

Aus der
Augenklinik und Poliklinik
Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Siegfried Priglinger

**In vitro-Evaluation neuer Therapiestrategien
bei neovaskulärer AMD: Inhibition von Angiogenese
und Fibrose jenseits von anti-VEGF**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Ben Asani

aus
Gelsenkirchen

Jahr
2025

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Claudia Priglinger
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Kirsten Eibl-Lindner
Prof. Dr. Ricarda Schumann

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. Jakob Georg Siedlecki

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 27.02.2025

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Zusammenfassung	5
Abbildungsverzeichnis	8
Abkürzungsverzeichnis	9
1 Einleitung	10
1.1 Das Sehorgan	10
1.1.1 Die Netzhaut.....	10
1.2 Blutversorgung der Netzhaut.....	12
1.2.1 Das Blutgefäß.....	12
1.2.2 Retinale Kreisläufe	13
1.3 Physiologische Etablierung von Gefäßsystemen	13
1.3.1 Vaskulogenese	13
1.3.2 Angiogenese	13
1.3.3 Gefäßreifung	14
1.3.4 Vaskularisierung der Netzhaut	14
1.4 Pathologische Angiogenese	15
1.4.1 Vaskuläre Erkrankungen der Netzhaut	15
1.5 Wachstumsfaktoren in der Angiogenese.....	18
1.5.1 Vascular endothelial growth factor (VEGF)	18
1.5.2 Perizyten und der Platelet-Derived growth factor (PDGF)	22
1.5.3 Mammalian Target of Rapamycin (m-TOR) und dessen Inhibitor Rapamycin	24
1.6 Ziel der vorliegenden Arbeit	30
2 Material und Methoden	33
2.1 Material.....	33
2.1.1 Medien und Lösungen	33
2.1.2 Medikamente	34
2.1.3 Zelllinien	35
2.1.4 Software	35
2.2 Zellkultur adhärent wachsender Zellen	35
2.2.1 Zellkulturbedingungen	35
2.2.2 Kultivierung.....	35
2.2.3 Kryokonservierung von Zellen.....	36
2.2.4 Bestimmung der Zellzahl	36
2.3 Funktionelle Assays	37
2.3.1 Zelluläre Toxizität	37
2.3.2 Zelluläre Migration.....	37
2.3.3 Zelluläre Proliferation	38
2.3.4 Tube formation	38
2.3.5 XTT-Assay.....	39
3 Ergebnisse	40

3.1	Untersuchung antiangiogener Eigenschaften von Rapamycin auf humane retinale Perizyten	40
3.2	Toxizität	40
3.2.1	XTT-Assay	40
3.2.2	HUVEC und HRP	40
3.3	Proliferationshemmung der HRP	42
3.4	Zelluläre Migrationshemmung der HRP (Scratch Assay)	43
3.5	Tube-Formation: Fähigkeit zur Ausbildung kapillarähnlicher Strukturen	45
3.5.1	HUVEC Monokultur	45
3.5.2	HUVEC/HRP Ko-Kultur	47
4	Diskussion	50
5	Literaturverzeichnis	59
	Danksagung	78
	Affidavit & Erklärung der Übereinstimmung	79
	Publikationsliste	81

Zusammenfassung

Deutsch:

Neben der diabetischen Retinopathie stellt die altersbedingte Makuladegeneration eine der häufigsten Erblindungsursachen im Alter dar. Sie wird unterteilt in eine trockene oder „nicht-neovaskuläre“ sowie in eine neovaskuläre Form. Therapeutisch hat sich bei der Zweiteren die Inhibition des vascular endothelial growth factor (VEGF) etabliert, die durch die Injektion von Antikörpern oder Fusionsproteinen in den Glaskörperraum im Inneren des Auges erreicht wird. Dadurch können zentrale pathophysiologische Prozesse der neovaskulären AMD, im Speziellen die Destabilisierung bestehender und das Aussprossen krankhafter neuer Gefäße (sogenannter makulärer oder choroidaler Neovaskularisationen) begrenzt werden. Ziel des bisherigen Therapiestandards ist eine Stabilisierung des Netzhautbefundes durch Eindämmung der Erkrankungsaktivität. Insbesondere bei der AMD lässt sich die Ausgangssehschärfe vor Erkrankungsbeginn aber trotz Therapie häufig nicht mehr erreichen und eine suffiziente Kontrolle der Neovaskularisation bleibt in vielen Fällen aus. Dies schlägt sich letztlich in einer hohen Therapiefrequenz nieder, die mit einer deutlichen Belastung für den Patienten, aber auch sozioökonomisch für das Gesundheitssystem einhergeht. Ein Grund dafür könnte die Ummantelung der neuen Gefäße durch Perizyten sein, die zu einer, zumindest partiellen, anti-VEGF-Resistenz führen und maßgeblich beteiligt an der Ausbildung subretinaler Fibrosen zu sein scheinen. Die aktuell verfügbare Medikation ist nicht auf diese, durch Perizyten hervorgerufene Stabilisierung bzw. Resistenz der Gefäße ausgelegt und hat zumeist nur VEGF als Zielmolekül (bzw. den VEGF-Rezeptor). Da Perizyten jedoch nicht auf VEGF, sondern auf den Platelet derived growth factor (PDGF) ansprechen, ist eine Inhibition dieser mit der üblichen anti-VEGF-Monotherapie nicht suffizient möglich und eine Regression solcher Neovaskularisationen unwahrscheinlich. In vorausgegangenen Arbeiten wurde bereits der Wirkmechanismus von Axitinib, einem dualen VEGF-R/PDGF-R Inhibitor untersucht und bestätigt. Allerdings zeigte sich unter Axitinib eine signifikant deutliche Hochregulierung von α SMA in Perizyten, was eine profibrotische Dedifferenzierung von Perizyten zur Folge hätte und damit im Hinblick auf makuläre Fibrosen bei nAMD problematisch wäre.

Die vorliegende Arbeit hatte demnach zum Ziel, weitere therapeutische Möglichkeiten jenseits von kombinierter VEGF/PDGF-Hemmung zu identifizieren, die zielgerichtet angiogenetische Eigenschaften in retinalen Perizyten hemmen.

Als potenzieller Inhibitor wurde Sirolimus (Rapamycin) und seine Wirkung als m-TOR-Inhibitor untersucht. Das intrazelluläre Protein mammalian target of rapamycin (m-TOR) ist ein Schlüssel-molekül in der Regulation von Zellwachstum – und Proliferation. Eine Hemmung des Proteins scheint in der Tumoriangiogenese deutlich anti-angiogene Wirkung auf Endothelzellen und Perizyten zu besitzen. Korrespondierend dazu wurde in dieser Arbeit untersucht, ob ähnliche Effekte an humanen retinalen Perizyten zu beobachten sind. Nach Untersuchung der Toxizität wurden klassische Angiogenese-Assays durchgeführt, um das Verhalten auf die Proliferation, Migration und die Ausbildung bzw. Destabilisierung endothelialer Tubes zu untersuchen.

Sirolimus zeigte keine toxischen Effekte in den getesteten Konzentrationen und erzielte hohe, dosisabhängige Hemmung der Proliferation um bis zu 60% mit einer mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) von 423ng/ml. Entsprechend dazu zeigten sich auch deutliche inhibitorische (und dosisabhängige) Effekte bei der Zellmigration in allen getesteten Konzentrationen bis zu 5µg/ml. Verglichen mit der unbehandelten Kontrolle bewirkte die Gabe von Sirolimus eine deutliche Hemmung der Perizytenmigration um 76,8% ($p < 0,0001$) bei der maximal getesteten Dosis. Bei der Ausbildung kapillärer Strukturen, den sogenannten endothelialen Tubes, sollte die physiologische Koexistenz von Endothelzellen und stabilisierenden Perizyten nachgebildet werden, weshalb eine Ko-Kultur beider Zelltypen etabliert wurde. Während eine Mono- und Kokultur Tubes ausbildeten, degradierte eine reine Monokultur mit Endothelzellen weitestgehend nach 24 Stunden Inkubation, während die Proben mit zugegebenen Perizyten im gleichen Zeitraum sich noch beständig zeigten und somit möglichst ein realitätsnahes Szenario zur Situation in-vivo schaffen. Der Effekt dieser Stabilisierung konnte jedoch dosisabhängig deutlich durch den Einsatz von Sirolimus reduziert werden und führte bei der maximal getesteten Dosis zu einer Degradation bis zu 94% verglichen mit den unbehandelten Kontrollen ($p < 0.0001$). Überträgt man diese Beobachtung auf einen potenziellen in-vivo Einsatz, so könnte eine m-Tor Inhibition die beginnende anti-VEGF Resistenz durch Perizyten womöglich aufheben oder zumindest reduzieren. Weitere Untersuchungen, insbesondere in-vivo, sind erforderlich, um diese Hypothese zu bestätigen.

English:

Age-related macular degeneration (AMD) is, alongside diabetic retinopathy, one of the most common causes of blindness in the elderly. It is categorized into a dry or "non-neovascular" form and a neovascular form. In the latter, therapeutic inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) has become established, achieved by injecting antibodies or fusion proteins into the vitreous cavity of the eye. This approach aims to limit the central pathophysiological processes of neovascular AMD, specifically the destabilization of existing and the sprouting of abnormal new vessels (so-called macular or choroidal neovascularizations). The goal of the current treatment standard is to stabilize retinal findings by reducing disease activity. However, with AMD, the original visual acuity prior to disease onset is often not restored even with therapy, and sufficient control of neovascularization remains elusive in many cases. This results in a high treatment frequency, which poses a significant burden on both the patient and the healthcare system socioeconomically. One possible reason for this could be the pericyte coverage of new vessels, leading to at least partial anti-VEGF resistance and potentially contributing significantly to the formation of subretinal fibrosis. Current available medications primarily target VEGF (or the VEGF receptor) and do not address pericyte-driven stabilization or resistance of vessels. Since pericytes respond not to VEGF but to platelet-derived growth factor (PDGF), inhibition with the usual anti-VEGF monotherapy is insufficient, and regression of such neovascularizations is unlikely. Previous studies have already investigated and confirmed the mechanism of action of Axitinib, a dual VEGF-R/PDGF-R inhibitor. However, Axitinib showed a significant upregulation of α SMA in

pericytes, which could lead to a profibrotic dedifferentiation of pericytes, raising concerns regarding macular fibrosis in nAMD.

This study, therefore, aimed to identify additional therapeutic approaches beyond combined VEGF/PDGF inhibition that specifically target and inhibit angiogenic properties in retinal pericytes. Sirolimus (Rapamycin) was investigated as a potential inhibitor due to its action as an m-TOR inhibitor. The intracellular protein mammalian target of rapamycin (m-TOR) is a key molecule in regulating cell growth and proliferation. Its inhibition has shown significantly anti-angiogenic effects on endothelial cells and pericytes in tumor angiogenesis. Accordingly, this study investigated whether similar effects could be observed on human retinal pericytes. After evaluating toxicity, classic angiogenesis assays were performed to study the effects on proliferation, migration, and the formation or destabilization of endothelial tubes.

Sirolimus exhibited no toxic effects at tested concentrations and achieved a high, dose-dependent inhibition of proliferation by up to 60%, with a half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of 423 ng/ml. Correspondingly, there were also significant (and dose-dependent) inhibitory effects on cell migration at all tested concentrations up to 5 μ g/ml. Compared to untreated controls, the administration of Sirolimus resulted in a marked inhibition of pericyte migration by 76.8% ($p < 0.0001$) at the maximum tested dose. In studies of capillary structure formation, known as endothelial tubes, the physiological coexistence of endothelial cells and stabilizing pericytes was modeled by establishing a co-culture of both cell types. While both mono- and co-cultures formed tubes, a pure endothelial monoculture largely degraded after 24 hours of incubation, whereas samples with added pericytes remained stable during the same period, creating a more realistic in-vivo scenario. However, this stabilization effect could be significantly reduced in a dose-dependent manner with Sirolimus treatment, leading to degradation of up to 94% compared to untreated controls at the maximum tested dose ($p < 0.0001$). If these observations can be translated to potential in-vivo applications, m-TOR inhibition might alleviate or reduce emerging anti-VEGF resistance mediated by pericytes. Further investigations, especially in-vivo, are required to confirm this hypothesis.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Histologischer Aufbau der Netzhaut²	11
Abbildung 2: Netzhautschichten in der OCT⁵: ILM = Internal limiting membrane, RNFL = Retinal nerve fiber layer, GCL = Ganglion cell layer, IPL = Inner plexiform layer, INL = Inner nuclear layer, OPL = Outer plexiform layer, ONL = Outer nuclear layer, ELM = External limiting membrane, ISOS = Inner Segment/Outer Segment oder auch EZ = Ellipsoid Zone, RPE = Retinal pigment epithelium, BM = Bruch's membrane	12
Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung des PI3K/Akt-Signalweges und die Bedeutung für die Angiogenese (Darstellung angelehnt an Karar et al, 2011, CC BY-Lizenz)¹⁷⁸ ..	29
Abbildung 4: Toxizitätsuntersuchung von Rapamycin (Sirolimus) auf HRP. Nach 72-stündiger Behandlung konfluenter HRP Zellen unter serumreduziertem Medium: Es zeigen sich in allen getesteten Konzentrationen bis 15 µg/ml keinerlei toxische Effekte von Rapamycin auf humane retinale Perizyten	41
Abbildung 5: Toxizitätsuntersuchung von Rapamycin (Sirolimus) auf HUVEC. Nach 72-stündiger Behandlung konfluenter HUVEC unter serumreduziertem Medium: Es zeigen sich in allen getesteten Konzentrationen bis 15 µg/ml keinerlei toxische Effekte von Rapamycin auf humane retinale Perizyten ($p < 0.05$)	41
Abbildung 6: Effekte von Rapamycin auf die Proliferation von HRP. Rapamycin erzielte eine signifikante Hemmung der Proliferation von subkonfluenten humanen retinalen Perizyten beginnend mit der geringsten Dosis von 0,005µg/ml bis 15µg/ml ($p > 0,05$ für alle Konzentrationen). Der Effekt war dosisabhängig bis 1µg/ml. Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) beträgt 423 ng/ml.	43
Abbildung 7: Beispiel einer Auswertung des Scratch-Assays. Es wurden mit dem LAS-Distance Tool (Leica Microsystems, USA) jeweils 20 Abstände vermessen und daraus der Durchschnitt ermittelt.	44
Abbildung 8: Hemmung der Perizytenmigration durch Rapamycin (Sirolimus){Asani, 2022 #47}. Für alle getesteten Konzentrationen, erzielte Rapamycin eine dosisabhängige Reduktion der Perizytenmigration in die Wunde (Co – Rapa 0.005: $p = 0.006$; MD: 25.7; 95 % CI: 9.2 – 42.2; Co – Rapa 0.05: $p < 0.0001$; MD 42.0; 95 % CI: 25.5 – 58.4; Co – Rapa 0.5: $p < 0.0001$; MD 56.7; 95 % CI: 40.2 – 73.2; Co – Rapa 5: $p < 0.0001$; MD 76.8; 95 % CI: 60.3-93.3).	45
Abbildung 9: Effekte von Rapamycin bei der HUVEC-Tubeformation. Ausbildung der rein endothelialen Tubes nach 6 Stunden ist durch die Gabe von Rapamycin verglichen zur unbehandelten Kontrolle signifikant und dosisabhängig bis 5µg/ml auf 74.0%, 63.6%, 59.1% und 54.9% respektive reduziert (Ko – Rapa 0.005: $p = 0.001$; MD: 26.0; 95 % CI: 13.8 – 38.2; Ko – Rapa 0.05: $p < 0.0001$; MD 36.4; 95 % CI: 24.2 – 48.6; Ko – Rapa 0.5: $p < 0.0001$; MD 40.9; 95 % CI: 28.7 – 53.1; Ko – Rapa 5: $p < 0.0001$; MD 45.1; 95 % CI: 33.0-57.3).	46
Abbildung 10: Versuch der Etablierung einer Ko-Kultur von Perizyten und Endothelzellen in-vitro. A: Eine 1:1 Verteilung von HRP und HUVEC führte zur Ausbildung von unstrukturierten Zellhaufen. B: Eine Reduktion der HRP auf 5% der HUVEC-Zellzahl führte zur Ausbildung regelrechter Tube-Strukturen.	47
Abbildung 11: Effekte von Rapamycin bei der Tubeformation einer HUVEC/HRP-Kokultur. A: Die HUVEC-Monokultur zeigt nach 24h Kultivierung 67% mehr Degradation der Tubes im Vergleich zur reinen unbehandelten Ko-Kultur (HUVEC/HRP – HUVEC: $p < 0.0001$; MD 67.7; 95 % CI: 52.9 – 82.6). Zugabe von Rapamycin kehrte den stabilisierenden Effekt wieder um und führte zu einer statistisch signifikanten Reduktion der Tube-Länge nach der gleichen Zeitspanne von 24 Stunden von 45.1, 78.9, 80.0 und 94% mit aufsteigend genutzten Konzentrationen (0.005, 0.05, 0.5 und 5µg/ml). B: Beispielbilder der Tubes nach jeweils 6 Stunden und 24 Stunden in Zellkultur.	49

Abkürzungsverzeichnis

AMD	altersbedingte Makuladegeneration
CFH	Komplementfaktor H
CNV	choroidale Neovaskularisation
DEPTOR	DEP domain containing mTOR interacting protein
DMÖ	diabetisches Makulaödem
EPC	endothelial progenitor cells
FGF	fibroblast growth factor
HIF	hypoxia-inducible factor
IGF	insulin-like growth factor
mLST8	mammalian lethal with Sec13 protein 8
mTOR	mammalian target of Rapamycin
mTORC1	mTOR - Complex 1
mTORC2	mTOR - Complex 2
nAMD	neovaskuläre altersbedingte Makuladegeneration
NPDR	nicht-proliferative diabetische Retinopathie
OCT	optische Kohärenztomographie
PDGF	platelet-derived growth factor
PDR	proliferative diabetische Retinopathie
PI3	Phosphatidylinositol-3'
PMS	Phenazinmethosulfat
PRAS40	proline-rich Akt substrate of 40 kDa
Raptor	regulatory protein associated with mTOR
RNV	retinale Neovaskularisation
RPE	retinales Pigmentepithel
SREBP	sterol responsive element binding protein
TGF	Transforming growth factor
TSC	Tuberöse-Sklerose-Komplex
VAV	Venenastverschluss
VEGF	vascular endothelial growth factor
XTT	2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide
ZVV	zentralvenöser Verschluss

1 Einleitung

1.1 Das Sehorgan

Das menschliche Sehorgan besteht aus dem Augapfel (*Bulbus oculi*), den okulären Anhangsgebilden (Bindehaut, Lider, Tränenorgane) und der Sehbahn. Der Augapfel wiederum besteht aus einem optischen Apparat, der das einfallende Licht bündelt, und der Netzhaut, die für die Wahrnehmung, Integration und Weiterleitung der Lichtreize zuständig ist.

1.1.1 Die Netzhaut

Die Netzhaut, oder synonym Retina (von lat. *rete* = Netz), entstammt entwicklungsgeschichtlich dem Diencephalon und ist somit ein vorgeschobener Gehirnteil. Ihre Aufgabe ist die Umwandlung von Lichtreizen in elektrische Impulse, die Integration dieser Signale und die Weiterleitung der Daten an den Sehnerv. Hierfür sind drei Neurone hintereinandergeschaltet¹:

1. Der **Photorezeptor** nimmt Lichtreize wahr und wandelt sie über biochemische Prozesse in elektrische Spannungssignale um.
2. Die **Bipolarzelle** integriert die Signale der Photorezeptoren und leitet sie an die Ganglienzellen (3. Neuron) weiter. Die Integration findet dabei über *On*- und *Off*-Bipolarzellen statt, die auf das nachfolgende Neuron erregend bzw. hemmend wirken. Dabei kann der Informationsfluss konvergent (eine Bipolarzelle erhält Reize von mehreren Photorezeptoren) oder divergent (ein Photorezeptor übermittelt an zwei oder mehr Bipolarzellen) sein.
3. Die **retinale Ganglienzelle** empfängt Reize von den Bipolarzellen und ist ebenso für die Signalmodulation verantwortlich. Ihre Axone bilden den Sehnerv aus, der die visuelle Information ins Gehirn leitet.

Zusätzlich zur vertikalen Verschaltung durch Bipolar- und Ganglienzellen findet eine laterale Verschaltung statt. Horizontalzellen modulieren die Signalübertragung an den Synapsen zwischen Photorezeptoren und Bipolarzellen, während amakrine Zellen mit Bipolar- und Ganglienzellen modifizierend in Kontakt stehen.

Aus den einzelnen Ebenen ergibt sich der schichtartige histologische Aufbau der Netzhaut (s. Abbildung 1). Dabei liegen das retinale Pigmentepithel und die Photorezeptoren am weitesten

außen (d.h. Richtung Sklera), während die innere Grenzmembran und die Nervenfaserschicht sich am weitesten innen (d.h. Richtung Glaskörper) befinden¹.

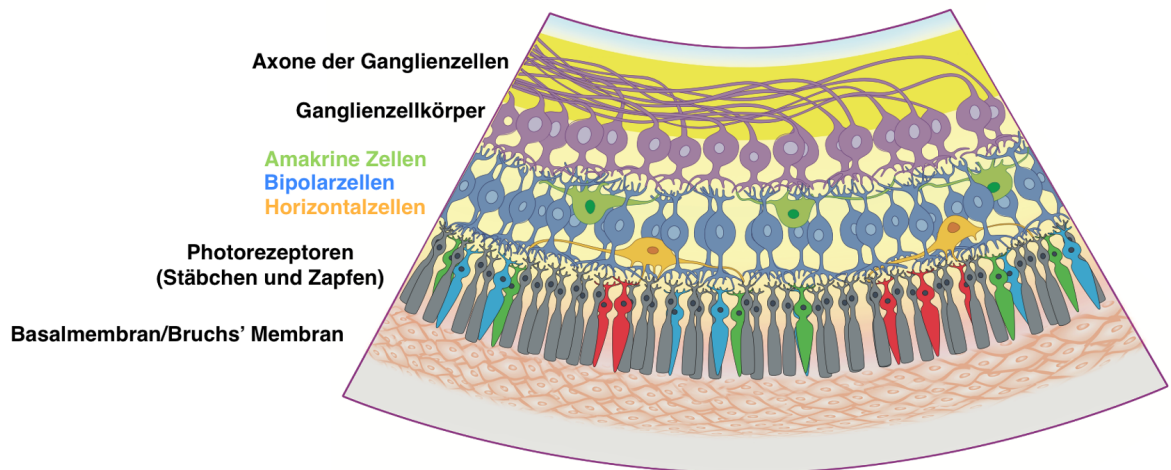


Abbildung 1: Histologischer Aufbau der Netzhaut²

In der optischen Kohärenztomographie (OCT) lassen sich diese Schichten *in vivo* darstellen, was in der okulären Diagnostik in den letzten Jahren sehr an Stellenwert gewonnen hat - insbesondere bei neovaskulären Erkrankungen^{3,4} (s. Abbildung 2).

