

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

**BEEINFLUSSUNG DER PHAGOZYTLOSEFÄHIGKEIT DES RETINALEN
PIGMENTEPITHELES DURCH VEGF-ANTAGONISTEN**

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

vorgelegt von
FRIEDERIKE MÖHLE
aus Göttingen

Kiel 2015

1. Berichterstatter: Prof. Dr. J. Roider

2. Berichterstatter: Prof. Dr. U. Kunzendorf

Tag der mündlichen Prüfung: 21.11.2016

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 20.09.2016

gez. _____
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGEN

1 EINLEITUNG	1
1.1 Die neovaskuläre altersabhängige Makuladegeneration	1
1.2 Das retinale Pigmentepithel	3
1.3 Die Phagozytose	4
1.4 Vascular Endothelial Growth Factor	5
1.5 Therapie	7
1.6 Fragestellung	10
2 MATERIAL UND METHODEN	11
2.1 Material	11
2.1.1 Geräte & Software	11
2.1.2 Chemikalien	13
2.1.3 Sonstige Materialien	14
2.1.4 Puffer und Lösungen	15
2.2 Methoden	16
2.2.1 Gewinnung von RPE-Zellen aus Schweineaugen	16
2.2.2 Vermehren von Zellen	16
2.2.3 Collagenbeschichtung (Collagen A)	17
2.2.4 Gewinnung von Photorezeptoraußensegmenten	17
2.2.5 Proteinbestimmung	17
2.2.6 Vorversuche	18
2.2.6.1 Opsonierung von Fluorescein Isothiocyanat (FITC)-markierten Latexkügelchen	18
2.2.6.2 Phagozytoseassay	18
2.2.7 Hauptversuche	19
2.2.7.1 Mannan	19
2.2.7.2 VEGF-Antagonisten	20
2.2.7.3 Rituximab	20
2.2.8 Mikroskopie und Auswertung	20
2.2.9 Statistik	21

3	ERGEBNISSE	22
3.1	Etablierung des Phagozytoseassays	22
3.2	Hauptversuche	24
3.2.1	Phagozytoseverhalten nach Gabe von Mannan.....	24
3.2.2	Phagozytoseverhalten nach Gabe von therapeutischen Antikörpern	25
3.2.2.1	Bevacizumab	25
3.2.2.2	Ranibizumab.....	25
3.2.2.3	Rituximab	27
4	DISKUSSION	29
4.1	Etablierung des Phagozytoseassays	29
4.2	Phagozytoseverhalten nach Gabe von Mannan.....	31
4.3	Einfluss von VEGF-Inhibitoren auf die Phagozytose	32
5	ZUSAMMENFASSUNG	37
6	LITERATURVERZEICHNIS	39
	DANKSAGUNG	
	LEBENS LAUF	

Abkürzungen

AK	Antikörper
AMD	Altersabhängige Makuladegeneration
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> / Rinderalbumin
CATT	<i>Comparison of Age-Related Macular Degeneration Treatments Trials</i>
CD	<i>Clusters of differentiation</i> / humane CD-Antigene
CNV	Choroidale Neovaskularisation
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> / standardisiertes Zellkultur-Nährmedium
DMSO	Dimethylsulfoxid
E-coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Fab-Fragment	Antigen-bindendes Fragment
Fc-Teil	<i>Fragment crystallizable</i> / kristallisierbares Fragment
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
Ig	Immunglobulin
IVAN	<i>Alternative treatments to Inhib VEGF in Age-related choroidal Neovascularisation</i>
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i> / Boten-RNA
NaCl	Natriumchlorid
NP	Neuropilin
NV-AMD	Neovaskuläre AMD
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> / Phosphatgepufferte Salzlösung
PDT	Photodynamische Therapie
Pe/St	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PIGF	<i>Placenta Growth Factor</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> / Ribonukleinsäure
ROS	<i>Receptor outer segments</i> / Photorezeptoraußensegmente
RPE	Retinales Pigmentepithel
rpm	<i>Rounds per minute</i> / Drehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SNAFL	<i>Carboxy seminaphthofluorescein</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> / Tris-gepufferte Salzlösung
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

TTBS	Mischung von <i>Tris-buffered saline</i> und <i>Tween 20</i>
UV	Ultraviolett
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>

1 Einleitung

1.1 Die neovaskuläre altersabhängige Makuladegeneration

Die altersabhängige Makuladegeneration (AMD) stellt mittlerweile weltweit die häufigste Erblindungsursache der älteren Bevölkerung dar (Bird 2010). Alleine in Deutschland sind ca. 4,5 Mio. Menschen betroffen, wovon 700 000 an einer potenziell zur Erblindung führenden Spätform leiden (s. u.). Studien belegen einen exponentiellen Anstieg der Prävalenz der AMD ab dem 70. Lebensjahr (Dietzel et al., 2010). Die Wahrscheinlichkeit, dass eine AMD diagnostiziert und erlebt wird steigt dabei ebenso wie die Zeitspanne, die mit einer Sehbehinderung gelebt werden muss (Schrader, 2006). Aktuellen Schätzungen nach werden 2020 mehr als 1 Mio. Deutsche an einer Spätform der AMD erkrankt sein (Dietzel et al., 2010).

Bei der AMD handelt es sich um eine phänotypisch heterogene, multifaktorielle, degenerative und progrediente Erkrankung der Retina, insbesondere des Komplexes aus äußerer neuronaler Retina, retinalem Pigmentepithel (RPE), Bruch-Membran und Aderhaut (Choriokapillaris) (Ambati et al., 2003, Bhutto und Lutty, 2012). Die Erkrankung führt in ihren Spätformen zum Verlust der zentralen Sehschärfe und damit zum Ausfall des zentralen Gesichtsfeldes (Finger et al., 2007).

Als Risikofaktoren gelten das Alter, Umweltfaktoren (z.B. Rauchen, hohe UV-Exposition, Adipositas) und eine genetische Prädisposition (Ambati et al., 2003, Bird, 2010, Dietzel et al., 2010). Auch weisen Polymorphismen in Genen der körpereigenen Abwehr auf die Rolle der angeborenen Immunität und entzündlicher Reaktionen in der Ätiologie der AMD (Bird, 2010, Lommatzsch, 2010).

Unterschieden wird die trockene (atrophische, nonexsudative) von der feuchten (neovaskulären, exsudativen) Form der AMD, wobei es sich in bis zu 90 % der Erkrankungen um die trockene Form handelt (Dietzel, 2010). Dabei kommt es durch Atrophie des retinalen Pigmentepithels und der sensorischen Netzhaut zu einer meist langsamen Verschlechterung der zentralen Sehschärfe. In ihrer Funktion gestörte Pigmentepithelzellen kommen ihrer im gesunden Gewebe wichtigen Transportfunktion nicht mehr nach (s. u.) wodurch sich Stoffwechselprodukte anhäufen und als so genannte Drusen zwischen RPE und Bruch-Membran ablagern. In Abhängigkeit vom klinischen Erscheinungsbild werden Drusen in hart und weich unterschieden, wobei vor allem weiche Drusen eine Rolle in der Pathologie der AMD spielen (Bonilha, 2008). Drusen allein sind nicht für den signifikanten Sehverlust bei einer AMD verantwortlich, stellen aber große Diffusionsbarrieren zwischen Blut und RPE dar. Ein wichtiger pathophysiologischer Faktor bei der Entwicklung einer trockenen AMD ist der

Verlust des RPE, was zu einer Atrophie der darüber liegenden Photorezeptoren führen und sich als geographische Atrophie manifestieren kann. Die betroffenen Areale werden als Hypo- bzw. Hyperpigmentierung in der Netzhaut sichtbar. Wegen nur geringfügiger retinaler Funktionseinschränkungen bleibt die frühe AMD eher unbemerkt, jedoch ist der Übergang in eine visusbedrohende Spätform möglich. Das Risiko ist variabel und hängt unter anderem vom Schweregrad der frühen AMD ab (Ambati et al., 2003, Dietzel et al., 2010, Strauss, 2005). Die prophylaktische Einnahme von Spurenelementen und Vitaminen soll das Risiko eine Spätform zu entwickeln mindern (Finger, 2007), doch sind bisher weder der Übergang in eine Spätform, noch die trockene Form an sich einer Therapie zugänglich (Bird, 2010, Finger et al., 2007).

Auch wenn die neovaskuläre Form nur 10-15 % aller AMD Fälle ausmacht, ist sie in 90 % für die schweren Einschränkungen des Sehvermögens im Zusammenhang mit einer AMD verantwortlich. Zu diesen schweren Einschränkungen des Sehvermögens kommt es meist innerhalb von 2 Jahren nach Diagnosestellung. Das führt neben funktionellen auch zu psychischen Beeinträchtigungen und hat negative Auswirkungen auf die Fähigkeiten und Aktivitäten des täglichen Lebens (z. B. Lesen, Auto fahren), wodurch Unabhängigkeit, Lebensqualität und das seelische Wohlbefinden stark beeinträchtigt sind (Pauleikhoff et al., 2009). In den Spätstadien ist die feuchte Form mit 60-70 % wiederum häufiger als die trockene AMD (Gerding et al., 2012).

Bei der feuchten Form kommt es zur Ausbildung neuer Blutgefäße aus der Aderhaut durch die Bruch-Membran in den sub- und intraretinalen Raum. Dieses wird als choroidale Neovaskularisation (CNV) oder neovaskuläre-AMD (NV-AMD) bezeichnet. Die wiederholte Leckage von Blut, Serum und/oder Lipiden führt zur Akkumulation der extrazellulären Flüssigkeiten und somit zu einem Makulaödem oder Makulablutungen (Ambati et al., 2003, Finger et al., 2007). Die Folge daraus sind Zelltod und oft bindegewebiger Umbau (Narbenbildung) mit irreversiblen Sehverlust (Ambati et al., 2003, Dietzel et al., 2010). Diese strukturellen Veränderungen führen allgemein zu einem Rückgang der Grundfunktionen (Bonilha, 2008). *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) gilt als der wichtigste Regulator der Gefäßentstehung in Krankheit und Gesundheit (s. u.) (Holmes und Zachary, 2005). Eine wichtige Quelle für VEGF in der Retina ist unter anderem das RPE (Klettner, 2013).

1.2 Das retinale Pigmentepithel

Pathophysiologische Veränderungen im Rahmen der AMD spielen sich vor allem auf Ebene des retinalen Pigmentepithels ab (Schütt et al., 2008). Das RPE ist ein pigmentiertes, einschichtiges Epithel aus polarisierten, hexagonalen Zellen zwischen den lichtsensitiven Photorezeptoraußensegmenten (*receptor outer segments*, ROS) der Retina und den fenestrierten Kapillaren der Aderhaut (Choroidea). Mit apikalen Mikrovilli umschließt das RPE die Außensegmente der Photorezeptoren und seine tief eingefaltete basolaterale Membran bildet über die Bruch-Membran die Interaktionsfläche zum Blutstrom der fenestrierten Aderhaut. Das RPE erfüllt vielfältige Funktionen und ist für den Sehvorgang und die Homöostase der neuronalen Retina unerlässlich. So ist es z. B. an der Aufbereitung des Sehpigmentes und der Versorgung der Photorezeptoren mit Nährstoffen beteiligt (Kevany und Palczewski, 2010, Strauss, 2005). Das RPE dient dabei als Filter, Schutz und Barriere. Als Teil der Blut-Retina-Schranke gewährleistet es den Stoffaustausch zwischen Retina und Blut. Die Transportfunktionen dienen sowohl der Ernährung als auch dem Abtransport anfallender Metabolite. Auch die Absorption von Licht und der Schutz vor schädigenden Radikalen bilden einen essentiellen Teil der funktionellen Einheit.

Da sich das RPE als postmitotisches Epithel in der Regel nicht erneuert, kann die jahrzehntelange Akkumulation schädigender Moleküle zu irreversiblen Beeinträchtigungen führen. Ein Anstieg schädigender Radikale und Sinken der Schutzmechanismen bildet oft den Einstieg für die Ursachen der AMD (Gamulescu et al., 2009, Kevany und Palczewski, 2010, Schütt et al., 2008, Strauss, 2005). Diverse mit dem Alter auftretende, strukturelle Veränderungen des RPE werden im Rahmen einer AMD noch verschärft. Auch wenn diese Veränderungen bekannt sind, können die Zusammenhänge dieser Mechanismen bisher nicht geklärt werden. Sie führen insgesamt zu einer Steigerung des oxidativen Stresses und allgemein zum Rückgang der Gesamtfunktion (Bonilha, 2008, Klettner, 2012).

Als sekretorisches Gewebe produziert das RPE Faktoren, die der Kommunikation und Funktionsabstimmung mit angrenzenden Geweben dienen. Es bildet neuroprotektive Wachstumsfaktoren sowie Faktoren zur Stabilisierung der choriokapillären Gefäßstruktur, unter anderem VEGF (s. u.) Diese Faktoren erhalten im gesunden Auge die strukturelle Integrität der Photorezeptoren und des Aderhautendothels. Allerdings kann sich die Sekretion in pathologischen Prozessen ändern und Neovaskularisationen auslösen (Klettner und Roeder, 2012). Eine vermehrte Sekretion angiogener Faktoren v. a. VEGF (s. u.) wird als Versuch gedeutet, den Nährstoffmangel durch Gefäßneubildung auszugleichen (Gamulescu et al., 2009).

Eine Hauptaufgabe des RPE und unerlässlich für den Sehvorgang, ist die einer zirkadianen Rhythmik unterliegende Phagozytose von Photorezeptoraußensegmenten (Karl et al., 2007, Strauss, 2005).

1.3 Die Phagozytose

Die Funktion der Photorezeptoren erfordert die Balance von Proteinen, Lipiden und Metaboliten. Eine Störung dieser Balance führt zur Retinadegeneration. Um toxische Effekte akkumulierter photooxidativer Produkte zu vermeiden und vor allem um das Sehpigment zu erneuern, geben Photorezeptoren täglich ca. 10 % ihres Volumens ab. Trotzdem behalten sie stets eine ungefähr konstante Länge, indem Außensegmente von der Basis her erzeugt und gleichzeitig äußere Segmente abgestoßen und vom RPE phagozytiert werden (Kevany und Palczewski, 2010, Strauss, 2005). Phagozytose beschreibt die Aufnahme größerer Partikel, wobei sich heterophagische Vakuolen (Phagosomen, Heterophagosomen) bilden. Dazu gibt es spezialisierte Zellen, wie z. B. Makrophagen, neutrophile Granulozyten oder RPE-Zellen. Der Vorgang läuft wie folgt ab: Die phagozytierende Zelle bildet mit Hilfe des Aktin-Systems Ausläufer (Pseudopodien, Lamellipodien), die das zu verdauende Objekt festhalten und umfassen. Durch Einstülpung der Plasmamembran (Invagination) und anschließender Membranfusion, wird der aufzunehmende Stoff in einer heterophagischen Vakuole ins Zellinnere aufgenommen (Internalisation). Besonders effizient erfolgt die Phagozytose, wenn Objekte aufgrund bestimmter Oberflächenmoleküle von Rezeptoren der Fresszelle erkannt und gebunden werden können. Diese Markierung der Oberfläche wird als Opsonisation bezeichnet. Binden Antikörper diese Markierung, werden sie mittels eines Fc-Rezeptors (*fragment crystallizable*) an der Oberfläche der phagozytierenden Zelle gebunden. Antikörper-unabhängige Opsonine haben denselben Effekt. Das Phagosom fusioniert letztlich mit Lysosomen und wird so zum Phagolysosom. Lysosomen enthalten über 40 verschiedene Enzyme durch die Makromoleküle gespalten werden. Freigesetzte Bausteine verlassen das Lysosom und werden wieder verwertet („Recycling“), unverdauliche Stoffe verbleiben als Residualkörper (Telolysosomen) (Lüllmann-Rauch, 2003).

