Page-Gel, 6 Lagen Filterpapier (Kathodenpuffer). Zwischen den einzelnen Lagen Filterpapier, bzw. zwischen Gel und Blotting-Membran wurden Luftblasen entfernt, die den Übertritt der Proteine behindert hätten. Dieser Blotaufbau wurde sodann in die *Semi-dry-blot*-Apparatur überführt und der Western Blot bei 37mA

(je Gel), 15V und 150W während der Dauer von 50 Minuten durchgeführt. Nachfolgend wurde die Lage des Gels auf der Membran markiert und die Filter sowie das Gel entfernt. Die nun die Proteine tragende PVDF-Membran wurde in eine mit einigen Millilitern TTBS gefüllte Plastikschaale überführt. Alle nun folgenden Arbeitsschritte wurden auf einem Schüttler bei 80 U/min durchgeführt. Die verwendeten Lösungen sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Tab. 11: Zusammensetzung der Wasch- und Blockierlösungen für PVDF-Membranen

Puffer	Inhaltsstoff	Menge/Konzentration
<i>10xTBS (Stammlösung)</i>	Tris/HCl	1M, pH 7,4
	NaCl	1,5M
<i>1xTTBS</i>	TBS	1:10 verdünnt
	Tween 20	0,10%
<i>Blockierlösung</i>	Magermilchpulver (Roth GmbH)	4g
	TTBS	100ml

Die Membran wurde drei mal für zehn Minuten in TTBS gewaschen. Daran schloss sich eine 60-minütige Inkubation in Blockierlösung an. Hierdurch wurden die verbliebenen Proteinbindungsstellen der Membran abgesättigt, um eine unspezifische Bindung der verwendeten Antikörper an die Membran zu verhindern. Über Nacht wurde die Membran nun bei 4°C mit dem Primärantikörper gegen VEGF (VEGF:sc-152 Antibody, Santa Cruz Biotechnology) inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Antikörperlösung wieder entfernt und der Blot mit TTBS dreimal gewaschen (15 min., 5 min., 5 min.). Anschließend wurde die Membran für 30 Minuten mit dem peroxidasegekoppelten Zweitantikörper (Anti Rabbit IgG-AK, HRP-linked, Cell signaling Technology) inkubiert. Es folgten fünf Waschgänge in TTBS für je fünf Minuten. Nun wurde ein Chemielumineszenzreagenz (Chemiluminescent HRP Substrate, Millipore Corporation, USA) bei Raumtemperatur für fünf Minuten auf die Membran gegeben. Dieses Reagenz stellt das Substrat der an den Zweitantikörper gebundene Peroxidase dar. Dazu wurde die Blotmembran mit der proteintragenden Seite nach oben auf eine Frischhaltefolie überführt, hier fand die Benetzung mit der Chemielumineszenzreagenz statt. Die Lösung wurde anschließend abgenommen, die Membran in der Frischhaltefolie eingeschlagen und die Chemielumineszenzsignale der Proteinbanden anschliessend in einem UV-Fluoreszenz-Chemilumineszenz-System (MF-ChemiBis,

BioStep GmbH, Jahnsdorf) detektiert. Die Belichtungszeit betrug vier Minuten. Die Bandenstärke wurde mit der TotalLab TL100-Software (TotalLab Limited, Newcastle upon Tyne, UK) densitometrisch ausgewertet.

Als Proteinkontrolle diente β -Actin. Dazu wurde obiges Vorgehen erneut identisch durchgeführt, statt des VEGF-Proteins jedoch β -Actin detektiert. Hierzu wurde ein Primärantikörper gegen β -Actin verwendet (Anti β -Actin Rabbit Antibody, Rockland Immunochemicals Inc., USA). Alle Arbeitsschritte bei Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) und Western Blot waren identisch zum Vorgehen bei der Bestimmung des VEGF-Gehalts der Proben. Lediglich die Belichtungszeit bei der Detektion der β -Actin-Proteinbanden betrug acht Minuten.

Nach der densitometrischen Auswertung der beiden Western Blots wurde die Ratio zwischen VEGF und β -Actin einer identischen Probe errechnet (Software: TotalLab Quant, Bio Systemica, Devon, UK). Hierdurch wurden eventuelle Schwankungen im Proteingehalt der Proben verrechnet. Die Ergebnisse wurden in Prozentzahlen umgerechnet, wobei die VEGF/ β -Actin-Ratio der unstimulierten Kontrolle bei der Berechnung der Ergebnisse als 100% definiert wurde. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde mittels eines t-Tests errechnet.

2.6.3 Ponceau S-Färbung

Zum Nachweis der Übertragung der Proteine aus dem Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) auf die PVDF-Membran erfolgte eine Färbung mit dem Azofarbstoff Ponceau S. Dieser färbt die Proteine auf der Membran durch Anlagerung an deren Aminogruppen reversibel rot an. Dazu wurde die Membran für drei Minuten in der Färbelösung inkubiert und anschließend die überschüssige Farbe mit Aqua dest. abgespült. Dadurch wurden auf allen Membranen die roten Proteinbanden sichtbar.

Tab. 12: Zusammensetzung der Ponceau S-Färbelösung

Inhaltsstoff	Menge/Konzentration
Ponceau-S	0,20%
Essigsäure in Aqua dest.	10%

2.7 VEGF-Enzym-Linked-Immunoabsorbent Assay

2.7.1 Testprinzip und Material

Als ELISA wurde ein Quantikine® Human VEGF Immunoassay (R&D Systems, Inc., USA, Minneapolis) verwendet. Er detektiert VEGF-Konzentrationen in Zellkulturmedien, Serum und Plasma (Klettner und Roeder 2008). Alle verwendeten Substanzen wurden vom Hersteller des ELISA-Kits geliefert und gehörten einer identischen Charge an. Der ELISA wurde gemäß Herstellerangabe durchgeführt.

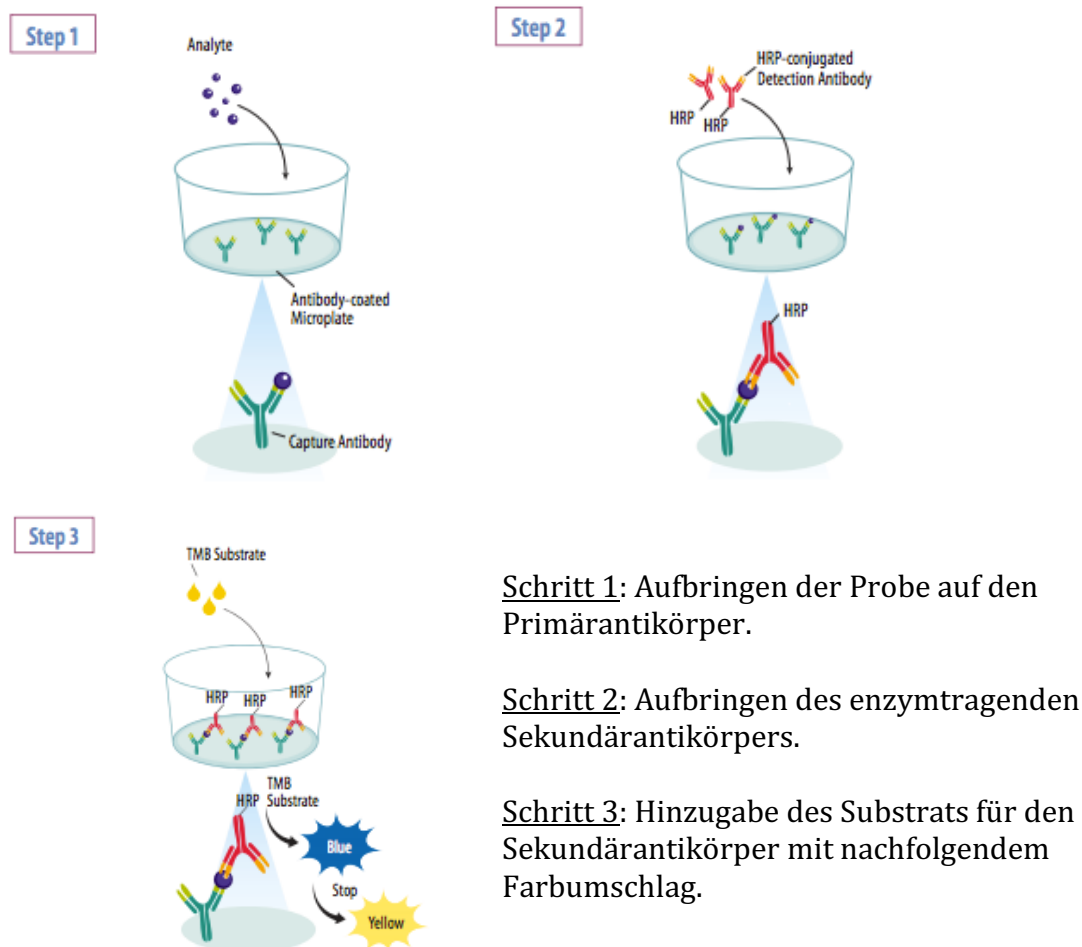


Abb. 8: Schematische Darstellung des VEGF-ELISA.

aus: R&D Systems, *ELISA Reference Guide & Catalogue*, Minneapolis, USA, 2012.

2.7.2 Durchführung des VEGF-ELISA

Um den VEGF-Gehalt einer Probe berechnen zu können ist es notwendig, im Rahmen der Durchführung des ELISAs Proben mitzubestimmen, bei denen der Gehalt an VEGF bekannt ist. Hierzu wurde ein vom Hersteller mitgelieferter pulverförmiger VEGF-

Standard in eine Verdünnungsreihe überführt, an deren Ende in Reaktionsgefäßen Lösungen entstanden, die einen VEGF-Gehalt von 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml und 62,5 pg/ml hatten. Der VEGF-Gehalt wurde später im ELISA mitbestimmt, um die Messergebnisse zu verifizieren.

Die zu untersuchenden Proben wurden aufgetaut, auf Raumtemperatur temperiert und durch auf- und abpipettieren vermischt. Bevor 200 µl dieser Probe in eines der 96 Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert wurden, erfolgte die Gabe von 50 µl RD1W in jede Vertiefung, um den ELISA zu aktivieren. Jede Probe wurde dann doppelt aufgetragen. Die Platte wurde mit Einweg-Klebestreifen überklebt, um sie vor Kontamination von außen zu schützen und für zwei Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Während dieser Zeit konnte das in der Probe enthaltene Protein an den Primärantikörper binden. Anschließend wurde der Inhalt der *wells*, und damit auch ungebundener Primärantikörper, dreimal maschinell mit einem *wash buffer* ausgewaschen (ELx50 Washer, Biotek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall).

Es erfolgte dann die Zugabe von 200 µl VEGF-Konjugat, welches den Zweitantikörper beinhaltet, der spezifisch gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers gerichtet war. Der ELISA wurde erneut abgeklebt und nach zwei Stunden analog zu obigem Vorgehen gewaschen. Nun wurde das Substrat der an den Sekundärantikörper gekoppelten Meerrettichperoxidase als *Color Reagent* (200 µl) in die *wells* gegeben und der ELISA für 20 Minuten unter einer lichtundurchlässigen Aluminiumfolie gelagert.

Während dieser Zeit bildete sich in der Lösung ein individueller gelblicher Farbumschlag. Nach Ablauf der 20 Minuten wurde die Folie entfernt und 50 µl *stop solution* hinzugegeben, die die enzymatische Reaktion beendete und gleichzeitig den gelblichen Farbumschlag ins Bläuliche verfärbte.

2.7.3 Auswertung

Der durch die enzymatische Reaktion hervorgerufene Farbumschlag wurde photometrisch bei $\lambda = 450\text{nm}$ gegen einen Leerwert aus 200 µl RD5K gemessen (ELx800 Reader, Biotek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall). Da jede Probe doppelt aufgetragen worden war, erhielt man für jede Probe auch zwei Messergebnisse, deren

Mittelwert anschließend als Messergebnis ermittelt wurde. So konnten eventuelle Schwankungen in der Probenauftragung eliminiert werden.

Die VEGF-Konzentration wurde anhand der Regressionsgeraden der Standardkurve berechnet, welche eine Linearität bis 1000 pg/ml aufwies.

2.8 Statistische Auswertung

Bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse der ELISA-Untersuchungen, der Toxizitätsanalysen mittels MTT sowie des Proteingehalts der Banden im Western Blot wurden zunächst die Mittelwerte der Ergebnisse und die zugehörigen Standardabweichungen berechnet. Anschließend wurde der t-test nach Student angewendet, um die signifikanten Unterschiede zwischen der jeweiligen Kontrolle und den nach Stimulation gewonnenen Werten zu berechnen. Hierzu wurde die Software SigmaPlot® (Systat Software Inc., USA) verwendet, wobei $p \leq 0,05$ als signifikant definiert wurde.

Sämtliche Versuche wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Zytotoxizität der verwendeten Substanzen auf RPE-Zellen

3.1.1 MTT-Assay

Entsprechend der beschriebenen Vorgehensweise wurden MTT-Assays mit der Frage durchgeführt, welchen Einfluss die verwendeten Substanzen auf das Überleben der Zellen des RPE haben. Keiner der verwendeten Inhibitoren hatte einen toxischen Effekt auf das RPE. Für die Toxizitätsanalysen wurden hierbei RPE-Zellen der F3-Generation verwendet. Die Ergebnisse sind einzeln für jede verwendete Substanz und jeden Zeitpunkt im Anhang wiedergegeben.

3.1.2 Calceinfärbung

Nach Beendigung der RPE-/Choroidea-Organkultur an Tag 5 erfolgte nach 20-minütiger Inkubation in Calcein die Betrachtung der Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop bei $\lambda=495\text{nm}$ zur Klärung der Frage, ob die verwendeten Substanzen in der Organkultur eine mögliche toxische Wirkung auf die Zellen besitzen. Für keinen der verwendeten Inhibitoren war eine solche toxische Wirkung auf die Zellen in der Organkultur festzustellen. Die folgenden Bilder zeigen jeweils vitales RPE in der Organkultur nach 48-stündiger Stimulation mit dem angegebenen Inhibitor.