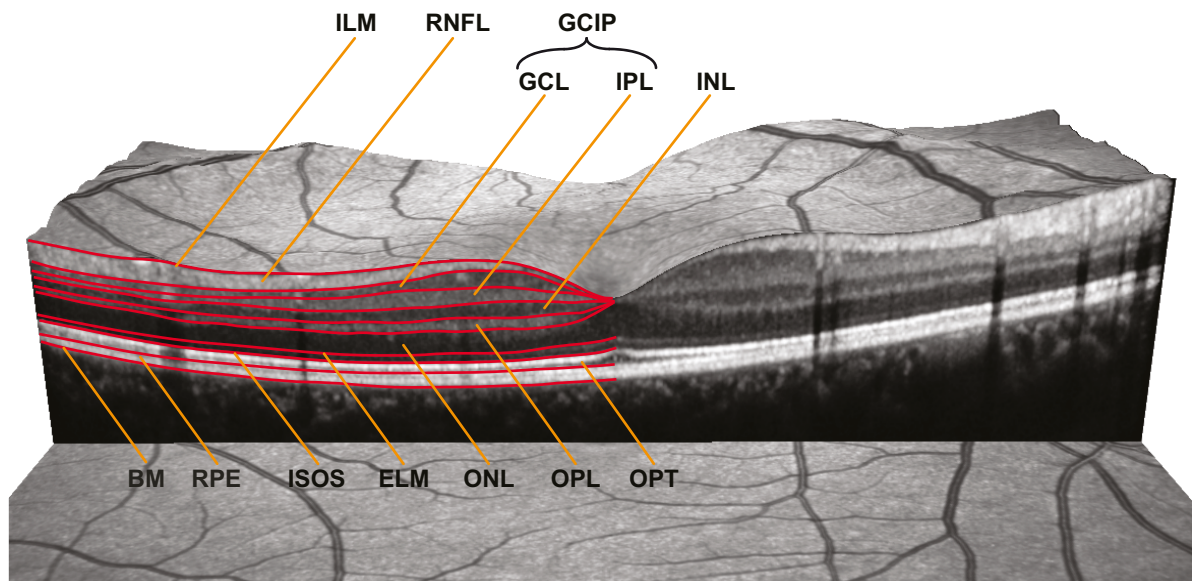


Abbildung 2: Netzhautschichten in der OCT⁵: ILM = Internal limiting membrane, RNFL = Retinal nerve fiber layer, GCL = Ganglion cell layer, IPL = Inner plexiform layer, INL = Inner nuclear layer, OPL = Outer plexiform layer, ONL = Outer nuclear layer, ELM = External limiting membrane, ISOS = Inner Segment/Outer Segment oder auch EZ = Ellipsoid Zone, RPE = Retinal pigment epithelium, BM = Bruch's membrane

1.2 Blutversorgung der Netzhaut

1.2.1 Das Blutgefäß

Blutgefäße sind rohrartige Gebilde, die in ihrem Inneren, dem *Lumen*, den Fluss des Blutes ermöglichen. Als *Arterien* werden Gefäße bezeichnet, die Blut vom Herzen weg leiten, *Venen* führen es dem Herzen zu. Zwischen arteriellem und venösem System befinden sich die *Kapillaren*, die über ein Mikrozirkulationsnetz effizienten Stoffaustausch zwischen Gewebe und Gefäß ermöglichen. Vom Herz kommend lassen sich Blutgefäße in folgende Gruppen gliedern^{1,6}:

Aorta – Arterien – Arteriolen – **Kapillaren** – Venolen – Venen – Hohlvenen

→→ Durchmesser nimmt ab →→

→→ Durchmesser nimmt zu →→

Arterien (so auch die A. centralis retinae) haben einen klassischen dreischichtigen Wandaufbau⁷:

1. Die **Intima** wird aus einer einzigen Endothelzellschicht gebildet, die einer Basalmembran aufsitzt. Zum Lumen hin schließt sich eine Membrana elastica interna an.
2. Die **Tunica media** besteht aus zirkulär angeordneter glatter Muskulatur, Bindegewebe und elastischen Fasern.
3. Die **Adventitia** ist eine bindegewebige Schicht, die das Gefäß im umliegenden Gewebe verankert.

Arteriolen entsprechen in ihrem Wandaufbau dem der Arterien, einzig die Membrana elastica interna ist nicht durchgängig.

Kapillaren zeigen einen zweischichtigen Aufbau⁶:

1. Endothelzellen, die durch tight junctions verbunden sind, bilden durch Verankerung in der Basalmembran die innere Blut-Retina-Schranke.
2. Perizyten umfassen mit ihren multiplen Zellfortsätzen die Endothelzellschicht von außen.

1.2.2 Retinale Kreisläufe

Die retinale Perfusion wird von zwei unabhängigen Kreisläufen bewerkstelligt^{8,9}:

1. **A. centralis retinae:** Die A. centralis retinae tritt kurz hinter dem Bulbus in den Sehnerv ein und verzweigt sich in die Netzhautarteriolen, die sich wiederum in Kapillaren aufteilen. So werden die inneren zwei Drittel der Netzhaut bis zur inneren Körnerschicht versorgt.
2. **Choriocapillaris:** Das äußere Netzhautdrittel wird direkt von der Choriocapillaris ernährt, welche das Blut über vier bis sechs Aa. ciliares posteriores breves erhält.

1.3 Physiologische Etablierung von Gefäßsystemen

1.3.1 Vaskulogenese

Die Entstehung neuer Gefäße kann in zwei verschiedene Entitäten eingeteilt werden: Vaskulogenese und Angiogenese⁸⁻¹⁰. Vaskulogenese beschreibt dabei eine *de novo*-Bildung vaskulärer Strukturen, d.h. es liegt an der Stelle der Gefäßentstehung noch keinerlei Gefäßsystem vor. Akteure der Vaskulogenese sind multipotente Vorläuferzellen, sog. Hämangioblasten, die auf lokale pro-angiogenetische Stimuli wie Wachstumsfaktoren oder extrazelluläre Matrices mit Differenzierung in Blut- und Gefäßzellen reagieren. Vaskulogenese ist vorwiegend ein Mechanismus der embryonalen Entwicklung. Allerdings sind auch beim Erwachsenen sog. *endothelial progenitor cells (EPC)* nachgewiesen worden, die wahrscheinlich die adulte Version von Hämangioblasten darstellen¹¹; ihre Funktion ist größtenteils unklar.

1.3.2 Angiogenese

Angiogenese dagegen ist definiert als Neubildung von Blutgefäßen aus differenzierten Endothelzellen bereits bestehender Kapillaren. Hierbei gibt es wiederum zwei verschiedene Formen: *sprouting angiogenesis* beschreibt die Gefäßbildung durch Aussprossung zellulärer Verbände aus bestehenden Kapillaren, während die *intussusceptive Angiogenese* durch die Zweiteilung bestehender Gefäße durch endovaskuläre Wandbildung definiert ist¹².

Die klassische *sprouting angiogenesis* besteht aus verschiedenen Teilschritten (nach Potente et al. 2011¹²):

1. **Degradierung der Basalmembran:** Aktivierte Endothelzellen sezernieren Matrix-Metalloproteinasen, die die Basalmembran des bestehenden Gefäßes abbauen, sodass sich Endothelzellen und Perizyten daraus lösen können.
2. **Migration:** Endothelzellen wandern ins Interstitium aus. Die Spitze des entstehenden Sprosses leitet die sog. *tip cell*, während die ihr folgenden Zellen *stalk cells* genannt werden.
3. **Proliferation:** Es kommt zum verstärkten Zellwachstum, das zusammen mit der Migration die vaskuläre Sprosse verlängert, bis Kontakt mit dem nächsten Gefäß hergestellt ist.
4. **Rohrbildung (tube formation):** *Stalk cells* bilden durch eine rohrförmige Anordnung ein Lumen aus und synthetisieren eine neue Basalmembran.

1.3.3 Gefäßreifung

Von Benjamin et al. wurde 1998¹³ postuliert, dass für endotheliale Gefäßstrukturen nach Vollendung der klassischen Schritte der Angiogenese ein kurzes Zeitfenster der vaskulären Plastizität besteht, in dem sich eine vaskuläre Regression gerade erst etablierter Gewebe zeigen kann. Diese Plastizität ist nötig, da endotheliale Gefäßbette zunächst im Überschuss gebildet werden, woraufhin sich je nach lokalen Perfusionsbedürfnissen nicht notwendige Äste durch Entzug des vascular endothelial growth factor (VEGF) wieder zurückbilden (sog. *vascular pruning*).

Bei der Beobachtung der postnatalen Vaskularisierung von Rattenretzhäuten machten Benjamin et al.¹³ die Beobachtung, dass der Schluss dieses plastischen Zeitfensters mit der Besetzung endothelialer Gefäßstrukturen mit Perizyten zusammenfällt. Deshalb wird der klassischen Angiogenese ein fünfter Schritt hinzugefügt:

5. **Gefäßreifung (vessel maturation):** Durch die Rekrutierung vaskulärer Gefäßwandzellen (Perizyten, glatte Muskelzellen) und Produktion extrazellulärer Matrix entsteht ein reifes Gefäß, das den lokalen Perfusionsbedürfnissen entspricht. Der Zellverband dieses Gefäßes ist in seinem Überleben nicht mehr VEGF-abhängig, sondern wird durch die Interaktion zwischen Endothelzelle und Perizyt stabilisiert.

1.3.4 Vaskularisierung der Netzhaut

Die Vaskularisierung der Netzhaut beginnt in der 14. Schwangerschaftswoche mit der Differenzierung des Mesoderms in endotheliale Vorläuferzellen¹⁴. Ausgehend vom Sehnervenkopf migrieren ab der 16. Schwangerschaftswoche spindelförmige Zellen nach peripher¹⁵. In der 22. Schwangerschaftswoche ist die Choroidea etabliert, während die Retina etwa in der 36. Schwangerschaftswoche komplett nach nasal, in der 40. Schwangerschaftswoche komplett nach temporal vaskularisiert ist^{15,16}.

1.4 Pathologische Angiogenese

1.4.1 Vaskuläre Erkrankungen der Netzhaut

Nach spätestens der 40. Schwangerschaftswoche ist das retinale Gefäßsystem ausgereift und unterliegt danach unter physiologischen Umständen keinen größeren Veränderungen mehr. Die Gesamtheit der retinalen Gefäßerkrankungen definiert sich darüber, dass es zu einer Störung dieser vaskulären Homöostase kommt. Als Antwort auf unterschiedliche pathologische Stimuli wie beispielsweise Hypoxie oder Inflammation kommt es zu einer vaskulären Destabilisierung, die über eine erhöhte Gefäßleckage zum Netzhautödem führt. Tritt dies in der Makula auf, kommt es zum Visusverlust. Die Bildung von Neovaskularisationen kann als Endstrecke einer Vielzahl von retinalen vaskulären Erkrankungen gesehen werden, die entweder von der Choroidea (CNV) oder der Retina (RNV) ausgehen. Zu den häufigsten retinalen Gefäßerkrankungen gehören die neovaskuläre, auch „feuchte“ altersbedingte Makuladegeneration (AMD), die Diabetische Retinopathie mit dem diabetischen Makulaödem (DMÖ) und die proliferative bzw. nicht-proliferative diabetische Retinopathie (PDR bzw. NPDR), die Retinopathia praematurorum (ROP), choroidale Neovaskularisationen aufgrund pathologischer Myopie (myope CNV) und der retinale Zentralvenen-/Venenastverschluss (ZVV/VAV) mit Makulaödem und Neovaskularisationen. Sozioökonomisch sind die neovaskuläre AMD und die diabetische Retinopathie am bedeutendsten^{17,18}.

1.4.1.1 Nicht-neovaskuläre und neovaskuläre AMD

Epidemiologie

8,7% der Weltbevölkerung zwischen 45 und 85 Jahren leiden unter einer altersbedingten Makuladegeneration¹⁷. Epidemiologische Daten aus den USA belegen die Prävalenz später Formen mit starker Visuseinschränkung mit 0,05% vor dem 50. und 11,8% nach dem 80. Lebensjahr¹⁹. Durch die aktuelle demographische Entwicklung wird eine starke Zunahme der Inzidenzen von 196 Millionen Erkrankten im Jahr 2020 auf 288 Millionen im Jahr 2040 erwartet¹⁷.

Risikofaktoren

Die drei größten Risikofaktoren für die Entwicklung einer AMD sind Alter²⁰, Rauchen²¹ sowie Genetik (positive Familienanamnese)²². Als Altersschwelle zur Diagnose einer AMD wurde das 50. Lebensjahr festgelegt²³. Im Vergleich zu Nie-Rauchern beträgt die Odds Ratio (OR) für die Entwicklung einer AMD für Raucher 3,11²⁴, für ehemalige Raucher 1,13²⁵ bis 1,34²⁴. Genetisch ist das Komplement-System von großer Bedeutung^{26,27}. Homozygote Mutationen im Komplement-Faktor H sind mit einer OR von 7,4 für die Entstehung einer AMD verbunden (heterozygot: 4,6)²⁸. Ebenso wird Faktor D und C3 eine große Bedeutung zugeschrieben^{29,30}. Weitere Risikofaktoren sind Hyperopie >0,75 dpt. (OR 2,4 im Vergleich zu anderen Refraktionsfehlern), kardiovaskuläre Erkrankungen, arterielle Hypertonie, Störungen im Cholesterin- und Fettstoffwechsel, Übergewicht und weibliches Geschlecht^{31,32}.

Klassifizierung

Traditionell lässt sich die AMD in eine „trockene“ und eine „feuchte“, neovaskuläre Form einteilen, wobei letztere durch das Aussprossen von choroidalen Neovaskularisationen (oder auch retinalen Neovaskularisationen bei der retinalen angiomatösen Proliferation) aus der Aderhaut charakterisiert ist³³. Neuere Klassifizierungen unterscheiden nicht in „feucht“ und „trocken“, sondern in frühe, intermediäre und späte AMD^{18,23,34}. Klassisches Unterscheidungsmerkmal ist die Ausprägung von Drusen, welche als frühestes Zeichen der AMD als kuppelförmige, eosinophile Strukturen zwischen der Bruch-Membran und dem retinalen Pigmentepithel (RPE) entstehen³⁵.

1. **Frühe AMD:** Vorhandensein einzelner kleiner ($<63\ \mu\text{m}$) oder intermediärer ($63\text{-}124\ \mu\text{m}$) Drusen.
2. **Intermediäre AMD:** Vorhandensein zahlreicher kleiner oder intermediärer Drusen oder Auftreten großer ($\geq 125\ \mu\text{m}$) Drusen.
3. **Späte AMD:** Auftreten einer geographischen Atrophie durch progressiven RPE- und Photorezeptoruntergang (Spätform der „trockenen“ AMD) oder Auftreten von choroidalen Neovaskularisationen (CNV; „feuchte“ AMD).

Pathogenese

Die Pathogenese der AMD ist noch nicht gänzlich geklärt. An der Ausbildung einer AMD sind folgende Strukturen beteiligt: Photorezeptorzellen, RPE, Bruch-Membran und die Choriokapillaris. Veränderungen dieser Strukturen führen letztlich zum typischen Erscheinungsbild der frühen AMD, jedoch müssen nicht alle Veränderungen gleichzeitig vorkommen, um zu einer Ausbildung der Erkrankung zu führen. Auf histopathologischer Ebene gehen dem drei altersbedingte Prozesse voraus, die bei Patienten mit AMD stärker ausgeprägt sind als bei nicht Betroffenen:

Atrophie der Choriokapillaris

Histologische Studien weisen darauf hin, dass die Dichte der Choriokapillaris mit zunehmendem Alter abnimmt und diese eine mehr tubuläre Form annimmt³⁶. Dieser Verlust bzw. diese Verengung der Strukturen scheint bei der AMD deutlich stärker ausgeprägt zu sein. Eine Degeneration der Choriokapillaris ist insbesondere bei der frühen AMD zu beobachten, noch bevor eine echte Atrophie des RPE stattfindet. Die Veränderungen scheinen tatsächlich auch nur auf die Choriokapillaris begrenzt zu sein, während die äußere Choroidea unabhängig vom Krankheitsstadium nicht bzw. nur wenig betroffen ist³⁷.

Verdickung der Bruch'schen Membran.

Eine Ursache dafür ist die pathologisch verdickte Bruch-Membran, die eine Diffusion von VEGF aus dem RPE choroideawärts erschwert, wodurch sich die durch diesen Wachstumsfaktor geprägte Struktur der Choriokapillaris verändert^{38,39}. Bei der AMD ist eine signifikant dickere Bruch-Membran beschrieben als durch das normale Altern zu erklären wäre und zwar durch die

Akkumulierung von sog. „basal laminar deposits“⁴⁰ (zu deutsch: Basale laminäre Ablagerungen). Die Bestandteile der basalen laminären Ablagerungen wurden in der Vergangenheit mehrfach untersucht. Als mitursächlich nahm man einen hohen Lipidgehalt der Bruch-Membran an, da die hydraulische Leitfähigkeit eben dieser im Alter deutlich abnimmt und es im sub-RPE-Raum zu Wassereinlagerungen kommt⁴¹. Es folgten mehrere Studien in denen nicht eindeutig geklärt werden konnte, ob der Anteil an Phospholipiden⁴² oder der Anteil an Cholesterol oder Cholesterol-Estern höher ist⁴³. Deutlich wurde jedoch, dass die Lipide zellulären Ursprungs zu sein scheinen und aus dem RPE entstammen. Letztlich ist anzunehmen, dass die verdickte Bruch-Membran und die Lipidakkumulation zu einem verminderten Durchfluss von Wasser und Metaboliten zwischen dem retinalen Pigmentepithel und der Choroidea führen. Hierbei ist zu bedenken, dass eine bereits verdickte Bruch-Membran eine Bedingung für die Lipid-Akkumulation zu sein scheint und das bereits vorher eine Reihe von Proteinen zu einer beginnenden Verdickung führen. Eine Akkumulation von β -Amyloid⁴⁴ und Vitronectin⁴⁵⁻⁴⁷ scheint in dieser Frühphase eine zentrale Rolle zu spielen, gefolgt von einer Anreicherung von Elementen des Komplementsystems und Metalloproteinasen. Insbesondere C3, C5b – C9 und Komplementfaktor H (CFH – complement factor H)⁴⁸; MMP2, MMP9 und MMP1 wird eine zentrale Rolle in der reaktiven, chronischen inflammatorischen Reaktion zugeschrieben, welche weiter zum Fortschreiten der AMD beiträgt⁴⁹.

Veränderungen des RPE: oxidativer Stress und sekretorische Aktivität

Wie zu Beginn erwähnt trägt auch das RPE seinen Anteil an der Entwicklung der frühen AMD bis zur geographischen Atrophie bei: Zum einen besetzen Residualkörper einen immer größeren Teil des zytoplasmatischen Volumens und beeinflussen so den Zellmetabolismus⁵⁰. Zum anderen ist das Lipofuscin als wesentlicher Bestandteil der Residualkörper ein Erzeuger von freien Radikalen und kann so zu Zellschäden führen⁵¹. Wie Zhou et al. bereits zeigte, scheint das Lipofuscin, beziehungsweise dessen Oxidationsprodukte, eine Aktivierung der Komplementkaskade zu begünstigen, welche wiederum zu einer Verdickung der Bruch'schen Membran führt,⁵² und die oben beschriebenen Mechanismen initiiert.

Während folglich auch die äußere Retina beziehungsweise die Fotorezeptoren durch die oben beschriebenen Vorgänge Veränderungen durchlaufen können, gibt es auch mehrere Beobachtungen, die zeigen, dass eine pathologisch veränderte Fotorezeptorschicht in der frühen AMD auch ohne Veränderungen im RPE oder in der Bruch'schen Membran vorkommen kann. Hinweise darauf gab es zum Beispiel bei den Untersuchungen durch Coffey et al, in denen eine CFH^{-/-} Maus deutliche Alterationen der Fotorezeptorschicht sowie einen deutlichen Anstieg der Konzentration von Komplementfaktor C3 in der äußeren Retina zeigte⁵³. Passend dazu zeigte Kim YH et al, dass CFH-Sekretion des RPE typischerweise apikal, statt choroideawärts stattfindet und so zunächst eher Veränderungen in der äußeren Retina als in der Bruch'schen Membran verursacht⁵⁴.

Letztlich liegt bei der AMD (oder der frühen AMD) eine multifaktorielle Pathogenese vor, bei der mehrere pathogenetische Prozesse unabhängig voneinander parallel stattfinden. Aus diesem Grund wirkt sich die therapeutische Beeinflussung eines einzelnen Vorgangs nur modifizierend

aus. Multimodale oder für den jeweiligen AMD-Subtyp modifizierte Therapieansätze könnten ein vielversprechendes Konzept für die Zukunft darstellen.

Neovaskuläre AMD

Die Prävalenz der neovaskulären AMD (nAMD) beträgt in den Industrienationen 0,17% zwischen dem 55. und 64. Lebensjahr und steigt bei über 85-Jährigen auf 5,8%²⁴. Auch wenn sie nur 10-15% aller AMD-Erkrankungsfälle ausmacht, zeichnet sie sich für über 80% aller starken Visusverluste verantwortlich⁵⁵. Verzerrungen im Sehen, insbesondere beim Lesen, aber auch Zentralskotome oder einfaches Verschwommensehen sind typische Erstmanifestationen der nAMD^{33,56}. Eine Vielzahl von Patienten zeigt jedoch auch keine frühe Symptomatik⁵⁶. Symptome entstehen meist durch sub- oder intraretinale Flüssigkeit, Elevationen des RPE und/oder Veränderungen bzw. Destruktionen der Photorezeptoren⁵⁷⁻⁵⁹. Eine „neovaskuläre“ AMD als Verlaufsform der späten AMD ist definiert durch das Vorhandensein einer choroidalen neovaskulären Membran (oder retinochoroidalen Membran bei der retinalen angiomatösen Proliferation), die entweder unter dem RPE begrenzt bleibt oder je nach Typ durch die Bruchmembran bricht und in einigen Fällen Anastomosen mit retinalen Gefäßen (auch retinalen Neovaskularisationen) ausbilden kann⁵⁹. Der Stimulus dieser Angiogenese wird im folgenden Abschnitt genauer erläutert. Als unbestritten gilt derzeit, dass der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) dabei eine Schlüsselrolle einnimmt⁶⁰.