Bestimmte Komponenten der Plasmamembran der Photorezeptoraußensegmente (z. B. Phospholipide oder bestimmte Aminogruppen) und deren Anordnung innerhalb der Membran scheinen als Phagozytose-auslösendes Signal bei den RPE-Zellen zu dienen, so dass vermutet wird, dass das RPE die Außensegmente der Rezeptoren (ROS) nach ähnlichen Mechanismen erkennt wie professionelle Fresszellen. Haben Makrophagen ihr Substrat erkannt, erfolgt die Bindung meist Rezeptor-vermittelt. Auch für die Bindung von ROS an das RPE wurden

erforderliche Rezeptoren nachgewiesen (Kevany und Palczewski, 2010). Zu nennen wären da Merck, ein Tyrosin-Kinase-Rezeptor, Mannoserezeptoren, Integrine oder Vitronektinrezeptoren wie $\alpha\beta 3$ und $\alpha\beta 5$, und der Membranrezeptor CD36, wobei das Substrat nicht direkt, sondern über Liganden gebunden wird (Carr et al, 2009, Greaton et al., 2003, Kevany und Palczewski, 2010, Zhao et al., 1999). Erkennen und Binden stellen die ersten Schritte dar, doch reicht die Bindung von ROS allein nicht aus, um die Phagozytose zu stimulieren. Versuche an Ratten, die eine Atrophie der RPE-Zellen und der Photorezeptoren aufwiesen, zeigten, dass ROS zwar gebunden, jedoch nicht aufgenommen werden konnten. Wie sich heraus stellte, fehlte den Ratten der Tyrosin-Kinase-Rezeptor Merck. Gleichzeitig waren die RPE-Zellen jedoch mit unspezifischen Partikeln gefüllt, so dass mindestens zwei Phagozytosewege zu bestehen scheinen. (Kevany und Palczewski, 2010). Da die Rezeptoren die Außensegmente nicht selber in das RPE befördern, scheinen sie an einem Signalweg beteiligt zu sein, der für die Internalisierung der Außensegmente erforderlich ist. Sowohl die Ausbildung von Pseudopodien (s. o.) als auch die Fusion der zur Vakuole verschmelzenden Membranen weist bezüglich der Motorproteine und der beteiligten Bindungsproteine Unterschiede auf. Da RPE-Zellen polarisiert und fixiert sind, erfolgt die Phagozytose immer an ihrer apikalen, den Photorezeptoren zugewandten, Membran. Internalisierte Phagosomen wandern somit von apikal nach basal und werden schließlich zum Phagolysosom (Kevany und Palczewski, 2010).

1.4 Vascular Endothelial Growth Factor

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), eine Familie von Wachstumsfaktoren, umfasst sieben Mitglieder (VEGF-A - F und *Placenta Growth Factor* (PlGF)), wobei VEGF-A der am besten untersuchte Faktor, in der Literatur synonym als VEGF bezeichnet wird (Otrock et al., 2007).

Durch alternatives Spleißen derselben *messenger*-RNA (mRNA) oder proteolytische Spaltung im Gewebe entstehen verschiedene VEGF Isoformen (Keyt et al., 1996, Robinson et al., 2006). Diese unterscheiden sich nicht nur in ihren chemischen Eigenschaften wie Löslichkeit und Molekulargewicht, sondern auch in ihrer Rezeptorspezifität und biologischen Aktivität (Ziemssen et al., 2008). Benannt werden sie nach der Anzahl ihrer Aminosäuren (Ishida et al., 2003, Klettner und Roider, 2009). Alle Isoformen weisen eine VEGF-Rezeptorbindungsdomäne auf, alle Isoformen bis auf VEGF₁₂₁ zusätzlich eine Heparinbindungsdomäne (Bhisitkul, 2006, Holmes und Zachary, 2005). VEGF₁₆₅ scheint die häufigste Isoform in der Retina zu sein aber auch VEGF₁₂₁ kommt vor (Saint-Geniez et al., 2006). Die Isoformen

VEGF₁₈₃ und VEGF₁₈₉ sind ebenfalls nachweisbar, ihre Funktion und Signifikanz ist jedoch bisher nicht weiter bekannt (Klettner, 2013). In jüngster Zeit wurde entdeckt, dass es durch weiteres Spleißen an einem andern Genort zum Austausch einer Aminosäure kommt, wodurch weitere Isoformen entstehen, die durch „b“ (z. B. VEGF_{121b}) gekennzeichnet werden. Diesen Isoformen werden als anti-angiogene-Isoformen beschrieben (Klettner, 2013, Nowak et al., 2008).

Bis heute stellt VEGF das potenteste pro-angiogene Protein dar (Otrock et al., 2007) und ist der wichtigste Regulator der Gefäßentstehung in Gesundheit und in Krankheit (Holmes und Zachery, 2005). Essentiell im Verlauf der Embryogenese, würde das Fehlen nur eines Allels aufgrund vaskulärer Defekte und kardiovaskulärer Abnormitäten den Tod bedeuten (Ambati et al., 2003, Carmeliet et al., 1996, Ferrara et al., 1996). Im adulten Organismus spielt er physiologisch im Rahmen des weiblichen Zyklus, einer Schwangerschaft und der Wundheilung eine Rolle, ist aber auch an pathologischen Prozessen wie Tumorentstehung und anderen mit Neovaskularisation assoziierten Erkrankungen (z.B. diabetischer Retinopathie, rheumatoider Arthritis und AMD) beteiligt (Bhisitkul, 2006). In der Retina wird VEGF u. a. vom RPE gebildet und ist ein Überlebensfaktor für vaskuläre Endothelzellen (Ambati et al., 2003, Ferrara et al., 2006). Es spielt eine wichtige Rolle in der physiologischen Vaskularisierung der Retina (Bhisitkul, 2006), hat neuroprotektive und autokrine Wirkungen auf das RPE (Byeon et al., 2010, Zachary, 2005) und ist wichtig für die Fenestrierung der Kapillaren der Aderhaut (Klettner, 2013, Peters et al., 2007). Im gesunden Auge wird so die strukturelle Integrität der Photorezeptoren und Endothelien der Choriokapillaris erhalten.

Die VEGF-Expression in der Retina wird durch verschiedene Stimuli z. B. oxidativen Stress oder Hypoxie hochreguliert, wobei sich die physiologische und pathologische Sekretion in ihrer Regulation unterscheiden. Die Regulierung ist komplex, eine Vielzahl von Signalmolekülen ist involviert, und hängt außer vom Stimulus auch vom Zelltyp ab (Klettner et al., 2009, Klettner und Roider, 2012). Beeinflusst werden mehrere Komponenten der Angiogenese, wie Proliferation, Überleben und Migration, sowie die Hyperpermeabilität der Gefäße (Ambati et al., 2003).

VEGF vermittelt seine Signale über zwei VEGF-Rezeptoren (VEGFR-1 und 2), beides Tyrosinkinase-Rezeptoren, sowie Korezeptoren, Neuropilin- (NP-) 1 und 2, die keine Tyrosinkinase-Rezeptoren sind. VEGFR-1 weist die stärkste Bindungsaffinität auf. Ihm werden sowohl pro- als auch antiangiogene Effekte nachgesagt, (Bhisitkul, 2006, Shibuya, 2001) doch generell gilt VEGFR-2 als Hauptvermittler mitogener, angiogener und permeabilitätsverändernder Effekte von VEGF (Ferrara et al., 2006). Korezeptoren scheinen die Bindung

von VEGF an seinen Rezeptor zu erleichtern und die vermittelte Signaltransduktion zu verstärken (Ferrara et al., 2006, Holmes und Zachery, 2005, Klettner et al., 2009). NPs erfüllen aber auch VEGFR-unabhängige Funktionen, sind ebenfalls essentiell für die Angiogenese und scheinen demnach nicht nur Korezeptoren zu sein (Zachary, 2005). Als Dimer hat VEGF zwei Bindungsstellen für Rezeptoren. Bei Besetzung dieser beider Bindungsstellen wird eine Signaltransduktionskaskade ausgelöst, nachdem sich die Rezeptoren gegenseitig phosphorylieren. Am Ende dieser Kaskade steht die Proliferation und Migration von Endothelzellen (Klettner et al., 2009). Seine Eigenschaften machen VEGF zu einem attraktiven Ziel anti-angiogener Therapie (Ambati et al., 2003).

1.5 Therapie

In der Vergangenheit standen zur Behandlung der feuchten AMD nur thermische Laserkoagulation, photodynamische Therapie (PDT) und chirurgische Verfahren zur Verfügung, die im besten Fall weiteren Sehverlust verhindern konnten (Finger et al., 2007). Heute sind die PDT und chirurgische Maßnahmen als Alternativbehandlungen in Einzelfällen anzusehen. Entwickelt für die Krebstherapie (Ferrara, 2010) revolutionierte der Einsatz von VEGF-Inhibitoren die Therapie von Augenerkrankungen, wie AMD, diabetisches Makulaödem und retinale Venenverschlüsse. Mittlerweile werden VEGF-Inhibitoren auch bei Frühgeborenenretinopathien oder Retinopathien anderer Ursache angewendet (Klettner, 2013). Für die Behandlung der AMD gilt ihre intravitreale Anwendung inzwischen als Goldstandard. Experten plädieren heute für eine individualisierte und bedarfsorientierte Therapie. Patienten sollten engmaschig überwacht und im Falle erneuter Aktivität der Krankheit, zeitnah weiter behandelt werden. Durch eine frühzeitige Behandlung sollte eine trockene Netzhaut (*no fluid toleranz*) angestrebt werden, da die wiederholte Zu- und Abnahme der Netzhautdicke, Schäden hervorrufen würde. Ziel ist es mit möglichst wenigen Injektionen einen möglichst guten Visus zu erhalten (Gerding et al., 2012).

Die durch VEGF induzierte Angiogenese kann auf unterschiedliche Arten gestoppt werden. So kann die Ausschüttung von VEGF selbst unterbunden, die Bindung an den Rezeptor verhindert oder die Weiterleitung des Signals durch den Rezeptor vermieden werden. Die derzeitig klinisch angewendeten Medikamente binden alle direkt an VEGF und verhindern so eine Rezeptoraktivierung (Klettner et al., 2009).

Der erste VEGF-Antagonist der in der Augenheilkunde eingesetzt wurde, war Bevacizumab (Avastin®, Roche), welches 2004 für die Krebstherapie zugelassen wurde. Bevacizumab ist ein humanisierter, monoklonaler Vollantikörper, der alle Isoformen von VEGF bindet. Eine

Bindung verhindert durch sterische Inhibition wiederum die Bindung an den Rezeptor, so dass keine Signaltransduktion ausgelöst wird, die eine Neovaskularisation einleiten könnte (Muller et al., 1998). Bevacizumab findet in Kombination mit einer Chemotherapie systemisch bei der Behandlung des kolorektalen Karzinoms, des Mammakarzinoms, bestimmten Formen des Bronchialkarzinoms, des Nierenzellkarzinoms, des Eierstock-, Eileiter- oder Bauchfellkarzinoms, des Glioblastoms und des Gebärmutterhalskarzinoms Anwendung und ist arzneimittelrechtlich in Deutschland nicht für die Behandlung der AMD zugelassen (National Cancer Institute, 2014).

Bereits 2005 erschienen erste Veröffentlichungen über die Anwendung Bevacizumabs bei der AMD, und für viele Retinaspezialisten stellt Bevacizumab derzeit als zulassungsfreie („*off label*“) Therapie die „*first-line*-Therapie“ dar (Ip et al., 2008). Bevacizumab ist weltweit wahrscheinlich das meistgenutzte Medikament in der AMD-Behandlung aufgrund der niedrigeren Kosten im Vergleich zu den Kosten dafür zugelassener Produkte (Patel et al., 2008). Nach vorliegenden Fallberichten ist Bevacizumab gut verträglich und hat, ähnlich dem zugelassenen Ranibizumab (s. u.), ein geringes Nebenwirkungsprofil (Ciulla und Rosenfeld, 2009, Ladas et al., 2009). Neuste Erkenntnisse liefert die vierarmige Studie CATT (Comparison of Age-Related Macular Degeneration Treatments Trials), bei der Patienten monatlich oder bei Bedarf jeweils Ranibizumab bzw. eine *off-label*-Therapie mit Bevacizumab erhielten. Es zeigten sich exzellente, äquivalente Effekte bezüglich der Sehschärfe und keine signifikanten Unterschiede bezüglich Tod, arterieller thromboembolischer oder venöser thrombotischer Ereignisse. Allerdings traten in der Gruppe der mit Bevacizumab behandelten Patienten schwere systemische unerwünschte Nebenwirkungen vermehrt auf (CATT Research Group, 2011).

Das erste in Deutschland zur Behandlung der AMD zugelassene Medikament im Rahmen einer Anti-VEGF-Therapie war 2006 Pegaptanib (Macugen®, Pfizer), ein synthetisch hergestelltes Oligonukleotid Aptamer und RNA-ähnliches Molekül, spezifisch für VEGF₁₆₅, dem die pathologischen Veränderungen bei der AMD zugeschrieben wurden (Bhisitkul, 2006, Spitzer et al., 2007). Pegaptanib wurde aufgrund einer geringeren Wirksamkeit im Vergleich mit den anderen VEGF-Antagonisten weitestgehend verdrängt (Klettner et al., 2009) und wird hier lediglich aus historischen Gründen erwähnt.

Ranibizumab (Lucentis®, Novartis) ist nach Pegaptanib das zweite zur Behandlung der AMD zugelassene Medikament und seit 2007 auf dem deutschen Markt. Ranibizumab ist ein rekombinantes monoklonales Antikörperfragment (Fab-Fragment) mit hoher Bindungsaffinität für alle Isoformen von VEGF. Es wurde aus dem gleichen murinen Antikörper

entwickelt wie Bevacizumab und weist im Vergleich zu Bevacizumab eine vielfach verstärkte Bindungsaffinität zu VEGF auf (Klettner und Roider, 2009). Man entwickelte das mit 48 kDa deutlich kleinere Fab-Fragment, nachdem erste Studien darauf hinwiesen, dass Bevacizumab, ein Vollantikörper mit 148 kDa die Netzhaut nicht penetrieren könne (Mordenti et al., 1999). Heiduschka et al. (2007) widerlegten diese Aussage allerdings. Bevacizumab durchdrang die Retina nach intravitrealer Injektion bei Affen. Ranibizumab wirkt wie Bevacizumab ebenfalls über sterische Inhibition (Ferrara et al., 2006). Ranibizumab verhindert den Sehverlust und bei ca. 25 % der Patienten kommt es zu einer Verbesserung der Sehstärke (Rosenfeld et al., 2006, Ip et al., 2008). Da Bevacizumab und Ranibizumab aus demselben Antikörper entwickelt wurden, ist eine ähnliche Wirksamkeit naheliegend. Sie unterscheiden sich außer in ihrer molekularen Masse und der Tatsache, dass Ranibizumab keinen Fc-Teil trägt, in 6 Aminosäuren. Zusätzlich wurde Bevacizumab in eukaryoten Zelllinien produziert und trägt Zuckerreste, während Ranibizumab in prokaryoten E-coli Zellen gebildet wurde und keine Zuckerreste trägt (Klettner et al., 2009).

Seit 2013 ist Aflibercept (Eylea®, Bayer Health Care) zur Behandlung der AMD zugelassen. Aflibercept ist ein humanes, rekombinantes Fusionsprotein von 115 kDa, welches sich aus der zweiten Ig-Bindungsdomäne des humanen VEGFR-1 und der dritten Ig-Bindungsdomäne des VEGFR-2 sowie dem Fc-Teil des humanen IgG1 zusammensetzt. Als löslicher Rezeptor bindet es VEGF und PlGF (Julien et al., 2014, Klettner und Roider, 2009). Bei der Durchführung der Studie, die dieser Doktorarbeit zugrunde liegt, war Aflibercept noch nicht verfügbar.

Klettner et al. zeigten in *in-vitro* Versuchen, dass sich Bevacizumab und Ranibizumab in klinischen Konzentrationen nicht in ihrer Wirksamkeit unterscheiden. Beide neutralisierten VEGF komplett für 6 Stunden und signifikant bis zu 16 Stunden. In verdünnter Anwendung zeigte sich Ranibizumab dabei effektiver als Bevacizumab. Interessant war, dass in Zellkulturen, nach Zugabe von Bevacizumab und Ranibizumab, Bevacizumab im Gegensatz zu Ranibizumab von den Zellen aufgenommen wurde und dort für den Beobachtungszeitraum von einer Woche nachweisbar war (Klettner et al., 2009, Klettner und Roider, 2008). Diese Beobachtungen ließ die Frage nach möglichen Wirkungen der VEGF-Antagonisten auf die Funktion der RPE-Zellen aufkommen.