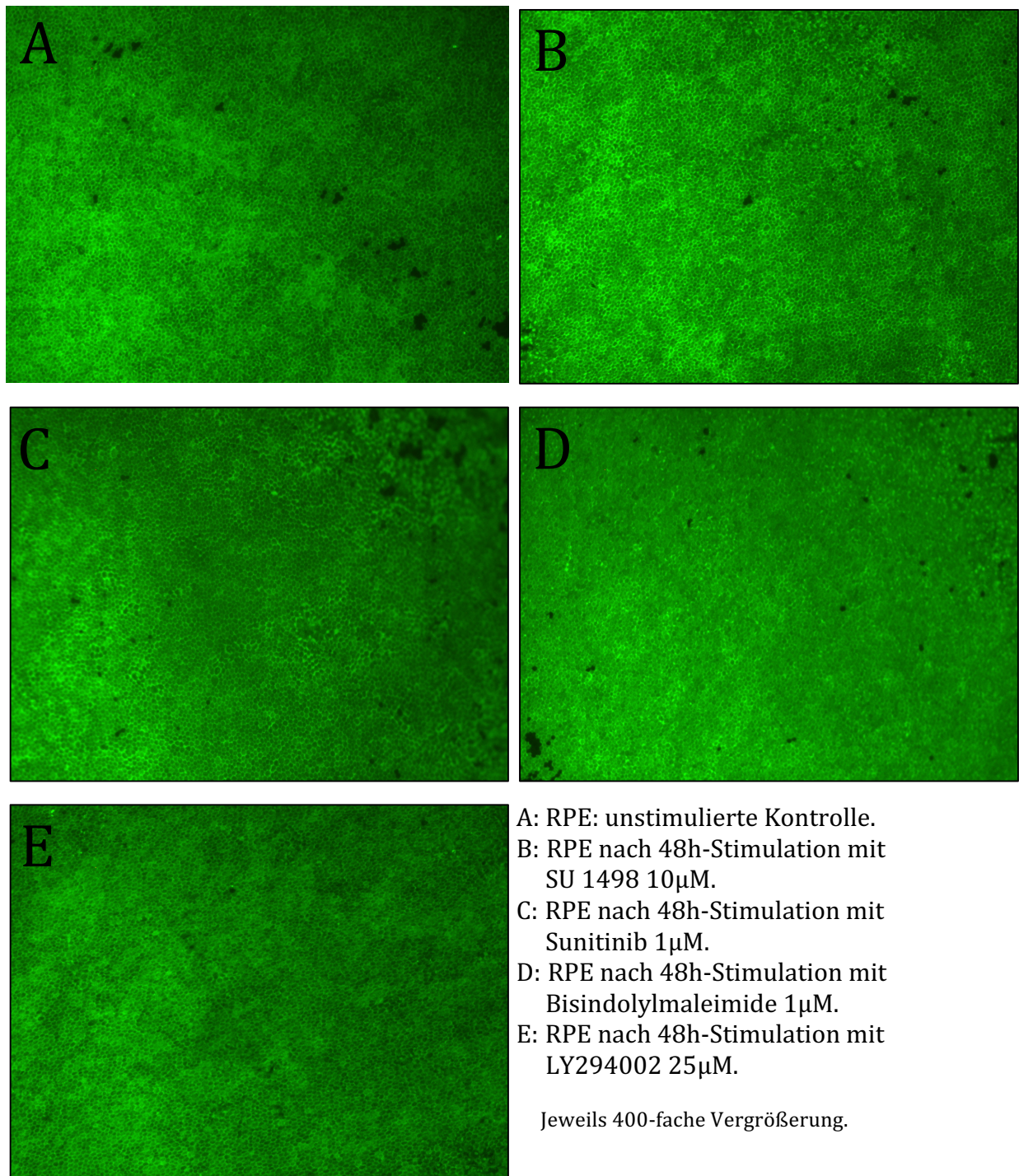


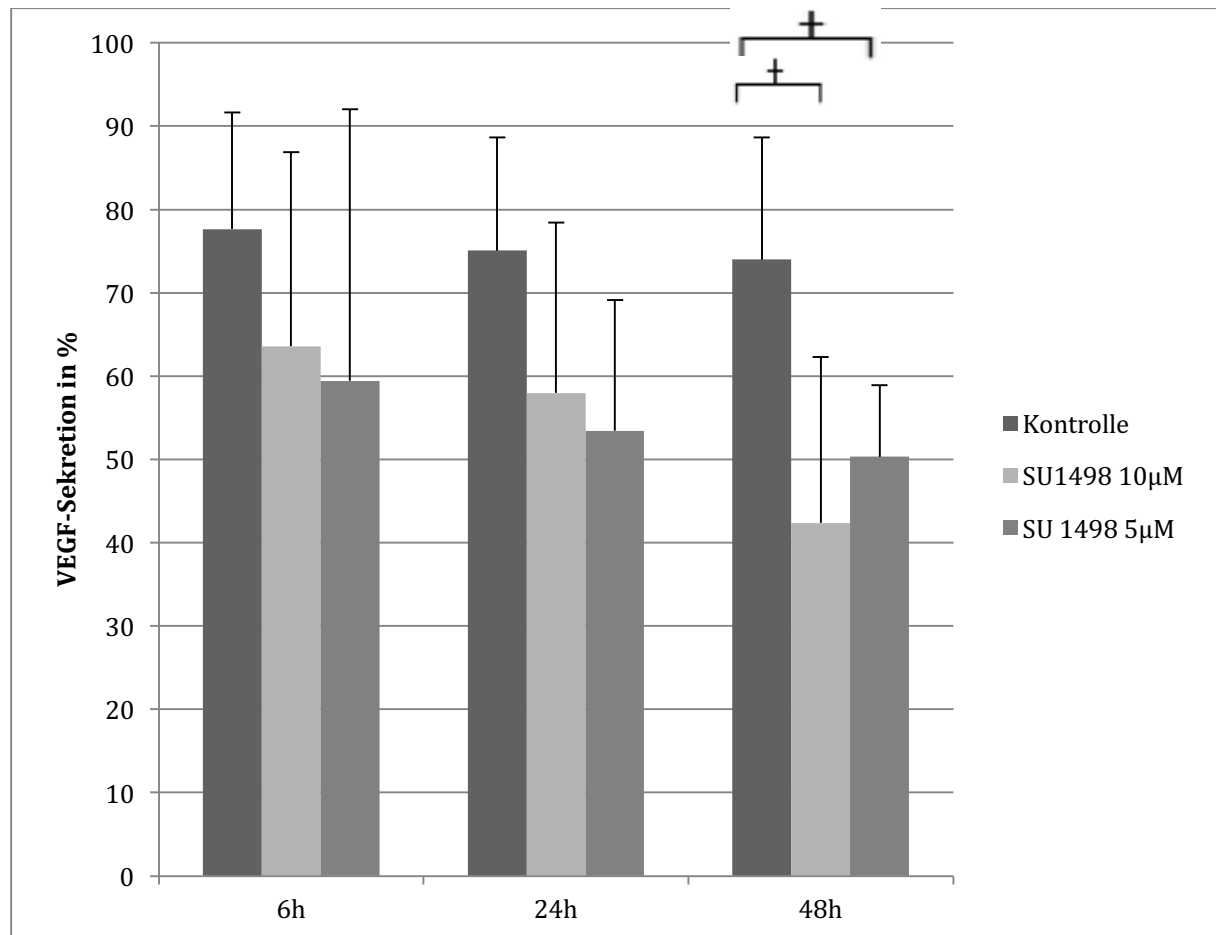
Abb. 9: Calceinfärbungen.

3.2 Ergebnisse Organkultur (ELISA)

Nachfolgend werden die jeweiligen Ergebnisse aufgeführt. Alle Versuche wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander mit verschiedenen Zelllinien durchgeführt. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt einzeln für jede getestete Substanz, bzw. für Substanzkombinationen. Dabei wurde die zu Versuchsbeginn sezernierte VEGF-Menge (Stimulation der Zellen zum Zeitpunkt 0h) als 100% definiert.

Im Folgenden werden die Ergebnisse graphisch und in ihren bedeutsamen Punkten im Text wiedergegeben; eine komplette tabellarische Übersicht aller Ergebnisse findet sich im Anhang.

3.2.1 Inhibition des VEGFR-II durch SU 1498



**Abb. 10: VEGF-Sekretion nach Inhibition des VEGFR-II durch SU 1498 („SU“).
+: $p \leq 0,05$, Signifikanz errechnet mit t-test.**

Nach Stimulation der Organkultur mit dem VEGFR-II-Inhibitor SU1498 in den Konzentrationen 10 µM und 5 µM war die sezernierte VEGF-Menge 48h nach Versuchsbeginn in beiden Versuchsreihen statistisch signifikant niedriger als in der unstimulierten Kontrolle (SU1498 10 µl nach 48h: 42,36% des Ausgangswerts ($p \leq 0,05$), SU1498 5 µl nach 48h: 50,31% des Ausgangswerts ($p \leq 0,05$)). Auch zu den anderen Messzeitpunkten (6 und 24h nach Stimulation) zeigten sich jeweils niedrigere VEGF-Konzentrationen als in der Kontrolle, jedoch waren die Unterschiede hier nicht als statistisch signifikant zu bewerten.

3.2.2 Tyrosinkinaseinhibition durch Sunitinib

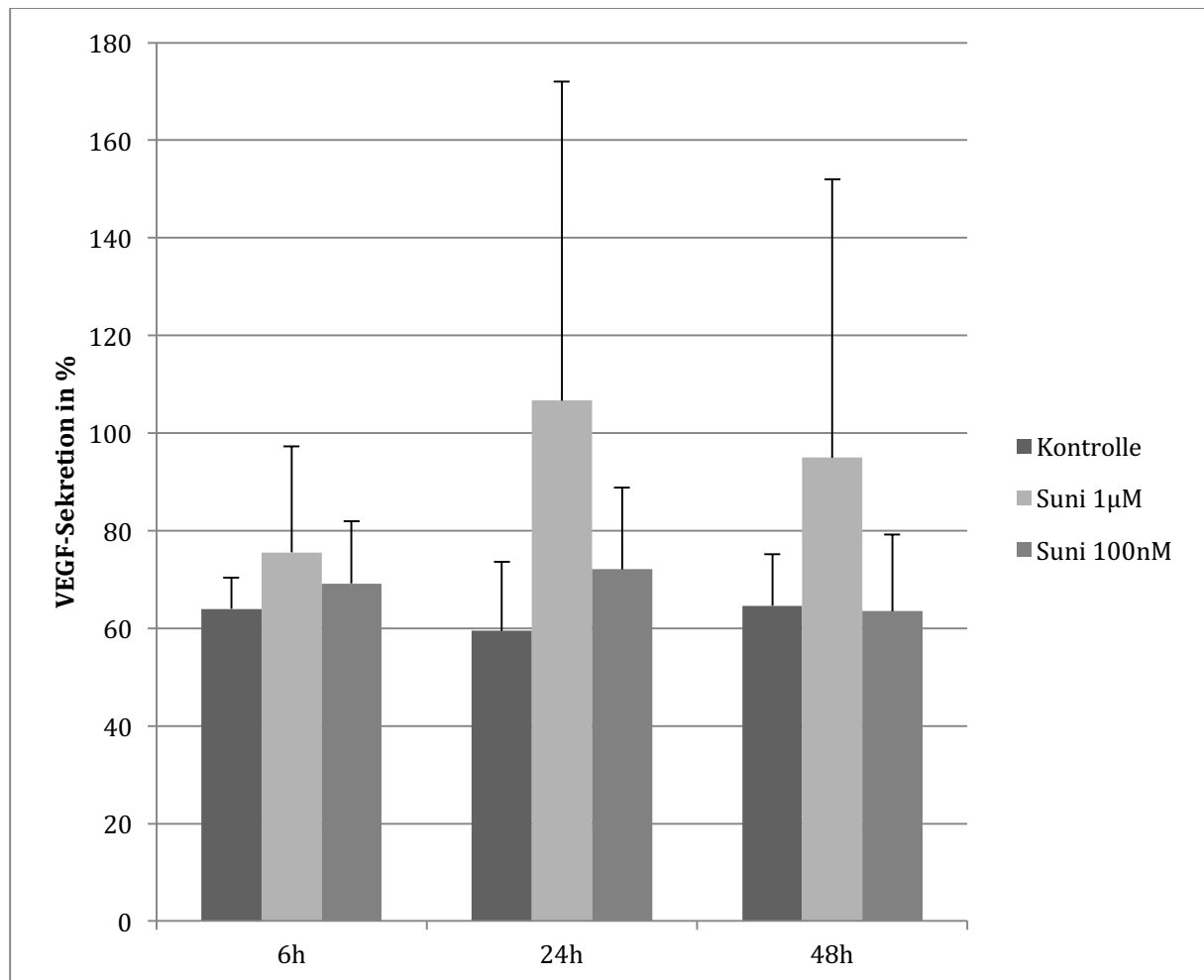


Abb. 11: VEGF-Sekretion nach Multityrosinkinaseinhibition durch Sunitinib („Suni“).

Unter Verwendung des Multityrosinkinase-Inhibitors Sunitinib in den Konzentrationen 1 µM sowie 100 nM war keine Abnahme der VEGF-Sekretion zu beobachten. Zu allen Messzeitpunkten waren die VEGF-Konzentrationen in den mit Sunitinib behandelten Organkulturkammern höher als in der Kontrolle; die einzige Ausnahme bildet die Messung nach 48h nach Stimulation mit Sunitinib in der niedrigen Konzentration von 100 nM.