1.5 Wachstumsfaktoren in der Angiogenese

1.5.1 Vascular endothelial growth factor (VEGF)

1.5.1.1 VEGF: Das Molekül

Die Existenz eines pro-angiogenetischen Wachstumsfaktors wurde erstmals 1948 von Michaelson⁶¹ postuliert, der die Vaskulogenese der Netzhaut an Katzen beobachtete. Er stellte die Hypothese auf, dass die sich entwickelnde Netzhaut eine biochemisch aktive Substanz sezernieren müsse, die die Bildung von Gefäßen stimuliere – und dass die Sekretion dieser Substanz auf einem veränderten Metabolismus der Netzhaut beruhe, der einer Optimierung der retinalen Perfusion bedürfe. Erstmals nachgewiesen wurde ein solches Protein 1983 von Senger⁶² in Aszites von tumorkranken Tieren. Es hatte ein Molekulargewicht von 34-42 kDA und besaß die Fähigkeit, bestehende Gefäße permeabel zu machen – weshalb es zunächst *vascular permeability factor* (VPF) genannt wurde. Ferrara⁶³ gelang es schließlich 1989, dieses Protein zu isolieren und zu klonieren. Da es eine stark stimulierende Wirkung auf das Wachstum vaskulärer Zellen hatte, wurde es von VPF in *vascular endothelial growth factor* (VEGF) umbenannt.

Die VEGF-Familie besteht aus Polypeptiden, die über Disulfidbrücken Homodimere mit einem Molekulargewicht von etwa 43 kDA bilden. Zur Proteinfamilie gehören VEGF-A, PlGF (placental growth factor), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, virale Homologe von VEGF-E und VEGF-F, die in

Schlangengift zu finden sind. Während die anderen Wachstumsfaktoren unter anderem für Vasculogenese und Lymphangiogenese verantwortlich sind, beruht die pathologische Angiogenese des Erwachsenen (besonders im Rahmen okulärer neovaskulärer Erkrankungen) hauptsächlich auf VEGF-A⁶⁴, weshalb in dieser Arbeit der Fokus auf diesem Wachstumsfaktor liegt. Im Folgenden ist analog zur Literatur immer VEGF-A gemeint, wenn von VEGF die Rede ist.

Das VEGF-Gen besteht aus acht Exons, aus denen durch alternatives mRNA-Splicing verschiedene Isoformen entstehen können^{65,66}. Diese Isoformen gliedern sich in zwei Gruppen: Findet das Splicing am proximalen Exon 8 statt, entstehen VEGF_{xxx}-Isoformen, die pro-angiogenetisch sind; am distalen Exon 8 dagegen entstehen VEGF_{xxx}-Isoformen, die anti-angiogenetisch sind⁶⁷. Die bedeutendsten vier Isoformen stellen VEGF₁₂₁/VEGF_{121b}, VEGF₁₆₅/VEGF_{165b}, VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆ dar; die tiefgestellte Zahl gibt dabei die Anzahl an Aminosäuren des jeweiligen Moleküls an. Unterschiede bestehen in der Fähigkeit der Bindung an Heparin und Heparansulfat, was die jeweilige Diffusionsfähigkeit und Bioaktivität bedingt. VEGF₁₂₁ kann als saures Polypeptid Heparin nicht binden, weshalb es frei diffundibel ist. VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆ haben dagegen eine so hohe Affinität zu Heparansulfat, dass sie nach der Sekretion fast ausschließlich an Zelloberflächen und extrazelluläre Matrix gebunden sind⁶⁸. VEGF₁₆₅ nimmt dabei eine Zwischenstellung ein; es kann frei diffundieren, hat aber aufgrund der Heparinbindungsfähigkeit eine etwa 100-fach erhöhte biologische Aktivität gegenüber VEGF₁₂₁⁶⁹, was es zur wichtigsten Isoform macht⁷⁰.

1.5.1.2 VEGF: Rezeptoren

VEGF vermittelt seine Wirkung hauptsächlich über die zwei Rezeptor-Tyrosinkinasen VEGFR-1 (Flt-1) und VEGFR-2 (Flk-1/KDR)⁷¹⁻⁷³. Der ebenso zur Rezeptorfamilie gehörende VEGFR-3 (Flt-4) bindet ausschließlich VEGF-C/D und hat seine Funktion in der Lymphangiogenese. Zusätzliche Signaltransduktion für VEGF findet über Neuropilin (NRP1 und NRP2) statt.

Die Induktion pro-angiogenetischer Prozesse durch VEGF wird hauptsächlich über VEGFR-2 vermittelt, wodurch es zur Aktivierung verschiedener Signaltransduktoren wie Phosphatidylinositol-3'-Kinase (PI3-Kinase), Phospholipase C oder Ras GTPase-aktivierendes Protein kommt⁷⁴. Daraus resultiert eine Vielzahl zellulärer biologischer Funktionen (s. 1.6.1.3).

Die Funktion von VEGFR-1 (Flt-1) ist nicht eindeutig geklärt. Es wird aber angenommen, dass VEGFR-1 als *Decoy*-Rezeptor fungiert⁷⁵, d.h. VEGF zwar gebunden wird, aber keinerlei intrazelluläre Prozesse initiiert werden, wodurch dem Rezeptor eine anti-angiogenetische Funktion zuteilwird. Gestützt wird diese Hypothese durch die Tatsache, dass die Deletion der Tyrosinkinase-Domäne von VEGFR-1 bei sonst intaktem Rezeptor Angiogenese und Lebensfähigkeit im murinen Tiermodell nicht einschränkt⁷⁶, während eine komplette Deletion von VEGFR-1 nicht mit dem Leben vereinbar ist^{77,78}. Zusätzlich kann durch alternatives Splicing eine Unterform von VEGFR-1 entstehen, der die Transmembran- und Tyrosinkinasedomäne fehlen. Dadurch wird dieser Rezeptor (sFlt-1) löslich und antagonisiert durch Abfangen von VEGF dessen pro-angiogenetische Wirkung⁷⁹.

Neuropilin-1 und -2 (NRP1 und NRP2) sind Co-Rezeptoren für VEGF. NRP1 verstärkt bei gleichzeitiger Expression mit VEGFR-2 die Wirkung von VEGF₁₆₅ an VEGFR-2 (nicht jedoch von

VEGF₁₂₁)⁸⁰. In diesem Zusammenhang haben NRP1 und NRP2 keine eigene Signaltransduktion⁸¹. NRP2 ist über die Bindung von Semaphorinen für die Führung von Axonen in der neuronalen Entwicklung verantwortlich⁸².

1.5.1.3 VEGF: Regulierung der Expression

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von VEGF durch eine Reihe von Signalmolekülen gesteuert wird. Hierzu gehören Wachstumsfaktoren wie Epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor- α und β (TGF- α/β), insulin-like growth factor-1 (IGF-1), fibroblast growth factor (FGF), keratinocyte growth factor (KGF) und platelet-derived growth factor (PDGF)^{66,70}. Auch inflammatorische Zytokine wie IL-1 α und IL-6 können die Expression von VEGF induzieren, wodurch die Hypothese gestützt wird, dass VEGF im Rahmen von Entzündungen für erhöhte vaskuläre Permeabilität verantwortlich ist^{83,84}. Eine ähnliche Funktion haben Hormone wie Thyroidea stimulierendes Hormon (TSH) bei Schilddrüsenkarzinomen⁸⁵, Corticotropine⁸⁶ und Gonadotropine⁸⁷.

Unerlässlich für das Wachstum solider Tumoren jenseits der kritischen Größe von 1-2 mm ist die Bildung versorgender Gefäße. Es konnte gezeigt werden, dass die Mutation verschiedener Onkogene die Expression von VEGF induziert; als prominentestes Beispiel sei hier die GTPase K-Ras genannt^{88,89}.

Die Schlüsselrolle in der Regulation von VEGF spielt allerdings die Hypoxie⁹⁰. Liegt in einem Gewebe ein zu niedriger Sauerstoffpartialdruck vor, kommt es über die Induktion des Transkriptionsfaktors HIF (hypoxia-inducible factor) zur vermehrten Expression von VEGF⁹¹, wodurch der Hypoxie über eine vermehrte Vaskularisierung entgegengewirkt werden soll. HIF ist ein Heterodimer, das aus den zwei Untereinheiten HIF-1 α und HIF-1 β besteht. Unter Normoxie ist HIF-1 α an zwei Prolylresten hydroxiliert, wodurch es von der von Hippel-Lindau-E3-Ubiquitinligase erkannt und dem proteasomalen Abbau zugeführt wird. Unter Hypoxie dagegen kommt es zur Bildung des Heterodimers HIF-1 α /HIF-1 β , welcher die Transkription einer Reihe von Genen hochreguliert, die für das zelluläre Überleben unter Sauerstoffmangel wichtig sind – unter anderem VEGF, Erythropoetin und Enzyme der Glykolyse^{91,92}.

1.5.1.4 VEGF: Biologische Funktionen

Die erste, von Senger 1983⁶² dokumentierte Wirkung von VEGF war die Fähigkeit, Gefäße permeabel zu machen. In diesem Zusammenhang hat der Aspekt der Abdichtung von Gefäßleckagen durch anti-VEGF in der ophthalmologischen Therapie von retinalen Ödemen große Bedeutung. Auf zellulärer Ebene wirkt VEGF hauptsächlich auf Endothelzellen: Es induziert Prozesse der Angiogenese wie Migration, Proliferation und Tube formation und erhöht die Aktivität von Matrix-Metalloproteinasen. *In vitro* wie *in vivo* wirkt VEGF auf Endothelzellen anti-apoptotisch^{93,94}. Zusätzlich hat es Effekte auf die monozytäre Migration⁹⁵ und Koloniebildung von Granulozyten-Makrophagen-Vorläuferzellen⁹⁶.

Neure Daten belegen, dass die Funktion von VEGF je nach Ursprung des Wachstumsfaktors differiert: Während exogenes, d.h. nicht von der Effektorzelle (in diesem Falle Endothelzelle) stammende VEGF-Prozesse der Angiogenese initiiert⁹⁷, ist die autokrine Sekretion und Wirkung für die vaskuläre Homöostase unerlässlich⁹⁸.

1.5.1.5 VEGF: Bedeutung für okuläre neovaskuläre Erkrankungen

Aiello konnte 1994⁶⁴ erstmals VEGF in okulären Flüssigkeiten von Patienten mit aktiven neovaskulären Erkrankungen nachweisen (Kammerwasser, Glaskörper, subretinale Flüssigkeit). Zudem zeigten sich die Konzentrationen von VEGF bei Patienten mit aktiver Neovaskularisation signifikant höher als bei inaktiver, abgelaufener Neovaskularisation. Lagen keine neovaskulären Erkrankungen vor, konnte nur in einem Bruchteil der Proben VEGF nachgewiesen werden, und die Konzentrationen des Wachstumsfaktors waren sehr gering. Ein Jahr später konnte Aiello zeigen, dass retinale Zellen (Pigmentepithelzellen, Endothelzellen und Perizyten) die Quelle des okulären VEGF unter Hypoxie darstellen⁹⁹. Ebenso wies er 1995 nach, dass Neovaskularisationen im murinen Modell der hypoxischen Retinopathie durch anti-VEGF-Antikörper signifikant reduziert werden können¹⁰⁰. Durch eine Vielzahl kommerziell verfügbarer Antikörper für verschiedene Indikationen wurde die Therapie okulärer neovaskulärer Erkrankungen in den letzten Jahren revolutioniert.

1.5.1.6 VEGF-R: Therapeutisches Ziel bei der neovaskulären AMD

Nach zunächst ernüchternden Ergebnissen mit einem VEGF-Aptamer (Macugen®)¹⁰¹, zeigte sich eine Inhibition des VEGF-Moleküls mit intravitreal verabreichten Medikamenten als die wirkungsvollere Alternative. Durch intravitreale Gabe des humanisierten monoklonalen anti-VEGF Antikörpers Bevacizumab konnte erstmals die choroidale Neovaskularisation im Rahmen der AMD (und auch anderer neovaskulärer Netzhauterkrankungen) kontrolliert werden. Eine Zulassung erhielten später eigens dafür entwickelten Medikamente, allen voran Ranibizumab (Lucentis®, Novartis AG), Aflibercept (Eylea®, Bayer AG), welches zusätzlich PlGF (Placenta-Like Growth Factor) hemmt sowie seit 2022 Brolucizumab (Bevou®, Novartis AG). Erst 2023 zugelassen wurde auch der bivalente Wirkstoff Faricimab (Vabysmo®, Genentech), dessen primäres therapeutisches Ziel eine Hemmung von VEGF-A und Angiopoietin 2 ist¹⁰². Während die ersten Zulassungsstudien gute Ergebnisse insbesondere auf die Therapiefrequenz- und das Ansprechen zeigen¹⁰², stehen noch sogenannte „real-life“-Daten zum Zeitpunkt dieser Arbeit aus.

Ziel des bisherigen Therapiestandards ist eine Stabilisierung des Netzhautbefundes durch Eindämmung der Erkrankungsaktivität. Oft lässt sich die Ausgangssehschärfe vor Erkrankungsbeginn aber trotz Therapie nicht mehr erreichen¹⁰³. Hauptverantwortlich für diese Problematik ist die Entstehung einer Netzhautfibrose im Sinne einer Wundheilungsreaktion, die bei etwa 50% aller Patienten nach zwei Jahren auftritt¹⁰⁴. Es wurde gezeigt, dass ein großer Teil dieser Narbe aus durch anti-VEGF fibrotisch umgewandelten Gefäßmembranen besteht^{105,106}. Zusätzlich zu eben erwähnten Limitierungen stellt die hohe Therapieintensität der etablierten anti-VEGF-

Wirkstoffe mit monatlichen bis zweimonatlichen Injektionen über mehrere Jahre, neuerdings auch drei- und viermonatlichen Injektionen, sowohl für die Patienten, als auch für das Gesundheitssystem eine große Herausforderung dar.

Eine weitere Erklärung für das möglicherweise unzureichende Ansprechen auf anti-VEGF-Injektionen ist eine partielle anti-VEGF-Resistenz durch (beginnende) Besiedelung der Neovessels mit Perizyten^{13,107-110}.

1.5.2 Perizyten und der Platelet-Derived growth factor (PDGF)

1.5.2.1 Perizyten

Perizyten sind vaskuläre Gefäßwandzellen, die in die vaskuläre Basalmembran eingebettet sind¹¹⁰. Ihre Lokalisation ist meist auf kapilläre Strukturen bzw. Arteriolen und Venolen begrenzt, während in großen Gefäßen meist vaskuläre glatte Muskelzellen zu finden sind, die sich in Lokalisation, Morphologie und Markerexpression von den Perizyten – trotz ihrer Verwandtschaft – unterscheiden^{111,112}. Morphologisch erscheinen sie als längliche, schlanke und polymorphe Zellen, die Kontakt zur selben Basalmembran haben wie die Endothelzellen, außer in den Bereichen eines direkten Kontakts zu Ihnen über Gap-Junctions^{110,113}. Ihre Funktion besteht vor allem in Bildung und Erhaltung einer gesunden Mikrovaskulatur, so auch in der Retina. Perizyten sind kontraktile, regeln die Permeabilität und dienen als Wachstumsmodulator für Endothelzellen mit beträchtlichem Potenzial zur mesenchymalen Transformation¹¹³. Die Gefäßmaturierung in der Retina ist erst nach Besiedlung mit Perizyten abgeschlossen. Diese sind jedoch größtenteils VEGF-unabhängig und werden insbesondere über den Platelet derived growth factor (PDGF) gesteuert. Ihre Konzentration ist in der Retina besonders hoch: Auf eine Endothelzelle folgt mit einem Verhältnis von 1:1 ein Perizyt. Im Gegensatz dazu liegt das Verhältnis Endothelzelle zu Perizyten in Arterien der Skelettmuskulatur bei 1:100¹¹⁴. Somit kommt gerade in der Retina dem Perizyten eine besondere Bedeutung zu und es ist bei einer beginnend partiellen Maturierung der choroidalen Neovaskularisation von einer zunehmenden VEGF-unabhängigkeit auszugehen¹³.

1.5.2.2 PDGF: Das Molekül

Der Platelet derived growth factor (PDGF) wurde 1974 von Ross¹¹⁵ entdeckt, als er in der Arterioskleroseforschung auf der Suche nach einem Molekül war, dass nach einer Endothelläsion vaskuläre glatte Muskelzellen zum Ort der Läsion migrieren und dort proliferieren ließ. Die PDGF-Wachstumsfaktorfamilie besteht ähnlich wie VEGF aus fünf Polypeptiden, die ein Molekulargewicht von 30 kDA haben und Heparin binden können¹¹⁶. Sie liegen als vier Homodimere und ein Heterodimer vor; aus den Untereinheiten A, B, C und D bilden sich die Moleküle PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-CC, PDGF-DD und PDGF-AB¹¹⁷⁻¹²⁰. *In vivo* wird die Bildung von Homodimeren bevorzugt. PDGF-CC und PDGF-DD werden als inaktive Vorstufen sezerniert und erst durch tPA

(tissue plasminogen activator) oder Plasmin bzw. Urokinase oder Matriptase in ihre aktive Form überführt¹²¹⁻¹²³.

1.5.2.3 PDGF: Rezeptoren

Für die Signaltransduktion stehen die zwei Rezeptor-Tyrosinkinasen PDGFR α und PDGFR β zur Verfügung, die bei Bindung von PDGF dimerisieren und sich autophosphorylieren¹²⁴⁻¹²⁶. PDGFR α hat eine hohe Affinität zu PDGF-A, -B und -C, während PDGFR β bevorzugt PDGF-B und -D bindet¹²⁷. *In vivo* scheinen die Bindung von PDGF-AA und -CC an PDGFR α und von PDGF-BB (und wahrscheinlich -DD) an PDGFR β am bedeutendsten zu sein¹²⁸. Je nach Kombination der PDGFR-Untereinheiten können aber verschiedene Rezeptordimere entstehen: PDGFR $\alpha\alpha$ kann durch Bindung von PDGF-AA, -BB, -CC und -AB entstehen, während PDGFR $\beta\beta$ durch PDGF-BB und -DD induziert wird. Für die Bildung von PDGFR $\alpha\beta$ sind PDGF-AB, -BB, -CC und -DD verantwortlich¹²⁸. Nach intrazellulär wird das Signal über die Aktivierung von Tyrosinkinasen der Src-Familie, die SHP-2 Tyrosinphosphatase, die Phospholipase C- γ (PLC- γ) und das GTPase-aktivierende Protein (GAP) für Ras weitergeleitet. Ebenso kommt es zur Aktivierung von STAT-Molekülen (signal transducers and activators of transcription), die in den Zellkern transloziert werden und dort als Transkriptionsfaktoren wirken.

1.5.2.4 PDGF: Regulierung der Expression

Die Hauptquelle von PDGF stellen Epithel- und Endothelzellen dar. Induziert wird die Expression von PDGF durch eine Vielzahl exogener Faktoren, zu denen Hypoxie¹²⁹, Thrombin¹³⁰ sowie die Stimulation mit diversen Zytokinen und Wachstumsfaktoren gehören.

1.5.2.5 PDGF: Biologische Funktionen

PDGF ist in humanem Plasma physiologischerweise nicht nachweisbar; experimentell intravenös appliziertes PDGF hat im Tiermodell (Pavian) eine Halbwertszeit von zwei Minuten¹³¹. Diese Tatsachen deuten darauf hin, dass die Wirkung von PDGF über lokale Synthese und Sekretion vermittelt wird. Zelluläre Effektoren der hauptsächlich parakrinen Signaltransduktion sind Fibroblasten, Perizyten und glatte Muskelzellen, wodurch sich zwei große Bereiche seiner Wirkung erschließen: Wundheilung und Angiogenese.

Beim Erwachsenen moduliert PDGF die zelluläre Funktion im Rahmen der Wundheilung durch Förderung von Proliferation und Migration von Fibroblasten und Induktion der Angiogenese im Wundbereich.

Im Rahmen der Angiogenese spielt PDGF eine Schlüsselrolle über die Induktion der Expression von VEGF, wodurch die Endothelzellfunktion stimuliert wird. Zusätzlich ist PDGF das wichtigste Molekül in der Rekrutierung perivaskulärer Zellen wie Perizyten und glatter Muskelzellen, die im letzten Schritt der Angiogenese frisch entstandene Gefäße ‚matur‘ werden lassen und damit stabilisieren. Quelle des PDGF während der Angiogenese sind dabei die an der Gefäßbildung

beteiligten Endothelzellen. Kernbestandteile dieser sog. ‚vessel maturation‘ sind die Migration und Proliferation perivaskulärer Zellen sowie die Induktion der Expression von pro-survival-Signalen an Endothelzellen¹³.

Embryologisch spielt PDGF eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Gehirn, Niere, Darm, Haut, Hoden und des kardiovaskulären und respiratorischen Systems. Zusätzlich gibt es Hinweise, dass PDGF beim Erwachsenen regulierend auf Erythropoese und Knochenbildung einwirkt^{110,132}.

1.5.3 Mammalian Target of Rapamycin (m-TOR) und dessen Inhibitor Rapamycin

Das mammalian (oder: mechanistic) target of rapamycin (mTOR) ist eine Serin-/Threonin Proteinkinase, die eine katalytische Untereinheit von zwei unterschiedlichen Proteinkomplexen bildet – das mTORC1 und das mTORC2¹³³ – und eine zentrale Rolle in Zellwachstum, Differenzierung, Autophagie, Immunantwort und Metabolismus spielt. Einen potenten Inhibitor von mTORC1, weniger von mTORC2, stellt das im Rahmen dieser Arbeit vorgestellte Metabolit Rapamycin (Medikamentennahme: Sirolimus) dar, das in Abschnitt 1.5.3.4 genauer erläutert wird. Im Folgenden wird zunächst ein grober Überblick, über die komplexen Zusammenhänge der Up- und Downstream Signalwege beider Untereinheiten von mTOR gegeben.