1.6 Fragestellung

Pathophysiologische Veränderungen im Rahmen der AMD spielen sich vor allem auf Ebene des RPE ab. RPE und Photorezeptoren der neuronalen Retina bilden eine funktionelle Einheit im Sehprozess (Bhutto und Luty, 2012, Schütt et al., 2008). Die Phagozytose von ROS gilt als eine Hauptaufgabe des RPE (Schraermeyer et al., 1997). Derzeitig stellt die Therapie mit VEGF-Antagonisten für die Behandlung der AMD den Goldstandard dar. Angewendet werden das für die Behandlung der AMD zugelassene Ranibizumab sowie *off-label*, Bevacizumab, außerdem seit 2013 Aflibercept. Klettner et al. wiesen 2009 nach, dass sich Bevacizumab, im Gegensatz zu Ranibizumab, in den Zellen anreichert, was zu der Frage führte, in wieweit VEGF-Antagonisten gegebenenfalls Einfluss auf die Phagozytosefähigkeit der Zellen haben.

Um die Phagozytoseaktivität des RPE zu untersuchen, wurden bisher unterschiedliche Methoden angewandt. Zu nennen sind z. B. die Elektronenmikroskopie (Essner et al., 1978), die Durchflusszytometrie (Miceli und Newsome, 1994) und die Fluoreszenzmikroskopie (McLaren, 1996). Die Aufnahme von Latexkügelchen oder fluoressenzmarkierter Photorezeptoraußensegmente (Carr et al., 2009, Seyfried-Williams und McLaughlin, 1983) ist ebenso erforscht, wie die Markierung von Latexkügelchen mit diversen Substanzen (z.B. Fucose, Mannose, Fibronectin, Kollagen) (Seyfried-Williams und McLaughlin, 1983, Zhao et al., 1999), doch keine diese Substanzen, mit Ausnahme von ROS, stellt das natürliche Substrat der Phagozytose dar. Hinzu kommt, dass die Markierung von ROS mit fluo-reszierenden Farbstoffen wie Oregon Green, FITC oder SNAFL-2 (Karl et al., 2007, McLaren, 1996) kostenintensiv ist und für die Auswertung der mikroskopischen Bilder eine spezifische Software benötigt wird. Ziel dieser Arbeit war es, eine einfache und kostengünstige Methode zu entwickeln, um die Phagozytoseeigenschaften des RPE zu beurteilen und mit Hilfe dieser Methode die Auswirkungen der VEGF-Antagonisten Bevacizumab und Ranibizumab auf die Phagozytose zu untersuchen. So wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Verfahren etabliert, das bereits bekannte Methoden miteinander kombiniert (Papermaster und Dreyer, 1974, Schraermeyer et al., 1997, Steinberg und Grinstein, 2007, Steinberg und Grinstein, 2009) und folgende Fragestellung bearbeitet:

1. Wie lässt sich die Phagozytosefähigkeit von RPE-Zellen einfach, schnell und kostengünstig quantifizieren und
2. Wirken sich unterschiedliche VEGF-Antagonisten bzw. ihre intrazelluläre Anreicherung auf die Phagozytosefähigkeit von RPE-Zellen aus?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte & Software

Die verwendeten Geräte finden sich in Tabelle 1 und die verwendete Software in Tabelle 2 wieder.

Tabelle 1: Verwendete Geräte

Bezeichnung	Firma
Abzug Antair BS	A. Sternkopf GmbH, Lübeck
Abzug Systemlabor	Köttermann GmbH & Co. KG, Uetze/ Hänigsen
Axioskop	Carl Zeiss AG, Jena
Brutschrank	Labotect, Göttingen
Fluoreszenzfilter A 13 N2.1	Leica Camera AG, Wetzlar
Fluoreszenzmikroskop	Leica Camera AG, Wetzlar
Kanüle Microlance™	Becton Dickinson
Magnetrührer	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Mikroskop LSM510UV	Carl Zeiss AG, Jena
Objektiv	Leica Fluotar PL 40x 0,7 Luft und 10x 1,3 Öl
Objektträger 21 x 26 mm und Deckgläser	Menzel GmbH, Braunschweig
Photometer Genesys 10 Bio	Thermo Electron Corporation, Langenselbold
Pinzette BD 314	Aesculap AG, Tuttlingen
Pipetten Research®	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Saugpumpen Vacusafe comfort	Integra Biosciences AG, Schweiz, Zizers
Schere 545A	Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen

Schüttler Rocking platform	VWR, USA, Pennsylvania, Radnor
Skalpell Rasierklinge T585	Plano GmbH, Wetzlar
Stromversorgungsgerät Electrophoresis-power- supply	Consort nv, Belgien, Turnhout
Vortexer Genie 2	Scientific Industries, USA, New York
Waage	Kern& Sohn GmbH, Balingen
Zellkulturschalen Nunclon™ ΔSurface	Nunc A/S, Dänemark, Roskilde
Zellkulturplatten (12-Kammern)	Biochrom GmbH, Berlin
Zentrifuge Sorvall ST40	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Zentrifuge Centrifuge 5414	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Heraeus Fresco17	Thermo Electron Corporation, Erlangen
Zentrifugenröhrchen	Falcon-Röhrchen Centrifuge Tubes, VWR, USA, Radnor, Pennsylvania, USA

Tabelle 2: Software

Bezeichnung	Firma
Axiovision	Carl Zeiss
analySIS	Kamera Software für CC-12, Olympus Image Analysis Software, Japan, Tokyo
MS Excel 2007	Microsoft, USA, Washington, Redmond
SigmaPlot™ Software	Systat Software GmbH, Erkrath

2.1.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Firma
Aceton Ensure TM	Merck KGaA, Darmstadt
Dinatriumphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
DMSO, Dimethylsulfoxid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
EDTA, Ethyldiamintetraessigsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Essigsäure 100 % (C ₂ H ₄ O ₂)	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol 99 %	Büfa Chemikalien GmbH & Co. KG, Hude
Glycin, Glycerin 87 %	Merck KGaA, Darmstadt
HEPES, 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	PAA Laboratories GmbH, Österreich, Pasching
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCL)	Merck KGaA, Darmstadt
Kalilauge 10 % (KOH)	Walter GmbH & Co. KG, Kiel
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich Chemikalien GmbH, Deisenhofen
Natriumbicarbonat (NaHCO ₃)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Natrium Pyruvat	PAA Laboratories GmbH, Österreich, Pasching
PBS, Phosphatgepufferte Salzlösung	PAA Laboratories GmbH, Österreich, Pasching
PFA, Paraformaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt
Salzsäure 25 % (HCL)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
TRIS,	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	
Tween 20	Merck KGaA, Darmstadt

2.1.3 Sonstige Materialien

Es wurden in der Arbeit die in Tabelle 4 dargestellten sonstigen Materialien verwendet.

Tabelle 4: Sonstige verwendete Materialien

Bezeichnung	Firma
Alexa 555 markierte Antikörper gegen humanes Immunglobulin G	Invitrogen, Karlsruhe
Aqua bidest., Ampuwa® Spüllösung	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg
Betaisodona®	Mundipharma GmbH, Limburg
Bevacizumab, Avastin®	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen
BioRad- Färbelösung	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
BSA, <i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin	Fluka Chemie AG, Schweiz, Buchs
Collagen A	Biochrom GmbH, Berlin
DMEM, <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium-High Glucose</i>	PAA Laboratories GmbH, Österreich, Pasching
FITC-markierte Latexkügelchen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Hoechst-Farbstoff	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
MabThera, Rituximab®	Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen
Mannan	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Nagellack	Handelsüblicher durchsichtiger Nagellack
Penicillin/Streptomycin (Pe/St)	PAA Laboratories GmbH, Österreich, Pasching
Ranibizumab, Lucentis®	Novartis Pharma GmbH, Nürnberg
SlowFade Gold, Eindeckmedium	Invitrogen, Eugene, USA, Oregon

Sucrose, Saccharose	Merck KGaA, Darmstadt
Schweineserum, Porcine Serum	PAA Laboratories GmbH, Österreich, Pasching
Trypsin	PAA Laboratories GmbH, Österreich, Pasching
Trypsin-EDTA Solution (10x)	PAA Laboratories GmbH, Österreich, Pasching

2.1.4 Puffer und Lösungen

Es wurden in der Arbeit die in Tabelle 5 aufgeführten Puffer und Lösungen verwendet.

Tabelle 5: Puffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung
Blockierungslösung	TBS + 0,1 % BSA + 0,2 % Glycin
Homogenisierungspuffer	34 % Sucrose + 65 mM NaCl + 2mM MgCl ₂ + 5mM HEPES
PBS-Azid	0,1 % Natriumazid in PBS
10xPBS	80 g NaCl + 2 g KCl + 14,4 g Na ₂ HPO ₄ + 2,4 g KH ₂ PO ₄
PFA-Stammlösung 18,5 %,	0,975 g PFA + 4,8 ml Aqua dest. + 17,5 µl 2M KOH
PFA 2,5 %	18,5 % PFA in PBS (1:7,4)
TBS	100 mM Tris in 150 mM NaCl
TTBS	0,1 % Tween in TBS
10xTBS	1 M Tris, 1,5 M NaCl in Aqua dest.
Trypsin A	0,25 % Trypsin in PBS, steril filtriert
Trypsin-EDTA	0,05 % Trypsin + 0,1 % EDTA in PBS, steril filtriert

2.2 Methoden

2.2.1 Gewinnung von RPE-Zellen aus Schweineaugen

Gekühlte Schweineaugen wurden von einem lokalen Schlachthof bezogen. Die Augen wurden von extraokulärem Gewebe wie Fett und Muskeln befreit, 5-10 Min. in Betaisodonalösung (1:3 mit NaCl) auf Eis gegeben und anschließend maximal 75 Min. in steriles NaCl auf Eis gelegt. Nun wurden die Bulbi aufgeschnitten und der vordere Augenabschnitt mit Kornea und Linse sowie der Glaskörper entfernt. Die so entstandenen Augenbecher wurden mit warmen PBS gefüllt und die Retina sofort vorsichtig abgelöst. Die Netzhäute wurden für die Gewinnung der Photorezeptoraußensegmente verwendet (s. u.). PBS wurde abgesaugt, Trypsin in den Augenbecher gegeben und 5-10 Min. bei 37 °C inkubiert. Nach Abnahme des Trypsins wurde Trypsin-EDTA auf die Augen gegeben und 45 Min. bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss daran wurden die RPE-Zellen vorsichtig mit einer Eppendorfpipette abgespült und in ein 50 ml Falcon mit ca. 20 ml Zellkulturmedium gegeben. Die Zellen wurden 7 Min. bei 800 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Nach weiteren 7 Min. Zentrifugation wurden die Zellen in 6 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Material von 4-6 Augen wurde in eine (60 mm) Petrischale mit 3 ml Medium gegeben und die Schalen im Wärmeschrank bei 37 °C kultiviert.

2.2.2 Vermehren von Zellen

Nach Absaugen des Zellüberstandes wurden die Zellen einer 60 mm Petrischale mit 1 ml warmem PBS gewaschen, 1 ml Trypsin-EDTA hinzugegeben und 5-10 Min. bei 37 °C inkubiert. Nach Ablösen der Zellen durch Trypsin-EDTA wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 ml Zellkulturmedium gestoppt. Zellen und Flüssigkeit wurden für 5 Min bei 900 rpm zentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstandes wurden die Pellets in 3 ml Medium resuspendiert. Dann wurden die Zellen auf kollagenbeschichteten Deckgläschen kultiviert. 12-Kammer-Zellkulturplatten, die kollagenbeschichtete Deckgläschen enthielten, wurden mit je 250 µl Medium/Kammer befüllt. Darauf wiederum wurden jeweils 250 µl/Kammer der Zellsuspension gegeben und bei 37 °C kultiviert. Für die Experimente wurden ausschließlich Zellen der Passage 2 genutzt, um eine geringe Dedifferenzierung der verwendeten RPE-Zellen zu gewährleisten (Wiencke et al, 2003). Die Morphologie der Zellen wurde lichtmikroskopisch überprüft.

2.2.3 Collagenbeschichtung (Collagen A)

Für die Beschichtung der Deckgläschen einer 12-Kammer-Zellkulturplatte, wurde Collagen A im Verhältnis 1:1 mit PBS gemischt und je 0,5 ml dieses Gemisches auf die Deckgläschen gegeben. Nach 30 Minuten bei 37 °C wurde mit PBS gewaschen.

2.2.4 Gewinnung von Photorezeptoraußensegmenten

Für die Gewinnung von ROS wurden 12 Netzhäute frisch geschlachteter Schweine in 1 ml Homogenisierungspuffer pro Retina aufgenommen und in einem Falcon ca. 2 Minuten kräftig geschüttelt. Durch diese Behandlung brechen die Außensegmente ab und verbleiben durch den Zuckergehalt des Puffers im Überstand. Nach einmaliger Zentrifugation (5 Min., 3800 rpm) wurde der Überstand gewonnen, mit zwei Volumina 10 mM HEPES (ca. 25 ml) verdünnt und erneut 5 Min. zentrifugiert. Die nun als Pellet vorliegenden Photorezeptoraußensegmente wurden in einem definierten Volumen 10 mM HEPES (5 ml) aufgenommen und durch wiederholtes Aufziehen in einer 20-Gauge Kanüle zerkleinert. So gewonnene Photorezeptoraußensegmentfragmente wurden bei -80 °C verwahrt und letztlich zur Oponierung FITC-markierter Latexkügelchen verwendet.

2.2.5 Proteinbestimmung

Bei dieser Methode handelt es sich um das Bestimmungsverfahren nach Bradford (1976). Das Prinzip dieses Testes ist, die Bindung zwischen einem Farbstoff und Proteinen nachzuweisen, die bevorzugt an den basischen und aromatischen Aminosäuren der Proteine stattfindet. In einem sauren Milieu wird dadurch eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 465 nm nach 595 nm hervorgerufen, und photometrisch ermittelt.

Die Proteinbestimmung wurde in 1 ml einer 1:5 verdünnten BioRad-Färbelösung durchgeführt, der 20 µl der 1:50 verdünnten Probe zugesetzt wurde. Die Lösung wurde kurz gevortext und für mindestens 10 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die Extinktion der Probe wurde anschließend bei einer Wellenlänge von $\lambda = 595$ nm photometrisch gemessen. Destilliertes Wasser in BioRad-Färbelösung dient als Leerwert. Die Proteinkonzentration wird über eine Kalibriergerade, mit BSA als Standardprotein, bestimmt.

2.2.6 Vorversuche

Zunächst wurden die optimalen experimentellen Bedingungen für die Phagozytose der Latexkugelchen in Vorversuchen bestimmt.

2.2.6.1 Oponierung von Fluorescein Isothiocyanat (FITC)-markierten Latexkugelchen

Zu je 10 µl Latexkugelchen wurden:

- a) 100 µl Aqua bidest.
- b) 100 µl 1 % BSA und 0,05 % Tween
- c) 10 µl ROS und 100 µl Aqua bidest. , sowie
- d) 10 µl ROS, 100 µl 1 % BSA und 0,05 % Tween gegeben.

Anschließend wurden diese vier verschiedenen Suspensionen eine Stunde bei RT geschüttelt, ca. 1 Min. mit einer Tischzentrifuge zentrifugiert und zweimal mit 100 µl NaCl gewaschen. Mit 50 µl der jeweiligen Suspension wurden Zellen einer 12-Kammer-Zellkulturplatte 1 Stunde bzw. 4 Stunden stimuliert und anschließend wie unten beschrieben fixiert.

Da sich die Behandlung der Latexkugelchen mit ROS als geeignet erwies, wurde in weiteren Vorversuchen die Behandlung der Latexkugelchen mit den ROS optimiert. Zunächst wurden 10 µl Latexkugelchen, 10 µl ROS und 100 µl. Aqua bidest. in ein Eppendorf-Röhrchen gegeben, eine Stunde bei RT geschüttelt und anschließend zweimal mit 100 µl NaCl gewaschen. Nun erfolgte eine Resuspendierung in 50 bzw. 100 µl NaCl und in 50 bzw. 100 µl Medium. Zellen einer 12-Kammer-Zellkulturplatte wurden mit je 50 µl der vier verschiedenen Suspensionen versehen und vier Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden wie unten beschrieben fixiert.