3.2.3 Inhibition der Proteinkinase C durch Bisindolylmaleimide

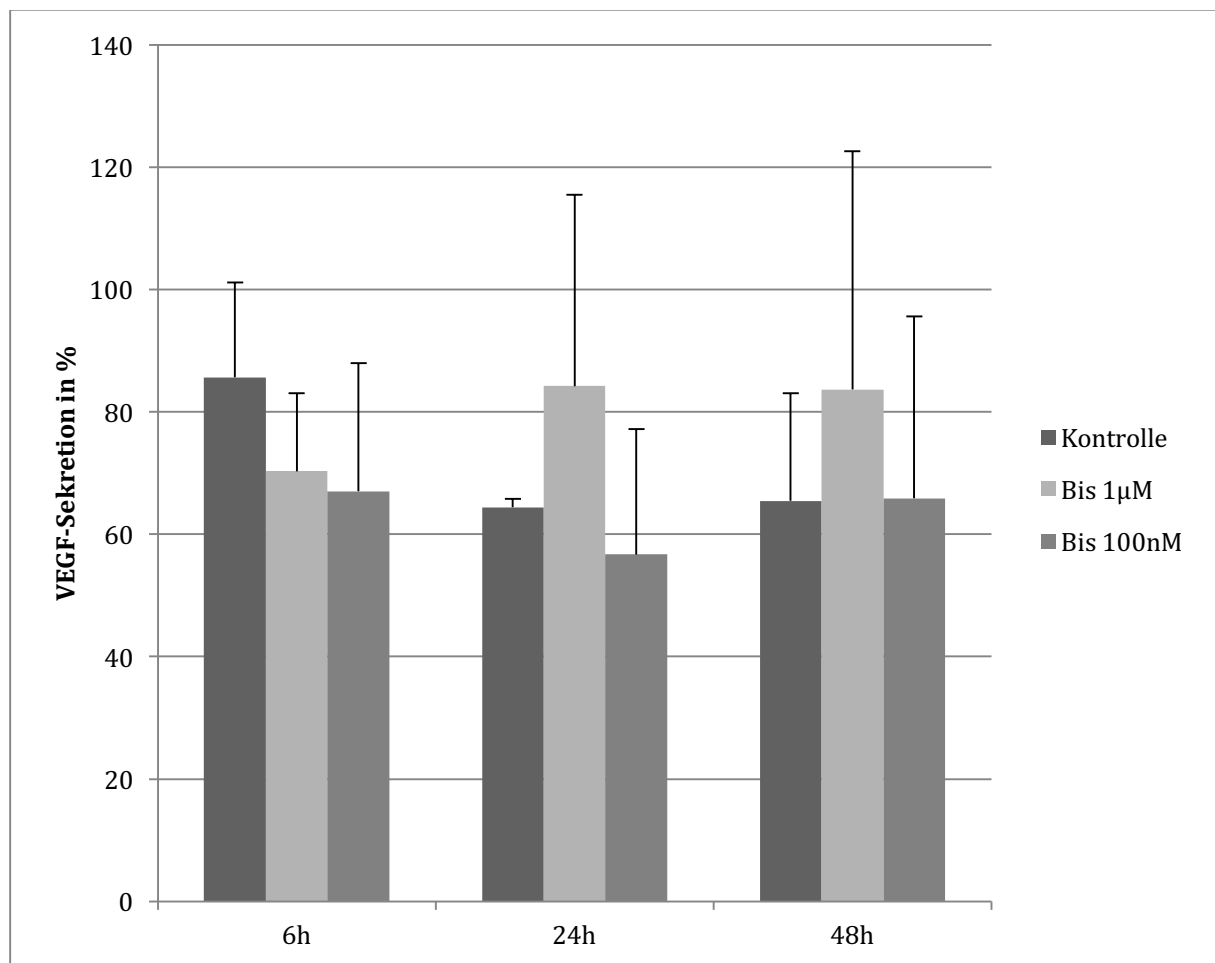


Abb. 12: VEGF-Sekretion nach Inhibition der Proteinkinase C durch Bisindolylmaleimide („Bis“).

Nach Inhibition der Proteinkinase C durch Bisindolylmaleimide ließ sich keine signifikante Abnahme der VEGF-Sekretion zeigen. Die Messwerte zeigen ein uneinheitliches Bild mit teils Zunahme, teils Abnahme der VEGF-Sekretion gegenüber der Kontrolle.

3.2.4 Inhibition der PI3K durch LY294002

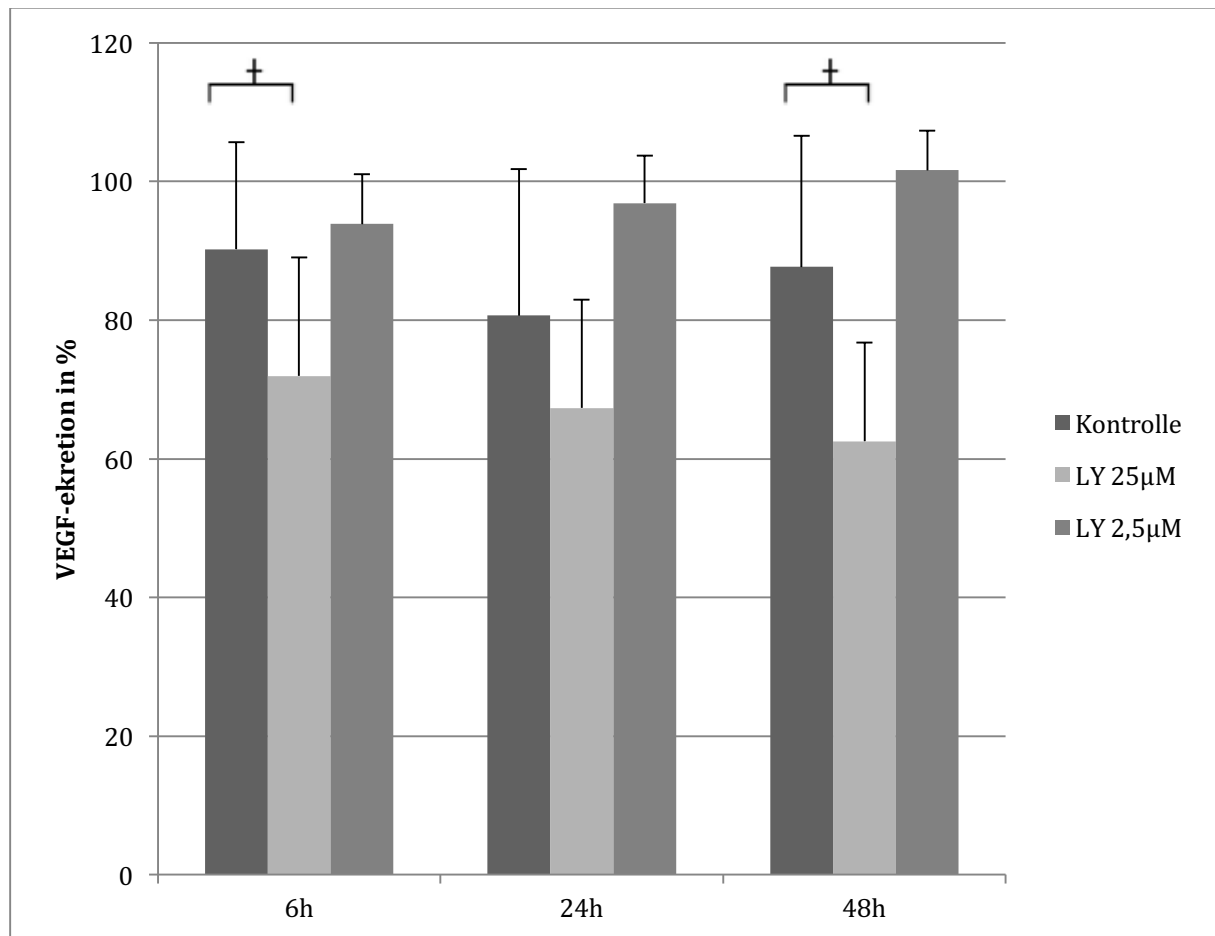


Abb. 13: VEGF-Sekretion nach Inhibition der PI3-Kinase durch LY294002 („LY“). +: $p \leq 0,05$, Signifikanz errechnet mit t-test.

Statistisch signifikant erniedrigte VEGF-Konzentrationen gegenüber der Kontrolle zeigten sich nach sechs und 48-stündiger Inhibition der Phosphatidylinositol-3-Kinase mittels LY294002 in der Konzentration 25 μM (6h: $p \leq 0,05$; 48h: $p \leq 0,05$). Auch nach 24h ist die Abnahme der VEGF-Sekretion deutlich (Kontrolle: 87,6%, LY: 62,5%; $p > 0,05$), allerdings nicht signifikant. Wird LY294002 dagegen in einer erniedrigten Konzentration von nur 2,5 μM eingesetzt, lässt sich die Abnahme der VEGF-Sekretion nicht reproduzieren. Die gemessenen VEGF-Spiegel liegen zu allen drei Messzeitpunkten oberhalb denen der Kontrolle.

3.2.5 Inhibition von VEGFR-II und Proteinkinase C durch SU1498 & Bisindolylmaleimide

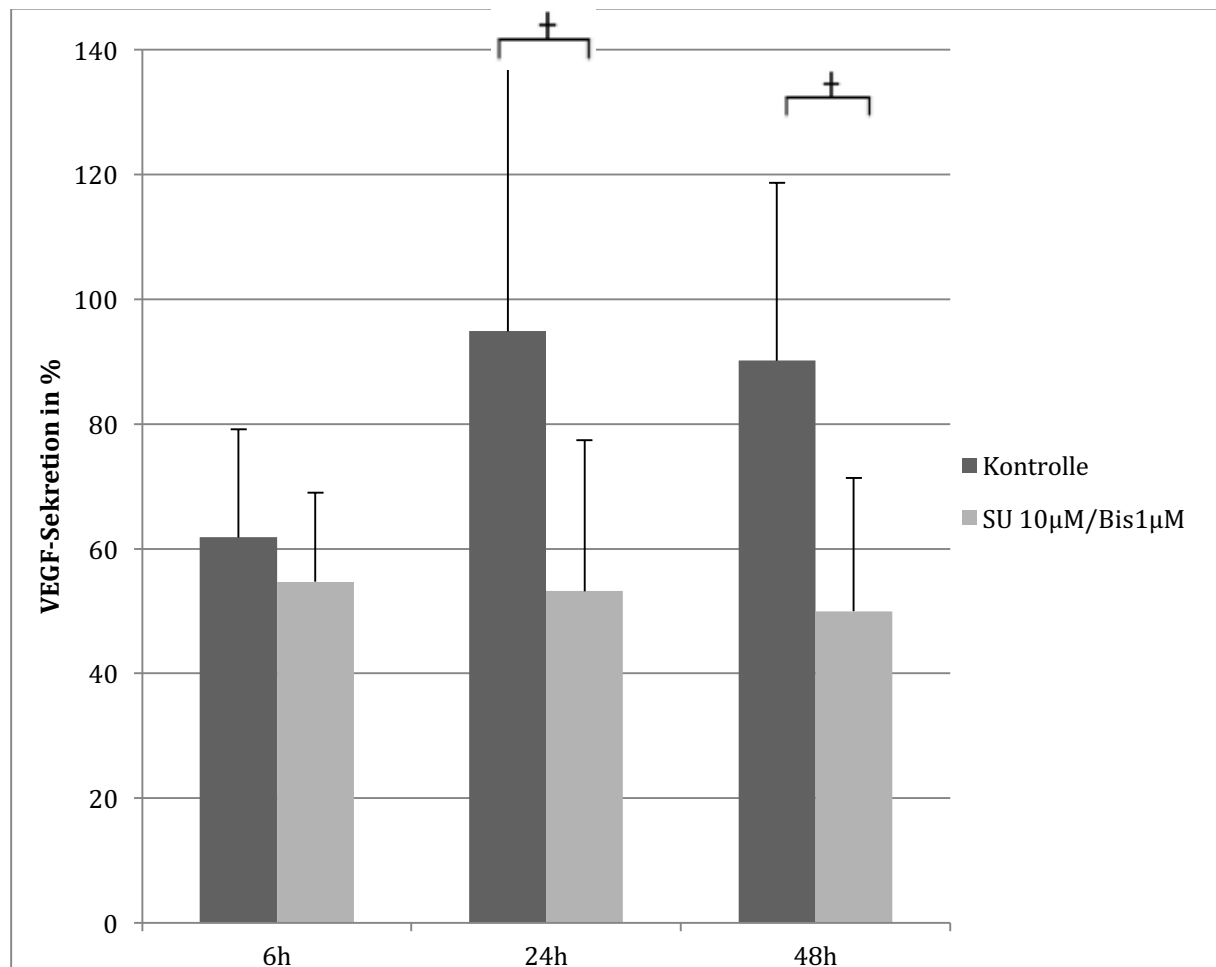


Abb. 14: VEGF-Sekretion nach gleichzeitiger Inhibition von VEGFR-II und Proteinkinase C durch SU 1498 („SU“) und Bisindolylmaleimide („Bis“). +: $p \leq 0,05$, Signifikanz errechnet mit t-test.

Zusätzlich zu den Versuchen, bei denen die Organkulturen mit einer Monosubstanz stimuliert wurden, wurden auch Versuchsreihen mit Kombinationen zweier Inhibitoren durchgeführt; um zu klären, ob die beteiligten Substanzen am selben Signaltransduktionsweg beteiligt sind; in diesem Falle mit SU1498 in einer Konzentration von 10 μM sowie Bisindolylmaleimide 1 μM .

Hierbei waren die VEGF-Konzentrationen nach 24h und 48h signifikant erniedrigt (24h: $p \leq 0,05$; 48h: $p \leq 0,05$). Bereits nach 6h zeigt sich ein erniedrigter VEGF-Gehalt, der zu diesem Zeitpunkt allerdings noch nicht signifikant ist ($p > 0,05$).