1.5.3.1 mTOR – Complex 1 (mTORC1)

mTORC1 spielt eine zentrale Rolle bei Zellprozessen, die wichtig für Wachstum und Proliferation sind, kontrolliert aber auch die Balance zwischen anabolischen und katabolischen Prozessen mit dem obersten Ziel der Energiehomöostase¹³³. Der proliferativen Aktivität sind daher mehrere negative feedback loops zwischengeschaltet. Wenn auch die Hauptfunktion in der Aktivierung von Metabolismus und Proliferation zu suchen ist, so inhibiert mTORC1 auch direkt katabole bzw. autophagie Prozesse, indem es durch Phosphorylierung von z.B. ULK1 (unc-51 like autophagy activating kinase 1, wichtig für die Formation von Autophagosomen) dessen Aktivierung durch AMPK verhindert¹³⁴. Ebenfalls erfolgt durch die Hemmung von mTORC1 ein schneller Anstieg der Aktivitäten des Ubiquitin-Proteasom-Systems, welche aktiv zur Proteolyse beitragen^{135,136}.

Aus folgenden Bestandteilen setzt sich mTORC1 zusammen: mTOR, Raptor (regulatory protein associated with mTOR) und mLST8 (mammalian lethal with Sec13 protein 8)¹³⁷⁻¹³⁹. Seine zwei inhibitorischen Untereinheiten sind PRAS40 (proline-rich Akt substrate of 40 kDa)¹⁴⁰⁻¹⁴² und DEP-TOR (DEP domain containing mTor interacting protein)¹⁴³.

Upstream-Signalwege von mTORC1

Die mTORC1 Aktivität wird durch zahlreiche Stimuli geregelt. Allen voran Wachstumsfaktoren, Energiebedarf, Aminosäuren und Hypoxie. Insbesondere ein erhöhtes Energievorkommen (zum Beispiel nach einer Nahrungsaufnahme) führt zur unmittelbaren Aktivierung von mTORC1 und dadurch zum gesteigerten Anabolismus¹³³. Im Folgenden werden die verschiedenen Upstream-

Signalwege vorgestellt, die zu einer Aktivierung von mTORC1 führen können, sowie die im Rahmen dieser Arbeit wichtigen Signalwege im Rahmen der Hypoxie-gesteuerten Angiogenese.

Wachstumsfaktoren

Die mTOR Kaskade ist das Ziel multipler Wachstumsfaktoren¹³³. Beispielsweise bindet Insulin an die Rezeptortyrosinkinasen Insulin-Rezeptor und Insulin-like growth-factor 1-Rezeptor mit nachfolgender Phosphorylierung verschiedener Insulinrezeptorsubstratproteine. Durch deren Phosphorylierung werden z.B. für Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) Bindungsstellen freigelegt, wodurch der Phosphatidylinositol (3,4,5)-Triphosphat (PIP3)-Akt-Signalweg als direkter Upstream-Aktivator von mTORC1 aktiviert wird (siehe Abb. Downstream Aktivierung von mTORC1)¹⁴⁴. Die Akt-PIP3-mTOR Achse spielt in durch mTORC1 vermittelten Prozessen eine zentrale Rolle (siehe weiter unten „Hypoxie und der Akt-Signalweg“).

Bereits in frühen Studien zu Rapamycin konnte festgestellt werden, dass zahlreiche Signalwege verschiedener Wachstumsfaktoren im Tuberöse-Sklerose-Komplex (TSC) enden, wodurch die Aktivierung von mTORC1 gehemmt wird¹³³. Der TSC fungiert dabei als GTPase-aktivierendes Protein (GAP), das den Austausch von GTP zu GDP vermittelt und die kleine GTPase Rheb inaktiviert^{145,146}. Im aktivierten Zustand bindet Rheb direkt an mTORC1 und trägt zu dessen Aktivierung bei^{140,147}. Somit führt also die **Inhibition** von TSC zur Aktivierung von mTORC1, während eine Stimulation von TSC zu deren Inaktivierung führt.

Inhibierende Signale

Bei Signalen die inkompatibel mit Zellwachstum sind, wird über Upstream-Wege die mTORC1-Aktivierung gehemmt: Niedrige Glukoselevel und niedriges ATP führen zu einer Aktivierung der AMP-abhängigen Kinase (AMPK), welche mTORC1 durch Phosphorylierung und somit Aktivierung von TSC2 (Tuberöse-Sklerose-Komplex 2) hemmt^{145,148,149}. Auch DNA-Schäden führen p53-vermittelt zur Aktivierung von AMPK und letztlich damit des TSC und einer Hemmung von mTORC1¹⁵⁰.

Stimulierende Signale

Durch eine hohe Aminosäurenverfügbarkeit zum Beispiel nach Nahrungsaufnahme kommt es zu einer erhöhten Aktivierung von mTORC1 über heterodimere Rag-GTPasen¹³³. Diese werden durch Aminosäuren stimuliert und in ein aktives Stadium versetzt, wodurch sie Raptor binden und dann ebenfalls aktivieren. Diese Aktivierung führt zu einer Rekrutierung von mTORC1 an die lysosomale Oberfläche wo das Rheb lokalisiert ist und dieses letztlich zu einer Aktivierung von mTORC1 führt¹⁵¹⁻¹⁵⁴. Desweiteren werden anabole Prozesse in Gang gesetzt, die mTORC1 zu einem Schlüsselregulator, zum Beispiel bei der Muskelsynthese machen¹⁴⁴.

Hypoxie und der AKT-Signalweg

Akt zählt zu den wichtigsten Upstream-Molekülen von mTORC1¹⁵⁵. Der PI3K/Akt-Signalweg ist ein wichtiger zellulärer Signalweg und spielt eine Schlüsselrolle in Proliferation, Zelladhäsion, Migration und der Angiogenese. Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3K) sind Enzyme, die das 3'OH des Inositol-Rings des Phosphatidylinositols phosphorylieren und bestehen aus drei verschiedenen Klassen. Letztlich bewirkt PI3K die Aktivierung zur Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphatase (PIP3) welches wiederum eine vitale Rolle in vielen Signalwegen spielt und über eine Aktivierung der Serin-/Threoninkinasen PDK1 und Akt auch mTORC1 aktiviert¹⁵⁶⁻¹⁵⁸. Wie oben beschrieben geschieht dies über eine Hemmung des Tuberöse-Sklerose-Komplexes. Parallel dazu stimuliert Akt auch die Stickstoffmonoxid-Produktion in Endothelzellen, was wiederum zu einer erhöhten VEGF-Konzentration führt und somit indirekt auch zu einer mTOR-unabhängigen Stimulierung der Angiogenese bzw. proangiogenetischer Wachstumsfaktoren (Siehe Abb. 3). Akt selbst wird, nachdem es von PIP3 zur Plasmamembran rekrutiert wurde, von PDK1 und mTORC2 aktiviert¹⁴⁴. Somit kann Akt als Down- und Upstreamregulator des gesamten mTOR-Komplexes gesehen werden. Zusätzlich scheint, neben der Aktivierung von mTORC1, Akt im Sinne eines positiven Feedback Loops auch mTORC2 zu aktivieren (siehe Abschnitt mTORC2)¹⁵⁹.

Downstream-Effekte von mTORC1

Die Aktivierung des mTORC1 Komplexes erfolgt vermutlich an der lysosomalen Membran durch GTP-gebundene Rheb Proteine (Rheb-GTP)¹⁴⁷. Aktiviertes mTORC1 fördert die *Proteinsynthese* vor allem durch deren Initiierung. Dies geschieht direkt durch Phosphorylierung des ribosomalen Proteins p70S6 Kinase 1 (S6K1) und des eukaryotic initiation factor 4E (eIF4B)-bindenden Proteins (4EBP). Phosphoryliertes S6K1 aktiviert in der Folge weitere Substrate (unter anderem eIF4B), die zur Translation der messenger RNA (mRNA) beitragen. 4EBP wiederum inhibiert im nicht-phosphorylierten Zustand die Translation, indem es einen Komplex mit eIF4E bildet. Diese Komplexbildung wird durch die multiple Phosphorylierung durch mTORC1 unterbunden und führt damit zu einer Beschleunigung weiterer Translationsprozesse¹⁶⁰.

Des Weiteren wird durch die Aktivierung von SREBP (sterol responsive element binding protein) die *Lipidsynthese* gesteuert und aktiv beeinflusst¹⁶¹. Die Aktivierung von SREBP erfolgt bei niedrigen Sterol-Konzentrationen oder durch Phosphorylierung von S6K1 und Lipin-1^{162,163}. Die SREBP-Aktivierung führt darüber hinaus zu einem erhöhten Influx im oxidativen Pentose-Phosphat-Signalweg und somit zu einer erhöhten Ausbeute von NADPH, eines der wichtigsten Metaboliten für Proliferation und Wachstum¹⁶². Letztlich wird durch mTORC1 auch die Expression von MTHFD2 gefördert, die besonders wichtig für die *Purin-Synthese* ist¹⁶⁴.

Der Tumor-Suppressor Komplex TSC (tuberous sclerosis complex) 1/2, bestehend aus den Proteinen TSC1/hamartin und TSC2/tuberin stellt einen der negativen Hauptregulatoren des mTOR/S6K1 Signalweges dar¹⁶⁵. Loss of function Mutationen im TSC-Komplex führen zum Krankheitsbild der tuberösen Sklerose, bei der es durch konstitutive Aktivierung von mTORC1 zu einem unkontrollierten Zellwachstum mit Ausbildung von Hamartomen in multiplen Organen

kommt. Der TSC Komplex hemmt mTORC1 dadurch, dass er dessen Aktivierung unterdrückt. Dies ist der GTP-ase Aktivität von TSC geschuldet, wodurch TSC die Verfügbarkeit der für die mTORC1 Aktivierung erforderlichen Rheb-GTP Proteine steuert^{165,166}. Akt hat letztlich die Inhibierung von TSC zum Ziel, was durch dessen Phosphorylierung erreicht wird^{146,165}.

Insgesamt hat sich in den letzten Jahren gezeigt, dass eine Inhibierung von mTORC1 insgesamt zu einer eher moderaten und generellen Hemmung der mRNA-Translation führt. Besonders stark werden jedoch Pyrimidin-reiche 5' „TOP“ oder „TOP-ähnliche“ – Motive beeinflusst, die wiederum die meisten Gene enthalten, die in der Proteinsynthese involviert sind^{167,168}.

Die wohl für die Fragestellung dieser Arbeit wichtigste Funktion von mTORC1 besteht in ihrer Downstream-Aktivierung von HIF-1alpha, das, wie oben beschrieben, eine Schlüsselrolle bei der Angiogenese und in der Aktivierung von VEGF besitzt^{133,162}.

1.5.3.2 mTOR – Complex 2 (mTORC2)

Upstream-Signalwege von mTORC2

Die Effekte von mTORC2 werden hauptsächlich über dessen Untereinheit Sin1 – eine phosphoinositid-bindende pH-Domäne – vermittelt. Diese Untereinheit verhindert zunächst Aktivität durch mTORC2. Diese Blockade wird durch das Binden von PIP3 gelöst¹⁶⁹. Letztlich ist mTORC2 also ein Effektor des Insulin/PI3K-Signalweges (siehe 1.5.3.4).

Ein nennenswerter Effekt ist auch eine Akt-vermittelte Aktivierung im Sinne einer positiven Feedbackschleife: Guang et al zeigten, dass Akt die Untereinheit Sin1 an T86 phosphoryliert, was zu einer erhöhten mTORC2-Kinaseaktivität und letztlich wieder zur Phosphorylierung von Akt führt¹⁵⁹.

Paradoxe Weise wird mTORC2 auch durch mTORC1 hemmend reguliert, was durchaus therapeutische Konsequenz hat: Durch Phosphorylierung des Wachstumsfaktorrezeptor-gebundenen Proteins 10 (Growth factor receptor-bound protein 10 = Grb10) entsteht eine negative Feedback-Hemmung von PI3K^{170,171}. Dies wird zusätzlich durch eine negatives Feedback von S6K1 verstärkt, ein Protein das, wie oben beschrieben, durch mTORC1 aktiviert wird^{149,172}.

Downstream von mTORC2

Insgesamt ist über mTORC2 weniger bekannt als über mTORC1. Während Letzteres eher für Zellwachstum und -metabolismus verantwortlich ist, ist mTORC2 wichtig für Zellproliferation und das Zellüberleben¹³³. Dabei wirkt es über verschiedene Wege: Zum einen über die Phosphorylierung von mehreren Substraten der AGC-Familie der Proteinkinasen¹⁷³⁻¹⁷⁶ und zum anderen über die Aktivierung von Akt¹⁷⁷. Die Aktivierung von Akt erfolgt dabei synergistisch zusammen mit PDK1¹⁴⁴. Beide Substrate sind wichtig für die oben genannten Funktionen. Wie oben beschrieben werden durch die Phosphorylierung von Akt, einem Hauptbestandteil des Insulin-/PI3K Signalweges, zahlreiche wichtige Signalketten aktiviert bzw. inaktiviert (wie zum Beispiel die Inhibition des

Tuberöse-Sklerose-Komplexes), die Zellwachstum- und Proliferation zur Folge haben^{133,177}. Darüber hinaus scheint Akt auch die Angiogenese über die Regulation des Stickstoff-Levels zu stimulieren¹⁷⁸.

1.5.3.3 mTOR, Angiogenese und der PI3K/Akt-Signalweg

Im Rahmen dieser Arbeit ist vor allem der Einfluss mTORs auf die Angiogenese entscheidend. Neben der oben beschriebenen allgemeinen Wichtigkeit mTORs für Zellproliferation, -wachstum und -migration (somit auch geltend für Endothelzellen und Perizyten), sind insbesondere die komplexen Signalwege entscheidend, die zu einer vermehrten Angiogenese führen. Ausgangspunkt ist, wie oben durch die Akt-Signalkette angedeutet, auch hier die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges, der letztlich über mTOR und Beeinflussung des Stickstoffhaushaltes eine Hochregulierung von HIF-1 und darüber einen Anstieg von VEGF bewirkt (siehe Abbildung 3)¹⁷⁸.

Wie bereits durch Phung et al beschrieben, ist insbesondere eine anhaltende Akt-Aktivierung ein wichtiger Trigger für pathologische Angiogenese mit Wachstum krankhafter Blutgefäße und erhöhter Gefäßpermeabilität¹⁷⁹. Diese sind letztlich ursächlich für eine deutliche Visusminderung durch andauernde Bildung von intra- und subretinaler Flüssigkeit (Makulaödem)¹⁷⁹. Die Serin-/Threoninkinase Akt, gesteuert vor allem über PI3K, ist ein zentraler und wichtiger Regulator in den komplexen Signalwegen der Angiogenese^{178,180}. Hauptsächlich wird dies über die Regulation der Signalwege des Stickstoffoxids (NO) erreicht. Die Synthese des NO wird über die NO-Synthase (NOS) reguliert, von der mehrere Isoformen existieren: nNOS/NOS1, eNOS/NOS3 und das iNOS/NOS2¹⁸¹. Sowohl in VEGF-induzierter Angiogenese als auch bei der Gefäßpermeabilität scheint vor allem die endotheliale NOS (eNOS) von Bedeutung zu sein, wie Fukumura et al bereits in 2001 anhand von eNOS und iNOS – Knockout-Mäusen zeigen konnte¹⁸². Darüber hinaus kann NO die Expression und die transkriptionale Aktivität von HIF-1 erhöhen, was letztlich in der Induktion von VEGF-mRNA resultiert¹⁸³. Kasuno et al. zeigten hier ebenfalls, dass unabhängig von hypoxischer Umgebung, eine Inhibition von PI3K (Upstream-Molekül von Akt) auch zur Hemmung der Expression von NO und HIF-1 führte. PI3K vermittelt seine Wirkung mit Hilfe von Akt¹⁷⁸, weshalb die Kinase über die Akt-Aktivierung ebenfalls eine Schlüsselrolle in der Angiogenese einnimmt. Wenn VEGF an den Rezeptoren normaler Endothelzellen bindet, so werden PI3K-Signalwege aktiviert, die Angiogenese stimuliert und die vaskuläre Permeabilität erhöht¹⁸⁴. Darüber hinaus werden über den PI3K/Akt-Signalweg auch weitere kleinere Moleküle, die für Angiogenese essenziell sind, reguliert: Survivin, beispielsweise ist ein anti-apoptotisches Protein, welches als Antwort auf VEGF-Stimulation hochreguliert wird. Fehlt dieses Protein, so kann dies bereits zu embryonalen Defekten in der Angiogenese führen¹⁸⁵. Survivin könnte ein wesentlicher Grund dafür sein, warum einige Patienten schlecht oder nicht auf eine anti-VEGF-Behandlung ansprechen. So zeigten Tran et al, dass Survivin in Endothelzellen chemoprotektive Eigenschaften aufweist und diese Zellen vor medikamenten-induzierter Apoptose schützt¹⁸⁶. mTOR stimuliert die Akt-Aktivierung ebenfalls, alternativ zum PI3K-Signalweg und trägt somit zur (auch unkontrollierten) Angiogenese entscheidend bei¹⁷⁸. Allerdings wird Akt über die mTORC2-Untereinheit des mTOR aktiviert und Rapamycin ist vorwiegend ein Inhibitor des mTORC1. Somit resultiert initial zunächst keine klare Akt-Hemmung. Ganz im Gegenteil: Die alleinige Hemmung von mTORC1

führt zunächst einmal zur Hochregulierung des Insulin-Rezeptor-Substrat 1 welches wiederum eine vermehrte Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges zur Folge hat und das Medikament somit potenziell in seiner antiproliferativen/antitumorösen Eigenschaft eingeschränkt sein könnte. Allerdings scheint eine verlängerte Inkubationszeit (24-72h) in gewissen Zelltypen ebenfalls mTORC2 und damit Akt zu inhibieren¹⁷⁷.

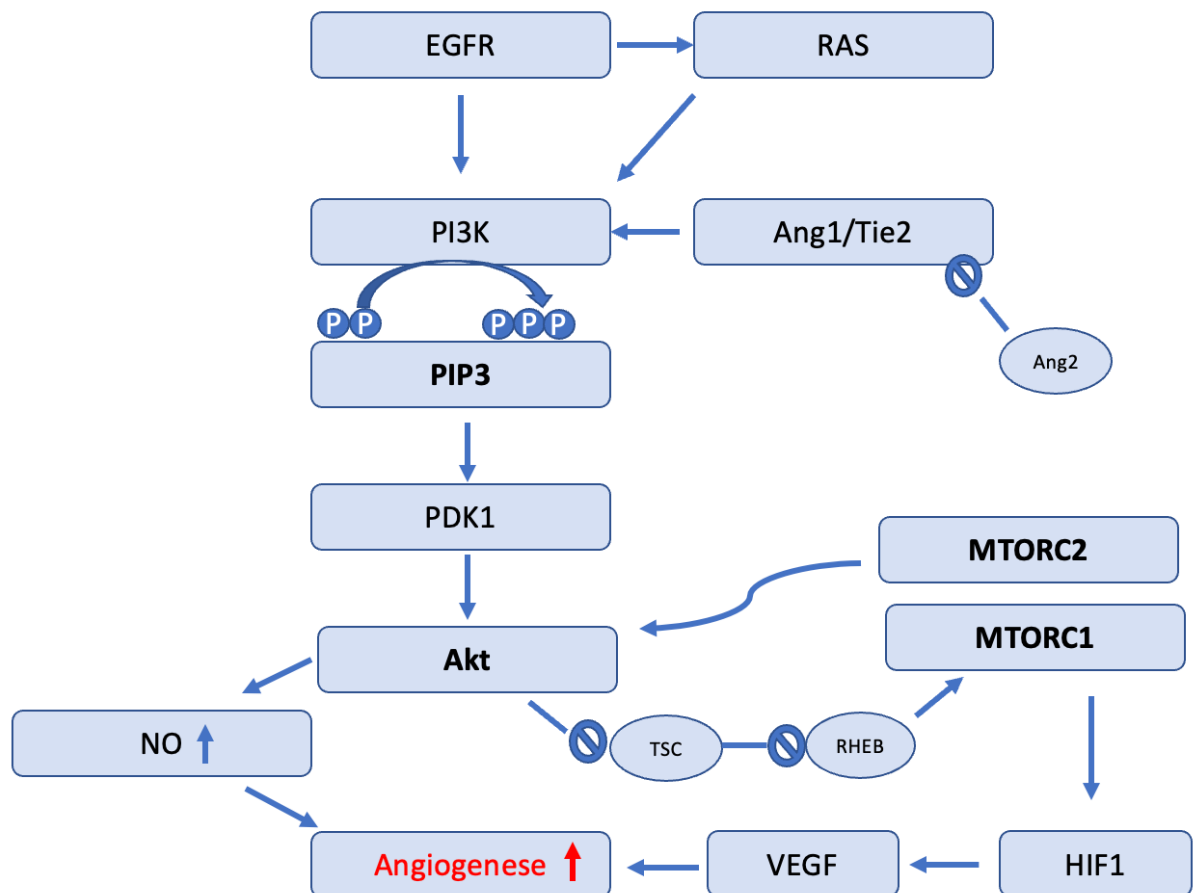


Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung des PI3K/Akt-Signalweges und die Bedeutung für die Angiogenese (Darstellung angelehnt an Karar et al, 2011, CC BY-Lizenz)¹⁷⁸

1.5.3.4 Rapamycin (Sirolimus)

Aus Bodenproben der Insel Rapa Nui (Osterinsel) wurde früh ein Metabolit des Bakteriums *Streptomyces hygroscopicum* isoliert, welches antimykotische, immunsuppressive und antitumoröse Eigenschaften besitzt¹⁸⁷⁻¹⁸⁹. Dieser Metabolit wurde folglich nach dem Entdeckungsort als Rapamycin (klinischer Name: Sirolimus) benannt. Erst Chung et al beschrieben 1992 die genaue Wirkungsweise: Rapamycin formt einen Gain-of-Function-Komplex mit der Peptidyl-Prolyl-Isomerase FK506 binding protein 12 (FKBP12). Erst zwei Jahre später wurde mTOR als direktes Zielprotein des FKBP12-Komplexes in Säugetieren nachgewiesen, dass eine inhibierende Wirkung auf mTOR (genauer mTORC1) hat¹⁹⁰⁻¹⁹².