Als am besten geeignete Behandlung der Latexkugelchen erwies sich die folgende, die im Verlauf für die weiteren Experimente angewandt wurde: Um FITC-markierte Latexkugelchen mit ROS zu markieren, wurden 100 µl ROS mit 70 µl Kugelchen und 1000 µl Aqua bidest. 1 h bei RT leicht geschüttelt. Anschließend wurden die Kugelchen zweimal mit steriler, physiologischer (0,9 %) Kochsalzlösung gewaschen und in 1000 µl NaCl resuspendiert.

2.2.6.2 Phagozytoseassay

FITC-markierte Latexkugelchen wurden wie oben beschrieben mit ROS oponiert und je 100 µl /Kammer auf RPE-Zellen der 2. Passage einer 12-Kammer-Zellkulturplatte gegeben. Die Zellen wurden 30 Minuten, 1 h, 2 h, 4 h und 6 h inkubiert und nach 6 h durch Zugabe von

PBS-Azid abgetötet. Sie wurden 3 x mit PBS gewaschen, 10 Min. bei RT in 2,5 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert, erneut mit PBS gewaschen, mit Aceton-Ethanol für 10 Min. bei -20 °C permeabilisiert und wieder 2 x 5 Min. mit TBS gewaschen. Zur Anfärbung der Kerne wurde Hoechst-Farbstoff (300 µl/ Kammer) für eine Stunde bei 37 °C hinzugegeben. Nach 1 Stunde wurde 2 x 5 Min. mit TTBS und 3 x 10 Min. mit TBS gewaschen.

Um die Phagozytose opsonierter und nicht opsonierter Latexkügelchen vergleichen zu können, wurden einerseits wie beschrieben, FITC-markierte Latexkügelchen mit ROS opsoniert und ein zweiter Ansatz ohne Zugabe von ROS hergestellt. Auch der zweite Ansatz wurde eine Stunde bei RT geschüttelt, zweimal mit 1 ml physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und in 1000 µl NaCl resuspendiert. Nun wurden Zellen einer 12-Kammer-Zellkulturplatte zur Hälfte mit der ersten und zur anderen Hälfte mit der zweiten Suspension für 30 Min., 1 h, 2 h, 4 h und 6 h behandelt. Nach 6 h wurden die Zellen wie oben beschrieben gewaschen. Nun wurden die die Zellen tragenden Deckgläschen mit Slow Fade Mounting Medium (Invitrogen) auf Objektträger gebracht und nach einer Nacht bei RT mit handelsüblichem Nagellack versiegelt.

2.2.7 Hauptversuche

2.2.7.1 Mannan

Zelloberflächenrezeptoren, die Glykoproteine durch Mannosereste erkennen, sind für Makrophagen beschrieben und scheinen Pino- und Phagozytose zu vermitteln. Auch auf den apikalen Membranen des RPE bei Ratten wurden Mannosespezifische Rezeptoren entdeckt (Tarnowski et al., 1988, Boyle et al., 1991). Das Transkript des Makrophagen-Mannose-rezeptors wurde in Ratten-, Schweine- und humanen RPE-Zellen nachgewiesen und wird mit der Phagozytose von ROS in Verbindung gebracht (Greaton et al, 2003). Mannan gilt als kompetitiver Inhibitor der Ligandenaufnahme.

Um zu untersuchen, ob Mannan einen Einfluss auf das Phagozytoseverhalten bei Schweine-RPE hat, wurde eine 12-Kammer-Zellkulturplatte mit ROS opsonierten FITC-markierten Latexkügelchen behandelt und den Zellen einer Plattenhälfte zusätzlich Mannan (100 bzw. 250 µg/ml) zugefügt. Nach 6 h wurden die Zellen nach bekanntem Protokoll gewaschen, fixiert und ausgewertet.

2.2.7.2 VEGF-Antagonisten

Um den Einfluss von VEGF-Antagonisten auf das Phagozytosevermögen des RPE zu untersuchen, wurden Zellen einer 12-Kammer-Zellkulturplatte einmalig mit klinisch relevanten Konzentrationen Bevacizumab (250 µg/ml) bzw. Ranibizumab (125 µg/ml) behandelt und eine Woche kultiviert (Spitzer et al., 2007). Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen.

Nach einer Woche wurden den mit Bevacizumab bzw. Ranibizumab behandelten Zellen, sowie den unbehandelten Zellen, je 100 µl mit ROS opsonierte FITC-markierte Latexkügelchen für 6 h zugefügt. Auf jeweils zwei Kammern sowohl der mit VEGF-Antagonisten behandelten als auch der unbehandelten Zellen, wurden keine mit ROS markierten FITC-markierten Latexkügelchen gegeben, was wiederum als Kontrolle diente. Nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden wurden die Zellen durch PBS-Azid abgetötet, 3x mit PBS gewaschen, 10 Min. durch 2,5 % PFA bei RT fixiert und mit Aceton-Ethanol 10 Min. bei -20 Grad permeabilisiert. Nach zweimaligem fünfminütigen Waschen mit TBS wurden die Zellen 1 h bei 37 °C mit einer Blockierungslösung inkubiert, und anschließend mit einem 2., mit Alexa555-markierten Antikörpern gegen humanes IgG (Invitrogen, Karlsruhe, 1:2000) behandelt. Dieser Antikörper erkennt sowohl Bevacizumab als auch Ranibizumab (Klettner et al., 2009). Die Kernfärbung erfolgte wiederum mittels Hoechst-Färbung (300 µl/Kammer). Nun wurde 2 x 5 Min. mit TTBS und 3 x 10 Min. mit TBS gewaschen. Fixierung und Auswertung erfolgten wie bereits beschrieben.

2.2.7.3 Rituximab

Rituximab (Mab Thera®, Roche) ist ein monoklonaler Antikörper (AK) der sich gegen CD20 richtet. Beruht der Effekt von Bevacizumab alleine auf der Tatsache, dass es sich um einen AK handelt, müsste Rituximab die gleichen Ergebnisse zeigen. Es wurden daher Zellen einer 12-Kammer-Zellkulturplatte außer mit Ranibizumab bzw. Bevacizumab auch einmalig mit Rituximab (250 µg/ml) behandelt und eine Woche kultiviert. Mit ROS opsonierte FITC-markierte Latexkügelchen wurden wie bisher für bis zu 6 h hinzugefügt. Fixierung und Auswertung erfolgten wie bereits beschrieben.

2.2.8 Mikroskopie und Auswertung

Nach sämtlichen oben beschriebenen Versuchen wurden die die Zellen tragenden Deckgläschen mit Slow Fade Mounting Medium (Invitrogen) auf Objektträger gebracht und nach einer Nacht bei RT mit handelsüblichem klarem Nagellack versiegelt.

Die Aufnahme der Latexkügelchen wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop (Leica, Wetzlar) untersucht. Dafür wurden 5-7 Bilder pro Deckglas aufgenommen. Diese Bilder wurden zufällig ausgewählt, sofern sowohl Kügelchen als auch Zellkerne gut unterscheidbar waren. Die Anzahl der Kügelchen und der Zellkerne wurde bestimmt, ebenso das Verhältnis der Kügelchen zu den Kernen (Axiovision, Carl Zeiss).

Nach Versuchen, in denen VEGF-Antagonisten hinzu gefügt wurden, erfolgte ebenfalls eine zufällige Auswahl der Bilder, sofern Kügelchen und Zellkerne gut zu unterscheiden waren und, sofern von den Zellen, die mit Bevacizumab behandelt wurden, mindestens zwei Zellen eine intrazelluläre Färbung mit Bevacizumab aufwiesen. Wiederum wurde die Anzahl der Kügelchen und der Zellkerne bestimmt, sowie das Verhältnis der Kügelchen zu den Kernen.

2.2.9 Statistik

Jedes Experiment wurde mindestens dreimal unabhängig wiederholt. Dargestellte Graphen zeigen Mittelwerte und Mittelwertabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. Signifikanzen wurden mit dem Student's t-Test berechnet. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe der Sigma-PlotR Software (Systat, Erkrath) durchgeführt. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ wurde als signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung des Phagozytoseassays

Ein Ziel der Arbeit war es, eine einfache und kostengünstige Methode zu erarbeiten, die es erlaubt, die Phagozytose von RPE-Zellen zu quantifizieren. ROS, als natürliches Substrat der RPE-Zellen, mussten so markiert werden, dass ihre Aufnahme mikroskopisch zu beurteilen ist. In Vorversuchen mussten daher Fragen zur geeigneten Markierung der ROS, der Inkubationsdauer, der optimalen Verdünnungslösung und -menge sowie der Zeitrahmen eines Versuches geklärt werden. Das Phagozytoseprotokoll wurde im Verlauf dieser Vorversuche optimiert. Da sich Latexkügelchen leicht zählen lassen und ROS das natürliche Substrat darstellen, wurden diese beiden vorteilhaften Eigenschaften in einer Methode kombiniert. Versuche zur optimalen Resuspendierung mit Medium, Aqua bidest. und NaCl erbrachten, dass NaCl am besten zur Verdünnung geeignet ist und eine sechsstündige Inkubation der Zellen gute Ergebnisse lieferte. Im Verlauf wurde die Menge der zugefügten FITC-markierten Latexkügelchen von 100 μ l auf 70 μ l reduziert, da sie bei starker Aufnahme in die Zellen sonst nicht mehr einzeln auszählbar waren. Nach Ausführung der erforderlichen Versuche konnte die Phagozytose der ROS nun leicht quantifiziert werden, indem aufgenommene Latexkügelchen in Bezug zu Zellkernen pro Bild gezählt wurden. Es zeigte sich eine Aufnahme in Abhängigkeit von der Zeit. Nach sechs Stunden hatten sich mit ROS markierte Latexkügelchen stark in den RPE-Zellen angereichert (siehe Abb. 1, a-c). Eine Latenzperiode wurde nicht beobachtet. Wurden hingegen unmarkierte Kügelchen verwendet, wurde keine Aufnahme in die Zellen registriert (Abb. 1, d-f und Abb. 1, g). Nicht alle RPE-Zellen nehmen Kügelchen im gleichen Ausmaß auf. Mit dem Fluoreszenzmikroskop angefertigte Aufnahmen dokumentieren diese Aussagen.

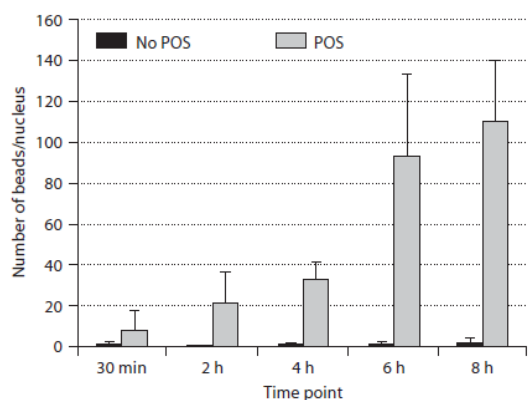
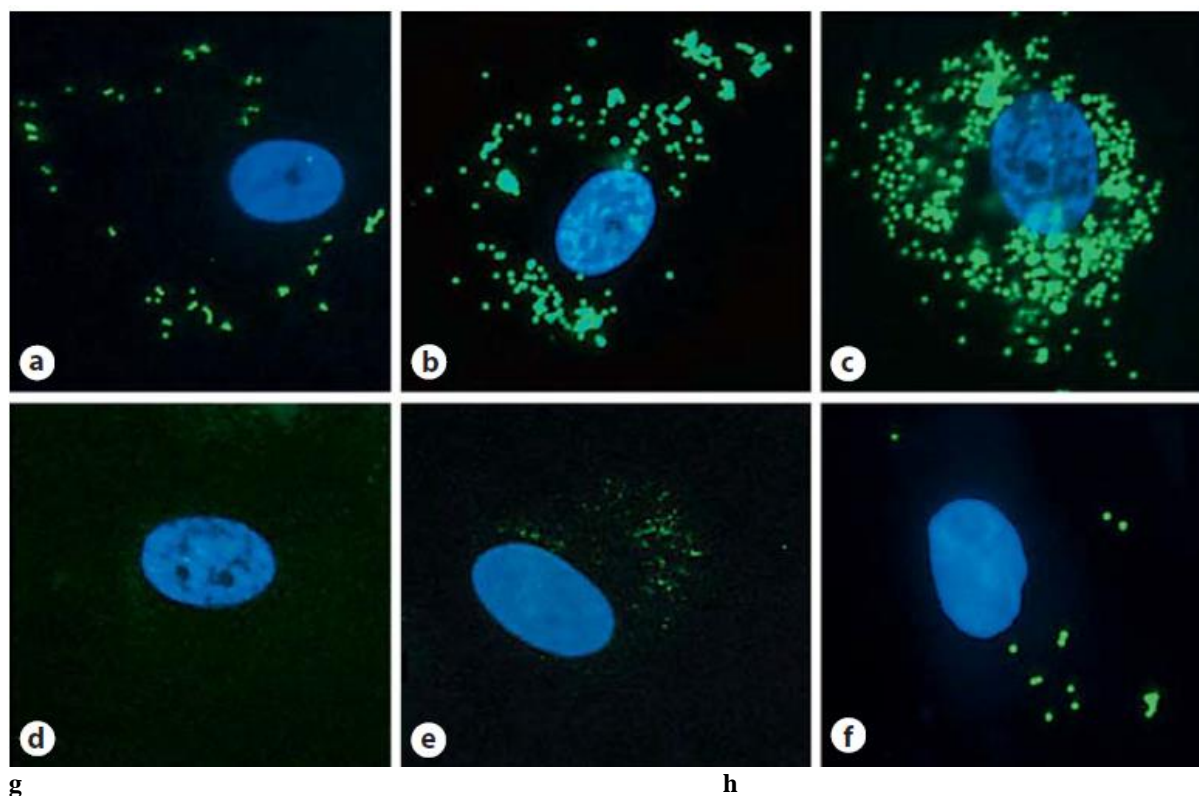


Abb. 1: Zeitabhängige Aufnahme von Latexkügelchen in RPE Zellen. **a–c** inkubiert mit ROS-Fragment-opsoneierten FITC-markierte Latexkügelchen für 2 h (a), 4 h (b) und 6 h (c). **d–f** inkubiert mit unbehandelten FITC-markierten Latexkügelchen für 2 h (d), 4 h (e) und 6 h (f). (Veröffentlicht in: Klettner, Möhle, Lucius, Roeder, 2011, Ophthalmic Res 46 (2): 88-91) **g** Aufnahme von Latexkügelchen mit (POS) und ohne (no POS) Opsonierung durch ROS. (Veröffentlicht in: Klettner, Möhle, Lucius, Roeder, 2011, Ophthalmic Res 46 (2): 88-91) **h** Mit einem Transmissionselektronenmikroskop erstelltes Bild eines Latexkügelchens, 1 h nach Inkubation mit ROS. Das Kügelchen ist bedeckt mit ROS-Membranen. Zu beachten ist, dass das Kügelchen durch den Fixierungsprozess schrumpfte. Maßstab 100 nm. (Veröffentlicht in: Klettner, Möhle, Lucius, Roeder, 2011, Ophthalmic Res 46 (2): 88-91. Bild: Ralph Lucius)

3.2 Hauptversuche

3.2.1 Phagozytoseverhalten nach Gabe von Mannan

Mannose spezifische Rezeptoren wurden auf apikalen Membranen des Ratten-RPE beschrieben. Studien zeigen eine signifikant reduzierte Phagozytose von Außensegmenten in Anwesenheit von Mannose auf. Mannan als Inhibitor führt zu einer verminderten Phagozytose. Auch ist bekannt, dass ROS Mannosehaltige Glykokonjugate als Liganden besitzen, die für die Interaktion mit RPE-Mannoserezeptoren während der Phagozytose eine Rolle spielen (Tarnowski et al., 1988). Es stellte sich heraus, dass Mannan in von uns durchgeführten Versuchen keinen signifikanten Einfluss auf die Phagozytosefähigkeit hat (Abb. 2).