3.2.6 Inhibition von VEGFR-II und PI3K durch SU1498 & LY294002

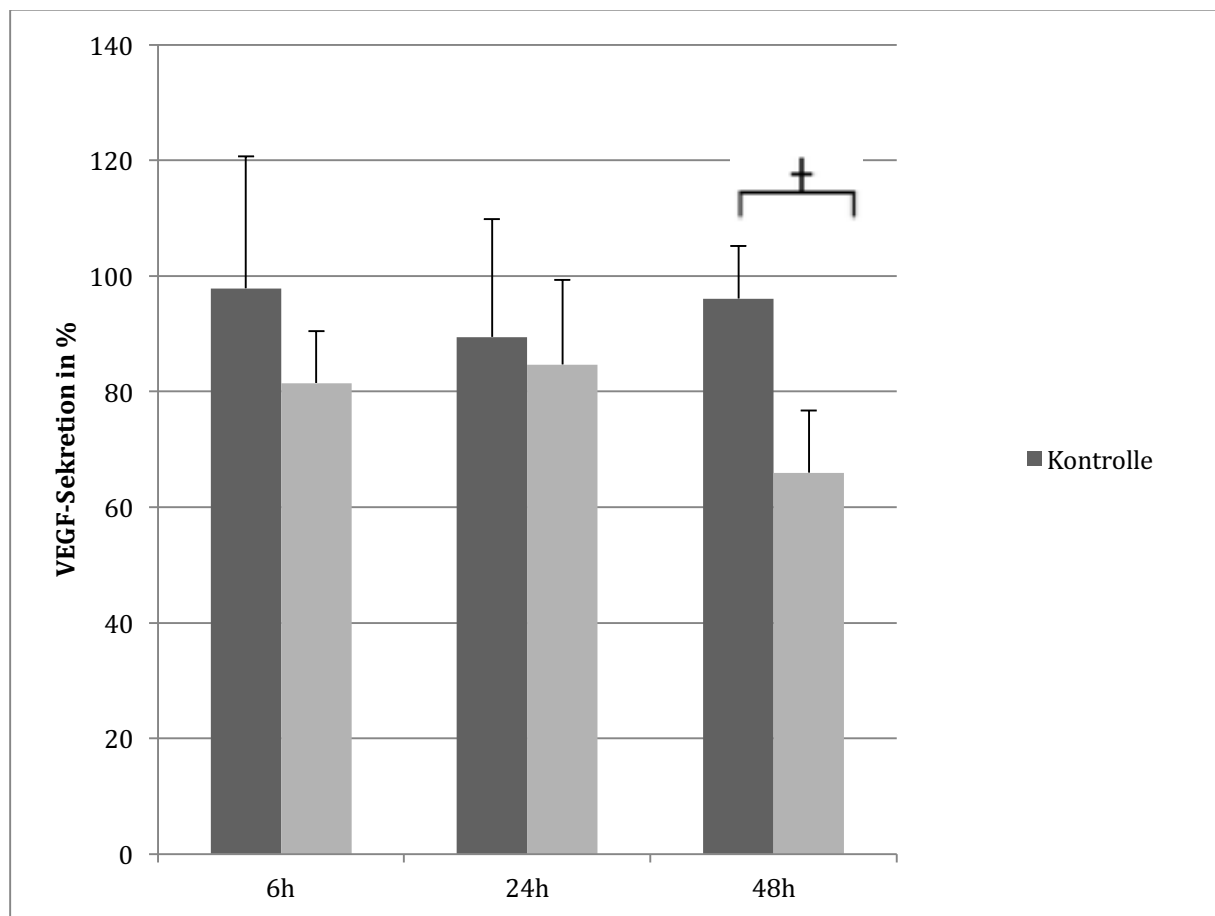


Abb. 15: VEGF-Sekretion nach gleichzeitiger Inhibition von VEGFR-II und PI3K durch SU 1498 („SU“) und LY294002 („LY“).

+: $p \leq 0,05$, Signifikanz errechnet mit t-test.

Bei einer gleichzeitigen Inhibition des VEGFR-II durch SU1498 (10 μM) und der PI3-Kinase durch LY294002 (25 μM) zeigen sich nach 48h ebenfalls gegenüber der Kontrolle signifikant erniedrigte VEGF-Konzentrationen ($p \leq 0,05$). Nach 6h und 24h ist die zu diesen Zeitpunkten ebenfalls nachweisbare Abnahme der VEGF-Sekretion aufgrund der Standardabweichung nicht als signifikant zu bewerten (6h: $p > 0,05$; 24h: $p > 0,05$).

3.3 Ergebnisse Western Blot

Um die intrazelluläre VEGF-Proteinexpression von RPE-Zellen unter dem Einfluss der verwendeten Inhibitoren zu untersuchen, wurde nach Stimulation der RPE-Zellkulturen ein Western Blot durchgeführt, um eine quantitative Aussage über die jeweilige Proteinkonzentration treffen zu können. Erneut wurde die Menge der in der unstimulierten Zellkultur gemessenen VEGF-Expression als 100% definiert. Alle

anderen Prozentangaben beziehen sich auf diesen Anfangswert. Im Folgenden werden die Ergebnisse in Ihren bedeutsamen Punkten graphisch und im Text wiedergegeben; eine komplette tabellarische Übersicht aller Ergebnisse findet sich im Anhang.

3.3.1 Inhibition des VEGFR-II durch SU1498

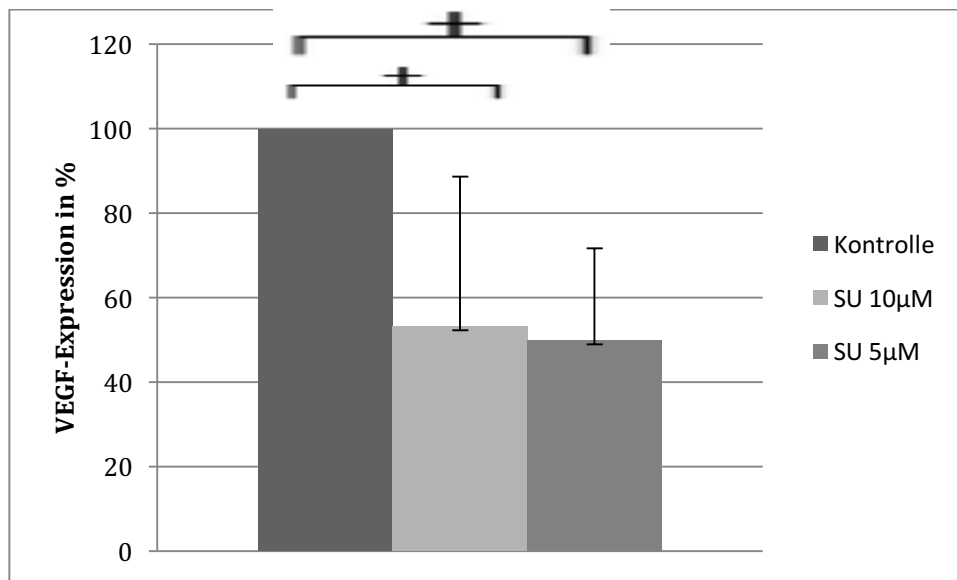


Abb. 16: VEGF-Expression nach 48h Inhibition des VEGFR-II durch SU 1498 („SU“). +: $p \leq 0,05$, Signifikanz errechnet mit t-test.

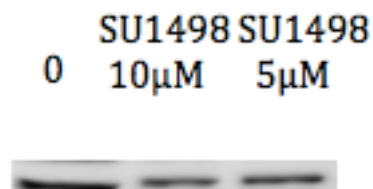


Abb. 17: Beispielblot für die Substanz SU1498 nach 48h Stimulation. 0: unstimulierte Kontrolle.

Die Inhibition des VEGFR-II durch SU 1498 führt nach 48 Stunden zu einer Abnahme der VEGF-Expression, die sowohl für die Konzentration 10 µM als auch für 5 µM statistisch signifikant ist. So beträgt die VEGF-Expression bei 10 µM nach 48h 44,64% der Kontrolle ($p \leq 0,05$), bei 5 µM 49,98% ($p \leq 0,05$).

3.3.2 Inhibition der Proteinkinase C durch Bisindolylmaleimide

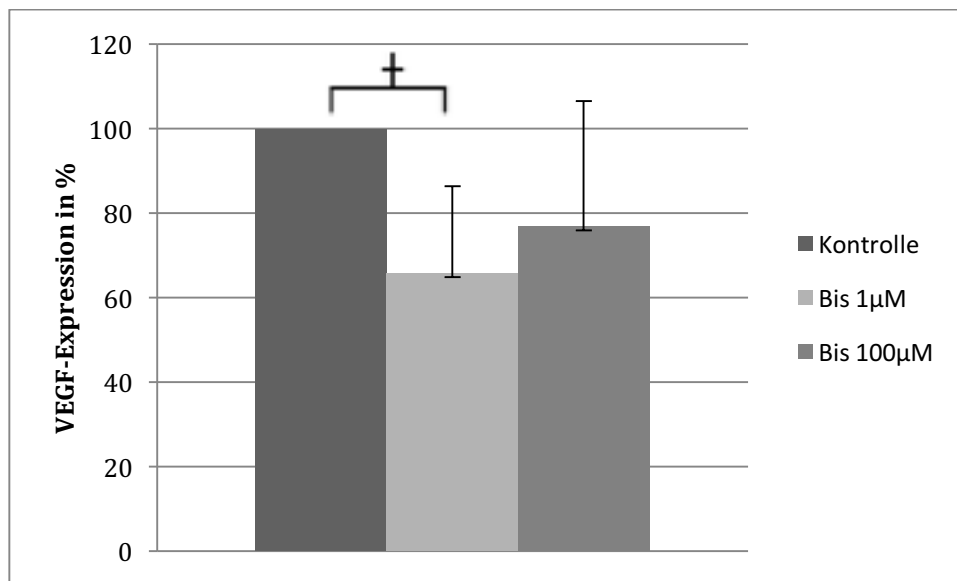


Abb. 18: VEGF-Expression nach 48-stündiger Inhibition der PKC durch Bisindolylmaleimide („Bis“).

+: $p \leq 0,05$, Signifikanz errechnet mit t-test.

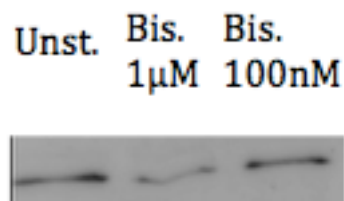


Abb. 19: Beispielblot für die Substanz Bisindolylmaleimide („Bis“) nach 48h Stimulation.

Unst.: unstimulierte Kontrolle.

Eine Blockade der Proteinkinase C durch Bisindolylmaleimide in den Konzentrationen 1 μM und 100 nM erniedrigt jeweils die VEGF-Expression gegenüber der Kontrolle (65,92% und 76,99%). Für 1 μM ist die Abnahme statistisch signifikant ($p \leq 0,05$); für 100 nM hingegen nicht ($p > 0,05$).

3.3.3 Inhibition der PI3-Kinase durch LY294002

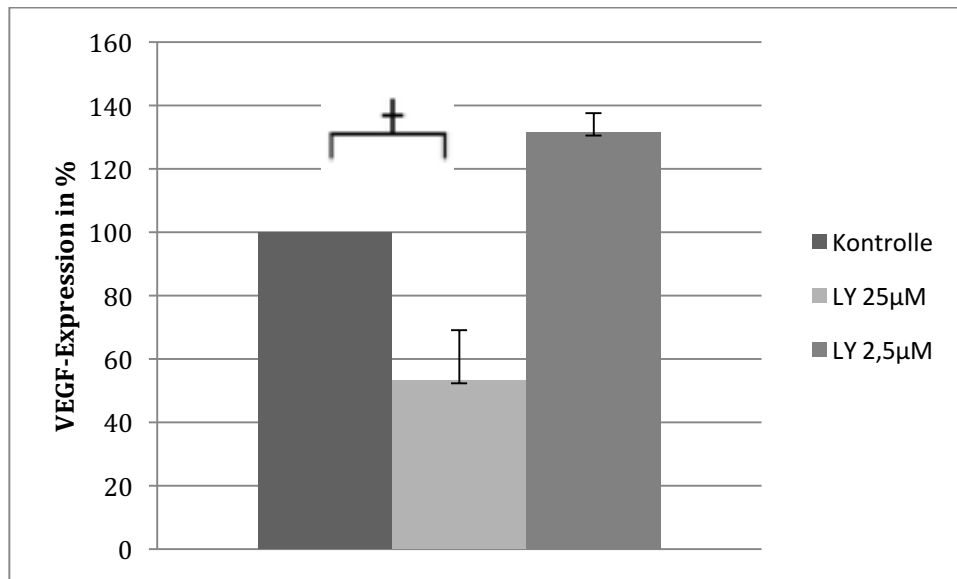


Abb. 20: VEGF-Expr. nach 48h Inhibition der PI3-Kinase durch LY294002 („LY“).
+: $p \leq 0,05$, Signifikanz errechnet mit t-test.

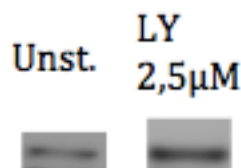


Abb. 21: Beispielblot für die Substanz LY 294992 („LY“) in der Konzentration 2,5µM nach 48h Stimulation.
Unst.: unstimulierte Kontrolle.

Mittels LY294002 wurde die PI3-Kinase der RPE-Zellen inhibiert. Hierbei wurde die Substanz in den Konzentrationen 25 µM und 2,5 µM eingesetzt. Die höhere Konzentration führt zu einer statistisch signifikanten Abnahme der VEGF-Expression ($p \leq 0,05$) auf 53,26% des Kontrollwerts. Anders stellt sich das VEGF-Verhalten bei der Konzentration 2,5 µM dar: Die Expression steigt auf 131,5% des Kontrollwerts an; die Zunahme ist als statistisch signifikant zu bewerten ($p \leq 0,05$).

4 Diskussion

4.1 Validität des Modells

Die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden durchgeführt, um die Pathomechanismen einer Krankheit des menschlichen Auges näher zu verstehen. Für die Versuche wurden dabei allerdings durchgehend porcine Zellen verwendet; daher verdient dieser Aspekt eine kurze gesonderte Betrachtung.