Heute wird das Medikament in einer Reihe von Krankheiten verwendet, zum Beispiel bei der Lymphangioliomyomatose, als effektives Immunsuppressivum nach einer Nierentransplantation oder auch in Phakomatosen (Progressionshemmung eines Neurofibromatose Typ 1-assoziierten plexiformen Neurofibroms oder in Formen der tuberösen Sklerose)¹⁹³⁻¹⁹⁶.

Rapamycin scheint primär wenig Einfluss auf mTORC2 zu haben; es bindet und hemmt vor allem mTORC1¹⁷⁵. Somit resultiert initial zunächst keine klare Akt-Hemmung. Ganz im Gegenteil: Die alleinige Hemmung von mTORC1 führt zunächst einmal zur Hochregulierung des Insulin-Rezeptor-Substrat 1 welches wiederum eine vermehrte Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges zur Folge hat und das Medikament somit potenziell in seiner antiproliferativen/antitumorösen Eigenschaft eingeschränkt sein könnte. Trotzdem zeigt eine verlängerte Inkubationszeit (24-72h)¹⁷⁷ bzw. eine längere Behandlungsdauer mit Rapamycin auch auf mTORC2 einen inhibierenden Effekt, da an Rapamycin gebundenes mTORC1 sich nicht mit mTORC2 verbinden kann¹⁹⁷. Wie bereits früh durch Zhong et al und Guba et al. beschrieben besitzt das Medikament die Fähigkeit die Produktion von VEGF deutlich zu drosseln, sowie zusätzlich antiproliferative und antitumoröse Eigenschaften^{198,199}. Die anti-angiogenetische Wirkung vermag es vor allem durch negative Stimulierung der HIF1-alpha Produktion zu vollbringen^{198,199}. Selbst unter hypoxischen Bedingungen zeigte Rapamycin eine deutliche Aktivitätsreduzierung von HIF1-Alpha wie durch Land and Tee et al beschrieben²⁰⁰. Wie stark die Wirkung potenziell sein könnte zeigt Phung et al (2006): Rapamycin blockiert in Mäusen trotz persistenter Akt-Aktivierung die Entstehung von Blutgefäßen¹⁷⁹. Auch antiproliferative Eigenschaften in Perizyten sind durch mTOR-Inhibition beschrieben, welche besonders in dieser Arbeit genauer untersucht werden²⁰¹.

1.6 Ziel der vorliegenden Arbeit

Trotz großer Fortschritte in der Therapie der neovaskulären AMD fehlen uns heute immer noch wirksame Alternativen für die Gruppe der sogenannten „Non-Responder“ oder „Poor-Responder“. Welch sozioökonomische Bedeutung dies hat, beleuchtet eine von Chopra et al veröffentlichte Studie., die zeigt, dass es von 2009 bis 2019 einen insgesamt 11-fachen Anstieg der intravitrealen Injektionen gegeben hat und dass diese Zahl erwartungsgemäß (insbesondere durch eine immer mehr alternde Bevölkerung¹⁷) steigen wird²⁰². Mit Faricimab erschien nun zum ersten Mal ein bivalenter Wirkstoff, der in den Zulassungsstudien erfolgsversprechende Ergebnisse zeigte. Dies beweist, dass eine alleinige Inhibition von VEGF, wie sie meist noch derzeitige Praxis ist, keine ausgeschöpfte Therapie darstellt und es sich lohnt, in den komplexen Signalketten der Angiogenese weitere Faktoren zu analysieren, die zu einem Therapieerfolg führen könnten. Dies könnte bei besserer Wirksamkeit möglicherweise insgesamt auch die Therapiefrequenz bei jenen Patienten reduzieren, die zwar auf anti-VEGF ansprechen, jedoch auf monatlich- bis zweimonatliche Injektionen angewiesen sind. Alle derzeit verfügbaren Therapien fokussieren insbesondere VEGF, lassen jedoch die Gefäßummantelung durch Perizyten, die eine potentielle anti-VEGF-Resistenz bewirken, außer Acht^{107-109,203,204}. Die Rekrutierung des Perizyten führt also

dazu, dass Neovaskularisationen vor einer (in der Angiogenese auch physiologischen) Regression durch VEGF-Entzug geschützt sind. Zusätzlich sezernieren Perizyten Angiopoietin-1 (Ang1), das über die Bindung des endothelialen Tie2- Rezeptors zu zellulären Mechanismen führt, die die Neovaskularisation stabilisieren^{205,206}. Erster Beleg dafür, dass die Aktivität der Perizyten ein weiteres therapeutisches Target darstellt, ist die Wirksamkeit des 2023 zugelassenen Faricimab¹⁰².

Somit erschließt sich, dass eine duale VEGF/PDGF-Inhibition erfolgsversprechend bei pathologischer Angiogenese sein könnte. Und in der Tat ist nicht nur in der Tumorforschung, sondern auch in okulären in-vitro und in-vivo Modellen mehrfach bestätigt worden, dass die duale Inhibition durchaus eine wirkungsvollere Alternative, insbesondere auch für Non-Responder, darstellen könnte^{107,108,110,207,208}. In unseren Vorarbeiten untersuchte auch unser zellbiologisches Labor (*in-vitro*) die Auswirkung von Axitinib auf humane umbilikale Endothelzellen sowie plazentäre humane Perizyten, die eine deutliche Wirksamkeit der dualen Inhibition bestätigten²⁰⁹. Interessant ist in diesem Zusammenhang, vor allem mit Blick auf die Langzeitbehandlung, die Bedeutung des Perizyten bei der Entwicklung subretinaler Fibrosen und ob eine Hemmung dieser und/oder des PDGF-Signalweges langfristig zu weniger Fibrose führt als eine Monotherapie mit anti-VEGF. Eine Assoziation des Perizyten mit subretinaler Fibrose ist in der Literatur bereits mehrfach beschrieben: Sie scheinen sich in anderen Organen wie zum Beispiel der Lunge und der Niere zu Myofibroblasten differenzieren zu können und dort die Fibroseentstehung anzutreiben^{132,210}. Lin et al machten bereits 2008 die Beobachtung, dass in den Nieren von postnatalen Mäusen noch viele Perizyten mit ihren typischen Markern nachzuweisen sind, diese Spezifizierung jedoch in der adulten Niere nach und nach verlieren²¹¹. In der adulten (und erkrankten) Niere zeigte sich, dass Perizyten recht rasant diejenigen Gene aktivierten, die für die Entstehung von Myofibroblasten verantwortlich sind²¹⁰. Auch für anderes Gewebe zum Beispiel im Gehirn oder im Auge wurde dieser Effekt nachgewiesen^{110,212}. Nachzuvollziehen ist dies, wenn man die Herkunft der Perizyten genauer betrachtet: Letztlich handelt es sich um Zellen mesenchymalen Ursprungs, die zwar als vaskuläre Gefäßwandzellen betrachtet werden können. Wenn jedoch Zellen mesenchymalen Ursprungs keinen Kontakt zu Endothelzellen haben, so werden sie (in der Niere) zu sogenannten „perivaskulären Fibroblasten“²¹³⁻²¹⁶. Ergänzend dazu konnten wir bereits zeigen, dass plazentäre Perizyten unter dualer Inhibitionstherapie mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Axitinib (Pan-VEGFR/Pan-PDGFR-Inhibitor) in-vitro zwar beginnen einen proto-myofibroblastischen Phänotypen auszubilden, jedoch aktive profibrotische zelluläre Mechanismen gehemmt werden¹⁰⁹.

Wie oben bereits beschrieben, zeigen Perizyten vor allem ein Ansprechen auf PDGF, weshalb bereits eine klinische Studie mit dualer Inhibition durch Ranibizumab und Fovista (monoklonaler anti-PDGF Aptamer) erfolgte. Während Phase 2b zwar einen deutlich besseren Effekt erzielte, zeigte sich in Phase 3 kein signifikant besseres Ergebnis als unter einer anti-VEGF-Monotherapie¹⁰⁸. Die ernüchternden Ergebnisse ließen eine duale Inhibition von VEGF und PDGF zunächst wieder in den Hintergrund rücken. Es besteht jedoch weiterhin dringende Notwendigkeit für wirksame Alternativmittel. Die in-vitro als auch in-vivo Evidenz für eine überlegene Wirksamkeit der dualen Inhibition von Endothelzellen und Perizyten in pathologischer Angiogenese bleibt jedoch überwältigend.

Aufgrund seiner Schlüsselrolle bei der HIF1-alpha-Regulation, der Perizytenrekrutierung, sowie bei Zellproliferation und -migration untersuchten wir mit dieser Arbeit eine Inhibition von mTOR durch Sirolimus (Rapamycin) *in vitro*. Rein antiangiogenetische Eigenschaften zum Beispiel bei pathologischer Tumorangiogenese aber auch bei okulären Modellen^{217,218} sind bereits sehr evident. Dort zeigte sich in den Mechanismen der Angiogenesehemmung auch eine deutliche Inhibition der Perizyten durch reine mTOR-Hemmung.

Zielsetzung dieser Arbeit war daher, zu klären, ob eine Hemmung unkontrollierter Angiogenese in Perizyten mittels Rapamycin möglich ist, um die Vorteile einer Perizyteninhibition im Rahmen einer nAMD zu nutzen, ohne aber myofibroblastische Transdifferenzierung zu induzieren wie zuvor mittels VEGF/PDGF-Inhibition beschrieben.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Medien und Lösungen

2.1.1.1 Zellkulturmedien

Die Zellkulturmedien für humane umbilikale vaskuläre Endothelzellen und humane plazentäre Perizyten wurden mit 2% einer Penicillin/Streptomycin-Lösung (Sigma) versetzt, die 5000 U/ml Penicillin und 5 mg/ml Streptomycin enthält. Das Zellkulturmedium der humanen retinalen Perizyten wurde entsprechend der Herstellerangaben mit dem mitgelieferten antibakteriellem Mittel Bac-Off® (Cell Systems) behandelt. Der Hersteller gibt an, das Bac-Off® die minimale Hemmkonzentration eines Chinolons enthält und die meisten Kontaminationen bekämpfen kann, ohne toxisch zu wirken. Weitere Angaben (z.B. genauer Wirkstoff) werden durch den Hersteller nicht gemacht.

Medium	Zusätze	Hersteller
<i>Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)</i>	+ 10% FCS	Biochrom
<i>Endothelial cell growth medium</i>	+ Supplement Mix	Promocell
<i>Pericyte Growth Medium</i>	+ Supplement Mix	Promocell
<i>Complete Classic Medium®</i>		
<i>Cell Freezing Medium®</i>	+ Bac-Off® und CultureBoost®	Cell Systems
		Cell Systems

2.1.1.2 Medien zur Passagierung

<i>PBS-Dulbecco</i>	NaCl	137 mM	8 g
	KCl	2,7 mM	0,2 g
	NA ₂ HPO ₄	10 mM	1,44 g
	KH ₂ PO ₂	2 mM	0,24 g
	Aq. dest.		ad 1000ml
<i>Anm: auf pH=7,4 einstellen</i>			

<i>0,025% Trypsin</i>	Trypsin 0,25%	10%	10ml
	Versene (1x)		100ml

Passage reagent	EDTA-dPBS
Group 1 (PRG 1)	

Passage reagent	Trypsin
Group 2 (PRG 2)	EDTA-dPBS

Passage reagent	Trypsin-Inhibitor
Group 3 (PRG 3)	EDTA-dPBS

2.1.2 Medikamente

2.1.2.1 Sirolimus (Rapamycin)

Rapamycin-Pulver (Sigma, St Louis, USA) wurde in 100% Dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma, St. Louis, USA) aufgelöst. Die gewünschte Konzentration an Rapamycin pro Experiment wurde ebenfalls durch Verdünnung mit dem jeweiligem Zellkulturmedium erreicht, mit einer finalen Konzentration von DMSO von 0,1% für in-vitro Studien. DMSO der gleichen Konzentration ohne Rapamycin wurde den unbehandelten Proben als Lösungsmittelkontrolle zugegeben.

2.1.3 Zelllinien

2.1.3.1 Humane Endothelzellen

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) wurden von der Firma Promocell (Heidelberg, Deutschland) bezogen und nach Angaben des Herstellers in *Endothelial Cell Growth Medium* (Promocell, Heidelberg) unter Zugabe von 2% Penicillin/Streptomycin (50x, Sigma, St. Louis, USA) kultiviert.

2.1.3.2 Humane retinale Perizyten

Human retinal pericytes (HRP) wurden von Cell Systems (Seattle, USA) bezogen und entsprechend der Herstellerangaben im erforderlichen Zellkulturmedium mit beigefügtem Antibiotikum (Bac-Off®, Cell Systems, Seattle, USA) und Wachstumsfaktor-Mix (Cultureboost™, Cell Systems, Seattle, USA) kultiviert. Alle Experimente erfolgten zwischen den Passagen 3-7 und als Duplikate. Sie wurden an 3 verschiedenen Tagen wiederholt.

2.1.4 Software

Die statistische Analyse wurde mit SPSS 23.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt. Vergleiche zwischen mehreren Gruppen erfolgten durch ANOVA mit dem LSD-Post-Hoc-Test. $P < 0,05$ wurde als statistisch signifikant mit einem 95 %-Konfidenzintervall betrachtet. Die Diagramme wurden in Microsoft Excel erstellt und zeigen die Standardabweichung.

2.2 Zellkultur adhärent wachsender Zellen

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Laminar Flow-Werkbank (Hera safe, Thermo Scientific) unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

2.2.1 Zellkulturbedingungen

Es herrschten zu jeder Zeit Standard-Zellkulturbedingungen (37°C, 5% CO₂ unter Raumlufte in feuchter Atmosphäre).

2.2.2 Kultivierung

Jede Zellreihe wurde auf *Nunclon T-75 Flasks* (Thermo Scientific, USA) unter Zugabe von 10ml des jeweiligen Zellkulturmediums ausgesät; Kontrolle der Kultur und Mediumwechsel erfolgten alle zwei Tage. Bei einer Konfluenz von 70-90% wurde subkultiviert. Folgende Reagenzien sind hierfür notwendig:

HUVEC:	(1) HepesBSS (30mM Hepes)	2ml
	(2) Trypsin/EDTA Solution (0.04%/0.03 %)	2ml
	(3) Trypsin Neutralizing Solution (TNS)	2ml
HRP:	(1) PRG 1 (dPBS)	
	(2) PRG 2 (Trypsin + dPBS)	
	(3) PRG 3 (Trypsin-Inhibitor + dPBS)	

Alle Reagenzien wurden vor Beginn der Subkultivierung auf 37°C erwärmt. Nach Absaugen des Zellkulturmediums wurden die Zellen zunächst mit 2ml Lösung (1) gespült. Nach Absaugen der Spüllösung wurden die Zellen für 3-5 Minuten mit 2ml Trypsin (=Lösung (2)) bei Raumtemperatur inkubiert und mikroskopisch auf zelluläres Detachment kontrolliert, was sich durch ein kugelförmiges Erscheinen der Zellen bemerkbar machte. Durch vorsichtiges, aber forciertes Klopfen an die Kulturflasche erfolgten eine komplette Ablösung der Zellen und ein Übergang in die Suspension. Anschließend wurden 2ml Lösung (3) (HUVEC und HRP) zugegeben. Das gesamte Flüssigkeitsvolumen der Kulturflasche wurde dann in ein 50ml Falcon-Tube überführt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 220xg (HUVEC) oder 900xg (HRP). Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Zellpellet im jeweiligen Medium wieder resuspendiert und auf die benötigten Kulturgefäße verteilt.

2.2.3 Kryokonservierung von Zellen

Zur Kryokonservierung wurden die Schritte der Subkultivierung (s. [2.2.2](#)) bis zur Gewinnung des Zellpellets durchgeführt. Anschließend erfolgte pro T-75 flask die Resuspendierung in 1ml des jeweiligen Zellkulturmediums, das für die Kryokonservierung 10% DMSO bzw. die doppelte Menge Supplement Mix (HUVEC) enthält. Für HRP wurde entsprechend das dafür vorgesehene Cell Freezing Medium (Cell System, USA) verwendet. Je 1ml wurde auf ein Kryoröhrchen verteilt. In einem speziellen Einfrierbehälter wurden die Röhrchen bei -20°C über drei Stunden um 1°C/Minute abgekühlt und danach in einen Gefrierschrank mit -80°C überführt.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen langsam im Wasserbad erwärmt. Der Inhalt wurde unter Zugabe von 10ml des jeweiligen Zellkulturmediums in T-75 flasks überführt und weiter kultiviert wie zuvor beschrieben.

2.2.4 Bestimmung der Zellzahl

Mittels eines Casy TT Cell Counters (OMNI Life Sciences, Bremen, Deutschland) wurde die Zellzahl bestimmt. Hierzu wurden nach Herstellerangaben 50µl Zellsuspension in 10ml Casyton-Puffer verdünnt und mittels 150µM-Kapillare gemessen. Die Bestimmung der Zellzahl beruht dabei

auf einer Widerstandsmessung der durch die Kapillare fließenden Lösung, wodurch ausschließlich lebendige Zellen gezählt werden.

2.3 Funktionelle Assays

2.3.1 Zelluläre Toxizität

2.3.1.1 HUVEC und HRP

HUVEC und HRP wurden auf Nunc multidishes (Thermo Scientific, Waltham, USA) bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert. 24 Stunden vor der Behandlung wurde die zelluläre Proliferation durch Wachstumsfaktorentzug gestoppt. Da bei HRP und HUVEC ein komplett serumfreier Ansatz in Zelltod resultierte, wurden beide Zellreihen für 24 Stunden in 1% Growth factor-Supplement inkubiert. Alle Zellreihen wurden mit aufsteigenden Konzentrationen von Rapamycin von 0.005 bis 15 µg/ml behandelt. Nach 48 Stunden (HUVEC) bzw. nach 72h (HRP) Behandlung wurde ein XTT-Assay wie unten beschrieben durchgeführt (s. [2.4.4](#)). Unterschiede in der Absorption im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle wurden als Unterschiede in der Stoffwechselaktivität und der Zellzahl aufgrund einer möglichen Toxizität von Rapamycin gewertet. Alle Experimente wurden an Passagen 3-7 durchgeführt, als Duplikate ausgeführt und mindestens dreimal an verschiedenen Tagen wiederholt.

2.3.2 Zelluläre Migration

Die hPC-PL und HRP-Migration wurden mit Hilfe eines modifizierten in-vitro Scratch Assay beobachtet, das zuvor von Liang et al. beschrieben wurde²¹⁹. Die Zellen wurden auf Nunc-Multidishes mit 12 Wells gezüchtet und nach Erreichen der Konfluenz mit einer 10-µl-Pipettenspitze eine lineare Kratzwunde in die Zellmonolage eingebracht. Die Wunde wurde mit einem inversen Phasenkontrastmikroskop mit Digitalkamera (Leica Microsystems GmbH, Solms, Deutschland) fotografiert und die genaue Stelle der Fotografie mit einem Filzstift auf dem Multidish markiert. Die Zellen wurden dann mit Vehikel- oder steigenden Rapamycin-Konzentrationen von 0.005, 0.05, 0.5 bzw. 5 µg/ml (HRP) behandelt und unter Standard-Zellkulturbedingungen inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die Kratzwunden an genau der gleichen, zuvor dokumentierten Stelle, erneut fotografiert. Der gesamte Wundverschluss (Abstand zwischen dem Rand der Wunde direkt nach der Verletzung und nach 24 Stunden) wurde mit dem LAS-Flächenmessgerät (Leica, Solms, Deutschland) bewertet. Die Ergebnisse werden als Prozentsatz der Verringerung des Wundverschlussabstands ausgedrückt, wobei die unbehandelten Kontrollen 100 % darstellen. Alle Experimente wurden an Passagen 3-7 durchgeführt, als Duplikate ausgeführt und mindestens dreimal an verschiedenen Tagen wiederholt.

2.3.3 Zelluläre Proliferation

HRP wurde mit etwa 10-15%-iger Konfluenz (3×10^3 Zellen/cm²) auf Nunc multidishes (Thermo Scientific, Waltham, USA) ausgesät und für fünf Stunden in den Inkubator gestellt, um ein vollständiges Anhaften aller Zellen zuzulassen. Hierauf wurde mit Rapamycin-Konzentrationen von 0.005 bis 15 µg/ml behandelt. Nach 48 Stunden wurde ein XTT-Assay durchgeführt (siehe 2.4.1). Unterschiede in der Absorption verglichen mit der unbehandelten Kontrolle wurden interpretiert als antiproliferative Effekte durch Rapamycin.

2.3.4 Tube formation

2.4.4.1 Tube formation: HUVEC Monokultur

Ein wichtiger Schritt der Angiogenese ist die Tube formation, die *in vitro* in basalmembranartigen Matrices simuliert werden kann. Zur Formung dieser Matrix wird ein Proteingemisch genutzt, das aus Engelbreth-Holm-Swarm (EHS)-Zellen isoliert wird, einer murinen Sarkom-Zelllinie, die reich an Bestandteilen der Basalmembran ist (Laminin, Kollagen IV, Entaktin, Heparansulfat-Proteoglykan). Das EHS-Sekret ist bei 4°C flüssig, formt bei Raumtemperatur ein Gel und ermöglicht durch seine Ähnlichkeit zur extrazellulären Matrix die Beobachtung komplexer zellulärer Prozesse. Es werden verschiedene industrielle Zubereitungen des EHS-Isolats angeboten; zur Testung der Wirkung von Wachstumsfaktoren ist ebenso eine Wachstumsfaktor-reduzierte Zubereitung erhältlich. Für diese Arbeit wurde *Cultrex* von R&D Systems in der nicht Wachstumsfaktor-reduzierten Version genutzt.

Das *Cultrex*-Gemisch wurde über 24 Stunden vor dem eigentlichen Versuch bei 4°C aufgetaut. Am Versuchstag wurden davon 50 µl pro well auf einer 96 well-Platte verteilt und zur Gelpolymerisation für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die HUVEC-Zellen passagiert und die Zellzahl mittels Casy TT Cell Counter bestimmt. In vier 15 ml Falcon-Tubes wurden je $7,5 \times 10^4$ Zellen gegeben (500 µl pro Tube; Zellzahl $1,5 \times 10^5$ /ml). Die Falcon-Tubes wurden wie folgt behandelt: Kontrolle (DMSO) – Rapamycin 0,005 µg/ml – Rapamycin 0.05 µg/ml – Rapamycin 0,5 µg/ml – Rapamycin 0,5 µg/ml. Zur dreifachen Probebestimmung wurden aus jedem Falcon-Tube je 100 µl (behandelte) Zellsuspension auf drei Wells verteilt (15 000 Zellen/Well). Dabei wurde darauf geachtet, die Zellsuspension gleichmäßig auf das Gel zu verteilen, ohne es zu berühren. Nach Inkubation bei 37°C für sechs Stunden erfolgten drei Aufnahmen pro Well mit einem invertierten Phasenkontrast-Mikroskop (Leica Microsystems GmbH, Solms, Deutschland). Die Gesamt-Tubelänge wurde mit Hilfe des LAS Distance Tools (Leica Microsystems GmbH, Solms, Deutschland) zur Quantifizierung der Länge des vaskulären Systems ermittelt. Alle Experimente wurden an Passagen 3-7 durchgeführt, als Duplikate ausgeführt und mindestens dreimal an verschiedenen Tagen wiederholt.