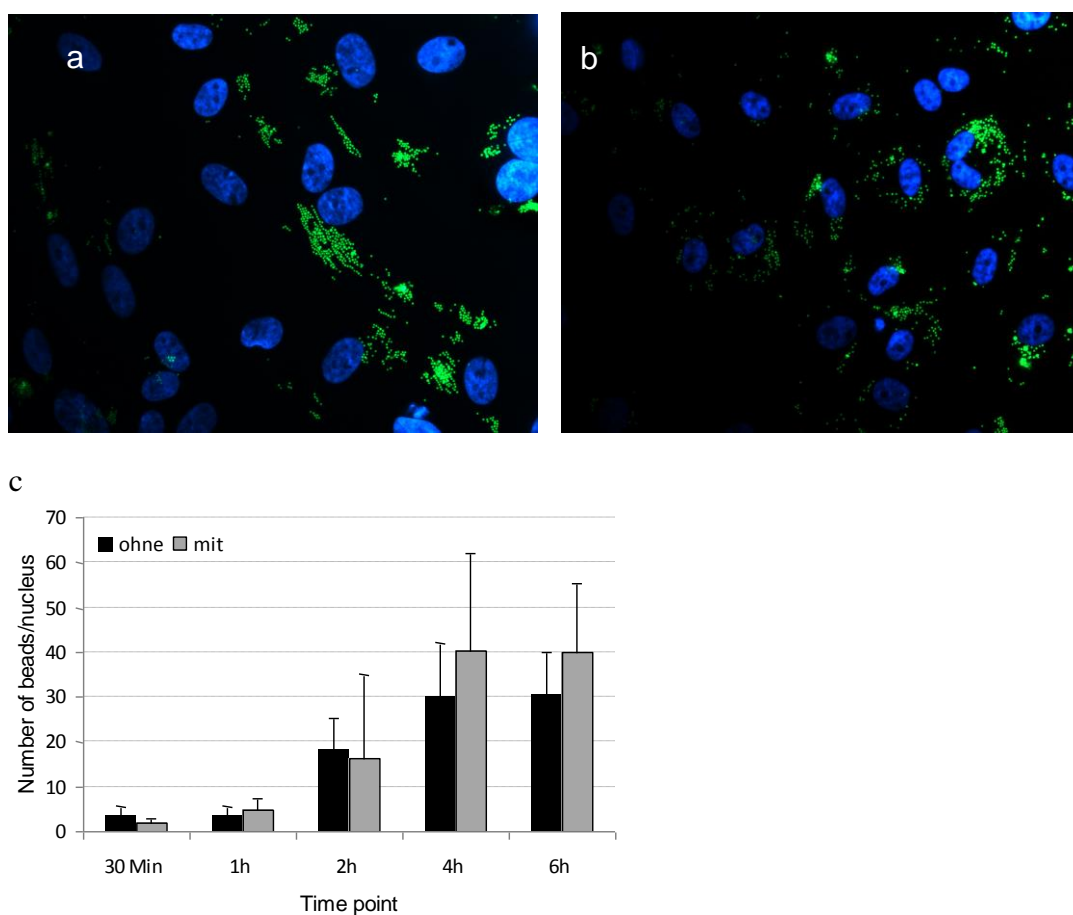


Abb. 2: Zeitabhängige Aufnahme von Latexkügelchen in RPE-Zellen, (a) inkubiert mit ROS-Fragment opsonierten FITC-markierten Latexkügelchen 6 h nach Zugabe von Mannan und (b) ohne Zugabe von Mannan. Es konnte kein signifikanter Einfluss auf die Phagozytosefähigkeit durch die Zugabe von Mannan nachgewiesen werden (c).

3.2.2 Phagozytoseverhalten nach Gabe von therapeutischen Antikörpern

Aus Veröffentlichungen von Klettner et al. (2009) ist bekannt, dass Bevacizumab, im Gegensatz zu Ranibizumab, von RPE-Zellen aufgenommen wird und in den Zellen akkumuliert. Um zu untersuchen, ob die Anreicherung Bevacizumabs einen Einfluss auf die Zellfunktionen hat, wurden einmalig mit einer klinisch relevanten Dosis von VEGF-Antagonisten behandelte Zellen für 7 Tage inkubiert.

3.2.2.1 Bevacizumab

Nach Behandlung von RPE-Zellen mit einer klinisch relevanten Dosis Bevacizumab (250 µl/ml) und Inkubation dieser Zellen für eine Woche, konnten folgende Beobachtungen gemacht werden.

Innerhalb der gleichen Zellkultur wiesen einige Zelle Vesikel auf, die stark mit Bevacizumab gefüllt waren und kaum Latexkügelchen enthielten, während andere hingegen kaum oder gar kein Bevacizumab enthielten dafür aber viele bzw. ausschließlich Latexkügelchen. Mit Bevacizumab gefüllte Zellen nahmen deutlich weniger Kügelchen auf, als Zellen der unbehandelten Kontrollgruppe. Nach Quantifizierung der Aufnahmen konnte eine signifikante Verminderung der Aufnahme von Kügelchen um mehr als 50 % bei den Zellen, die mit Bevacizumab behandelt wurden gezeigt werden. (Unbehandelt 57,9 Kügelchen/Kerne, SD 16,2 Kügelchen/Kerne; Bevacizumab 26,2 Kügelchen/Kerne, SD 12,0 Kügelchen/Kerne; $p < 0,05$) (Abb. 3, b, e).

3.2.2.2 Ranibizumab

Wurden Zellen mit klinisch relevanten Dosen Ranibizumab behandelt, eine Woche inkubiert und mit FITC-markierten Latexkügelchen versehen, ergaben die Auswertungen, dass Ranibizumab von den RPE-Zellen nicht aufgenommen wurde. Mit klinisch relevanten Dosen (125 µg/ml) behandelte Zellen wiesen auch in der Phagozytose keinen Unterschied zur unbehandelten Kontrollgruppe auf. (Unbehandelt 57,9 Kügelchen/Kerne, SD 16,2 Kügelchen/Kerne; Ranibizumab 54,4 Kügelchen/Kerne, SD 24,0 Kügelchen/Kerne; $p < 0,05$) (Abb. 3, c, f).

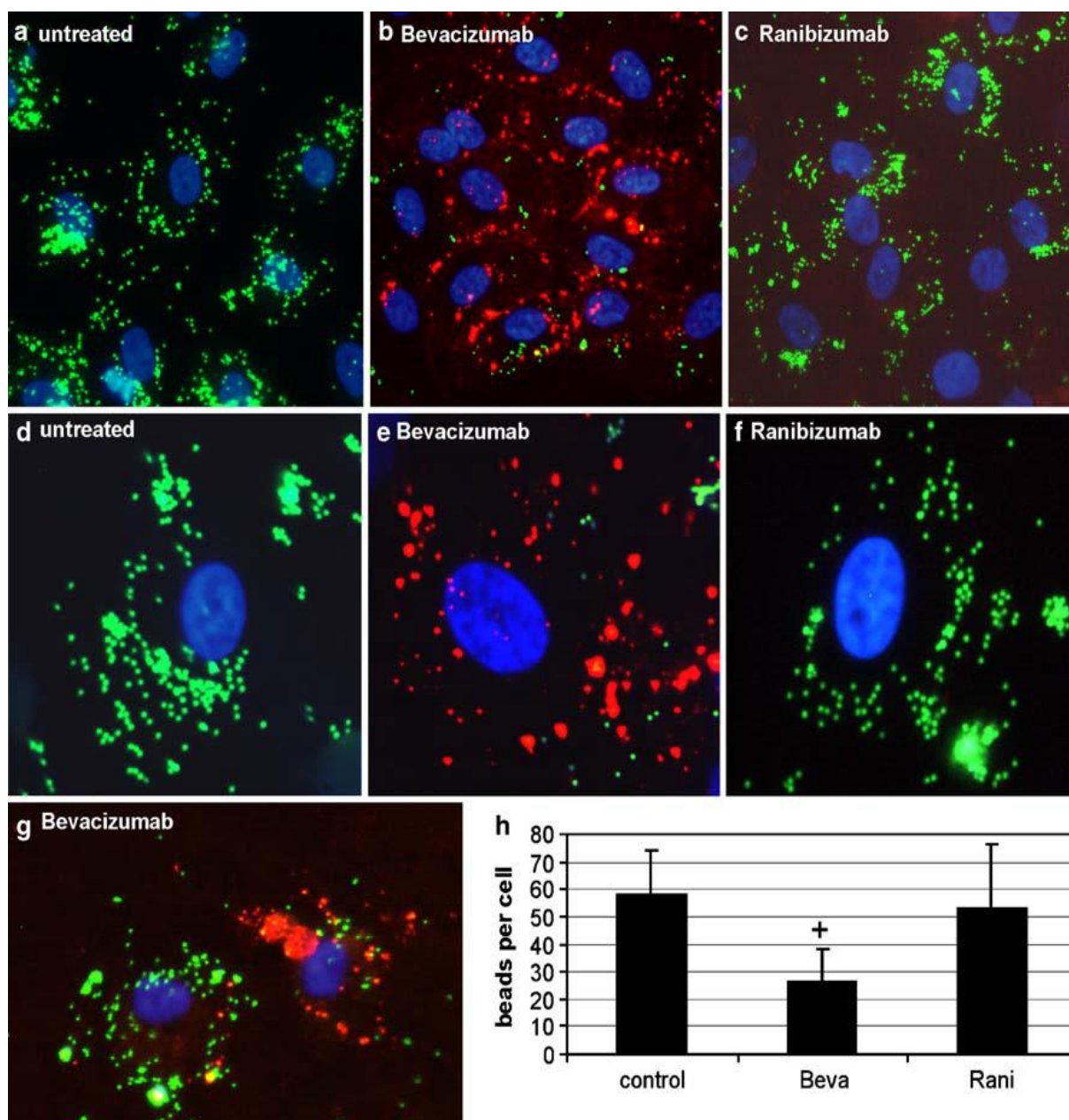


Abb. 3: Unbehandelt (**a, d**) oder einmalig mit klinisch relevanten Konzentrationen Bevacizumab (250 μ l/ml) (**b, e**) bzw. Ranibizumab (125 μ l/ml) (**c, f**) behandelt. Die Zellen wurden 7 Tage kultiviert und nach 7 Tagen für 6 Stunden mit ROS-markierten FITC-markierten Latexkügelchen (grün) inkubiert. Um AK/AK-Fragmente sichtbar zu machen, wurde ein mit Alexa555-markierter Antikörper gegen humanes IgG zugefügt (rot). Die Kernfärbung erfolgte mit Höchst-Farbstoff (blau).

a, b, c liefern einen Überblick, **d, e, f** zeigen einzelne Zellen. **g** zeigt die Quantifizierung der Latexkügelchen-Aufnahme von 4 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Mit Bevacizumab behandelte Zellen zeigen eine deutlich verminderte Aufnahme von Latexkügelchen (+ $p < 0,05$. Signifikanz evaluiert mit t-test). (Veröffentlicht in: Klettner, Möhle, Roeder., 2010a, Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 248 (6): 819-824)

3.2.2.3 Rituximab

Um zu testen, ob der Effekt Bevacizumabs alleine auf der Tatsache beruht, dass es sich um ein IgG handelt, wurden Zellen einer 12-Kammer-Zellkulturplatte einmalig mit Rituximab, einem monoklonalen Antikörper, behandelt und eine Woche kultiviert. Es zeigte sich, dass Rituximab, ebenso wie Ranibizumab, nicht von den RPE-Zellen aufgenommen wurde (Abb. 4) und keinerlei Einfluss auf die Phagozytosefähigkeit der RPE-Zellen hatte (Abb. 5).

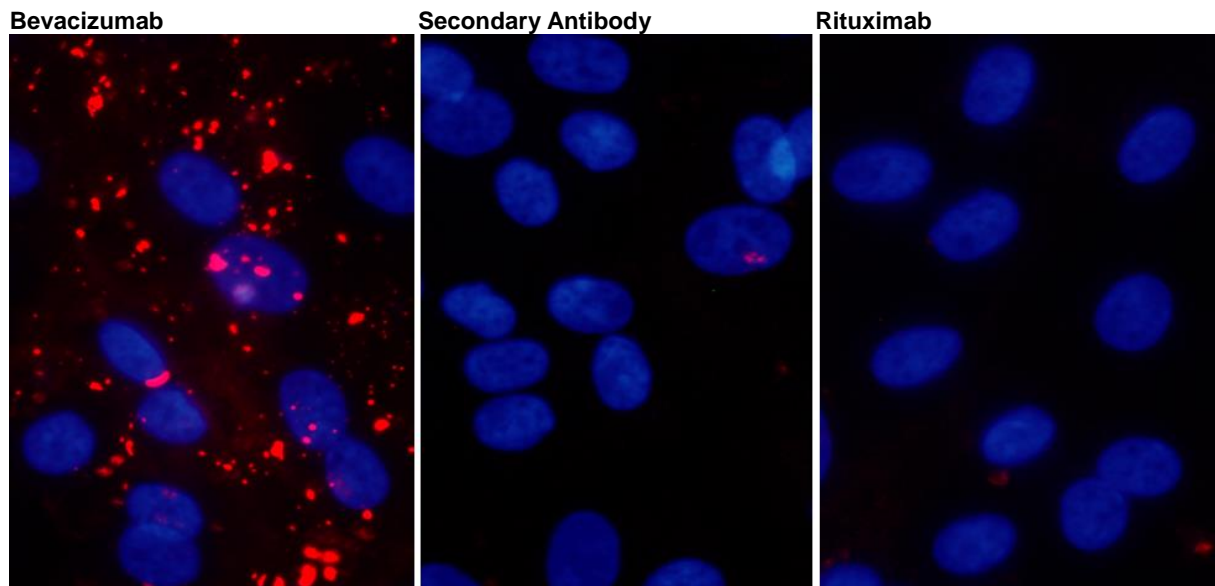


Abb. 4: Aufnahme von Bevacizumab und Rituximab (Fluoreszenzmikroskopie). Bevacizumab, aber nicht Rituximab, wird von RPE-Zellen aus Schweineretina aufgenommen. (Veröffentlicht in: Klettner, Meyer, Möhle, Kruse, Wesch, Kabelitz, Roider, 2010b, ARVO Meeting Abstract 51: 465)

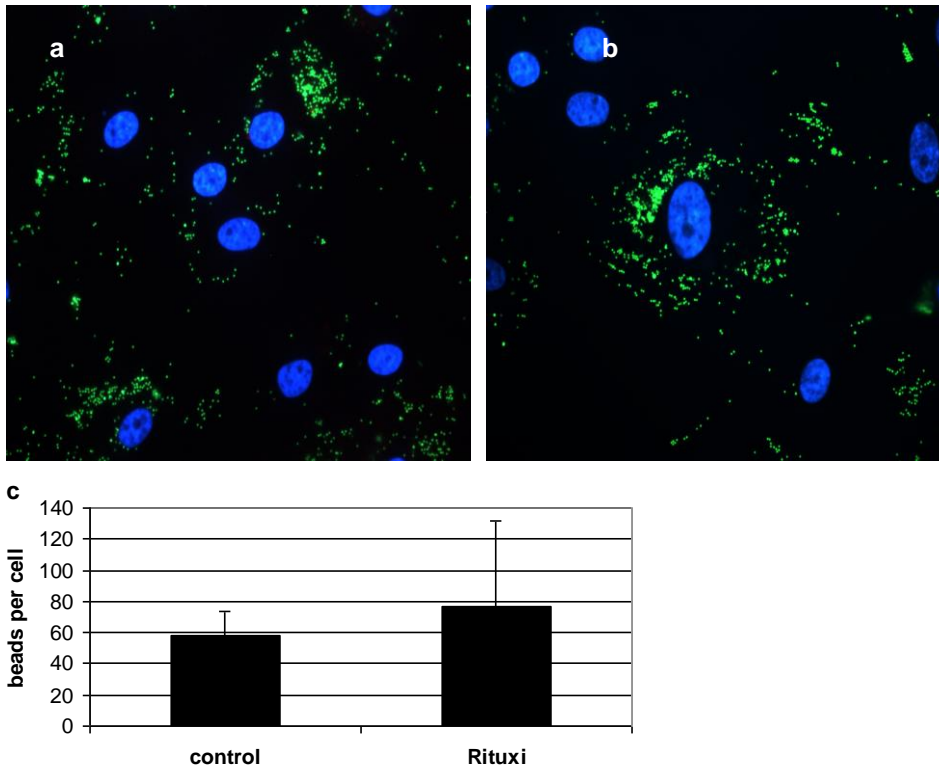


Abb. 5: Einmalig mit dem Antikörper Rituximab (250 $\mu\text{l/ml}$) (a) behandelte und unbehandelte (b) RPE-Zellen. Die Zellen wurden 7 Tagen kultiviert und nach 7 Tagen für 6 Stunden mit ROS-opsonierten FITC-markierten Latexkügelchen (grün) inkubiert. Rituximab wurde nicht von den Zellen aufgenommen und zeigte keinen Einfluss auf die Phagozytose. Die Graphik (c) zeigt die Quantifizierung der Latexkügelchen-Aufnahme von 4 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die mit Rituximab behandelten Zellen zeigen keine verminderte Aufnahme von Latexkügelchen (+ $p < 0,05$. Signifikanz evaluiert mit t-Test).