Bezüglich Anatomie und Physiologie ist das Auge des Schweins dem menschlichen Auge von allen nicht-primaten Lebewesen am ähnlichsten. Die Morphologie des Schweineauges und seine Größe ähneln dem menschlichen Auge. Der histologische Aufbau der Retina ist für beide identisch, beide haben je zehn Schichten und sind etwa gleich dick (Lassota 2008; Middleton 2010; Sanchez et al. 2011).

Grundsätzlich muss an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass dennoch eine gewisse Limitation bei der Übertragung der Ergebnisse mit porcinen Zellen auf das menschliche Auge vorliegen könnte. Die erhobenen Daten stehen aber in gutem Einklang mit Werten aus anderen Veröffentlichungen und dürften für das menschliche Auge von Relevanz sein.

Das retinale Pigmentepithel steht im Zentrum vieler chorioretinaler Erkrankungen, so auch bei der altersbedingten Makuladegeneration. Viele Therapieoptionen, die in der modernen Ophthalmologie angewandt werden, konzentrieren sich aus diesem Grund auf das RPE als Zielstruktur (z. B. intravitreale Injektionen). Um die Vorgänge im RPE genauer untersuchen zu können, wurde eine Organkultur verwendet. Miura et al. (2009) konnten zeigen, dass eine porcine RPE-Organkultur hierfür für insgesamt fünf Tage geeignet ist und valide Ergebnisse liefert. So konnte gezeigt werden, dass die VEGF-Sekretion durch das RPE in den ersten fünf Versuchstagen konstant ist und dass eine relevante Apoptose der Zellen am vierten Tag noch nicht vorliegt. Der Versuchsaufbau der in dieser Arbeit verwendeten Organkultur orientiert sich am Modell von Miura und ist somit für die Durchführung der Versuche geeignet.

Ergänzend zur verwendeten Organkultur wurde die bereits beschriebene Zellkultur mit porcinen RPE-Zellen eingesetzt. Ausgehend von der P0-Generation, die direkt aus Augen frisch geschlachteter Schweine gewonnen wurde, wurde die Zellkultur drei

Generationen weiter angezogen (F3). Dass porcine RPE-Zellen in einer Zellkultur in den genannten Generationen über ein normales Wachstum mit normaler Zelldichte und einen normalen DNA-Gehalt verfügen, wurde bereits demonstriert (Wiencke et al. 2003).

Auffällig in der Auswertung der Ergebnisse ist der Umstand, dass in der RPE-Zellkultur niedrigere Konzentrationen der Inhibitoren erforderlich sind, um eine Abnahme der VEGF-Sekretion herbeizuführen, als in der Organkultur. In der Zellkultur liegen die RPE-Zellen als Zellrasen nebeneinander; in der RPE-Organkultur ist zusätzliches Gewebe enthalten. Die Wirkstoffe können ihre Zielmoleküle auf den RPE-Zellen direkt erreichen, während in der Organkultur eine wesentlich längere Diffusionsstrecke bis zu den Zielzellen existiert.

Die VEGF-Sekretion in einer RPE-Aderhaut-Organkultur wurde unter Verwendung verschiedener Inhibitoren untersucht: Der VEGFR-II wurde durch den VEGFR-II-Tyrosinkinaseinhibitor SU1498 inhibiert. Wurde die Organkultur SU1498 für 48 Stunden ausgesetzt, so war die VEGF-Sekretion im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikant reduziert ($p < 0,05$). Nach 6 und 24 Stunden war keine signifikante Abnahme vorhanden. Das Blockieren der PI3K durch LY294002 zeigte ebenso eine signifikante Abnahme der VEGF-Sekretion nach 48 Stunden ($p \leq 0,05$); nach 6 und 24 Stunden war keine signifikante Reduktion festzustellen. Wenn beide Substanzen gleichzeitig eingesetzt wurden, ergab sich keine zusätzliche Abnahme der VEGF-Sekretion. Bisindolylmaleimide I wurde zur Blockierung der PKC eingesetzt; hierbei zeigte sich keine Abnahme der Sekretion. Wurden VEGFR-II- und PKC-Inhibitor gleichzeitig verwendet, zeigte sich erneut die Sekretionsabnahme wie bei singulärer Hemmung des VEGFR-II. Unter Verwendung des Multityrosinkinaseinhibitors Sunitinib nahm die VEGF-Sekretion zu.

In einer RPE-Zellkultur waren diese Ergebnisse reproduzierbar. Das Blockieren des VEGFR-II und der PI3K führten nach 48 Stunden zu einer Abnahme der VEGF-Sekretion (p jeweils $\leq 0,05$). Allerdings war, entgegen der Ergebnisse in der Organkultur, auch nach Inhibition der PKC ein signifikanter Abfall nach 48 Stunden vorhanden ($p \leq 0,05$).

Alle verwendeten Inhibitoren wurden dabei in Konzentrationen verwendet, wie sie auch in anderen Arbeiten verwendet wurden. Die biochemischen Inhibitoren sind in der Literatur gut beschrieben (Toullec et al. 1991), wengleich deren Spezifität (Davies et al. 2000) teilweise noch in der Diskussion steht.

4.2 Modell der Autoregulation von VEGF im retinalen

Pigmentepithel

Die Kernfrage dieser Arbeit galt der Überlegung, ob im RPE eine Autoregulation der VEGF-Sekretion existiert, die möglicherweise durch den VEGFR-II vermittelt wird.

Die mögliche autokrine Regulation der VEGF-Expression war bereits zuvor vermutet worden, nachdem Klettner & Roider 2009 zeigen konnten, dass Bevacizumab und Ranibizumab den VEGF-Gehalt von RPE-Zellen reduzieren. Außerdem gelang an Zellen eines Glioblastoma multiforme der Nachweis, dass VEGF via VEGFR-II seine eigene Expression induziert (Knizetova et al. 2008). Zudem ist bekannt, dass in Endothelzellen durch extrazelluläre Hinzugabe von VEGF HIF-1 α induziert wird. Hierbei handelt es sich um ein Protein, das als Regulator von VEGF in hypoxischer Umgebung fungiert (Deudero et al. 2008).

Hier konnte nun gezeigt werden, dass eine Blockierung des VEGFR-II durch SU1498 nach 48 Stunden zur einer Abnahme der VEGF-Sekretion führt. Dies ist ein eindeutiger Hinweis auf einen Langzeiteffekt durch autokrine oder parakrine Regulation. Dieser Effekt würde ebenso eine Erklärung liefern, warum Bevacizumab, das VEGF extrazellulär bindet, zur Abnahme der intrazellulären VEGF-Expression führt (Heiduschka et al. 2007). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die durch die Verwendung von Tyrosinkinaseinhibitoren herbeigeführte Abnahme der VEGF-Sekretion durch den VEGFR-II vermittelt ist.

Die erwähnte Herabregulation von VEGF durch spezifische Tyrosinkinaseinhibitoren wurde bereits zuvor bei Sorafenib und Pazopanib festgestellt. Auch die VEGF-Zunahme bei Verwendung des Multityrosinkinaseinhibitors Sunitinib ist bereits vorbeschrieben; man vermutet einen proangiogenetischen Effekt bei gleichzeitiger unselektiver Hemmung etlicher Tyrosinkinasen (Kernt et al. 2012; Yafai et al. 2011).

Der VEGFR-II nutzt für die intrazelluläre Signaltransduktionskaskade als wichtige Moleküle die Proteinkinase C (PKC) und Phosphatidylinositolkinase-3 (PI3K). Tatsächlich lässt sich durch isolierte Hemmung der PI3K eine ähnliche Abnahme der VEGF-Sekretion herbeiführen wie bei Blockade des VEGFR-II. Durch Inhibition der PKC gelang dies nicht. Wurden der VEGFR-II und PI3K bzw. PKC dual inhibiert, zeigte sich

derselbe Effekt wie bei alleiniger Blockade des VEGFR-II, sodass von einem gemeinsamen Signaltransduktionsweg ausgegangen werden kann. Bekanntermaßen hat der angesprochene VEGFR-II/PI3K-Weg für das RPE eine wichtige Bedeutung für den Schutz gegen oxidativen Streß (Byeon et al. 2010), sodass die Vermutung geäußert werden darf, dass es sich um einen grundsätzlich bedeutenden Signaltransduktionsweg für autoregulatorische Funktionen des RPE handelt.

Analog zur Organkultur führt auch in der Zellkultur die Inhibition von VEGFR-II und PI3K zur Abnahme der Sekretion, wenngleich in der Zellkultur auch eine Blockierung der PKC zu verminderter VEGF-Sekretion führt. Die Ursache für das unterschiedliche Verhalten in Organ- und Zellkultur bezüglich der PKC ist aus den vorhandenen Daten nicht abzuleiten, kann aber auf den Einfluss von Zellen in der Aderhaut hindeuten.

Neben dieser gerade beschriebenen autoregulatorischen Form der VEGF-Sekretion im RPE ist eine parakrine Regulation denkbar; insbesondere im Hinblick auf die Tatsache, dass in der verwendeten Organkultur neben dem RPE auch die Choroidea enthalten ist. Im Hinblick auf parakrine Sekretion wäre hier speziell auf das Endothel der Choroidea hinzuweisen, da diese Zellen (in Zellkultur gehalten) nachweislich geringe Mengen VEGF-mRNA sezernieren (Toullec et al. 1991).

4.3 Limitierungen des Modells

Neben der Limitierungen eines in-vitro-Modells ist an dieser Stelle nochmals auf die bereits angesprochenen Limitierungen eines nicht-menschlichen Versuchsmodells zu erinnern. In der verwendeten Organkultur sind zudem viele andere Zelltypen als das RPE enthalten, sodass auch eine parakrine Sekretion ursächlich für das VEGF-Verhalten der Zellen sein kann. Neben dem bereits erwähnten Endothel der Choroidea finden sich hier Melanozyten, Makrophagen, Fibroblasten und Muskelzellen (Nickla et al. 2010). Obwohl das RPE als Hauptquelle für VEGF im hinteren Augenabschnitt gilt (Saint-Geniez et al. 2006) ist es unwahrscheinlich, dass von den gerade genannten Zelltypen eine relevante Menge des gemessenen VEGF sezerniert wurde. So produzieren normale Melanozyten der Uvea kein VEGF (Notting et al. 2006). Die ortsständigen Makrophagen, die im menschlichen Auge vorhanden sind (Schroedl et al. 2008), gehören üblicherweise zu einem anti-angiogenetischen Phänotyp und sind damit unverdächtig auf VEGF-

Produktion (Apte 2010, Lin et al. 2005). Bereits an anderer Stelle thematisiert wurde die Rolle des Endothels der Choroidea, das VEGF produziert. In der Organkultur finden sich weiterhin glatte Muskelzellen, die an der Angiogenese beteiligt und grundsätzlich zur Produktion von VEGF in der Lage sind (Doranzo et al. 2012, Demyantes et al. 2011). Gleichwohl wurde ein VEGF-Beitrag dieser Zellen in der Choroidea noch nie nachgewiesen. Schließlich enthält die RPE-/Aderhaut-Organkultur Perizyten, die denkbar durch VEGF-Produktion zum Überleben von Endothelzellen beitragen könnten. Für Perizyten in der Choroidea wurde eine VEGF-Sekretion jedoch noch nicht nachgewiesen (Darland et al. 2003, Yamagishi et al., 2002, Vidro et al. 2008).

Die Expression von VEGF durch die gerade genannten Zelltypen wurde fast ausschließlich in Zellkulturmodellen nachgewiesen, wenn die Zellen verschiedenen Stimuli ausgesetzt waren. Im Auge selbst allerdings ist das RPE die Hauptquelle für VEGF - denkbar ist dabei durchaus auch, dass es die einzige Quelle ist. In der Choroidea von Maus- und Affenaugen, die keinen besonderen Stimuli ausgesetzt sind, findet sich nämlich nahezu kein VEGF (Saint-Geniez et al. 2006).

Die Ergebnisse aus der RPE-Zellkultur liefern eindeutige Hinweise auf eine autokrine Komponente der VEGF-Expression, da in der Kultur keine anderen Zellen als die des RPE vorhanden sind und die Regulation somit von diesen ausgehen muss. Im Hinblick auf die Organkultur, die wie beschrieben weitere Zelltypen enthält, sind weitere Untersuchungen notwendig, um das Zusammenspiel dieser verschiedenen Zelltypen näher zu verstehen und um weiter zwischen autokrinen und parakrinen Effekten zu differenzieren.

4.4 Klinische Relevanz

Die gezielte Blockade des VEGFR-II/PI3K-Weges durch spezifische Inhibitoren scheint dabei grundsätzlich eine Therapieoption zur Behandlung der altersbedingten Makuladegeneration darzustellen. Weitere Untersuchungen der Substanzen im Hinblick auf ihre klinische Verwendbarkeit und Wirksamkeit sind notwendig. Interessanterweise finden Tyrosinkinaseinhibitoren sogar schon klinische Anwendung. So wird Sunitinib, wie bereits erwähnt, als Sutent® bei der Therapie des Nierenzellkarzinoms eingesetzt. Gleichzeitig sind aber auch Probleme bei der Verwendung dieser Substanzen bekannt. So kann die Verwendung von Multityrosinkinaseinhibitoren zu einem Anstieg des VEGF-Gehalts der Zellen (Kernt et al. 2012; Yafai et al. 2011) führen. Weitere Forschung ist

notwendig, um die Möglichkeit und den Nutzen eines Einsatzes am Menschen näher zu untersuchen.

4.5 Schlussfolgerung

Zusammenfassend ist anhand der erhobenen Daten festzustellen, dass eine autokrine Langzeitregulation von VEGF im RPE existiert. Auch eine parakrine Komponente ist wahrscheinlich, hierbei ist auf die verschiedenen Zelltypen der Choroidea zu verweisen. Der Mechanismus scheint über den VEGFR-II/PI3K-Transduktionsweg vermittelt zu sein.