2.4.4.2: Tube-Formation: HUVEC/HRP Ko-Kultur

Nach der Vorbereitung von Cultrex wie oben in 2.4.4.1 beschrieben, wurden HUVEC auf $1,5 \times 10^5$ Zellen/ μ l und HRP auf $7,5 \times 10^3$ Zellen/ μ l passagiert. Ein Drittel der Wells wurde nun mit einer reinen HUVEC-Monokultur beimpft. Anschließend wurden beide Zelllinien in eine Falcon-Tube überführt und durch mehrmaliges Suspendieren und Re-suspendieren miteinander vermischt. Die neu entstandene HUVEC-HRP Ko-Kultur wurde nun unbehandelt auf die restlichen zwei Drittel der Wells gegeben wie zuvor durch 1, et al beschrieben²²⁰. Erneut wurden nach 6 Stunden Inkubation bei 37°C drei Fotos je Well aufgenommen, um so die nun frisch entstandenen Tubes zu dokumentieren. Anschließend an die Aufnahmen erfolgte die Behandlung aller Ko-Kultur-Wells mit aufsteigenden Rapamycin-Konzentrationen (0.005, 0.05, 0,5 und 5 μ g/ml) unter Ausparung von Kontroll-Wells, die auch hier lediglich DMSO erhielten. Nun wurden die Well-Platten erneut für 24h unter Standard-Zellkulturbedingungen inkubiert um die Stabilität der Tubes zu beobachten. Analog zur in 2.4.4.1 beschriebenen Monokultur wurde mit Hilfe des LAS Distance Tools (Leica Microsystems GmbH, Solms, Deutschland) die Gesamtlänge der Tubes gemessen. Die Kontrolle stellt in diesem Fall 100% dar und die Veränderung der Tube-Gesamtlänge als Prozentsatz dieser dargestellt.

2.3.5 XTT-Assay

Der XTT-Assay wurde erstmals 1988 von Scuderio²²¹ beschrieben und für okuläre Zellkulturen durch Spitzer²²² und Wertheimer²²³ modifiziert. Er ermöglicht die Messung der metabolischen Aktivität eines Zellkollektivs durch photometrische Erfassung der Reduktion des Tetrazolium-Reagens XTT ((2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide) in blaue Formazan-Kristalle unter Verstärkung durch die Zugabe von Phenazinmethosulfat (PMS).

Nach Inkubation der Zellen mit den entsprechenden Substanzen für die Testung von Toxizität oder Proliferationshemmung wird das Zellkulturmedium abgesaugt. Die Zellen werden mit PBS (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) gewaschen und es wird 1ml XTT-Lösung (50 Teile Zellkulturmedium: 2 Teile 2mg/ml XTT-Salz in PBS) pro Well dazugegeben. Nach 30minütiger Inkubation wird die gesamte Lösung abgesaugt; durch Zugabe von DMSO werden die blauen Formazan-Kristalle aufgelöst, die sich durch zelluläre Reduktion gebildet haben. Mittels eines *multiwell spectrophotometer* (Molecular Probes, Eugene, USA) wird die optische Dichte pro well bei 550nm gemessen. Die Ergebnisse sind als prozentuale Anteile der optischen Dichte pro Konzentration von Rapamycin angegeben, wobei die unbehandelte Lösungsmittelkontrolle 100% repräsentiert.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung antiangiogener Eigenschaften von Rapamycin auf humane retinale Perizyten

3.2 Toxizität

3.2.1 XTT-Assay

Die Ergebnisse des XTT-Assays spiegeln die zelluläre metabolische Aktivität unter den jeweiligen experimentellen Bedingungen wider. Durch Abnahme der optischen Dichte lassen sich toxische Konzentrationen detektieren, da tote Zellen nicht mehr zur Metabolisierung des XTT-Farbstoffs beitragen. Untersucht wurden potenzielle toxische Effekte von Rapamycin auf HUVEC und humane retinale Perizyten.

3.2.2 HUVEC und HRP

Um toxische Effekte von Rapamycin auf kultivierte HUVEC und HRP auszuschließen, wurde die Lebensfähigkeit der Zellen nach Exposition gegenüber steigenden Konzentrationen von Rapamycin in Abhängigkeit von der Stoffwechselaktivität, die mit dem XTT-Assay bestimmt wurde, untersucht. Für beide Zelllinien konnte keine statistisch signifikante Abnahme der Stoffwechselaktivität bei Konzentrationen zwischen 0,005 µg/ml und 15 µg/ml beobachtet werden ($p > 0.05$ für alle getesteten Konzentrationen; Abb. 4+5, Tabelle 1+2).

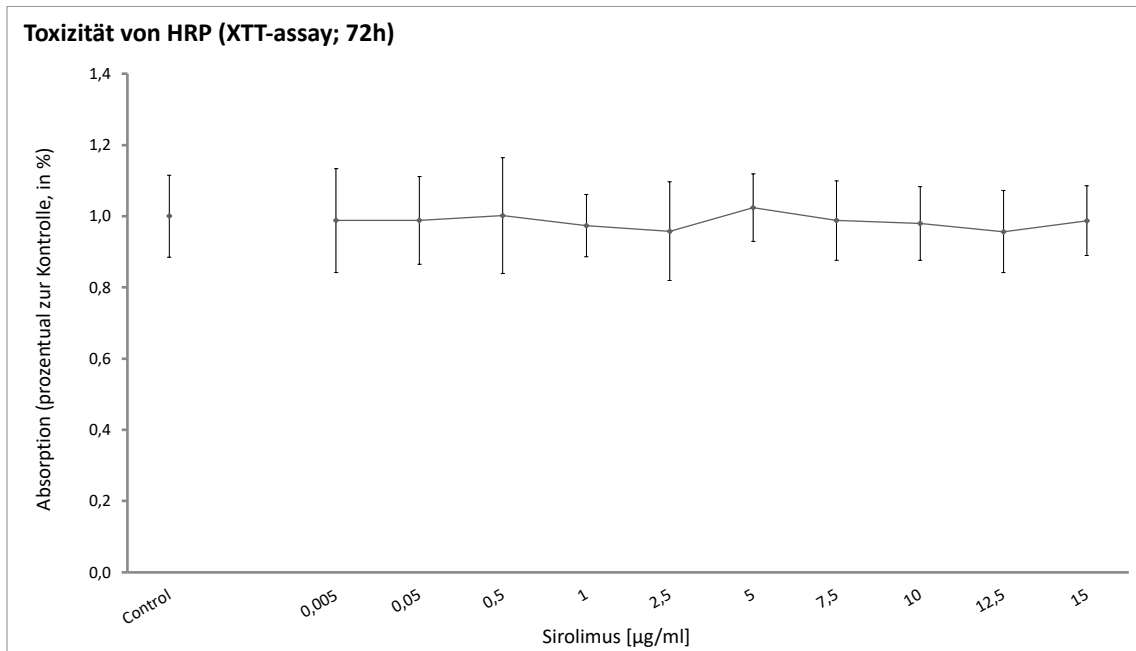


Abbildung 4: Toxizitätsuntersuchung von Rapamycin (Sirolimus) auf HRP²²⁴. Nach 72-stündiger Behandlung konfluenter HRP Zellen unter serumreduziertem Medium: Es zeigen sich in allen getesteten Konzentrationen bis 15 µg/ml keinerlei toxische Effekte von Rapamycin auf humane retinale Perizyten

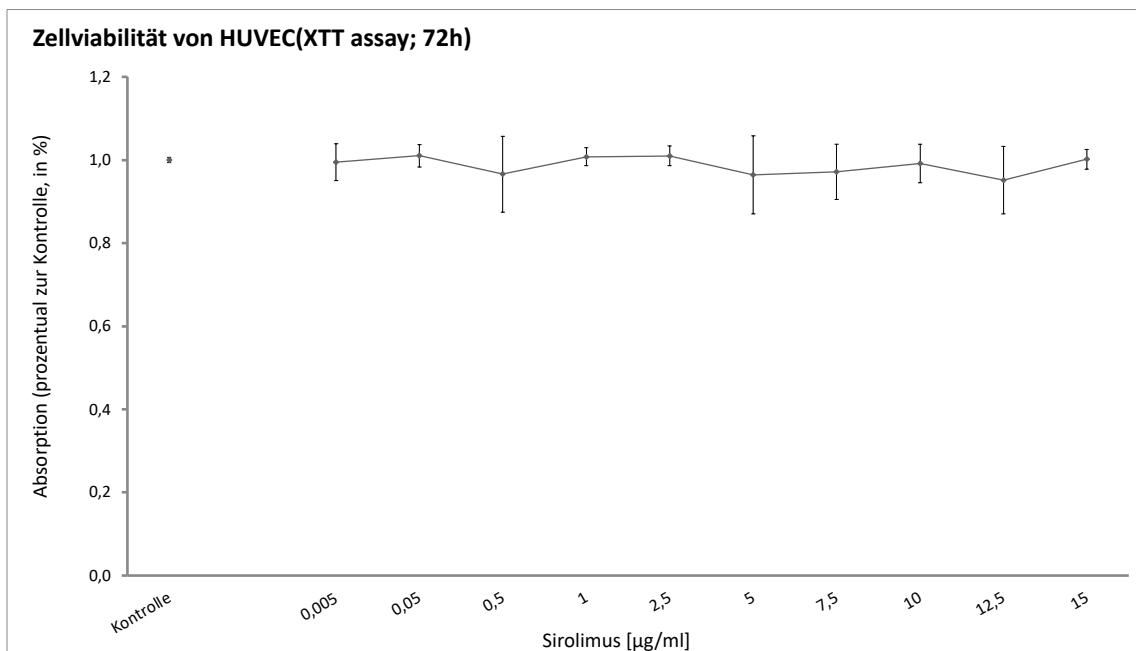


Abbildung 5: Toxizitätsuntersuchung von Rapamycin (Sirolimus) auf HUVEC²²⁴. Nach 72-stündiger Behandlung konfluenter HUVEC unter serumreduziertem Medium: Es zeigen sich in allen getesteten Konzentrationen bis 15 µg/ml keinerlei toxische Effekte von Rapamycin auf humane retinale Perizyten ($p < 0.05$).

Tabelle 1: Bestimmung der Toxizität von Rapamycin auf HUVEC²²⁴

	P-Wert	Mean Deviation	95% CI
Co – rapa 0.005	0.87	0.55	-6.1 – 7.1
Co – rapa 0.05	0.75	1.03	-7.6 – 5.6
Co – rapa 0.5	0.30	3.39	-3.2 – 10.0
Co – rapa 1	0.81	0.79	-7.4 – 5.8
Co – rapa 2.5	0.76	1.02	-7.6 – 5.6
Co – rapa 5	0.28	3.55	-3.1 – 10.1
Co – rapa 7.5	0.40	2.80	-3.8 – 9.4
Co – rapa 10	0.81	0.81	-5.8 – 7.4
Co – rapa 12.5	0.15	4.85	-1.7 – 11.4
Co – rapa 15	0.95	0.19	-6.8 – 6.4

Tabelle 2: Bestimmung der Toxizität von Rapamycin auf HRP²²⁴

	P-Wert	Mean Deviation	95% CI
Co – rapa 0.005	0.76	1.22	-6.8 – 9.2
Co – rapa 0.05	0.78	1.22	-6.9 – 9.2
Co – rapa 0.5	0.97	0.15	-8.2 – 7.9
Co – rapa 1	0.51	2.69	-5.3 – 10.7
Co – rapa 2.5	0.30	4.22	-3.8 – 12.2
Co – rapa 5	0.55	2.42	-10.4 – 5.6
Co – rapa 7.5	0.77	1.21	-6.8 – 9.2
Co – rapa 10	0.62	2.03	-6.0 – 10.4
Co – rapa 12.5	0.29	4.32	-3.7 – 10.3
Co – rapa 15	0.76	1.27	-6.7 – 9.2

3.3 Proliferationshemmung der HRP

Der Proliferations-Assay beruht auf der Tatsache, dass eine Zunahme der Zellzahl eine Zunahme an metabolischer Aktivität bedeutet. Untersucht wurde die proliferative Aktivität der humanen retinalen Perizyten unter Behandlung mit Rapamycin in steigenden Konzentrationen analog zum Toxizitäts-Assay.

Bei der Behandlung von humanen retinalen Perizyten mit Rapamycin zeigte sich eine signifikante Hemmung der Proliferation für alle getesteten Konzentrationen beginnend von 0,005 µg/ml bis 15 µg/ml ($p < 0.05$ für alle getesteten Konzentrationen). Der Effekt zeigte sich dosisabhängig bis zu einer Konzentration von 1 µg/ml mit einer maximalen Reduktion der Proliferationsaktivität von bis zu 59.0% (Abb. 6). Die halbe maximale inhibitorische Konzentration (IC_{50}) errechnete sich bei 432 ng/ml.

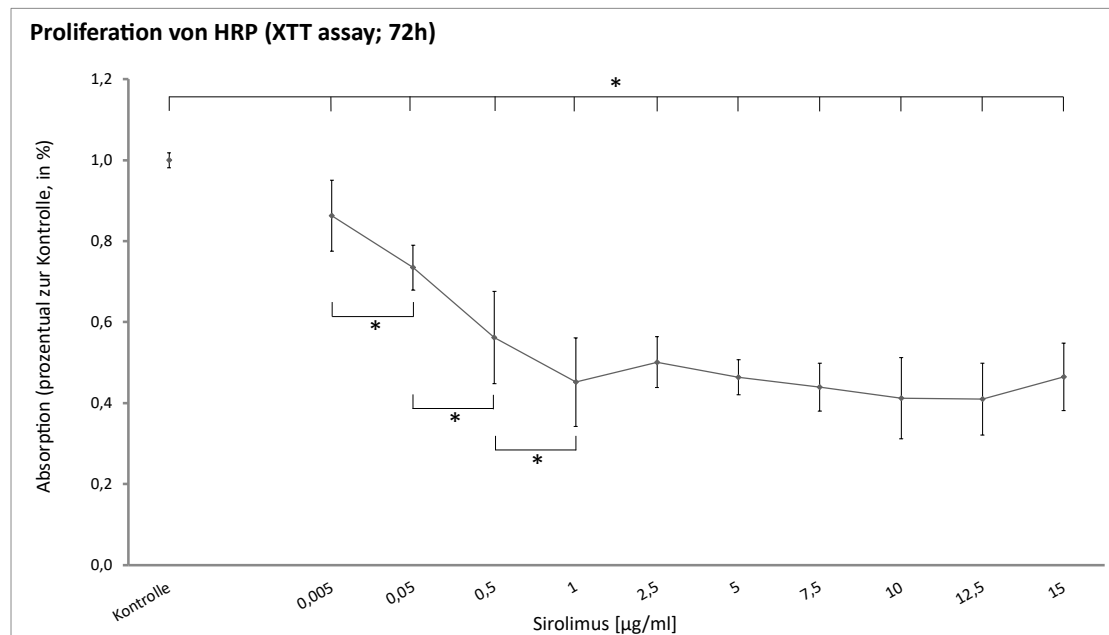


Abbildung 6: Effekte von Rapamycin auf die Proliferation von HRP²²⁴. Rapamycin erzielte eine signifikante Hemmung der Proliferation von subkonfluenten humanen retinalen Perizyten beginnend mit der geringsten Dosis von 0,005 µg/ml bis 15 µg/ml ($p > 0,05$ für alle Konzentrationen). Der Effekt war dosisabhängig bis 1 µg/ml. Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) beträgt 423 ng/ml.

3.4 Zelluläre Migrationshemmung der HRP (Scratch Assay)

Die Effekte von Rapamycin auf die zelluläre Migration von Perizyten wurden mittels Scratch-Assay ermittelt. Hierbei wurde die Prozentzahl der Strecke ermittelt, die von den Zellen zurückgelegt wurde im Vergleich zur Kontrollgruppe, welche, zur besseren Interpretation, auf 100% geeicht wurde. Die getesteten Konzentrationen von Rapamycin von 0.005 µg/ml, 0.05 µg/ml, 0.5 µg/ml und 5 µg/ml reduzierten die „Wundheilung“ um 25.7%, 42.0%, 56.7% und 76.8% respektive. Die Wirkung von 0.05 µg/ml, 0.5 µg/ml erwies sich als statistisch signifikant. Diese Migrationshemmung war dosisabhängig zwischen 0.005 und 0.5 µg/ml, 0.005 und 5 µg/ml, 0.05 und 5 µg/ml sowie zwischen 0.5 und 5 µg/ml (Tabelle 3+4, Abb. 8). Ein Beispiel der Auswertung zeigt Abbildung 7.

Tabelle 3: Effekte von Rapamycin bei der Perizytenmigration zur unbehandelten Kontrolle²²⁴

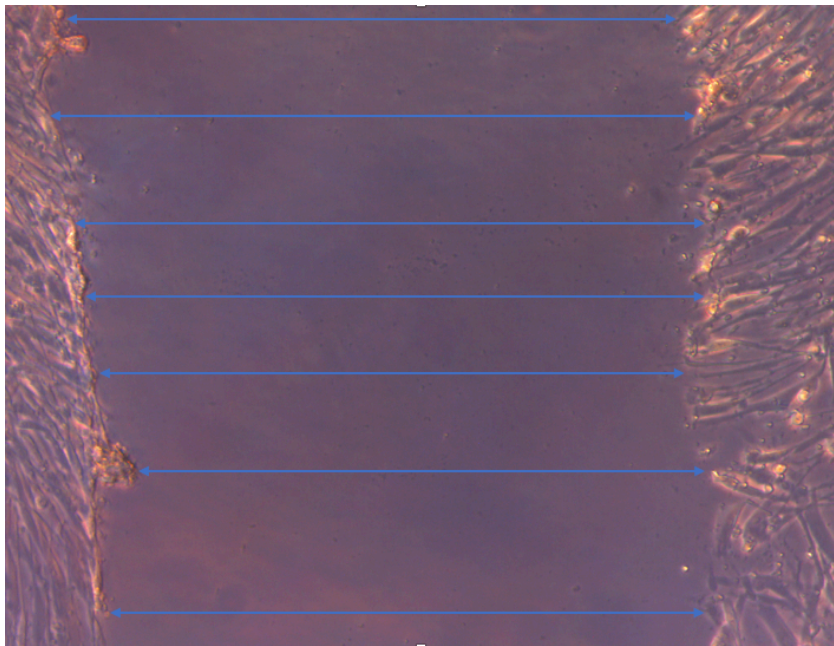
	P-Wert	Mean Deviation	95% CI
Co – rapa 0.005	0.01	25.7	9.2 – 42.2
Co – rapa 0.05	0.00*	42.0	25.5 – 58.4
Co – rapa 0.5	0.00*	56.7	40.2 – 73.2
Co – rapa 5	0.00	76.8	60.3 – 93.3

Anmerkung:
* $p < 0.001$

Tabelle 4: Dosisabhängiger, hemmender Effekt von Rapamycin auf die Migration von Perizyten²²⁴

	P-Wert	Mean Deviation	95% CI
rapa 0.005 – rapa 0.5	0.00**	31.0	14.6 – 47.5
rapa 0.005 – rapa 5	0.00*	51.1	34.7 – 67.6
rapa 0.05 – rapa 5	0.00*	34.8	18.3 – 51.3
rapa 0.5 – rapa 5	0.02	20.1	3.6 – 36.6

Anmerkung. * $p \leq 0.001$; ** $p = 0.002$

**Abbildung 7: Beispiel einer Auswertung des Scratch-Assays.** Es wurden mit dem LAS-Distance Tool (Leica Microsystems, USA) jeweils 20 Abstände vermessen und daraus der Durchschnitt ermittelt.

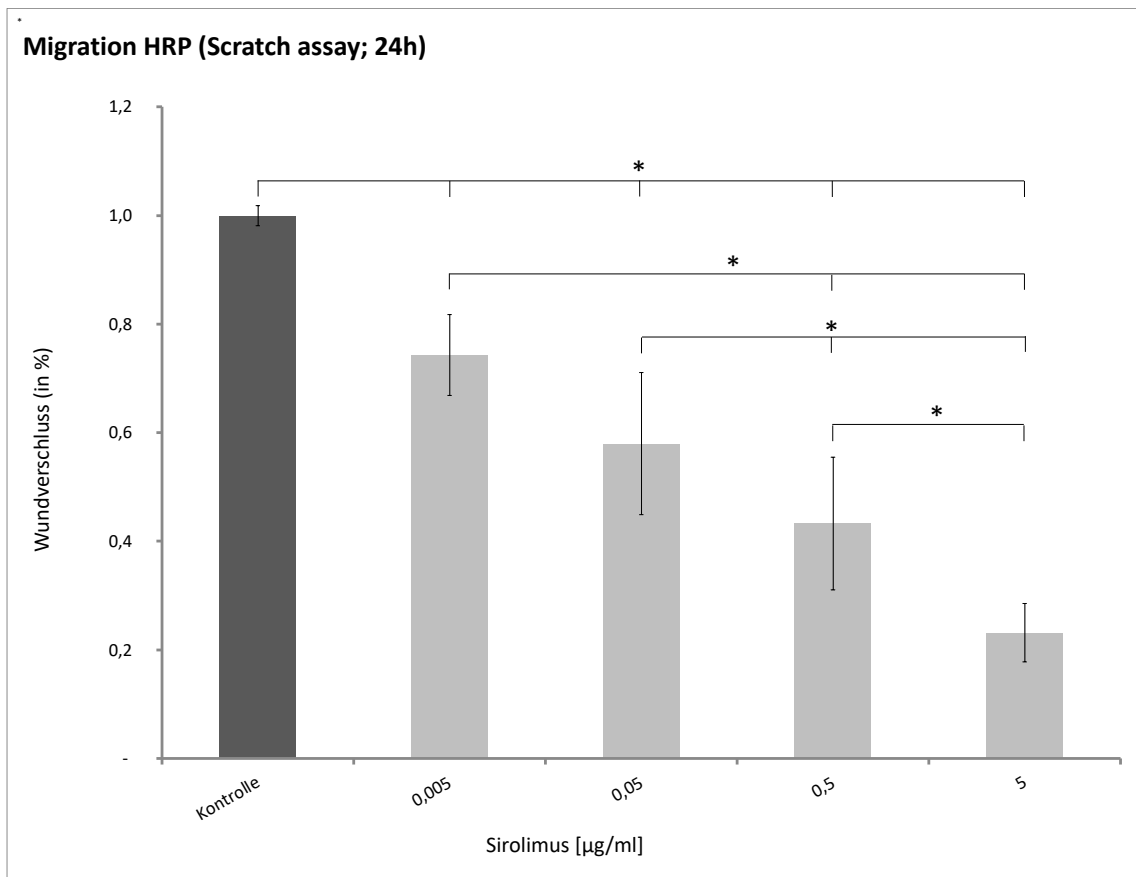


Abbildung 8: Hemmung der Perizytenmigration durch Rapamycin (Sirolimus)²²⁴. Für alle getesteten Konzentrationen, erzielte Rapamycin eine dosisabhängige Reduktion der Perizytenmigration in die Wunde (Co – Rapa 0.005: $p=0.006$; MD: 25.7; 95 % CI: 9.2 – 42.2; Co – Rapa 0.05: $p<0.0001$; MD 42.0; 95 % CI: 25.5 – 58.4; Co – Rapa 0.5: $p<0.0001$; MD 56.7; 95 % CI: 40.2 – 73.2; Co – Rapa 5: $p<0.0001$; MD 76.8; 95 % CI: 60.3-93.3).