4 Diskussion

Für die Behandlung der AMD gilt die Verwendung von VEGF-Antagonisten derzeit als Goldstandard. Angewendet werden das zur Behandlung der AMD zugelassene Ranibizumab, das ohne Zulassung (*off-label*) verwendete Bevacizumab und seit kurzem Aflibercept, welches zur Zeit der Durchführung der Studie, die dieser Doktorarbeit zugrunde liegt, noch nicht verfügbar war.

Während keine der beiden in dieser Arbeit getesteten Substanzen toxische Wirkungen aufwies (Spitzer et al., 2007), wurde gezeigt, dass sie sich in ihrer Wirkung auf das retinale Pigmentepithel unterscheiden. Bevacizumab wird im Gegensatz zu Ranibizumab von RPE-Zellen aufgenommen (Klettner et al., 2009). Das wirft die Frage nach möglichen Nebenwirkungen durch diese Aufnahme auf. Eine wichtige Aufgabe des RPE ist die Phagozytose von Photorezeptoraußensegmenten, daher war es das Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, ob sich VEGF-Antagonisten, bzw. ihre intrazelluläre Anreicherung auf die Phagozytosefähigkeit des RPE auswirken. Eine Einschränkung der Phagozytose, die unerlässlich für den Sehzyklus ist, könnte schwerwiegende Folgen haben (Nandrot und Dufour, 2010).

Um die Phagozytose des RPE untersuchen zu können, wurde zunächst ein neuer, kostengünstiger Phagozytoseassay etabliert, der bereits bekannte Methoden kombiniert.

4.1 Etablierung des Phagozytoseassays

Die Phagozytose des RPE wird bereits seit Jahrzehnten durch unterschiedliche Methoden untersucht. So führten Essner et al. schon um 1978 Untersuchungen an Kaninchen-, Ratten und Kälber-RPE durch. RPE-Zellen wurden dabei Latexkügelchen zugefügt und bis zu 96 Stunden kultiviert. Auswertungen erfolgten an einem Transmissionsmikroskop. In ihren Versuchen an Ratten-RPE gaben McLaren et al. (1996) FITC-markierte ROS für 3-19 Stunden auf kultivierte Zellen und werteten die Ergebnisse an einem Phasen-Kontrast- und einem Fluoreszenzmikroskop aus, und Miceli und Newsome bestimmten 1994 die ROS-Aufnahme des menschlichen RPE durchflusszytometrisch, nachdem zuvor SNAFL-2 markierte Rinder-ROS zugefügt worden waren.

Ebenso wie andere Gruppen verwendeten wir ROS, welche das natürliche Substrat des RPE darstellen. Allerdings verwendeten wir keine kostenintensiven Farbstoffe, sondern kostengünstigere FITC-markierte Latexkügelchen, die wiederum mit ROS-Fragmenten opsoniert wurden. ROS-Fragmente wurden aus Retinas gewonnen, die bei der Präparation von RPE-

Zellen routinemäßig anfielen. Nach Inkubation der Kügelchen mit ROS legten sich ROS-Membranen um die Latexkügelchen und bedeckten die gesamte Oberfläche (Abb. 1, h). Eine Anreicherung von mit FITC-markierten Latexkügelchen markiert mit ROS konnte innerhalb von 6 Stunden beobachtet werden, was eine Auszählung nach bereits verhältnismäßig kurzer Zeit möglich machte. Anders als bei den von anderen Gruppen durchgeführten Versuchen ist neben einer gängigen Laborausstattung und den Voraussetzungen für Zellkulturen lediglich eine Zentrifuge und ein einfaches Fluoreszenzmikroskop nötig. Die Auszählung phagozytierter Kügelchen kann sogar an mit einer Analogkamera aufgenommenen, ausgedruckten Bildern erfolgen, so dass eine Spezialsoftware und teures Equipment nicht erforderlich sind.

Auch eine die Versuchsreihe verlängernde sogenannte Latenzperiode konnte von uns nicht beobachtet werden. Karl et al. (2007) beschrieben die höchste Phagozytoserate innerhalb der ersten 4-6 Stunden, gefolgt von einer Refraktärperiode von ca. 4 Stunden. Danach stieg die Aufnahme wieder an, bis sie nach etwa 12 Stunden ein Plateau erreicht hatte. Feeney und Mixton waren die Ersten, die überhaupt von einer Latenzperiode bei humanem und Rinder-RPE von 4-8 Stunden berichteten. Trotz hoher Konzentrationen an ROS auf den apikalen Membranen, wurden diese kaum aufgenommen. Funahashi et al. führten Versuche durch, in denen Affen Styropor in die Augen injiziert wurde, welches erst nach 6 Stunden aufgenommen wurden. ROS hingegen wurden sofort aufgenommen. Auch Essner et al. untersuchten das Phagozytoseverhalten von RPE-Zellen bereits 1978 mit Latexkügelchen an Hase, Kalb und der Ratte, wobei Kalb- und Hasen-RPE eine Latenzperiode aufwiesen (Essner et al., 1978). Von McLaren durchgeführte Studien zu phenotypischen Variationen innerhalb einer Zellkultur bei Ratten-RPE wiesen einen Zusammenhang zwischen Zellmorphologie und jeweiligem ROS-Bindungs- bzw. Aufnahmeverhalten nach. Beschrieben wurden drei verschiedene Zellsubtypen, wobei einer den *in vivo*-Zellen glich. Diese Zellen wiesen strukturelle Ähnlichkeiten mit intakten RPE-Zellen auf, wie z. B. die hexagonale Form, starke Pigmentierung, apikale Mikrovilli und *tight junctions*. Es wurden massive Bindungen von ROS beobachtet, allerdings wurden die ROS erst nach 9-11 Stunden nahezu synchron aufgenommen (McLaren, 1996). In sämtlichen von uns durchgeführten Versuchen, waren mit ROS-markierte Latexkügelchen bereits nach 15 Minuten intrazellulär nachweisbar und hatten sich nach 6 Stunden sehr stark intrazellulär angereichert. Eine Latenzperiode konnte nicht beobachtet werden, was eine recht schnelle Auswertung möglich macht. Es scheint daher, als sei eine Latenzperiode bei der Phagozytose nicht obligatorisch. Weiterhin scheint sie unter anderem von der Oberflächenbeschaffenheit der aufzunehmenden Partikel abzuhängen (Essner et

al., 1978). In sämtlichen von uns durchgeführten Versuchen wurden RPE-Zellen und Photorezeptoraußensegmente des Schweins verwendet, doch ist davon aus zu gehen, dass die Methode auch bei Zellen einer anderen Spezies möglich ist, da sich die Phagozytosemechanismen zwischen den Säugetierspezies nicht grundlegend unterscheiden. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode konnte bereits in verschiedenen anderen Projekten angewendet werden (Dithmer et al., 2014, Klettner et al., 2014 a). Teilweise wurde sie auch schon für andere Zelltypen abgewandelt (Klettner et al., 2014 b).

4.2 Phagozytoseverhalten nach Gabe von Mannan

Die Phagozytose von ROS durch das RPE ist ein Rezeptor vermittelter Prozess der durch Interaktion von Bindungsproteinen erfolgt. Eines dieser Bindungsproteine soll ein Mannosebindende Rezeptor sein (Greaton et al., 2003). Mannosespezifische Rezeptoren wurden für Makrophagen beschrieben und scheinen an der Pino- und der Phagozytose beteiligt zu sein. Das Makrophagen-Mannoserezeptor-Transkript wurde u. a. im RPE von Schwein und Mensch nachgewiesen (Boyle et al., 1991, Greaton et al., 2003, Tarnowski et al., 1988). Tarnowski et al (1988) untersuchten das Phagozytoseverhalten von gesundem und dystrophischem Ratten-RPE und wiesen auf beiden Geweben Mannoserezeptoren nach. In diesen Versuchen markierte man Latexkügelchen mit Mannan, einem kompetitiven Inhibitor der Ligandenaufnahme und stellte fest, dass dystrophes RPE so gut wie keine Mannanmarkierten Kügelchen aufnahm. Fügt man gesundem RPE Mannan hinzu, reduzierte sich die Phagozytoserate um 49 %. Die Aufnahme unbehandelter Kügelchen wurde hingegen durch die Zugabe von Mannan nicht beeinflusst. Wir wollten untersuchen, ob zugefügtes Mannan, als Inhibitor der Mannoseliganden die Phagozytose mit ROS markierter FITC-markierter Latexkügelchen beeinflusst. Es ließ sich wie schon bei Tarnowski et al. (1988) eine Wirkung, jedoch kein signifikanter Einfluss auf das Phagozytoseverhalten feststellen. Da Mannosebindende Rezeptoren sowohl bei der Phago- als auch bei der Pinozytose eine Rolle spielen sollen, haben gelöste Liganden ggf. Einfluss auf die Pino-, jedoch nicht auf die Phagozytose. Es gibt verschiedene Arten von Rezeptormolekülen (Boyle et al., 1991). Viele Rezeptor-Liganden-Interaktionen wurden identifiziert wie z. B. Integrine, CD36, Mertk und Mannosebindende Rezeptoren und wurden auch auf dem RPE nachgewiesen. Versuche an Ratten zeigten, wie bereits erwähnt, das ROS von dystrophen Zellen zwar gebunden, jedoch nicht aufgenommen wurden. Gleichzeitig waren die Zellen jedoch mit unspezifischen Partikeln gefüllt, was für unterschiedliche Phagozytosewege bzw. Aufnahmemechanismen spricht. Mannose soll für die Bindung von ROS wichtig sein, die Aufnahme scheint jedoch über einen

anderen Weg zu laufen (Greaton et al., 2003). Die extrazelluläre Gabe von Mannan zeigte zumindest in unseren Experimenten keinen Einfluss auf die Phagozytose, was darauf hindeutet, dass der Mannoserezeptor bei der Aufnahme mit ROS opsonierter Latexkügelchen keine Rolle spielt.

4.3 Einfluss von VEGF-Inhibitoren auf die Phagozytose

Die Anwendung von VEGF-Inhibitoren gilt heute in der Behandlung der AMD als Goldstandard. Verwendet werden vor allem Ranibizumab und Bevacizumab. Seit Kurzem ist Aflibercept als weiteres Medikament zur Behandlung der AMD zugelassen, stand jedoch zur Zeit der Durchführung dieser Doktorarbeit noch nicht zur Verfügung. Da Bevacizumab bei ähnlicher Wirkweise um ein vielfaches günstiger ist als Ranibizumab, wurde bereits 2005 damit begonnen, ohne Zulassung, also *off-label*, mit Bevacizumab zu behandeln, ohne dass Daten zur intraokularen Sicherheit oder Dauer des therapeutischen Effektes vorlagen. Die Behandlung mit Bevacizumab gilt als eine Standardtherapie und auch die CATT-Studie belegt mit höchster Evidenz den Nutzen der intravitrealen Gabe des Präparates bei exsudativer AMD (CATT-Research Group, 2012). Allerdings gibt es Vorbehalte bezüglich der systemischen Sicherheit von Bevacizumab, deren Bedeutung jedoch noch nicht geklärt ist (s. u.).

Bei der Verwendung von Ranibizumab und Bevacizumab sind in den meisten Veröffentlichungen keine toxischen Effekte nachzuweisen (Kernt et al. 2007, Spitzer et al. 2007), andere Veröffentlichungen hingegen beschreiben morphologische Veränderungen schon nach einer Behandlung mit niedrigen Konzentrationen von VEGF-Inhibitoren. In der Zellkultur führt die Behandlung von RPE-Zellen mit VEGF-Antagonisten zu einer gesteigerten Apoptose und ultrastrukturellen Veränderungen (Ford et al., 2011, Klettner, 2014). Nebenwirkungen sind somit nicht nur systemischer Natur, sondern zeigen sich auch im Augenhintergrund. Schon 2007 wiesen Peters et al. ultrastrukturelle Veränderungen der Aderhaut in der Affenretina nach Behandlung mit Bevacizumab auf. Hier kam es u. a. zu einer signifikanten Verminderung der Fenestrierung des Aderhautendothels und regional verschlossenen Gefäßen. Die Abnahme der Fenestrierung steht im Einklang mit der antiexsudativen Wirkung Bevacizumabs, allerdings erfolgt über die Choriokapillaris die Versorgung des RPE und der Photorezeptoren mit Sauerstoff und Nährstoffen, so dass eventuelle Risiken in der Langzeitanwendung weiter überprüft werden müssen (Peters et al., 2007, Schraermeyer et al., 2009). Einerseits kann es sich hierbei um Effekte durch die allgemeine VEGF-Inhibition handeln, andererseits kann aber auch sein, dass diese Effekte mit den Moleküleigenschaften Bevacizumabs an sich in Zusammenhang stehen.

Bevacizumab ist ein humanisierter, monoklonaler Vollantikörper, Ranibizumab hingegen ist ein humanisiertes, rekombinantes monoklonales Antikörperfragment (Fab-Fragment), trägt also keinen Fc-Teil.

Auch auf zellulärer Ebene zeigen sich Unterschiede in der Wirkung von Bevacizumab und Ranibizumab. So beschrieben Klettner et al. bereits 2009 die Aufnahme von Bevacizumab im Gegensatz zu Ranibizumab. Nach Behandlung von RPE-Zellen mit klinisch relevanten Konzentrationen Bevacizumab und Ranibizumab, konnte Bevacizumab durchflusszytometrisch und immunohistologisch nach einer Stunde intrazellulär nachgewiesen werden, wobei diese Anreicherung nicht mit einer verlängerten oder stärkeren VEGF-Inhibition verbunden ist. Die Ergebnisse von Klettner et al. bezüglich der Anreicherung von Bevacizumab im Gegensatz zu Ranibizumab konnten in dieser Arbeit bestätigt werden. Klettner et al. (2010a) zeigten weiterhin, dass sowohl Ranibizumab als auch Bevacizumab die Proliferation der Zellen beeinträchtigen, wobei Bevacizumab einen stärkeren Effekt zeigte.

Als eine weitere Nebenwirkung intravitreal angewandter VEGF-Antagonisten gelten RPE-Risse. Miura et al. zeigten, dass Ranibizumab und Bevacizumab die Barrierefunktion des RPEs reduzierten, wobei der Effekt des in die Zellen aufgenommenen Bevacizumabs deutlich länger und stärker anhielt, was wiederum einen Zusammenhang mit der Aufnahme Bevacizumabs und eines damit verbundenen stärkeren Effektes vermuten lässt (Miura et al., 2010).

In unseren Versuchen zeigte sich, dass Bevacizumab die Aufnahme der mit ROS-markierten Latexkügelchen signifikant verringerte. Innerhalb der gleichen Zellkultur reicherten sich einige Zellen stark mit Bevacizumab an und enthielten kaum mit ROS-markierte Latexkügelchen, während andere kaum oder gar kein Bevacizumab enthielten, dafür aber viele mit ROS-markierte Latexkügelchen. Als Kontrollantikörper eingesetztes Rituximab konnte nicht intrazellulär nachgewiesen werden und zeigte auch keinen Einfluss auf die Phagozytose.