5 Zusammenfassung

Die altersabhängige Makuladegeneration ist die häufigste Ursache für die Erblindung älterer Menschen in der westlichen industrialisierten Welt. Bei der exsudativen Form der Erkrankung kommt es zu einer choroidalen Neovaskularisation (CNV) mit der Folge eines Sehverlusts mit Störung der zentralen Sehkraft und charakteristischen Sehstörungen, die im Alltag gravierende Probleme bereiten. Ein wichtiger pathogenetischer Faktor bei der Entstehung der feuchten Form der AMD ist der *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), der als Wachstumsfaktor die Entstehung neuer Blutgefäße induziert.

In dieser Arbeit wurde die Regulation der konstitutiven VEGF-Ausschüttung im retinalen Pigmentepithel untersucht. Dazu wurden verschiedene Substanzen verwendet, die in die VEGF-vermittelte intrazelluläre Signaltransduktion eingreifen. Hierzu wurden vier verschiedene Inhibitoren eingesetzt, die den VEGFR-II (SU 1498), Tyrosinkinase (Sunitinib), die Proteinkinase C (Bisindolylmaleimide) und die Phosphatidyl-Inositol-Kinase 3 (LY294002) inhibieren. Die Versuche wurden einerseits an einer RPE-/Aderhaut-Organokultur durchgeführt, wobei mittels eines *Enzym-Linked Immunoabsorbent Assay* (ELISA) die VEGF-Sekretion der Organokultur quantifiziert wurde. Zusätzlich wurde mittels Western Blot die VEGF-Expression in einer reinen RPE-Zellkultur unter dem Einfluss der genannten Substanzen untersucht. Zum Ausschluss einer Toxizität der verwendeten Substanzen auf das RPE wurden Calceinfärbungen und Methyl-Thiazolyl-Tetrazolium (MTT)-Assays durchgeführt.

Die Versuche ergaben, dass die Blockade des VEGFR-II als Langzeiteffekt zu einer Abnahme der VEGF-Sekretion führt. Die Inhibition der PI3K führt zum selben Effekt, sodass es sich wahrscheinlich um denselben Signaltransduktionsweg handelt, der für das RPE nebenher auch in der Protektion gegen oxidativen Stress bekanntermaßen Bedeutung hat. Durch Inhibition der PKC konnte keine Abnahme der VEGF-Sekretion herbeigeführt werden. Die Ergebnisse in Organ- und Zellkultur bestätigen einander. Es ist zu bedenken, dass in der verwendeten Organokultur neben dem RPE zahlreiche andere Zelltypen der Aderhaut (Endothel, Muskelzellen, Fibroblasten, etc.) enthalten sind, die potentiell auch zur VEGF-Sekretion fähig sind. Hierin besteht eine der Limitationen der eingesetzten Methoden.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass eine autokrine Langzeitregulation von VEGF im RPE vorhanden ist. Auch eine parakrine Komponente ist wahrscheinlich, hierbei ist auf die verschiedenen Zelltypen der Choroidea zu verweisen. Die Regulation scheint über den VEGFR-II/PI3K-Transduktionsweg vermittelt zu sein. Weiterführende Arbeiten werden die exakten Wechselwirkungen der verschiedenen Zellen untereinander näher charakterisieren müssen.

Theoretisch bestünde durch die Inhibition des VEGFR-II eine weitere Therapieoption zur Behandlung der AMD. Weitere Untersuchungen sind erforderlich um zu klären, ob eine Anwendung in der Humanmedizin möglich und erfolgversprechend ist.

Anhang

Ergebnisse der Toxizitätsanalysen

SU1498

Toxizität nach 24 Stunden

	MW in %	SA	p
Kontrolle	100	0	
SU1498 10μM	101,1	17,98	0,92
SU1498 5μM	104,5	6,5	0,3

Tab. 13: Zytotoxizität von SU1498 auf RPE-Zellen nach 24 Stunden Stimulation. (10 μ M bzw. 5 μ M). Anteil vitaler Zellen in %.

Toxizität nach 48 Stunden

	MW in %	SA	p
Kontrolle	100	0	
SU1498 10μM	87,13	11,4	0,12
SU1498 5μM	95,97	15,07	0,67

Tab. 14: Zytotoxizität von SU1498 auf RPE-Zellen nach 48 Stunden Stimulation. (10 μ M bzw. 5 μ M). Anteil vitaler Zellen in %.

Sunitinib

Toxizität nach 24 Stunden

	MW in %	SA	p
Kontrolle	100	0	
Sunitinib 1μM	103,2	10,72	0,63
Sunitinib 100nM	105	8,8	0,38

Tab. 15: Zytotoxizität von Sunitinib auf RPE-Zellen nach 24 Stunden Stimulation. (1 μ M bzw. 100nM). Anteil vitaler Zellen in %.

Toxizität nach 48 Stunden

	MW in %	SA	p
Kontrolle	100	0	
Sunitinib 1μM	102,2	14,73	0,81
Sunitinib 100nM	108,83	15,85	0,39

Tab. 16: Zytotoxizität von Sunitinib auf RPE-Zellen nach 48 Stunden Stimulation (1 μ M bzw. 100nM). Anteil vitaler Zellen in %.

Bisindolylmaleimide

Toxizität nach 24 Stunden

	MW in %	SA	p
Kontrolle	100	0	
Bisindolylmaleimide 1μM	103,35	6,37	0,41
Bisindolylmaleimide 100nM	102,57	6	0,5

Tab. 17: Zytotoxizität des PKC-Inhibitors Bisindolylmaleimide auf RPE-Zellen nach 24 Stunden Stimulation (1 μ M bzw. 100nM). Anteil vitaler Zellen in %.

Toxizität nach 48 Stunden

	MW in %	SA	p
Kontrolle	100	0	
Bisindolylmaleimide 1μM	122,96	14,78	0,05
Bisindolylmaleimide 100nM	117,02	12,63	0,08

Tab. 18: Zytotoxizität des PKC-Inhibitors Bisindolylmaleimide auf RPE-Zellen nach 48 Stunden Stimulation (1 μ M bzw. 100nM). Anteil vitaler Zellen in %.

LY294002**Toxizität nach 24 Stunden**

	MW in %	SA	p
Kontrolle	100,00	0,00	
LY294002 25μM	98,18	1,27	0,33
LY294002 2,5μM	101,07	2,65	0,52

Tab. 19: Zytotoxizität des PI3-Inhibitors LY294002 auf RPE-Zellen nach 24 Stunden Stimulation (25 μ M bzw. 2,5 μ M). Anteil vitaler Zellen in %.

Toxizität nach 48 Stunden

	MW in %	SA	p
Kontrolle	100,00	0,00	
LY294002 25μM	102,27	3,09	0,06
LY294002 2,5μM	101,08	2,59	0,35

Tab. 20: Zytotoxizität des PI3-Inhibitors LY294002 auf RPE-Zellen nach 48 Stunden Stimulation (25 μ M bzw. 2,5 μ M). Anteil vitaler Zellen in %.

SU1498 & Bisindolylmaleimide**Toxizität nach 24 Stunden**

	MW in %	SA	p
Kontrolle	100,00	0,00	
SU1498 10μM & Bis. 1μM	106,32	21,31	0,63

Tab. 21: Zytotoxizität von SU1498 (10 μ M) und Bisindolylmaleimide (1 μ M) auf RPE-Zellen nach 24 Stunden Stimulation. Anteil vitaler Zellen in %.

Toxizität nach 48 Stunden

	MW in %	SA	p
Kontrolle	100,00	0,00	
SU1498 10μM & Bis. 1μM	147,86	8,89	<0,01

Tab. 22: Zytotoxizität von SU1498 (10 μ M) und Bisindolylmaleimide (1 μ M) auf RPE-Zellen nach 48 Stunden Stimulation. Anteil vitaler Zellen in %.

SU1498 & LY294002

Toxizität nach 24 Stunden

Datum	MW in %	SA	p
Kontrolle	100,00	0,00	
SU10 μ M & LY294002 25 μ M	103,37	7,15	0,46

Tab. 23: Zytotoxizität von SU1498 (10 μ M) und LY294002 (25 μ M) auf RPE-Zellen nach 24 Stunden Stimulation. Anteil vitaler Zellen in %.

Toxizität nach 48 Stunden

Datum	MW in %	SA	p
Kontrolle	100,00	0,00	
SU10 μ M & LY294002 25 μ M	123,99	47,12	0,43

Tab. 24: Zytotoxizität von SU1498 (10 μ M) und LY294002 (25 μ M) auf RPE-Zellen nach 48 Stunden Stimulation. Anteil vitaler Zellen in %.

Ergebnisse Organkultur (ELISA)

Nachfolgend sind, ergänzend zu Punkt 4.1, alle Ergebnisse zu den Untersuchungen der VEGF-Sekretion mittels ELISA tabellarisch dargestellt. Alle Werte sind Prozentangaben. Die bei Versuchsbeginn, also zum Zeitpunkt "0h", sezernierte VEGF-Menge entspricht dabei 100%, alle anderen Angaben beziehen sich auf diese 100%. In den Tabellen werden die jeweiligen Messzeitpunkte ausgewiesen, zudem existiert für jede unterschiedliche Konzentration, in der die Inhibitoren eingesetzt wurden, eine eigene Tabelle. Die entsprechende Konzentration ist in der Tabellenbeschreibung angegeben.

Inhibition des VEGFR-II durch SU 1498

	0h	6h	24h	48h
	100	68,17	68,92	61,3
	100	84,33	93,55	91,22
	100	94,02	75,86	81,05
	100	64,06	61,92	62,53
Mittelwert	100	77,65	75,1	74
Standardabw.	0	13,99	13,58	14,62

Tab. 25: VEGF-Sekretion der Kontrollkammer (unbehandelt)

	0h	6h	24h	48h
	100	39,14	35,23	34,84
	100	95,35	84,71	66,32
	100	59,68	58,44	48,73
	100	60,16	53,53	19,56
Mittelwert	100	63,58	58	42,36
Standardabw.	0	23,335	20,43	19,925
p		0,1706	0,107	0,0214

Tab. 26: VEGF-Sekretion nach Stimulation mit SU 1498 10 μ M

	0h	6h	24h	48h
	100	77,47	48,74	55,22
	100	71,78	75,44	56,93
	100	77,81	51,33	51,16
	100	10,66	38,22	37,93
Mittelwert	100	59,43	53,4	50,31
Standardabw.	0	32,631	15,73	8,6088
p		0,1722	0,041	0,0157

Tab. 27: VEGF-Sekretion nach Stimulation mit SU 1498 5 μ M

Tyrosinkinaseinhibition mittels Sunitinib

	0h	6h	24h	48h
	100	71,16	69,33	69,65
	100	69,30	58,11	64,41
	100	61,85	62,85	58,34
	100	62,1	71,18	79,09
	100	55,31	35,94	51,46
Mittelwert	100	63,944	59,482	64,59
Standardabw.	0	6,385	14,15	10,575

Tab. 28: VEGF-Sekretion der Kontrollkammer (unstimuliert)

	0h	6h	24h	48h
	100	104,39	219,07	190,33
	100	57,8	54,19	46,3
	100	58,59	87,27	67,99
	100	93,43	101,78	102,46
	100	63,49	70,92	67,85
Mittelwert	100	75,54	106,646	94,99
Standardabw.	0	21,792	65,312	56,97
p		0,286	0,153	0,275

Tab. 29: VEGF-Sekretion nach Stimulation mit Sunitinib 1 μ M

	0h	6h	24h	48h
	100	50,41	57,05	50,41
	100	71,05	71,92	74,17
	100	80,57	100,45	75,36
	100	80,53	66,34	42,72
	100	63,41	64,56	74,88
Mittelwert	100	69,194	72,064	63,51
Standardabw.	0	12,725	16,74	15,71
p		0,217	0,118	0,4507

Tab. 30: VEGF-Sekretion nach Stimulation mit Sunitinib 100nM

Inhibition der PKC mittels Bisindolylmaleimide

	0h	6h	24h	48h
	100	84,35	62,87	47,27
	100	101,75	65,62	66,44
	100	70,8	64,69	82,57
Mittelwert	100	85,633	64,39	65,427
Standardabw.	0	15,515	1,3988	17,6718

Tab. 31: VEGF-Sekretion der Kontrollkammer (unstimuliert)

Datum	0h	6h	24h	48h
	100	72,96	52,53	42,98
	100	81,47	85,01	87,41
	100	56,53	115,07	120,55
Mittelwert	100	70,32	84,20	83,647
SA	0	12,678	31,278	38,922
p		0,1281	0,1673	0,25066

Tab. 32: VEGF-Sekretion nach Stimulation mit Bisindolylmaleimide 1µM

	0h	6h	24h	48h
	100	53,49	37,22	32,41
	100	91,20	78,10	89,50
	100	56,36	54,88	75,68
Mittelwert	100	67,02	56,73	65,863
SA	0	20,992	20,502	29,785
p		0,1422	0,2769	0,49181

Tab. 33: VEGF-Sekretion nach Stimulation mit Bisindolylmaleimide 100nM**Inhibition der PI3-Kinase mittels LY294002**

	0h	6h	24h	48h
	100	79,78	94,24	97,71
	100	98,39	53,10	51,65
	100	89,98	76,07	92,53
	100	102,7	65,07	94,17
	100	65,03	82,69	84,36
	100	105,37	112,73	105,52
Mittelwert	100	90,208	80,65	87,66
Standardabw.	0	15,464	21,169	18,94

Tab. 34: VEGF-Sekretion in der Kontrollkammer (unstimuliert)

	0h	6h	24h	48h
	100	70,15	80,45	77,24
	100	98,6	55,90	63,42
	100	74,91	63,32	47,15
	100	52,56	86,55	75,71
	100	63,56	50,31	49,08
Mittelwert	100	71,956	67,31	62,52
Standardabw.	0	17,092	15,636	14,216
p		0,048	0,1369	0,0186