3.5 Tube-Formation: Fähigkeit zur Ausbildung kapillarähnlicher Strukturen

3.5.1 HUVEC Monokultur

Die Bildung eines Tube-Systems auf regulärem Cultrex wurde signifikant durch die Gabe von Rapamycin in allen getesteten Konzentrationen (0.005, 0.05, 0.5 und 5 µg/ml) respektive um 26.0, 36.4, 40.9 und 45.1% relativ zur unbehandelten Kontrolle reduziert. Ein dosisabhängiger Effekt konnte zwischen 0.005, 0.5 und 5 µg/ml (rapa 0.005 – rapa 0.5: $p=0.021$; MD 15.0; 95 % CI: 2.8 – 27.1; rapa 0.005 – rapa 5: $p=0.006$; MD 19.2; 95% CI: 7.0 – 31.4) beobachtet werden (Abb. 9 und Tabelle 5).

Tabelle 5: Effekte von Rapamycin auf die HUVEC-Tubeformation verglichen mit der Kontrolle²²⁴

	P-Wert	Mean Deviation	95% CI
Co – rapa 0.005	0.00**	26.0	13.8 – 36.2
Co – rapa 0.05	0.00*	36.4	24.2 – 48.6
Co – rapa 0.5	0.00*	40.9	28.7 – 53.1
Co – rapa 5	0.00*	44.1	33.0 – 57.3

Anmerkung. * $p \leq 0.001$; ** $p = 0.001$

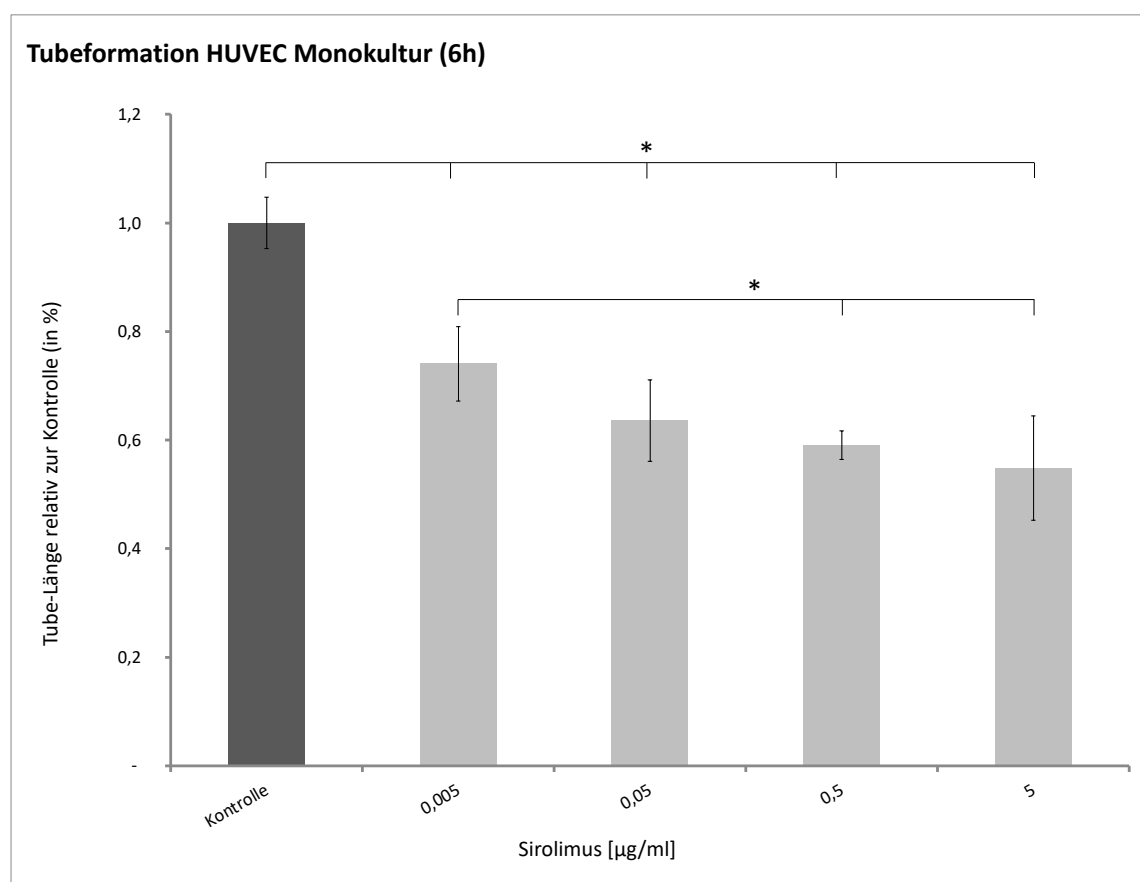


Abbildung 9: Effekte von Rapamycin bei der HUVEC-Tubeformation²²⁴. Ausbildung der rein endothelialen Tubes nach 6 Stunden ist durch die Gabe von Rapamycin verglichen zur unbehandelten Kontrolle signifikant und dosisabhängig bis 5 µg/ml auf 74.0%, 63.6%, 59.1% und 54.9% respektive reduziert (Ko – Rapa 0.005: $p=0.001$; MD: 26.0; 95 % CI: 13.8 – 38.2; Ko – Rapa 0.05: $p<0.0001$; MD 36.4; 95 % CI: 24.2 – 48.6; Ko – Rapa 0.5: $p<0.0001$; MD 40.9; 95 % CI: 28.7 – 53.1; Ko – Rapa 5: $p<0.0001$; MD 45.1; 95 % CI: 33.0-57.3).

3.5.2 HUVEC/HRP Ko-Kultur

In vivo werden endotheliale Tubes von Perizyten umklammert und stabilisiert. Um eine vergleichbare Situation in-vitro zu kreieren, etablierten wir eine Ko-Kultur von humanen retinalen Perizyten und Humanen umbilikalen Endothelzellen.

Etablierung einer Ko-Kultur

Im Rahmen dieser Versuchsreihe wurde erstmalig eine Ko-Kultur mit humanen retinalen Perizyten und humanen umbilikalen Endothelzellen etabliert, um eine möglichst realitätsnahe Situation in-vivo zu schaffen. Dies ist besonders wichtig zur Untersuchung der Vaskulogenese, die unter anderem (aber vor allem) durch die Interaktionen zwischen Endothelzelle und Perizyt entscheidend beeinflusst wird¹¹⁰. Diese Etablierung war mit einigen Schwierigkeiten verbunden. Initial versuchten wir, ähnlich zur tatsächlichen Situation in der Retina, eine möglichst gleiche Verteilung von Perizyt und Endothelzelle zu erreichen. Bei Durchführung der Versuche bildeten sich jedoch keine strukturierten Tubes, sondern lediglich Zellhaufen (Abb. 10). Stratman et al. empfehlen in einem ähnlich durchgeführten Assay, die Zugabe der Perizyten auf 20% der Endothelzellzahl zu reduzieren²²⁵. Allerdings wurden dort bovine retinale Perizyten verwendet und keine primäre humane Zelllinie. Für diese Versuchsreihe (HUVEC und HRP) schien eine Reduktion auf 20% nicht zielführend zu sein, mit weiterhin nur ungenügender Ausbildung kapillärer Strukturen. Erst bei einer HRP-Reduktion auf 5% der HUVEC-Zellzahl, führte die Ko-Kultur zur Ausbildung stabiler Tubes, bestehend aus beiden Zelllinien.

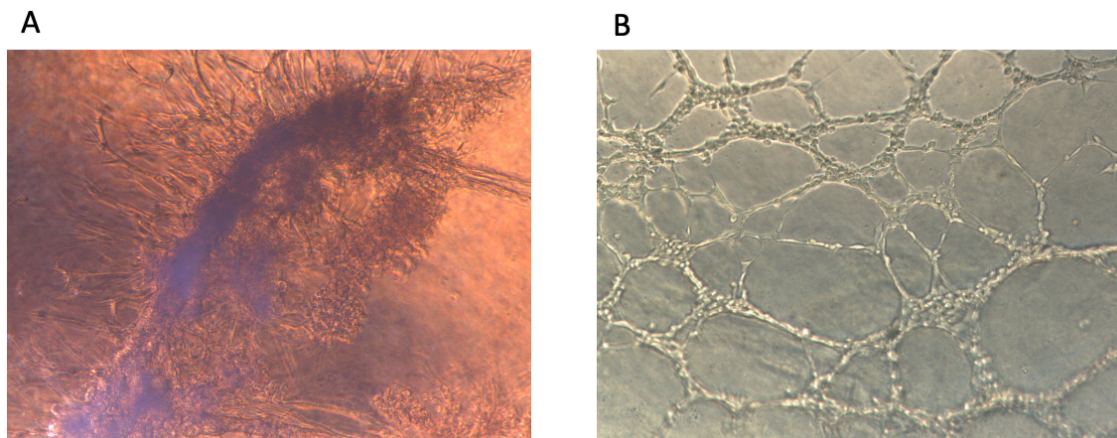


Abbildung 10: Versuch der Etablierung einer Ko-Kultur von Perizyten und Endothelzellen in-vitro. A: Eine 1:1 Verteilung von HRP und HUVEC führte zur Ausbildung von unstrukturierten Zellhaufen. **B:** Eine Reduktion der HRP auf 5% der HUVEC-Zellzahl führte zur Ausbildung regelrechter Tube-Strukturen.

Rapamycin macht Stabilisierung der Tubes durch HRP wieder rückgängig

Die reine Addition von HRP zu den Endothelzellen erbrachte tatsächlich auch in-vitro eine statistisch signifikante Erhöhung der Tube-Stabilität. Die reine Monokultur zeigte vergleichsweise nach 24 Stunden Inkubation 67.7% mehr Degradation der Tubes verglichen mit der unbehandelten Ko-

Kultur aus HUVEC und HRP. Diese Stabilität konnte durch die Gabe von Rapamycin wieder partiell rückgängig gemacht werden. In allen getesteten Konzentrationen (0.005, 0.05, 0.5 und 5 µg/ml) wurde eine signifikante Reduktion der Gesamttube-Länge in der Ko-Kultur verglichen mit der unbehandelten Kontrolle beobachtet. Dieser zeigte sich dosisabhängig von 0.005 µg/ml bis 5 µg/ml (Tabelle 7, Abb. 11) und von 0.05 µg/ml auf 5 µg/ml ($p = 0.47$).

Tabelle 7: Effekte von Rapamycin auf die Tube-Stabilität in einem Ko-Kultur-Modell²²⁴

	P-Wert	Mean Deviation	95% CI
Co – rapa 0.005	0.00**	45.1	30.2 – 59.9
Co – rapa 0.05	0.00*	78.9	64.1 – 93.8
Co – rapa 0.5	0.00*	80.0	65.1 – 94.8
Co – rapa 5	0.00*	94.0	79.2 – 108.9
<i>Anmerkung. *$p \leq 0.001$; **$p = 0.001$</i>			

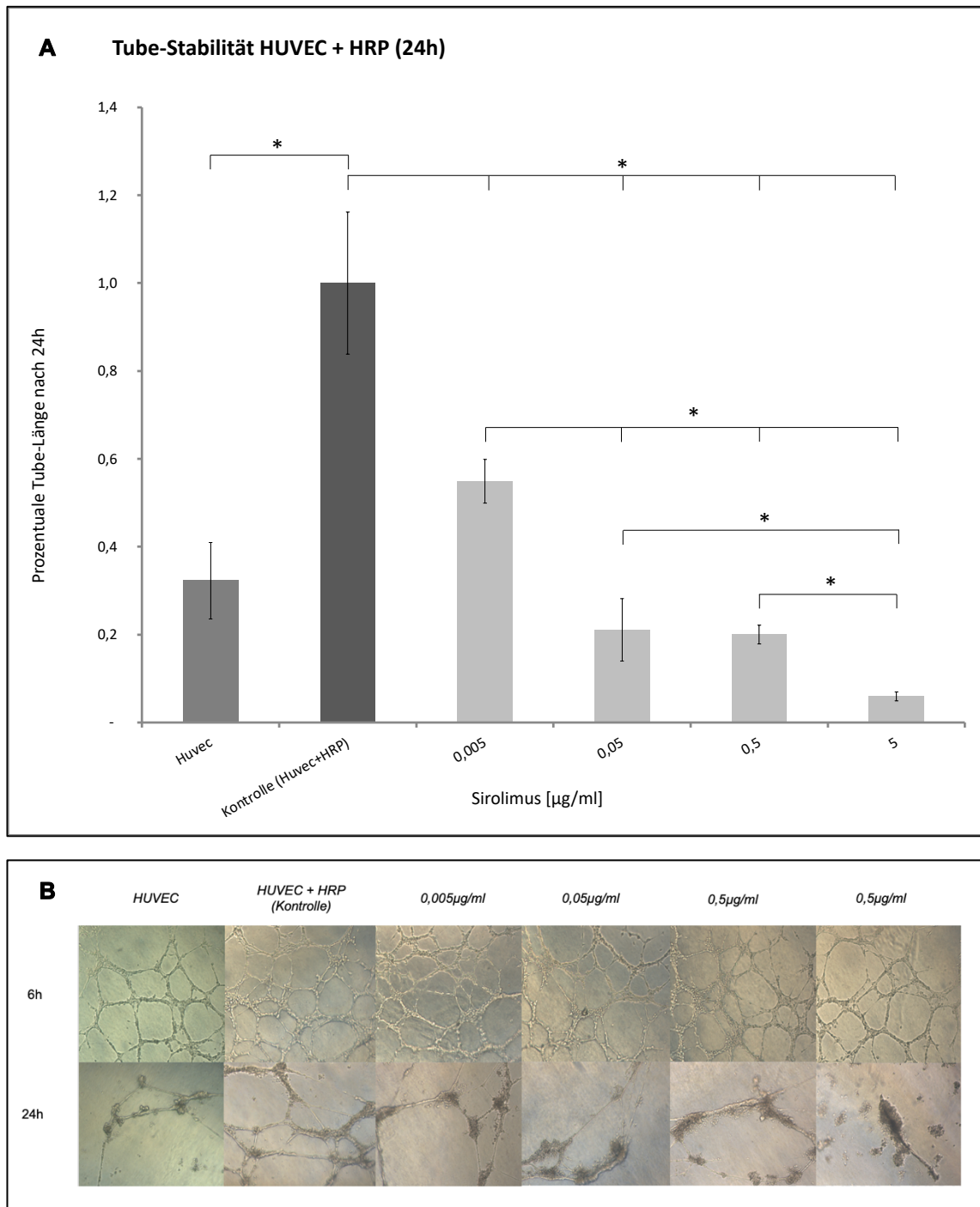


Abbildung 11: Effekte von Rapamycin bei der Tubeformation einer HUVEC/HRP-Kokultur²²⁴. **A:** Die HUVEC-Monokultur zeigt nach 24h Kultivierung 67% mehr Degradation der Tubes im Vergleich zur reinen unbehandelten Ko-Kultur (HUVEC/HRP – HUVEC: $p < 0.0001$; MD 67.7; 95 % CI: 52.9 – 82.6). Zugabe von Rapamycin kehrte den stabilisierenden Effekt wieder um und führte zu einer statistisch signifikanten Reduktion der Tube-Länge nach der gleichen Zeitspanne von 24 Stunden von 45.1, 78.9, 80.0 und 94% mit aufsteigend genutzten Konzentrationen (0.005, 0.05, 0.5 und 5µg/ml). **B:** Beispielbilder der Tubes nach jeweils 6 Stunden und 24 Stunden in Zellkultur.

4 Diskussion

Der Einsatz von Medikamenten zur Hemmung von VEGF hat die Behandlung der neovaskulären altersbedingten Makuladegeneration erheblich verbessert. Leider bleiben immer noch viele Bedürfnisse unerfüllt, wie z.B. der Erhalt der langfristigen Sehkraft und die Verringerung der Behandlungslast für die Patienten. Ciulla et al. konnten in einer Studie mit über 130,000 Augen zeigen, dass Patienten nach drei und fünf Jahren mit einem deutlichen Visusverlust trotz Behandlung rechnen müssen²²⁶. Diese Einschränkungen der reinen anti-VEGF-Therapie sind größtenteils darauf zurückzuführen, dass die anti-VEGF Monotherapie nicht immer in der Lage ist, die CNV komplett wirksam zu behandeln^{103,227,228}. Diese eingeschränkte Wirksamkeit gilt vor allem dann, wenn die Therapieinitiation zu spät erfolgt. Wenn eine CNV unbehandelt eine gewisse Zeit Angiogenese betreiben konnte, wird sie von Perizyten ummantelt, die eine Schlüsselrolle bei der Reifung und Stabilisierung der Gefäße haben^{107-109,203,209}. Hier ist eine anti-VEGF-Monotherapie nicht mehr ausreichend wirksam, da Perizyten parakrin VEGF sezernieren und die CNV mechanisch stützen. Darüber hinaus scheint die Perizyten-Rekrutierung auch entscheidend bei der Entstehung subretinaler Fibrose mitzuwirken, eine große und häufige Gefahr für langfristigen, irreversiblen Visusverlust bei andauernder anti-VEGF-Behandlung^{105,106}.

Die vorliegende Arbeit hatte somit zum Ziel, *in vitro* einen Therapieansatz für eine potenziell effektivere Hemmung der Angiogenese zu untersuchen, welcher unabhängig von einer Besiedlung und partiellen VEGF-Resistenz durch Perizyten ist. Von einem solchen Therapieansatz könnten nicht nur sogenannte „Non-Responder“ profitieren, sondern auch Patienten mit einem verspäteten Therapiestart.

Dies war bereits auch die Rationale jener klinischen Studien, die eine additive Hemmung von PDGF als weiteren pathogenetischen Faktor in der Angiogenese bei AMD und in der Perizyten-differenzierung zum Ziel hatten. Eine PDGF-Inhibition mittels Fovista® (anti-PDGF Aptamer) zeigte jedoch in einer Phase 3-Studie selbst in Kombination mit Ranibizumab keine Überlegenheit zur anti-VEGF-Monotherapie¹⁰⁸. Trotz der ernüchternden klinischen Ergebnisse bleibt die Evidenz einer dualen Inhibition von Endothelzelle und Perizyt weiterhin überwältigend. Alternativ zur direkten PDGF-Inhibition untersuchten wir in dieser Studie daher den Einfluss einer mTOR-Inhibition auf die Proliferation und Migration humaner Perizyten *in vitro*. Diese Idee gründete aus Erkenntnissen in der Tumoriangiogenese. Zahlreiche Vorarbeiten konnten dort der mTOR Inhibition bereits starke anti-angiogenetische Effekte zuschreiben^{178,204,229-231}. Als mTOR-Inhibitor wählten wir das bereits bekannte und klinisch gut etablierte Sirolimus (Rapamycin) und testeten die Effekte in verschiedenen Angiogenese-Assays sowohl in einer primären humanen Perizyten-Zelllinie (HRP) als auch in einer humanen vaskulären Endothelzelllinie (HUVEC) und in einer Ko-Kultur.

Wir konnten in dieser Arbeit zeigen, dass Rapamycin *in-vitro* aktiv angiogene Eigenschaften in humanen retinalen Perizyten beeinflusst und hemmt. Wichtige Voraussetzung für die Interpretation der durchgeführten Experimente und zur Bestimmung einer möglichst sicheren

Dosierung war zunächst der Ausschluss toxischer Effekte. Durch die durchgeführten Toxizitäts-Assays konnten in allen getesteten Konzentrationen toxische Effekte sowohl auf HRP als auch auf HUVEC ausgeschlossen werden und so sichere Behandlungskonzentrationen für in okulären Zellkulturen gut etablierten^{14,16,232} Proliferations- und Angiogenese-Assays ermittelt werden. Wir stellten eine signifikante Hemmung der Proliferation in humanen retinalen Perizyten durch die Zugabe von Rapamycin in allen getesteten Konzentrationen mit einer dosisabhängigen Wirkung bis 1 µg/ml fest. Eine höhere Wirkstoffkonzentration erzielte keinen weiteren Effekt. Im Scratch- bzw. Migrationsassay zeigte sich bestärkend eine deutliche und signifikante Hemmung der Zellmigration um bis zu 76.8%, die bis zur maximal getesteten Dosis von 5 µg/ml dosisabhängig war. Rapamycin erwies sich auch in der endothelialen Tube-Bildung hemmend auf die HUVEC-Zelllinie mit einer Reduktion zu 45.1% im Vergleich zu den unbehandelten Tubes. Zur genaueren Untersuchung des synergistischen Effekts auf beide Zelllinien etablierten wir eine Ko-Kultur zwischen HUVEC und HRP, in der gezeigt werden konnte, dass rein endotheliale Tube-Strukturen unbehandelt nach 24h fast vollständig degradierten, die Zugabe von HRP jedoch diesen Zerfall verhindern konnte. Dies bekräftigt die Hypothese, dass Perizyten selbst *in vitro* die Stabilität von kapillären Strukturen verbessern können. Diese, durch die Perizyten neu gewonnene Stabilität, konnte durch die Zugabe von Rapamycin erneut aufgehoben bzw. disruptiert werden. Dieser Stabilitätsverlust war dosisabhängig mit einem Maximalverlust von 94.0% der Tube-Länge verglichen mit der unbehandelten Kontrolle.