Ford et al. (2011) beschrieben ebenfalls eine Abnahme der Phagozytose. In dieser Arbeit wurde die verminderte Phagozytoserate auf die Reduktion von Länge und Dichte apikaler Mikrovilli des RPE durch VEGF-Inhibition zurückgeführt. Im Gegensatz zu Ford et al., zeigen unsere Ergebnisse jedoch, dass die Abnahme von VEGF nicht ursächlich ist für eine verminderte Phagozytoserate, da Ranibizumab zwar Einfluss auf VEGF aber nicht auf die Phagozytose zeigt. Dieses lässt einen direkten Zusammenhang zwischen der Aufnahme von Bevacizumab und der Fähigkeit zur spezifischen Phagozytose von ROS vermuten. Die Phagozytoserate reduzierte sich in Anwesenheit von Bevacizumab signifikant, um mehr als

50 %. Der gleiche Effekt konnte kürzlich in Versuchen mit Aflibercept beobachtet werden. Klettner et al. (2014a) behandelten, dem in dieser Arbeit beschriebenen Phagozytoseprotokoll folgend, RPE-Zellen einmalig mit Aflibercept und inkubierten die Zellen mit ROS-markierten FITC-markierten Latexkügelchen. Bereits nach 1 Stunde konnte eine Aufnahme von Aflibercept in die RPE-Zellen beobachtet werden. Aflibercept war, wie Bevacizumab, auch nach 7 Tagen noch in den Zellen nachweisbar, und, die Ergebnisse von Bevacizumab spiegelnd, nahmen auch in diesen Versuchen nicht alle Zellen Aflibercept auf. Die intrazelluläre Anreicherung von Aflibercept führte auch hier zu einer signifikant verringerten Phagozytose opsonierter Latexkügelchen.

Die Verringerung der Phagozytose ist dabei eindeutig abhängig von dem tatsächlichen Vorhandensein des Antagonisten in der Zelle und nicht von der VEGF-Inhibition, da Ranibizumab keinen Einfluss auf die Phagozytosefähigkeit zeigte. Der Grund, warum mit Bevacizumab oder Aflibercept angereicherte Zellen weniger phagozytieren ist bisher nicht bekannt. Weisman und Korn (1967) vermuten eine Art Sensor, der Zellen davor schützt, zu viel aufzunehmen. Des Weiteren könnten die für die Phagozytose notwendigen Rezeptoren durch die Aufnahme von Bevacizumab oder Aflibercept blockiert oder unerreichbar sein. In einer kürzlich erschienenen Studie zeigen Aboul Naga et al., dass intrazelluläres Bevacizumab an Myosin 7a bindet, welches an dem Transport von Phagosomen beteiligt ist und so einen Zusammenhang zwischen Bevacizumabaufnahme und der Abnahme der Phagozytose darstellen könnte (Aboul Naga et al., 2015). Die Ähnlichkeiten zwischen Bevacizumab und Aflibercept lassen vermuten, dass der Fc-Teil der Moleküle in die Aufnahme und den intrazellulären Transport involviert ist. Die Frage, warum einige Zellen vorrangig Bevacizumab (oder Aflibercept), andere vorrangig mit ROS-markierte Latexkügelchen aufnehmen ist bisher unklar. Schraermeyer et al. (1997) führten Untersuchungen zur Phagozytose an RPE-Zellen mit SNAFL2-markierten ROS durch und beobachtete ebenfalls große Unterschiede in der gleichen Kultur. McLaren (1996) wies phänotypische Varianten in Zellkulturen von gesundem und dystrophem Ratten-RPE nach. Dabei stellte sich eine Korrelation zwischen der Morphologie und der Bindung von ROS heraus. Es ergaben sich auffallende Differenzen bezüglich der Phagozytoserate in Abhängigkeit vom Zelltyp, wobei eine ähnliche Morphologie eine vergleichbare Phagozytosefähigkeit bedeutet. Es wurden drei Zell-Subtypen entdeckt, wovon einer der *in vivo* Morphologie glich. Die Unterschiede bezüglich der unterschiedlichen Eigenschaften sind ungeklärt. Man vermutet Unterschiede im Zytoskelett, Komponenten der Extrazellulärmatrix betreffend, eine unterschiedliche Verteilung von Rezeptoren oder unterschiedliche lysosomale Systeme. Das Vorhandensein

unterschiedlicher Zelltypen innerhalb der gleichen Zellkultur könnte auch für unsere Versuche eine Erklärung sein. Karl et al. (2007) assoziierten eine Veränderung der Phänotypen des RPE und Veränderungen ihrer Funktion *in vitro* mit Medium-eigenschaften. Das Zellkulturmedium und das Milieu um das RPE übten einen Einfluss auf die Phagozytosefähigkeit aus. Es konnten Veränderungen oder der Verlust von Signalwegen beobachtet werden. Außerdem nahm die Fähigkeit ROS aufzunehmen mit jeder Passage ab, was einen Zusammenhang von Zellkulturbedingungen, Zellmorphologie und Zellfunktion vermuten ließ. In unseren Versuchen wurden ausschließlich Zellen der 2. Passage verwendet, was einen gravierenden Verlust der Phagozytosefähigkeit aufgrund von Kulturbedingungen ausschließt.

Eine Beeinträchtigung der Phagozytose, einer der Hauptaufgaben des RPE könnte schwerwiegende Konsequenzen haben, deren klinische Relevanz allerdings durch die hier durchgeführten Versuche nicht einzuschätzen ist. Versuche zeigten, dass Ratten, die aufgrund einer bestimmten Genmutation keine Phagozytose betreiben können, kurz nach ihrer Geburt erblinden. Die Mutation betrifft das Gen für die Rezeptor Tyrosin Kinase MerTK, eine Schlüsselkomponente der rezeptorvermittelten Phagozytose (Hall et al., 2003).

Generell gilt bereits die Verminderung von Abbauprozessen als Zeichen des Alterns. *In vivo* ist die Akkumulation unabbaubarer Substanzen ein Charakteristikum altersabhängiger Veränderungen im RPE, welche die Phagozytosefunktion vermindern. So wäre es möglich, dass eine Verminderung der Phagozytose die altersabhängigen Veränderungen retinaler Strukturen beschleunigen könnte (Bonilha, 2008). Die Funktion der Photorezeptoren, deren tägliche Erneuerung der Außensegmente unerlässlich für den Sehzyklus ist, wäre möglicherweise unmittelbar betroffen, was auf lange Sicht eine Degeneration dieser Zellen zur Folge haben könnte. Eine Minderung der Phagozytose könnte also das Altern des RPE fördern und im schlimmsten Fall zu geographischer Atrophie führen, das heißt, das Fortschreiten einer AMD letztlich sogar fördern. Auch die CATT-Studie berichtet vom Auftreten geographischer Atrophie unter VEGF-Inhibition durch Bevacizumab oder Ranibizumab. Allerdings entwickelte sich eine geographische Atrophie in der Gruppe am stärksten aus, die monatlich mit Ranibizumab behandelt wurde (CATT Research Group, 2012) und wurde somit sicherlich nicht durch die Verminderung der Phagozytose bewirkt.

All unsere Daten wurden *in vitro* an Schweine RPE-Zellen erhoben und reflektieren nicht unbedingt die humane *in vivo* Situation. Sollten sie aber auch auf den Menschen übertragbar sein, so könnte Bevacizumab bisher unbekannte Langzeitwirkungen hervorrufen. Eine oft jahrelange VEGF-Suppression könnte in der Retina zu ungewollten Nebenwirkungen führen,

die durch VEGF-Inhibition ausgelöst werden. Zusätzlich deuten unsere Daten darauf hin, dass auch eine von VEGF unabhängige Inhibition der RPE-Funktion stattfinden könnte. Eine Ungewissheit möglicher Folgeschäden macht die Wahl zwischen einem zugelassenen Medikament und einer deutlich günstigeren Alternative damit auch zu einem ethischen Dilemma (Schmucker et al., 2009). Das Wirtschaftlichkeitsgebot verlangt bezogen auf die Medikamentenverordnung unter anderem, dass bei gleicher Wirksamkeit und Sicherheit die preiswertere Substanz verordnet wird. Die CATT-Studie verglich Wirksamkeit und Sicherheit von Bevacizumab und Ranibizumab und ergab, dass sich die Visusprognose nach zwei Jahren zwischen den beiden Präparaten statistisch nicht signifikant unterscheidet. Klinisch ist eine Nichtunterlegenheit von Bevacizumab gegenüber Ranibizumab damit belegt. Zwar zeigen sowohl die CATT- als auch die IVAN-Studie (alternative treatments to Inhibit VEGF in Age-related choroidal Neovascularization) auf, dass mit Bevacizumab behandelte Patienten von schwereren systemischen Nebenwirkungen betroffen sind, doch ist ein Zusammenhang fraglich, wenn man sich die Art der Nebenwirkungen (Hernien, Erbrechen, Stürze, Knochenbrüche) ansieht. Möglicherweise sind diese Nebenwirkungen auch trotz der auffälligen statistischen Daten unbedeutend, da sie außerhalb des Kernspektrums der Nebenwirkungen Bevacizumabs liegen (CATT Research Group, 2011, CATT Research Group 2012, IVAN Study Investigators, 2012, Kirchhof et al., 2013).

Unsere Studie zeigte deutliche Unterschiede in der Wirkung der Substanzen auf, so dass neben der Untersuchungen und Prüfungen bisher angewandter, und der Entwicklung neuer Behandlungsmethoden, in Zukunft vor allem die Überwachung von Langzeitveränderungen erforderlich sein wird.

5 Zusammenfassung

Die altersabhängige Makuladegeneration ist weltweit die am häufigsten zur Erblindung führende Ursache des älteren Menschen. Pathologische Veränderungen im Rahmen dieser Erkrankung ereignen sich vor allem auf der Ebene des retinalen Pigmentepithels. Der *Vascular Endothelial Growth Faktor* gilt als wichtigster Regulator der Gefäßentstehung in Krankheit und Gesundheit und stellt aktuell den Hauptangriffspunkt bei der Therapie der AMD dar. Eine Behandlung mit intravitrealen VEGF-Antagonisten gilt als Goldstandard. Ihre Entwicklung hat die Behandlung der AMD zwar revolutioniert, doch ist eine Heilung bisher leider nicht belegt. Angewandt werden das zur Behandlung der AMD zugelassene Ranibzumab, das mittlerweile ebenfalls zugelassene Aflibercept und das wesentlich kostengünstigere, aber ohne Zulassung genutzte, Bevacizumab. Um den eventuellen Einfluss derzeitig angewandter VEGF-Antagonisten auf das Phagozytoseverhalten des retinalen Pigmentepithels nachzuweisen und quantifizieren zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein einfacher, schneller und kostengünstiger Phagozytoseassay entwickelt und überprüft. Dafür wurden zuvor beschriebene Methoden kombiniert. FITC-markierte Latexkügelchen wurden mit zuvor gewonnenen Rezeptorausensegmenten opsoniert und die Aufnahme in einem einfachen Fluoreszenzmikroskop beurteilt. Um den Einfluss der zum Zeitpunkt dieser Studie angewandten VEGF-Antagonisten (Ranibizumab und Bevacizumab) auf das Phagozytoseverhalten des retinalen Pigmentepithels zu untersuchen, wurden RPE-Zellen einmalig mit einer klinisch relevanten Dosis eines VEGF-Antagonisten behandelt, eine Woche kultiviert und mit Rezeptorausensegmenten opsonierte, FITC-markierte Latexkügelchen zugefügt. Die bereits beschriebene Anreicherung von Bevacizumab aber nicht Ranibizumab in den RPE-Zellen konnte bestätigt werden. Deutlich wurde in dieser Untersuchung, dass es einen direkten Zusammenhang zwischen der Anreicherung von Bevacizumab in den Zellen und der Fähigkeit der Phagozytose ROS-markierter Latexkügelchen zu geben scheint. So nahmen mit Bevacizumab angereicherte Zellen signifikant weniger mit ROS markierte Latexkügelchen auf als unbehandelte Zellen. Diese Daten belegen einen nachweisbaren Effekt von Bevacizumab auf die physiologischen Funktionen von RPE-Zellen, in diesem Fall auf die Phagozytosefähigkeit. Ranibizumab und der therapeutische anti-CD20 Antikörper Rituximab hingegen zeigten keinen Einfluss. Die Ergebnisse der Arbeit könnten, sollten sie auf den Menschen übertragbar sein, Hinweise auf bisher unbekannte Langzeitwirkungen einer Behandlung mit Bevacizumab geben. Im schlimmsten Fall könnte eine Verminderung der für den Sehvorgang essentiell wichtigen

Phagozytosefähigkeit sogar zu einer Progression der Erkrankung führen. Trotz guter klinischer Resultate bestehen somit weiterhin Bedenken, besonders da es sich um ein Medikament ohne Zulassung handelt. Weitere Untersuchungen und Prüfungen bisher angewandter und die Entwicklung neuer Behandlungen ist daher dringend erforderlich.

6 Literaturverzeichnis

- Aboul Naga SH, Dithmer M, Chitadze G, Kabelitz D, Lucius R, Roeder J, Klettner A (2015): Intracellular pathways following uptake of Bevacizumab in RPE cells. *Exp Eye Res* 131C: 29-41
- Ambati J, Ambati BK, Yoo, SH, Ianchulev S, Adamis AP (2003): Age-related macular degeneration: etiology, pathogenesis and therapeutic strategies. *Surv Ophthalmol* 48(3): 257-293
- Bhisitkul RB (2006): Vascular endothelial growth factor biology: clinical implications for ocular treatments. *Br J Ophthalmol* 90 (12): 1542-1547
- Bhutto, I, Luttj, G (2012): Understanding age-related macular degeneration (AMD): Relationships between the photoreceptor/ retinal pigment epithelium/ Bruch's membrane/ choriocapillaris complex. *Mol Aspects Med* 33(4): 295-317
- Bird AC (2010): Therapeutic targets in age-related macular disease. *J Clin Invest* 120 (9): 3033-3041
- Bonilha VL (2008): Age and disease-related structural changes in the retinal pigment epithelium. *Clin Ophthalmol*: 2(2): 413-424
- Bornfeld N, Pauleikhoff D, Bartz- Schmidt U, Bertram B, Bresgen M, Holz FG, Kampik A, Kirchhof B, Lemmen KD, Roeder J (2009): Neue Aspekte in der Therapie der neovaskulären altersabhängigen Makuladegeneration. Aktuelle Stellungnahme der Retinologischen Gesellschaft, der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft und des Berufsverbands der Augenärzte Deutschlands e. V. (Stand März 2009) *Der Ophthalmologe* 106: 457-464
- Boyle D, Tien LF, Cooper NG, Shepherd V, McLaughlin BJ (1991): A mannose receptor is involved in retinal phagocytosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32 (5): 1464-1470
- Bradford M (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254

- Byeon SH, Lee SC, Choi SH, Lee HK, Lee JH, Chu YK, Kwon OW (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 (2): 1190-1197
- Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A (1996): Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380 (6573): 435-439
- Carr AJ, Vugler A, Lawrence J, Chen LL, Ahmado A, Chen FK, Semo M, Gias C, da Cruz L, Moore HD, Walsh J, Coffey PJ (2009): Molecular characterization and functional analysis of phagocytosis by human embryonic stem cell-derived RPE cells using a novel human retinal assay. *Mol Vis* 15: 283-295
- CATT Research Group, Martin DF, Maquire MG, Ying GS, Grunwald JE, Fine SL, Jaffe GJ (2011): Ranibizumab and Bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med*; 364 (20): 1897-1908
- CATT Research Group, Martin DF, Maquire MG, Fine SL, Ying GS, Jaffe GJ, Grunwald JE, Toth C, Redford M, Ferris FL 3rd (2012): Ranibizumab and Bevacizumab for treatment of neovascular age-related macular degeneration: two-year results. *Ophthalmology* 119 (7): 1388-1398
- Ciulla TA, Rosenfeld PJ (2009): Antivascular endothelial growth factor therapy for neovascular age-related macular degeneration. *Curr Opin Ophthalmol* 20 (3): 158-165
- Dietzel M, Farwick A, Hense HW (2010): Genetik und Risikofaktoren der exsudativen AMD. *Ophthalmologie* 107 (12): 1103-1108
- Dithmer M, Fuchs S, Shi Y, Schmidt H, Richert E, Roeder J, Klettner A (2014): Fucoidan reduces secretion and expression of Vascular Endothelial Growth Factor in the retinal pigment epithelium and reduces angiogenesis in vitro. *PLoS One* 9 (2): e89150
- Essner E, Roszka JR, Schreiber JH (1978): Phagocytosis and surface morphology in cultured retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 17 (11): 1040-1048
- Ferrara N (2010): Pathways mediating VEGF-independent tumor angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 21 (1): 21-26

- Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW (1996): Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380 (6573): 439-442
- Ferrara N, Damico L, Shams N, Lowman H, Kim R (2006): Development of Ranibizumab, an anti-Vascular Endothelial Growth Factor antigen binding fragment, as therapy for neovaskular age-related macular degeneration. *Retina* 26 (8): 859-870
- Finger RP, Fleckenstein M, Scholl HPN, Holz FG (2007): Pathophysiologie und Therapie der AMD. *Pharm Unserer Zeit* 36 (6): 424-430
- Ford KM, Saint-Gentez M, Walsbe T, Zahr A, D'Amore PA (2011): Expression and role of VEGF in the adult retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52 (13): 9478-9487
- Gamulescu MA, Renner AB, Helbig H (2009): Klinische Manifestationen von Funktionsstörungen des retinalen Pigmentepithels. *Ophthalmologie* 106 (4): 305-310
- Gerding H, Holz FG, Maier M, Pauleikhoff D (2012): Memorandum VEGF-vermittelte Netzhauterkrankungen. Experten-Roundtable am 14.12.2011 in Frankfurt am Main. Fortbildungsveranstaltung „Moderne Therapieoptionen und innovative Diagnostik – OCT bei AMD und DMÖ“ 09.-10.12.2011 in Heidelberg. u. a. Beilage SMKR 1861 in: *Der Ophthalmologe* 2/2012: 2-6 Heidelberg: Springer-Verlag GmbH
- Greaton CJ, Lane KB, Shepherd VL, Mc Laughlin BJ (2003): transcription of a single mannose receptor gene by macrophage and retinal pigment epithelium. *Ophthalmic Res* 35 (1): 42-47
- Hall MO, Abrams TA, Burgess BL (2003): Integrin alpha5beta1 is not required for phagocytosis of photoreceptor outer segments by cultured retinal pigment epithelial cells. *ExpEyeRes* 77 (3): 281-286
- Heiduschka P, Fietz H, Hofmeister S, Schultheiss S, Mack AF, Peters S, Ziemssen F, Niggemann B, Julien S, Bartz-Schmidt KU, Schraermeyer U, Tübingen Bevacizumab Study Group (2007): Penetration of Bevacizumab through the retina after intravitreal injection in the monkey. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48 (6): 2814-2823
- Holmes DI, Zachary I (2005): The Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease. *Genome Biol* 6 (2): 209

- Ip MS, Scott I, Brown GC, Brow MM, Ho AC, Huang SS, Recchia FM (2008): Anti-Vascular Endothelial Growth Factor pharmacotherapy for age-related macular degeneration: a report by the American Academy of Ophthalmology. *Ophthalmology* 115 (10): 1837-1846
- Ishida S, Usui T, Yamashiro K, Kaji Y, Amano S, Ogura Y, Hida, T, Oguchi Y, Ambati J, Miller JW, Gragoudas ES, Ng YS, D'Amore PA, Shima DT, Adamis AP (2003): VEGF164-mediated inflammation is required for pathological, but not physiological, ischemia-induced retinal neovascularization. *J Exp Med* 198 (3): 483-489
- IVAN Study Investigators, Chakravarthy U, Harding SP, Rogers CA, Downes SM, Lotery AJ, Wordsworth S, Reeves BC (2012): Ranibizumab versus Bevacizumab to treat neovascular age-related macular degeneration: one-year findings from the IVAN randomized trial.
- Julien S, Biesemeier A, Taubitz T, Schraermeyer U (2014): Different effects of intravitreally injected Ranibizumab and Aflibercept on retinal and choroidal tissues of monkey eyes. *Br J Ophthalmol.* 98 (6): 813-825
- Karl MO, Valtink M, Bednarz J, Engelmann K (2007): Cell culture conditions affect RPE phagocytic function. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 245 (7): 981-991
- Kernt M, Welge-Lüssen U, Yu A, Neubauer AS, Kampik A (2007): Bevacizumab wirkt nicht toxisch auf Zellen des menschlichen Auges. *Ophthalmologe* 104: 965-971
- Kevany BM, Palczewski K (2010): Phagocytosis of retinal rod and cone photoreceptors. *Physiology (Bethesda)* 25 (1): 8-15
- Keyt BA, Berleau LT, Nguyen HV, Chen H, Heinsohn H, Vandlen R, Ferrara N (1996): The carboxyl-terminal domain (111-165) of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) is critical for its mitogenic potency. *J Biol Chem* 271 (13): 7788-7795
- Kirchhof B, Lehmacher W, Thomas S (2013): Ist off-label use geboten? *Dtsch Arztebl* 110 (15): A 708-713
- Klettner A (2012): Oxidative stress induced cellular signalling in RPE cells. *Front Biosci (Schol Ed)*. 4:392-411

- Klettner A (2013): Physiological functions of VEGF in the retina and its possible implications of prolonged anti-VEGF therapy. In: *Vascular Endothelial Growth Factor: Biology, Regulation and Clinical significance*. Series: Protein Biochemistry, Synthesis, Structure and Cellular Function. Nova Publishing, NY, USA. 117-136
- Klettner A (2014): VEGF-A and its inhibitors in age-related macular degeneration-pharmacokinetic differences and their retinal and systemic implications. *J Biochem Pharmacol Res* 2 (1): 8-20
- Klettner A, Roider J (2008): Comparison of Bevacizumab, Ranibizumab, and Pegaptanib in vitro: efficiency and possible additional pathways. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49 (10): 4523-4527
- Klettner A, Roider J (2009): Treating age-related macular degeneration – interaction of VEGF-antagonists with their target. *Mini Rev Med Chem* 9(9): 1127-1135
- Klettner A, Roider J (2012): Mechanisms of pathological VEGF production in the retina and modification with VEGF-antagonists. In: *Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice, Studies on Retinal and Choroidal Disorders*. Springer, NY, USA. 277-306
- Klettner AK, Kruse ML, Meyer T, Wesch D, Kabelitz D, Roider J (2009): Different properties of VEGF-antagonists: Bevacizumab but not Ranibizumab accumulates in RPE cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 247 (12): 1601-1608
- Klettner A, Möhle F, Roider J (2010a): Intracellular Bevacizumab reduces phagocytotic uptake in RPE cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 248 (6): 819-824
- Klettner A, Meyer T, Möhle F, Kruse ML, Wesch D, Kabelitz D, Roider J (2010b): Uptake and storage of Bevacizumab in RPE cells affect its physiological function. *ARVO Meeting Abstract* 51:465
- Klettner A, Möhle F, Lucius R, Roider J (2011): Quantifying FITC-labeled latex beads opsonized with photoreceptor outer segment fragments: an easy and inexpensive method of investigating phagocytosis in retinal pigment epithelium cells. *Ophthalmic Res* 46 (2): 88-91
- Klettner A, Tahmaz N, Dithmer M, Richert E, Roider J (2014 a): Effects of Aflibercept on primary RPE cells: toxicity, wound healing, uptake and phagocytosis. *Br J ophthalmol*. 98 (10): 1448-1452

- Klettner A, Hamann T, Schlüter K, Lucius R, Roeder J (2014 b): Retinal pigment epithelium cells after the pro-inflammatory response of retinal microglia to TLR-3 stimulation. *Acta Ophthalmol.* 92 (8): e621-629
- Ladas ID, Karagiannis DA, Rouvas AA, Kotsolis AI, Liotsou A, Vergados I (2009): Safety of repeat intravitreal injections of Bevacizumab versus Ranibizumab: our experience after 2000 injections. *Retina* 29 (3): 313-318
- Lommatzsch A (2010): Pigmentepithelabhebung bei exsudativer Makuladegeneration. *Ophthalmologie* 107: 1115-1122
- Lüllmann-Rauch R (2003): Histologie. Verstehen, Lernen, Nachschlagen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 43-50
- McLaren MJ (1996): Kinetics of rod outer segment phagocytosis by cultured retinal pigment epithelial cells. Relationship to cell morphology. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37 (7): 1213-1224
- Miceli M, Newsome DA (1994): Insulin stimulation of retinal outer segment uptake by cultured human retinal pigment epithelial cells determined by flow cytometric method. *Exp Eye Res*: 59 (3): 271-280
- Miura Y, Klettner A, Roeder J (2010): VEGF antagonists decrease barrier function of retinal pigment epithelium in vitro: possible participation of intracellular glutathione. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51 (9): 4848-4855
- Mordenti J, Cuthbertson RA, Ferrara N, Thomsen K, Berleau L, Licko V, Allen PC, Valverde CR, Meng YG, Fei DT, Foure KM, Ryan AM (1999): Comparisons of the intraocular tissue distribution, pharmacokinetics, and safety of 125I-labeled full-length and Fab antibodies in rhesus monkeys following intravitreal administration. *Toxicol Pathol.* 27 (5):536-544
- Muller YA, Chen Y, Christinger HW, Cunningham BC, Lowman HB, de Vos AM (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 (9): 1153-1167
- Nandrot EF, Dufour EM (2010): Merck in daily retinal phagocytosis: a history in the making. *Adv Exp Med Biol* 664: 133-140

- National Cancer Institute: FDA Approval for Bevacizumab, <http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/fda-bevacizumab>.
- Nowak DG, Woolard J, Amin EM, Konopatskaya O, Saleem MA, Churchill AJ, Ladomery MR, Harper SJ, Bates DO (2008): Expression of pro- and anti-angiogenic isoforms of VEGF is differentially regulated by splicing and growth factors. *J Cell Sci* 121 (Pt 20): 3487-3495
- Otrock ZK, Makarem JA, Shamseddine AI (2007): Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review. *Blood Cells Mol Dis* 38 (3): 258-268
- Papermaster DS, Dreyer WJ (1974): Rhodopsin content in the outer segment membranes of bovine and frog retinal rods. *Biochemistry* 13 (11): 2438-2444
- Patel PJ, Bunce C, Tufail A, ABC Trial Investigators (2008): A randomized, double-masked phase III/IV study of the efficacy and safety of Avastin® (Bevacizumab) intravitreal injections compared to standard therapy in subjects with choroidal neovascularisation secondary to age-related macular degeneration: clinical trial design. *Trials* 9: 56
- Pauleikhoff D, Scheider A, Wiedmann P, Gelissen F, Scholl HP, Roeder J, Mohr A, Zlateva G, Xu X (2009): Neovaskuläre altersabhängige Makuladegeneration in Deutschland. *Ophthalmologie* 106 (3): 242-251
- Peters S, Heiduschka P, Julien S, Ziemssen F, Fietz H, Bartz-Schmidt KU, the Tübingen Bevacizumab study group, Schraermeyer U (2007): Ultrastructural findings in the primate eye after intravitreal injection of bevacizumab. *Am J Ophthalmol* 143 (6): 995-1002
- Robinson CJ, Mulloy B, Gallagher M, Stringer SE (2006): VEGF-165-binding sites within heparin sulfate encompass two highly sulfated domains and can be liberated by K5 lyase. *J Biol Chem* 281 (3): 1731-1740
- Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS, Boyer DS, Kaiser PK, Chung CY, Kim RY (2006): Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 355 (14): 1419-1431
- Saint-Geniez M, Maldonado AE, D'Amore PA (2006): VEGF expression and receptor activation in the choroid during development and in the adult. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47 (7): 3135-3142

- Schmucker C, Antes G, Lelgemann M (2009): Position Paper: the need for head-to-head studies comparing Avastin versus Lucentis. *Surv Ophthalmol.* 54 (6): 705-707
- Schrader WF (2006): Altersbedingte Makuladegeneration - Sozioökonomische Zeitbombe in der alternden Gesellschaft. *Ophthalmologie* 103: 742-748
- Schraermeyer U, Enzmann V, Kohen L, Addicks K, Wiedemann P, Heimann K (1997): Porcine iris epithelial cells can take up retinal outer segments. *Exp Eye Res* 65 (2): 277-287
- Schraermeyer U, Heiduschka P, Bartz-Schmidt KU (2009): Lokalisation von Bevacizumab in der Netzhaut von Affen nach einer intravitrealen Bevacizumab-Injektion. *Ophthalmologie* 106 (7): 619-624
- Schütt F, Kopitz J, Yu A, Welge-Lüssen U (2008): Pathomechanismen der Alterung des RPE und prophylaktische Therapieoptionen im Hinblick auf die AMD. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 225: 548-554
- Seyfried-Williams R, McLaughlin BJ (1983): The use of sugar-coated beads to study phagocytosis in normal and dystrophic retina. *Vision Res* 23 (5): 485-494
- Shibuya M (2001): Structure and dual function of Vascular Endothelial Growth Factor receptor-1 (Flt-1). *Int J Biochem Cell Biol* 33 (4): 409-420
- Spitzer MS, Yoeruek E, Sierra A, Wallenfels-Thilo B, Schraermeyer U, Spitzer B, Bartz-Schmidt KU, Szurman P (2007): Comparative antiproliferative and cytotoxic profile of Bevacizumab (Avastin), Pegaptanib (Macugen) and Ranibizumab (Lucentis) on different ocular cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 245 (12): 1837-1842
- Steinberg BE, Grinstein S (2007): Assessment of phagosome formation and maturation by fluorescence microscopy. *Methods Mol Biol* 412: 289-300
- Steinberg BE, Grinstein S (2009): Analysis of macrophage phagocytosis: quantitative assays of phagosome formation and maturation using high-throughput fluorescence microscopy. *Methods Mol Biol.* 531: 45-56
- Strauss O (2005): The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev* 85 (3): 845-881
- Tarnowski BI, Shepherd VL, McLaughlin BJ (1988): Expression of mannose receptors for pinocytosis and phagocytosis on rat retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29 (5): 742-748

- Weisman RA, Korn ED (1967): Phagocytosis of latex beads by *Acanthamoeba*. I. Biochemical properties. *Biochemistry* 6 (2): 485-497
- Wiencke AK, Kiilgaard JF, Nicolini J, Bundgaard M, Röpke C, La Cour M (2003): Growth of cultured porcine retinal pigment epithelial cells. *Acta Ophthalmol Scand* 81(2): 170-176
- Zachary I (2005): Neuroprotective role of Vascular Endothelial Growth Factor: signalling mechanisms, biological function, and therapeutic potential. *Neurosignals* 14 (5): 207-221
- Zhao MW, Jin ML, He S, Spee C, Ryan SJ, Hinton DR (1999): A distinct integrin-mediated phagocytic pathway for extracellular matrix remodeling by RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 (11): 2713-2723
- Ziemssen F, Heiduschka P, Peters S, Grisanti S, Schraermeyer U (2008): Chancen und Risiken der Anti-VEGF-Therapie. *Klin Monbl Augenheilkd* 225 (9): 770-778

Danksagung

Hiermit möchte ich mich herzlichst bei Herrn Prof. Dr. Johann Roider bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen.

Besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Alexa Klettner für die Überlassung des Themas, ihre jahrelange Betreuung und stete Hilfsbereitschaft.

Frau Serap Luick, Frau Monika Marquardt, Frau Alexandra Pfaff und Herrn Michael Schwarz, den Mitarbeitern „der Pharma“, Frau Dr. Katrin Starke und Frau Dr. Sandra Schott danke ich von Herzen für ihre unermüdliche Hilfe und freundschaftliche Unterstützung, die ebenfalls maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Danke!

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Friederike Möhle
 Geburtsdatum und –ort 18. Juli 1975 in Göttingen

Ausbildung

1986- 1991 Mariengymnasium Papenburg
 1991- 1995 Stiftung Louisenlund, Abitur Juni 1995
 1995- 2002 Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität
 Göttingen
 2002- 2005 Ausbildung zur Operationstechnischen Assistentin (OTA) am
 Ev. Kranken- und Versorgungshaus, Mülheim an der Ruhr
 2005 OTA im Zentral- OP im Klinikum links der Weser, Bremen
 2005- 2011 Studium der Humanmedizin an der
 Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
 2012- 2014 Assistenzärztin in der Klinik für Psychiatrie, imland Klinik,
 Rendsburg
 seit 2014 Assistenzärztin im Institut für Rechtsmedizin,
 Universitätsklinikum, Bonn

Veröffentlichungen

Klettner A, Möhle F, Roider J (2010a): Intracellular Bevacizumab reduces phagocytotic uptake in RPE cells. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 248 (6): 819-824

Klettner A, Meyer T, Möhle F, Kruse ML, Wesch D, Kabelitz D, Roider J (2010b): Uptake and storage of Bevacizumab in RPE cells affect its physiological function. ARVO Meeting Abstract 51:465

Klettner A, Möhle F, Lucius R, Roider J (2011): Quantifying FITC-labeled latex beads opsonized with photoreceptor outer segment fragments: an easy and inexpensive method of investigating phagocytosis in retinal pigment epithelium cells. Ophthalmic Res 46 (2): 88-91