Tab. 35: VEGF-Sekretion nach Stimulation mit LY294002 25 μ M

	0h	6h	24h	48h
	100	85,56	89,02	95,35
	100	97,93	99,69	103
	100	98,06	101,82	106,54
Mittelwert	100	93,85	96,84	101,6
SA	0	7,179	6,8584	5,7194
p		0,35828	0,1251	0,1323

Tab. 36: VEGF-Sekretion nach Stimulation mit LY294002 2,5 μ M

Duale Inhibition von VEGFR-II und PKC mittels SU 1498 und Bisindolylmaleimide

	0h	6h	24h	48h
	100	79,78	94,24	97,71
	100	51,38	48,98	46,51
	100	53,90	169,25	86,23
	100	65,03	82,69	84,36
	100	82,69	112,5	135,42
	100	38,29	61,69	90,51
Mittelwert	100	61,85	94,89	90,12
Standardabw.	0	17,285	42,892	28,496

Tab. 37: VEGF-Sekretion in der Kontrollkammer (unstimuliert)

	0h	6h	24h	48h
	100	66,54	53,68	57,62
	100	60,72	48,39	38,40
	100	57,14	65,41	57,52
	100	37,25	76,17	75,25
	100	77,56	93,42	63,99
	100	40,77	33,67	67,20
	100	40,06	32,96	19,13
	100	57,63	21,91	20,68
Mittelwert	100	54,71	53,20	49,97
Standardabw.	0	14,275	24,166	21,351
p		0,2068	0,0194	0,0053

Tab. 38: VEGF-Sekretion nach gleichzeitiger Stimulation mit SU 1498 10 μ M und Bisindolylmaleimide 1 μ M

Duale Inhibition von VEGFR-II und PI3-Kinase mittels SU 1498 und LY294002

	0h	6h	24h	48h
	100	118,21	97,33	100,3
	100	102,7	65,01	94,17
	100	65,03	82,69	84,36
	100	105,37	112,7	105,52
Mittelwert	100	97,83	89,44	96,09
Standardabw.	0	22,889	20,39	9,0908

Tab. 39: VEGF-Sekretion in der Kontrollkammer (unstimuliert)

	0h	6h	24h	48h
	100	90,94	93,75	76,24
	100	73,17	92,41	66,82
	100	80,33	67,80	54,78
Mittelwert	100	81,48	84,65	65,95
SA	0	8,9406	14,61	10,757
p		0,1511	0,373	0,005

Tab. 40: VEGF-Sekretion nach gleichzeitiger Stimulation mit SU 1498 10 μ M und LY294002 25 μ M

Ergebnisse Western Blot

Nachfolgend werden alle Ergebnisse zu den Untersuchungen der VEGF-Expression mittels Western Blot tabellarisch dargestellt. Alle Werte sind Prozentangaben. Die in der unstimuliert belassenen Zellkultur gemessene VEGF-Expression entspricht dabei 100%, alle anderen Prozentangaben beziehen sich auf diese 100%. Zuvor wurde das gemessene Signal gegen β -Actin verrechnet, um eventuelle Schwankungen der

Proteinmenge der Proben untereinander zu eliminieren. Für jede unterschiedliche Konzentration, in der die Inhibitoren eingesetzt wurden, existiert eine eigene Tabelle. Die entsprechende Konzentration ist in der Tabellenbeschreibung angegeben.

Inhibition des VEGFR-II durch SU 1498

	0	48h
	100	14,23
	100	12,77
	100	92,18
	100	62,23
	100	72,57
	100	13,84
Mittelwert	100	44,64
Standardabweichung	0	35,32
p		0,0016

Tab. 41: VEGF-Expression nach Stimulation mit SU 1498 10 μ M

	0	48h
	100	21,3
	100	37,54
	100	51,49
	100	86,75
	100	52,47
	100	50,33
Mittelwert	100	49,98
Standardabweichung	0	21,63
p		0,0001

Tab. 42: VEGF-Expression nach Stimulation mit SU 1498 5 μ M

Inhibition der PKC durch Bisindolylmaleimide

	0	48h
	100	93,33
	100	57,27
	100	67,77
	100	45,32
Mittelwert	100	65,93
Standardabweichung	0	20,44
p		0,0078

Tab. 43: VEGF-Expression nach Stimulation mit Bisindolylmaleimide 1 μ M

	0	48h
	100	100,33
	100	37,32
	100	71,73
	100	98,58
Mittelwert	100	76,99
Standardabweichung	0	29,509
p		0,0849

Tab. 44: VEGF-Expression nach Stimulation mit Bisindolylmaleimide 100nM

Inhibition der PI3-Kinase mittels LY294002

	0	48h
	100	67,02
	100	36,06
	100	56,71
Mittelwert	100	53,26
Standardabweichung	0	15,77
p		0,003

Tab. 45: VEGF-Expression nach Stimulation mit LY294002 25 μ M

	0	48h
	100	129,57
	100	138,41
	100	126,54
Mittelwert	100	131,51
Standardabweichung	0	6,17
p		0,0004

Tab. 46: VEGF-Expression nach Stimulation mit LY294002 2,5 μ M

Literaturverzeichnis

- Apte, R.S. (2010). Regulation of angiogenesis by macrophages. *Adv. Exp. Med. Biol.* 664, 15–19.
- Badalà, F. (2008). The treatment of branch retinal vein occlusion with bevacizumab. *Curr Opin Ophthalmol* 19, 234–238.
- Bian, Z.-M., Elner, S.G., and Elner, V.M. (2007). Regulation of VEGF mRNA expression and protein secretion by TGF-beta2 in human retinal pigment epithelial cells. *Exp. Eye Res.* 84, 812–822.
- Blaauwgeers, H.G., Holtkamp, G.M., Rutten, H., Witmer, A.N., Koolwijk, P., Partanen, T.A., Alitalo, K., Kroon, M.E., Kijlstra, A., van Hinsbergh, V.W. (1999). Polarized vascular endothelial growth factor secretion by human retinal pigment epithelium and localization of vascular endothelial growth factor receptors on the inner choriocapillaris. Evidence for a trophic paracrine relation. *Am. J. Pathol.* 155, 421–428.
- Browning, D.J., Kaiser, P.K., Rosenfeld, P.J., and Stewart, M.W. (2012). Aflibercept for age-related macular degeneration: a game-changer or quiet addition? *Am. J. Ophthalmol.* 154, 222–226.
- Butler, J.E., Sun, J., Wertz, N., and Sinkora, M. (2006). Antibody repertoire development in swine. *Dev. Comp. Immunol.* 30, 199–221.
- Byeon, S.H., Lee, S.C., Choi, S.H., Lee, H.-K., Lee, J.H., Chu, Y.K., and Kwon, O.W. (2010). Vascular endothelial growth factor as an autocrine survival factor for retinal pigment epithelial cells under oxidative stress via the VEGF-R2/PI3K/Akt. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 1190–1197.
- Campanella, N.C., de Oliveira, A.T., Scapulatempo-Neto, C., Guimarães, D.P., and Reis, R.M. (2013). Biomarkers and novel therapeutic targets in gastrointestinal stromal tumors (GISTs). *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 8, 288–297.
- Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoek, A., Harpal, K., Eberhardt, C. (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380, 435–439.
- Chakravarthy, U., Wong, T.Y., Fletcher, A., Piau, E., Evans, C., Zlateva, G., Buggage, R., Pleil, A., and Mitchell, P. (2010). Clinical risk factors for age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. *BMC Ophthalmol* 10, 31.
- Chalhoub, N., and Baker, S.J. (2009). PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annu Rev Pathol* 4, 127–150.
- Coleman, H.R., Chan, C.-C., Ferris, F.L., and Chew, E.Y. (2008). Age-related macular degeneration. *Lancet* 372, 1835–1845.

- Cunningham, S.A., Waxham, M.N., Arrate, P.M., and Brock, T.A. (1995). Interaction of the Flt-1 tyrosine kinase receptor with the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. Mapping of a novel site involved in binding. *J. Biol. Chem.* *270*, 20254–20257.
- Darland, D.C., Massingham, L.J., Smith, S.R., Piek, E., Saint-Geniez, M., and D'Amore, P.A. (2003). Pericyte production of cell-associated VEGF is differentiation-dependent and is associated with endothelial survival. *Dev. Biol.* *264*, 275–288.
- Davies, S.P., Reddy, H., Caivano, M., and Cohen, P. (2000). Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem. J.* *351*, 95–105.
- Demyanets, S., Kaun, C., Rychli, K., Pfaffenberger, S., Kastl, S.P., Hohensinner, P.J., Rega, G., Katsaros, K.M., Afonyushkin, T., Bochkov, V.N. (2011). Oncostatin M-enhanced vascular endothelial growth factor expression in human vascular smooth muscle cells involves PI3K-, p38 MAPK-, Erk1/2- and STAT1/STAT3-dependent pathways and is attenuated by interferon- γ . *Basic Res. Cardiol.* *106*, 217–231.
- Deudero, J.J.P., Caramelo, C., Castellanos, M.C., Neria, F., Fernández-Sánchez, R., Calabia, O., Peñate, S., and González-Pacheco, F.R. (2008). Induction of hypoxia-inducible factor 1 α gene expression by vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* *283*, 11435–11444.
- Dewan, A., Liu, M., Hartman, S., Zhang, S.S.-M., Liu, D.T.L., Zhao, C., Tam, P.O.S., Chan, W.M., Lam, D.S.C., Snyder, M. (2006). HTRA1 promoter polymorphism in wet age-related macular degeneration. *Science* *314*, 989–992.
- Doronzo, G., Viretto, M., Russo, I., Mattiello, L., Anfossi, G., and Trovati, M. (2012). Effects of high glucose on vascular endothelial growth factor synthesis and secretion in aortic vascular smooth muscle cells from obese and lean zucker rats. *Int J Mol Sci* *13*, 9478–9488.
- Ferrara, N. (2009). Vascular endothelial growth factor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *29*, 789–791.
- Ferrara, N., and Davis-Smyth, T. (1997). The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.* *18*, 4–25.
- Ferrara, N., and Henzel, W.J. (2012). Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *425*, 540–547.
- Ferrara, N., Houck, K.A., Jakeman, L.B., Winer, J., and Leung, D.W. (1991). The vascular endothelial growth factor family of polypeptides. *J. Cell. Biochem.* *47*, 211–218.
- Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O'Shea, K.S., Powell-Braxton, L., Hillan, K.J., and Moore, M.W. (1996). Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* *380*, 439–442.

Ferrara, N., Damico, L., Shams, N., Lowman, H., and Kim, R. (2006). Development of ranibizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antigen binding fragment, as therapy for neovascular age-related macular degeneration. *Retina (Philadelphia, Pa.)* 26, 859–870.

Gotink, K.J., and Verheul, H.M.W. (2010). Anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors: what is their mechanism of action? *Angiogenesis* 13, 1–14.

Heiduschka, P., Fietz, H., Hofmeister, S., Schultheiss, S., Mack, A.F., Peters, S., Ziemssen, F., Niggemann, B., Julien, S., Bartz-Schmidt, K.U. (2007). Penetration of bevacizumab through the retina after intravitreal injection in the monkey. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48, 2814–2823.

Holmes, D.I.R., and Zachary, I. (2005). The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease. *Genome Biol.* 6, 209.

Holz, F.G., Helb, H.M., Bindewald-Wittich, A., and Scholl, H.P.N. (2006). [Modern pharmacotherapy of age-related macular degeneration]. *Internist (Berl)* 47, 192–198.

Joško, J., and Mazurek, M. (2004). Transcription factors having impact on vascular endothelial growth factor (VEGF) gene expression in angiogenesis. *Med. Sci. Monit.* 10, RA89–RA98.

Joy, S.V., Scates, A.C., Bearely, S., Dar, M., Taulien, C.A., Goebel, J.A., and Cooney, M.J. (2005). Ruboxistaurin, a protein kinase C beta inhibitor, as an emerging treatment for diabetes microvascular complications. *Ann Pharmacother* 39, 1693–1699.

Kendall, R.L., and Thomas, K.A. (1993). Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 10705–10709.

Kernt, M., Thiele, S., Hirneiss, C., Neubauer, A.S., Lackerbauer, C.A., Wolf, A., Eibl, K.H., Haritoglou, C., Ulbig, M.W., and Kampik, A. (2011). [Cytoprotective and antiangiogenic effects of the multikinase inhibitor sorafenib on human retinal pigmentepithelium]. *Ophthalmologie* 108, 445–451.

Kernt, M., Thiele, S., Neubauer, A.S., Koenig, S., Hirneiss, C., Haritoglou, C., Ulbig, M.W., and Kampik, A. (2012). Inhibitory activity of ranibizumab, sorafenib, and pazopanib on light-induced overexpression of platelet-derived growth factor and vascular endothelial growth factor A and the vascular endothelial growth factor A receptors 1 and 2 and neuropilin 1 and 2. *Retina (Philadelphia, Pa.)* 32, 1652–1663.

Kim, I., Ryan, A.M., Rohan, R., Amano, S., Aguilar, S., Miller, J.W., and Adamis, A.P. (1999). Constitutive expression of VEGF, VEGFR-1, and VEGFR-2 in normal eyes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40, 2115–2121.

Kinnunen, K., Petrovski, G., Moe, M.C., Berta, A., and Kaarniranta, K. (2012). Molecular mechanisms of retinal pigment epithelium damage and development of age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmol* 90, 299–309.

- Klettner, A., and Roider, J. (2008). Comparison of bevacizumab, ranibizumab, and pegaptanib in vitro: efficiency and possible additional pathways. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *49*, 4523–4527.
- Klettner, A., and Roider, J. (2009). Constitutive and oxidative-stress-induced expression of VEGF in the RPE are differently regulated by different Mitogen-activated protein kinases. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* *247*, 1487–1492.
- Knizetova, P., Ehrmann, J., Hlobilkova, A., Vancova, I., Kalita, O., Kolar, Z., and Bartek, J. (2008). Autocrine regulation of glioblastoma cell cycle progression, viability and radioresistance through the VEGF-VEGFR2 (KDR) interplay. *Cell Cycle* *7*, 2553–2561.
- Kokotas, H., Grigoriadou, M., and Petersen, M.B. (2011). Age-related macular degeneration: genetic and clinical findings. *Clin. Chem. Lab. Med.* *49*, 601–616.
- Lassota, N. (2008). Clinical and histological aspects of CNV formation: studies in an animal model. *Acta Ophthalmol* *86 Thesis 2*, 1–24.
- Lin, H.-H., Faunce, D.E., Stacey, M., Terajewicz, A., Nakamura, T., Zhang-Hoover, J., Kerley, M., Mucenski, M.L., Gordon, S., and Stein-Streilein, J. (2005). The macrophage F4/80 receptor is required for the induction of antigen-specific efferent regulatory T cells in peripheral tolerance. *J. Exp. Med.* *201*, 1615–1625.
- Luttun, A., Autiero, M., Tjwa, M., and Carmeliet, P. (2004). Genetic dissection of tumor angiogenesis: are PlGF and VEGFR-1 novel anti-cancer targets? *Biochim. Biophys. Acta* *1654*, 79–94.
- Marneros, A.G., Fan, J., Yokoyama, Y., Gerber, H.P., Ferrara, N., Crouch, R.K., and Olsen, B.R. (2005). Vascular endothelial growth factor expression in the retinal pigment epithelium is essential for choriocapillaris development and visual function. *Am. J. Pathol.* *167*, 1451–1459.
- Matsumoto, T., and Claesson-Welsh, L. (2001). VEGF receptor signal transduction. *Sci. STKE* *2001*, re21.
- Meyer, C.H. (2008). [Introduction to the topic: anti-VEGF therapy in the management of AMD]. *Ophthalmologe* *105*, 123–124.
- Michels, S., Rosenfeld, P.J., Puliafito, C.A., Marcus, E.N., and Venkatraman, A.S. (2005). Systemic bevacizumab (Avastin) therapy for neovascular age-related macular degeneration twelve-week results of an uncontrolled open-label clinical study. *Ophthalmology* *112*, 1035–1047.
- Middleton, S. (2010). Porcine ophthalmology. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* *26*, 557–572.
- Minuth, W.W., Steiner, P., Strehl, R., Schumacher, K., de Vries, U., and Kloth, S. (1999). Modulation of cell differentiation in perfusion culture. *Exp. Nephrol.* *7*, 394–406.

- Miura, Y., Klettner, A., Noelle, B., Hasselbach, H., and Roider, J. (2010). Change of morphological and functional characteristics of retinal pigment epithelium cells during cultivation of retinal pigment epithelium-choroid perfusion tissue culture. *Ophthalmic Res.* *43*, 122–133.
- Monnot, A.D., and Zheng, W. (2013). Culture of choroid plexus epithelial cells and in vitro model of blood-CSF barrier. *Methods Mol. Biol.* *945*, 13–29.
- Motzer, R.J., Rini, B.I., Bukowski, R.M., Curti, B.D., George, D.J., Hudes, G.R., Redman, B.G., Margolin, K.A., Merchan, J.R., Wilding, G., et al. (2006). Sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *JAMA* *295*, 2516–2524.
- Muller, Y.A., Chen, Y., Christinger, H.W., Li, B., Cunningham, B.C., Lowman, H.B., and de Vos, A.M. (1998). VEGF and the Fab fragment of a humanized neutralizing antibody: crystal structure of the complex at 2.4 Å resolution and mutational analysis of the interface. *Structure* *6*, 1153–1167.
- Nagineeni, C.N., Kommineni, V.K., William, A., Detrick, B., and Hooks, J.J. (2012). Regulation of VEGF expression in human retinal cells by cytokines: implications for the role of inflammation in age-related macular degeneration. *J. Cell. Physiol.* *227*, 116–126.
- Nickla, D.L., and Wallman, J. (2010). The multifunctional choroid. *Prog Retin Eye Res* *29*, 144–168.
- Nishizuka, Y. (1992). Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* *258*, 607–614.
- Notting, I.C., Missotten, G.S.O.A., Sijmons, B., Boonman, Z.F.H.M., Keunen, J.E.E., and van der Pluijm, G. (2006). Angiogenic profile of uveal melanoma. *Curr. Eye Res.* *31*, 775–785.
- Pagès, G., and Pouysségur, J. (2005). Transcriptional regulation of the Vascular Endothelial Growth Factor gene--a concert of activating factors. *Cardiovasc. Res.* *65*, 564–573.
- Pagès, G., Berra, E., Milanini, J., Levy, A.P., and Pouysségur, J. (2000). Stress-activated protein kinases (JNK and p38/HOG) are essential for vascular endothelial growth factor mRNA stability. *J. Biol. Chem.* *275*, 26484–26491.
- Rosenfeld, P.J., Brown, D.M., Heier, J.S., Boyer, D.S., Kaiser, P.K., Chung, C.Y., Kim, R.Y., and MARINA Study Group (2006). Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N. Engl. J. Med.* *355*, 1419–1431.
- Saint-Geniez, M., Kurihara, T., Sekiyama, E., Maldonado, A.E., and D'Amore, P.A. (2009). An essential role for RPE-derived soluble VEGF in the maintenance of the choriocapillaris. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 18751–18756.
- Scholl, S., Kirchhof, J., and Augustin, A.J. (2010). Pathophysiology of macular edema. *Ophthalmologica* *224 Suppl 1*, 8–15.

- Schroedl, F., Brehmer, A., Neuhuber, W.L., Kruse, F.E., May, C.A., and Cursiefen, C. (2008). The normal human choroid is endowed with a significant number of lymphatic vessel endothelial hyaluronate receptor 1 (LYVE-1)-positive macrophages. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *49*, 5222–5229.
- Sharma, T., Dhingra, R., Singh, S., Sharma, S., Tomar, P., Malhotra, M., and Bhardwaj, T.R. (2013). Aflibercept: a novel VEGF targeted agent to explore the future perspectives of anti-angiogenic therapy for the treatment of multiple tumors. *Mini Rev Med Chem* *13*, 530–540.
- Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D., and Keshet, E. (1992). Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* *359*, 843–845.
- Sonpavde, G., Jian, W., Liu, H., Wu, M.-F., Shen, S.S., and Lerner, S.P. (2009). Sunitinib malate is active against human urothelial carcinoma and enhances the activity of cisplatin in a preclinical model. *Urol. Oncol.* *27*, 391–399.
- Spilisbury, K., Garrett, K.L., Shen, W.Y., Constable, I.J., and Rakoczy, P.E. (2000). Overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the retinal pigment epithelium leads to the development of choroidal neovascularization. *Am. J. Pathol.* *157*, 135–144.
- Strauss, O. (2009). [Retinal pigment epithelium]. *Ophthalmologe* *106*, 297–298.
- Strawn, L.M., McMahon, G., App, H., Schreck, R., Kuchler, W.R., Longhi, M.P., Hui, T.H., Tang, C., Levitzki, A., Gazit, A. (1996). Flk-1 as a target for tumor growth inhibition. *Cancer Res.* *56*, 3540–3545.
- Terman, B.I., Dougher-Vermazen, M., Carrion, M.E., Dimitrov, D., Armellino, D.C., Gospodarowicz, D., and Böhlen, P. (1992). Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *187*, 1579–1586.
- Tischer, E., Mitchell, R., Hartman, T., Silva, M., Gospodarowicz, D., Fiddes, J.C., and Abraham, J.A. (1991). The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J. Biol. Chem.* *266*, 11947–11954.
- Toullec, D., Pianetti, P., Coste, H., Bellevergue, P., Grand-Perret, T., Ajakane, M., Baudet, V., Boissin, P., Boursier, E., and Loriolle, F. (1991). The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* *266*, 15771–15781.
- Vidro, E.K., Gee, S., Unda, R., Ma, J., and Tsin, A. (2008). Glucose and TGFbeta2 modulate the viability of cultured human retinal pericytes and their VEGF release. *Curr. Eye Res.* *33*, 984–993.
- Vlahos, C.J., Matter, W.F., Hui, K.Y., and Brown, R.F. (1994). A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J. Biol. Chem.* *269*, 5241–5248.

De Vries, C., Escobedo, J.A., Ueno, H., Houck, K., Ferrara, N., and Williams, L.T. (1992). The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 255, 989–991.

Wiencke, A.K., Kiilgaard, J.F., Nicolini, J., Bundgaard, M., Röpke, C., and La Cour, M. (2003). Growth of cultured porcine retinal pigment epithelial cells. *Acta Ophthalmol Scand* 81, 170–176.

Wymann, M.P., and Pirola, L. (1998). Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim. Biophys. Acta* 1436, 127–150.

Yafai, Y., Yang, X.M., Niemeyer, M., Nishiwaki, A., Lange, J., Wiedemann, P., King, A.G., Yasukawa, T., and Eichler, W. (2011). Anti-angiogenic effects of the receptor tyrosine kinase inhibitor, pazopanib, on choroidal neovascularization in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 666, 12–18.

Yamagishi, S., Inagaki, Y., Amano, S., Okamoto, T., and Takeuchi, M. (2002). Up-regulation of vascular endothelial growth factor and down-regulation of pigment epithelium-derived factor messenger ribonucleic acid levels in leptin-exposed cultured retinal pericytes. *Int J Tissue React* 24, 137–142.

Yamazaki, Y., and Morita, T. (2006). Molecular and functional diversity of vascular endothelial growth factors. *Mol. Divers.* 10, 515–527.

Yang, Z., Stratton, C., Francis, P.J., Kleinman, M.E., Tan, P.L., Gibbs, D., Tong, Z., Chen, H., Constantine, R., Yang, X., et al. (2008). Toll-like receptor 3 and geographic atrophy in age-related macular degeneration. *N. Engl. J. Med.* 359, 1456–1463.

Zhang, J., Yang, P.L., and Gray, N.S. (2009). Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat. Rev. Cancer* 9, 28–39.

Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Professor Dr. Johann Roider, Direktor der Klinik für Ophthalmologie am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, für den Arbeitsplatz im Labor, die freundliche Aufnahme in die Klinik und die guten Arbeitsbedingungen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Professor Dr. Alexa Klettner für die Überlassung des interessanten Themas, die engagierte, ehrliche und sehr freundliche wissenschaftliche Betreuung und die reibungslose Kommunikation.

Ich möchte mich bei Elisabeth Richert, M. Sc., Serap Luick, Monika Marquardt und Alexandra Pfaff für die hervorragende technische Unterstützung im Umgang mit der Zellkultur und im Laboralltag allgemein bedanken. Ohne ihre Hilfe wäre der Weg zum Abschluss dieser Arbeit weitaus schwieriger gewesen. PD Dr. Stefan Koinzer und PD Dr. Felix Treumer bin ich für viele gute praktische Ratschläge während der Laborarbeit und beim Verfassen der Dissertation allgemein dankbar.

Meinem guten Freund Hendrik Faby danke ich für zahlreiche gemeinsam durchgestandene Stunden im Labor. Ohne Hendrik wäre ich nicht zu dieser Doktorarbeit gekommen und ich danke ihm für all die Hilfe - ob moralisch, technisch oder mathematisch -, mit der er uns beiden das Doktorandenleben leichter gemacht hat. Auch allen anderen Doktorandinnen und Doktoranden der Augenklinik gilt mein Dank für die schöne, fröhliche Zusammenarbeit.

Ich danke Sarah Lüders, Madelene Spincke und Marco Nehmer für die gewissenhafte Korrektur der Arbeit. Ein ebenso großes Dankeschön gilt Finn Oliver Maurer, M.A. für die wertvolle technische Hilfe.

Der größte Dank gilt von Herzen meiner Familie. Ich möchte ich diese Arbeit widmen. Meinen Eltern Angela und Holger danke ich dafür, dass Sie mir das Studium ermöglicht und mich immer unterstützt haben, meinen lieben Geschwistern Niels und Imke für all die Verbundenheit und Unterstützung, die weit über die Zeiten des Studiums und der Erstellung dieser Doktorarbeit hinausgeht.

Lebenslauf

- entfällt in der elektronischen Version -

Promotion und Veröffentlichungen

Promotion

2010 – 2015 Anfertigung der Dissertation an der Klinik für Ophthalmologie (Direktor: Prof. Dr. J. Roider) im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel.

Veröffentlichungen

2012 Klettner A., **Lassen J.**, Westhues D., Roider J.
Regulation of constitutive Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in RPE/choroid ocular tissue and RPE cell culture. ARVO Meeting Abstracts March 26, 2012 53:3698
ARVO 2012 Translational research: Seeing the possibilities, May 6-10 2012, Fort Lauderdale, Florida, USA.

2013 Klettner A., Westhues D., **Lassen J.**, Bartsch S., Roider J.
Regulation of constitutive vascular endothelial growth factor secretion in retinal pigment epithelium/choroid organ cultures: p38, nuclear factor kappaB, and the vascular endothelial growth factor receptor-2/phosphatidylinositol 3 kinase pathway. *Mol. Vis.* 19, 281–291.

Lassen J., Klettner A., Roider J.

Die Regulation der konstitutiven Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-Ausschüttung in RPE-/Choroidea-Organkultur und RPE-Zellkultur.

63. Tagung der Vereinigung Norddeutscher Augenärzte, 31. Mai - 1. Juni 2013, Westerland/Sylt.

2015 Klettner A., Kaya L., Flach J., **Lassen J.**, Treumer F., Roider J.
Basal and apical regulation of VEGF-A and placenta growth factor in the RPE/choroid and primary RPE. *Mol Vis.* 2015 Jul 10; 21:736-48.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit selbständig von mir verfasst wurde und keine weiteren als die darin angegebenen Quellen und Hilfsmittel Verwendung fanden. Diese Arbeit wurde bisher weder ganz noch in Auszügen an einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Ferner erkläre ich, dass ich noch keine früheren Promotionsversuche unternommen habe.

Kiel, den 14.09.2015

gez. Jens Lassen