Die Ergebnisse der Toxizitätsuntersuchungen sind mit Vorarbeiten allgemein schwer vergleichbar. Zum einen lassen sich keine Versuche finden, die entsprechend toxische Effekte von Rapamycin auf die gleiche Zelllinie (primäre humane retinale Perizyten) untersuchen. Zum anderen sind zwar vergleichbare Arbeiten zur HUVEC-Zelllinie vorhanden; weisen jedoch einige Unterschiede auf, die eine direkte Vergleichbarkeit erschweren. Liegl et al. untersuchten beispielsweise die Wirkungen des strukturverwandten und wirkungsähnlichen Wirkstoffs Temsirolimus sowohl auf retinale Pigmentepithelzellen als auch auf HUVEC²⁰⁴. In dieser Arbeit zeigte eine Dosis von $\geq 10 \mu\text{g/ml}$ einen gewissen toxischen Effekt bzw. eine leichte Reduktion der Zellviabilität. Jedoch zeigten auch hier in der höchsten getesteten Dosis noch über 60% der Zellen weiterhin glykolytische Aktivität²⁰⁴. Davon sehr unterschiedliche Ergebnisse ergaben Toxizitätsversuche von Zhang et al., die bereits eine toxische Wirkung ab 0,1 µg/ml feststellen²³³. Allerdings sind hier andere Zelllinien untersucht worden. Im Gegensatz dazu konnten beispielsweise Eshleman et al. keine toxischen Effekte für Rapamycin entdecken. Auch die intravenöse Konzentration von 30mg bei Temsirolimus zur Behandlung eines Nierenzellkarzinoms oder 6mg bei Rapamycin zur Verhinderung einer Transplantatabstoßung ist deutlich höher und wird selbst systemisch gut vertragen²³⁴. Sicherlich sind hier weitere Untersuchungen erforderlich und insbesondere Bestätigungen unserer Ergebnisse in gleicher Zelllinie (HUVEC und HRP) wichtig. Wir entschlossen uns bei den weiteren Assays (mit Ausnahme des Proliferationsassay) bei einer möglichst sicheren Konzentration von 5 µg/ml zu bleiben, um genügend Abstand zu den potenziell toxischen Effekten zu haben, die in der Studie von Liegl et al bei 10 µg/ml für Temsirolimus gemessen wurden. Zusätzlich zeigte

sich zwar insgesamt eine recht hohe Proliferationshemmung von 60%, jedoch bei einer maximalen Wirkdosis von 1 µg/ml. So entschlossen wir uns für die weiteren Angiogenese-Assays größtenteils unter 1 µg/ml zu bleiben, schlossen in unsere Messungen aber ebenfalls eine Konzentration über 1 µg/ml ein, um auch rein anti-proliferative Effekte möglichst auszuschließen: Sollte es dosisabhängige Effekte bis zu 5 µg/ml geben, so kann davon ausgegangen werden, dass zum Beispiel die Hemmung der Zellmigration durch Rapamycin nicht durch seine (zumindest allein) antiproliferativen Effekte verursacht wird.

Grundsätzlich jedoch sind die gemessenen antiproliferativen Effekte zur Behandlung der Neovaskularisationen vielversprechend. Diese greifen aktiv in die Rekrutierungs- und Proliferationsphase der Perizyten ein, was potenziell dazu führt, dass eine beginnende anti-VEGF-Resistenz blockiert wird. Dies ist wichtig, da eine unkontrollierte Proliferation sowohl von Endothelzellen als auch von Perizyten einen wesentlichen Mechanismus für die pathologische Gefäßbildung, wie sie bei einer CNV auftritt, darstellt²³⁵. Letztere sind zumindest partiell für die Therapieresistenz verantwortlich, sobald sie entlang der Endothelzellen migrieren^{13,236}. Obwohl eine Regulation über PDGF- und VEGF-Inhibition sicherlich auch die gewünschten antiproliferativen Effekte bewirken kann, so sind diese Angriffspunkte extrazellulär gelegen²³⁷. Die komplexen Signalwege des Zellwachstums und der Zellproliferation werden jedoch hauptsächlich intrazellulär gesteuert und sind abhängig von verschiedenen Signalmolekülen. Limitierend bei einer extrazellulären Inhibition von PDGF beispielsweise sind Interaktionen der Rezeptoren mit anderen Molekülen. Beispielsweise zeigen sowohl PDGF-Rezeptoren eine hohe Interaffinität zu VEGF²³⁸ als auch VEGF-Rezeptoren zu PDGF²³⁹. Somit ist ein extrazellulärer Ansatz, beispielsweise die duale Inhibition durch den Einsatz eines PDGF-Aptamers (reine Hemmung von PDGF-BB)^{240,241}, potenziell diesen Limitierungen unterlegen. Dieser Ansatz wurde in einer Phase 3 Studie als duale Inhibition mit Ranibizumab und Pegpleranib (Anti-PDGF-BB Aptamer) untersucht, mit einer fehlenden besseren Wirksamkeit nach 12 Monaten im Vergleich zur reinen anti-VEGF-Monotherapie²⁴². Eine reine PDGF-Blockade durch einen PDGF-Antikörper könnte somit dazu führen, dass die PDGF-R Aktivierung durch potenzielle Kreuzreaktionen mit anderen Wachstumsfaktoren wie z.B. PDGF-DD (ein gut beobachtetes und untersuchtes Phänomen in den hier erwähnten Tyrosinkinasen)^{238,243} weiterhin stattfindet. Ein weiterer Faktor könnte sein, dass die PDGF-R schnell internalisiert werden und die eigentliche Aktivierung intrazellulär weiterläuft. Insbesondere der für die Perizytenaktivität wichtige PDGF-R β scheint deutlich schneller internalisiert zu werden als das PDGF-R α , wie jüngst durch Rogers et al untersucht²⁴⁴. Alldem gegenüber besitzt mTOR hier jedoch als intrazelluläres Schlüsselmolekül eine zentrale Rolle in der Regulation dieser Prozesse durch die Aktivierung von Akt¹³³ und liegt somit als Angriffspunkt deutlich tiefer in der Signalkaskade als die extrazellulären Wachstumsfaktoren oder Rezeptor-Tyrosinkinasen.

Die Auswirkungen auf Proliferation und Migration decken sich gut mit früheren Untersuchungen. Liu et al konnte beispielsweise in Maus-Modellen des Mamma-Karzinoms zeigen, dass eine Inhibition von mTOR eine deutliche Reduktion der Zelldichte von Endothelzellen (um 35%) und Perizyten (um 46%) in der Tumervaskulatur bewirkt²¹⁷. Zusätzlich konnte durch die

Zugabe von Rapamycin eine deutliche Reduktion der HIF-1 α -Konzentration bewirkt werden. Auch wenn die Tumorangio-genese sich maßgeblich von jener bei der neovaskulären altersbedingten Makuladegeneration unterscheidet, so ist beiden Ätiologien gemeinsam, dass eine Gewebhypoxie zur vermehrten VEGF-Sekretion und schließlich zum Wachstum neuer Blutgefäße beiträgt^{13,245}.

Um der komplexen *in vivo* Situation etwas näher zu kommen, waren die durchgeführten Modelle der Tubulogenese besonders relevant, da sie ein dreidimensionales Modell darstellen, in dem die *in-vivo* Aktivität von Rapamycin besser simuliert werden kann²¹⁷. Insbesondere Tube-Assays sind gut dazu geeignet, um (u.a. okuläre) Angiogenesemodelle zu simulieren und untersuchen. So konnten Yang et al in einem solchen Modell nachweisen, dass VEGFR-2 der Hauptregulator in der Tubulogenese ist und dass über diesen Rezeptor für die Angiogenese grundlegende Prozesse wie Mitose, Migration und Gefäßpermeabilität gesteuert werden²⁴⁶. Der Aufbau unserer Versuche folgte bewusst einer zweistufigen Methodik. Zunächst sollten die Effekte auf „junge“ Kapillarstrukturen bzw. auf reine endotheliale Strukturen ohne Ummantelung durch Perizyten untersucht werden. Es konnte eine deutliche dosisabhängige Hemmung der Tubulogenese bis zu 45.1% durch Rapamycin nachgewiesen werden. Da, wie durch Zhang et al untersucht, die physiologische Tubulogenese vor allem VEGF-gesteuert ist²⁴⁷, kann hier zumindest eine aktive Beeinflussung des VEGF-Signalweges vermutet werden. Diese Beobachtung deckt sich zudem gut mit früheren Untersuchungen, die zeigen, dass Rapamycin den VEGF-Signalweg tatsächlich aktiv beeinflusst²⁴⁸, und zwar hauptsächlich über die Modulation der S6-Tyrosinkinase (S6K1), Hemmung der Akt-Aktivierung und Reduzierung des HIF1- α ^{231,249}. Besonders beachtenswert ist die Hemmung der S6K1, die bisher nicht direkt oder nur wenig in Zusammenhang mit einer unkontrollierten Angiogenese gebracht wurde. Die, auch im Rahmen dieser Arbeit, meist diskutierte anti-angiogenetische Wirkung durch Rapamycin wird in der Literatur vor allem durch seine Modulation in der Akt-Aktivierung und Reduktion des HIF1 erklärt. Als zweiten synergistischen Effekt konnte jedoch Xue et al eindeutig auch die Wirkung auf S6K1 nachweisen: Mäuseohren, die mit einem VEGF-A Adenovirus behandelt wurden, zeigten nach Injektion von S6K1-inhibierender shRNA (small hairpin RNA) eine starke Reduktion der Neovaskularisationen²³¹. Neben der vielseitigen und offensichtlichen Effekte auf den VEGFR-2 Signalweg zeigte Luo et al, dass Rapamycin die Bildung von lymphatischen endothelialen Tubes auch über eine Hemmung des VEGF – Rezeptors 3 signifikant reduziert²⁵⁰.

Bedeutend werden diese Ergebnisse vor dem Hintergrund, dass eine mTOR-Inhibition durch Rapamycin potenziell allein ausreicht, um zum einen die endotheliale Angiogenese zu hemmen und zum anderen auch einer beginnenden Gefäßmaturierung durch Perizyten entgegenwirkt. Dies bestätigt bisher jedoch nur, dass die Angiogenese potenziell auch zu einem etwas späteren Zeitpunkt erfolgreich inhibiert oder gar rückgängig gemacht werden kann. Wie es sich bei bereits teil-maturierten (oder sogar fast vollständig maturierten) Gefäßen verhält, kann hier noch nicht abgeleitet werden. Durch Xue et al wissen wir, dass bei bereits maturierten Neovaskularisationen die Effekte von Rapamycin nicht mehr ausreichen, um zu einer Regression der Gefäße zu führen bzw. dass ein Behandlungseffekt dann ausblieb²³¹.

Um dies festzustellen, wurde in-vivo in Mäuseohren die Angiogenese durch ein VEGF-A-Adenovirus angeregt und diese Neovaskularisationen entsprechend ihrer jeweiligen Stadien behandelt. Ein fehlender Effekt bei bereits vollständig maturierten Gefäßen im Rahmen der neovaskulären AMD wäre jedoch aus zweierlei Gründen nicht unbedingt bedenkenswert bzw. möglicherweise sogar von Vorteil. Zum einen soll das physiologische und vollständig maturierte Gefäßsystem der Retina und Choroidea eine Behandlung unbeschadet überstehen. Zum anderen wissen wir, dass stabile und maturierte Neovaskularisationen, die insgesamt keine exsudative Aktivität ausüben, Schutz vor geographischer Atrophie bieten können^{251,252}. Problematischer sind teil-maturierte Gefäße, die weiterhin konstant durch VEGF stimuliert werden, aber durch die bereits begonnene Perizytenakquise therapieresistent gegenüber der herkömmlichen anti-VEGF Medikation sind. Hier besteht weiterhin die Gefahr aktiver Exsudationen und im Ernstfall eine subretinaler Blutung mit massivem Visusverlust. Von Interesse in dieser Hinsicht ist, dass wir durch Etablierung einer Ko-Kultur als Tube-Assay zeigen konnten, dass Rapamycin das Stadium einer partiellen, perizytenbedingten Stabilisierung der endothelialen Tubes rückgängig machen kann, was letztlich eine Regression der Kapillarstrukturen zur Folge hatte. Auch hier ist jedoch anzumerken, dass es sich bisher nur um in-vitro Ergebnisse handelt und auch einige andere Protokolle zur Durchführung von Assays mit Anlage einer Ko-Kultur existieren. Stahl et al nutzte z.B. zwei unterschiedliche Kollagen-Schichten für jede Zelllinie, um die Effekte von Rapamycin auf ein Ko-Kultur-System von Endothelzelle und RPE zu untersuchen²³². Für unsere spezielle Fragestellung jedoch war es wichtig, dass die entstandenen Tubes HUVEC und HRP beinhalten und nicht durch Kollagenschichten voneinander getrennt sind bzw. tatsächliche Zell-Zell-Kontakte entstehen. So konnte sich eine einzige Tubestruktur ausbilden (statt zwei unterschiedlicher), was die tatsächliche Situation in-vivo besser nachahmen soll.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse unserer Experimente die weitreichenden Auswirkungen von Rapamycin auf Perizyten in zwei wichtigen Phasen der Angiogenese und Blutgefäßreifung. Erstens, wie bereits durch Benjamin et al beschrieben¹³, verzögert sich die Rekrutierung und Abdeckung durch Perizyten während der Angiogenese wodurch ein Zeitfenster für den Gefäßumbau entsteht. Durch die Zugabe von Rapamycin zur konventionellen Anti-VEGF-Therapie könnte so die Migration und Proliferation von Perizyten zu den Stellen, an denen neue Blutgefäße wachsen, eingeschränkt werden, was zu einer geringeren Perizytenbedeckung der reifenden endothelialen Tubes führt. Zweitens reagierten bereits gereifte (oder teilweise gereifte), mit Perizyten bedeckte endotheliale Tubes empfindlich auf Rapamycin, wenn das Medikament der Ko-Kultur zugesetzt wurde. In einer klinischen Umgebung könnte dies möglicherweise zu einer Rückbildung neuer pathologischer Blutgefäße führen, wenn eine Kombination aus Rapamycin und Anti-VEGF-Therapie eingesetzt wird. Bei der nAMD könnten so Teile der neuen Blutgefäße, die aufgrund der Perizytenbedeckung nicht mehr von VEGF abhängig sind, wieder VEGF-abhängig werden, falls Rapamycin auch in vivo zur Regression der Perizyten führen sollte.

Aus einer rein klinischen Perspektive wäre insbesondere eine Regression der partiell gereiften Gefäße wichtig. Mehrere Studien zeigen mittels Optischer Kohärenztomographischer

Angiographie (OCT-A), dass die choroidalen Neovaskularisationen zwar auf eine Behandlung mit aktuell verfügbaren Mitteln kurzfristig mit einer Degradation der Gefäße und der Perfusion reagieren, jedoch hartnäckige Persistenz an ihren recht voluminösen Gefäßstämmen zeigen und bei sinkenden anti-VEGF-Leveln wieder beginnen zu wachsen^{253,254}.

In diesem Zusammenhang ist insbesondere die Frage nach der intravitrealen Halbwertszeit von Rapamycin ausschlaggebend, die laut Sarbassov et al idealerweise mehr als 24 Stunden betragen sollte, um eine ausreichende Hemmung auch von mTORC2 zu erreichen¹⁷⁷. Jeeyun Ahn et al. zeigt für die aktuell in Verwendung befindliche Medikation eine Halbwertszeit von sieben Tagen für Bevacizumab, vier Tage für Aflibercept und drei Tage für Ranibizumab²⁵⁵. Mudumba et al untersuchte die Pharmakokinetik eines intravitrealen Depot-Systems für Rapamycin und wies in Kaninchenaugen noch zwei Monate später ausreichend hohe Konzentrationen intravitreal nach²⁵⁶. Hier stehen sicherlich noch weitere Untersuchungen aus, um zu klären, welche Dauer oder Dosis ausreichend (und sicher) zur erfolgreichen Behandlung in menschlichen Augen ist, um eine gegebenenfalls erforderliche mTORC2-Hemmung zu erreichen. Dass eine suffiziente Hemmung des Akt-Signalweges durch Rapamycin nicht nur theoretisch möglich ist, zeigt Phung et al.: Mäuse mit einer transgenetischen myrAKT1-Aktivierung (und dadurch persistierende Aktivierung des Akt-Signalweges) zeigten abnorme Angiogenese mit erhöhter Leckage und daraus resultierender Ödembildung. Behandlung durch Rapamycin inhibierte die endothelialen Akt-Signalwege und die daraus resultierenden ungebremsten Neovaskularisationen¹⁷⁹.

Obwohl in dieser Arbeit nicht untersucht, läge nach Datenlage in der Literatur der Vorteil von Rapamycin gegenüber herkömmlicher Medikation darin, dass synergistisch zur potenziellen Hemmung der Akt-Aktivierung durch mTORC2, der VEGF-Signalweg auch von mTORC1 über die Aktivierung des HIF moduliert wird und damit nicht nur Perizyten sondern auch Endothelzellen gehemmt werden^{257,258}. Somit könnte mit Rapamycin ein Wirkstoff ausreichen, um eine simultane Hemmung mehrerer an der Angiogenese beteiligter Signalwege zu erzielen mit der Erwartung, dass eine Dissoziation der Perizyten nicht zu erhöhter fibrotischer Aktivität führt. Dieses Szenario ist allerdings denkbar, nachdem in Mausmodellen nachgewiesen wurde, dass durch Laserphotokoagulation aktivierte Perizyten den subretinalen Raum infiltrieren und profibrotische Wachstumsfaktoren sezernierten²⁵⁹. Dass Perizyten eine signifikante Rolle in der Ausbildung subretinaler Fibrosen spielen könnten, konnten auch wir in einer Vorstudie feststellen¹⁰⁹. So zeigte sich, dass humane plazentäre Perizyten, die mit Axitinib, einem Pan-VEGFR-PDGFR-Inhibitor, behandelt wurden, zwar einen proto-myofibroblastischen Phänotypen aufweisen, profibrotische zelluläre Mechanismen unter konstanter PDGF-Inhibition jedoch unterdrückt wurden. Welche Auswirkungen dies bei einer *in-vivo* Hemmung durch Axitinib hätte und ob Rapamycin zu einer ähnlichen Veränderung führt, wurde noch nicht untersucht.

Eine subretinale Fibrose kann allerdings auch bei einer unbehandelten neovaskulären altersbedingten Makuladegeneration entstehen und ist bereits 1926 durch Junius und Kuhnt beschrieben worden (Heute auch als „Junius und Kuhnt Narbe“ bekannt)^{260,261}. Diese Folge der

Exsudation, unkontrollierten Produktion profibrotischer und proangiogenetischer Wachstumsfaktoren sowie ungehemmtem fibrovaskulären Wachstum konnte durch die Einführung der intravitrealen anti-VEGF-Behandlung bereits deutlich reduziert werden. Nicht nur die bessere Kontrolle und Minimierung der exsudativen Komponente, sondern auch die reine Reduktion des VEGF führt zur deutlich geringeren Narbenbildung. Dies zeigten bereits Wilgus et al. durch die Messung der VEGF-Konzentration in fetalen, narbenfreien Wunden, die deutlich niedriger waren als in adulten Wunden mit reichem fibrotischem Narbengewebe. Eine Zugabe von VEGF führte auch bei narbenfreien Wunden zu einer deutlichen fibrotischen Narbenreaktion²⁶². Auch konnte gezeigt werden, dass in Wundheilungsreaktionen der Haut VEGF nicht nur durch Keratinozyten, sondern ebenfalls durch dermale Fibroblasten und Makrophagen sezerniert wird^{263,264}. In der okulären Therapie der nAMD zeigte sich in Vergangenheit durch Bloch et al, dass eine 14-tägige Verzögerung der Behandlung bereits ausreicht um ein um 2,24-Fach erhöhtes Risiko einer subretinalen Fibrose zu entwickeln²⁶⁵. Der Grund dafür ist hauptsächlich VEGF und die daraus folgenden Wundheilungsreaktionen: Der Wachstumsfaktor sorgt für einen Anstieg von Matrix-Metalloproteinasen, Plasminogenaktivator, Fibronectin und CTGF (connective tissue growth factor) in den Netzhäuten von Ratten, alles wichtige Bestandteile in Wundheilungsreaktion und fibrotischer Narbenbildung²⁶⁶. Darüber hinaus werden durch VEGF mehrere profibrotische Gene sowie α -SMA (alpha-smooth muscle actin) und Kollagen hochreguliert²⁶⁷.

Trotz der deutlichen Reduktion in fibrotischer Wundheilung durch die anti-VEGF-Therapie zeigen Langezeitbeobachtungen in den CATT-Trials, dass die subretinale Fibrose weiterhin mit einer Prävalenz von 45.3% in 2 Jahren ein stark visuslimitierender Faktor bei der nAMD bleibt^{104,265}. Genau hier könnte sich das zusätzliche Potenzial von Rapamycin entfalten: MTOR ist ein sehr integraler Bestandteil des zellulären Metabolismus. Als zentraler Regulator steuert er grundlegende Signalwege, die bei vielen verschiedenen Krankheiten dysreguliert zu sein scheinen. So auch in fibrotischen Signalwegen: Jiang et al konnte zeigen, dass in durch transforming growth factor-beta (TGF- β) aktivierte interstitielle Fibroblasten in Ratten nieren auch eine erhöhte Aktivität im Rheb/mTORC1 Signalweg verursachten, während die Behandlung mit Rapamycin die Fibroblastenaktivierung wieder aufheben ließ²⁶⁸. In der Literatur sind zudem zahlreiche Hinweise bekannt, dass eine mTOR-Hemmung auch eine Hemmung fibrotischer Signalwege in vielen weiteren Organen wie z.B. in der Lunge oder der Leber erzielen kann²⁶⁹⁻²⁷³. Erst jüngst zeigte Zhao et al (2022), dass eine Transition choroidaler Perizyten zu Myofibroblasten eine ausschlaggebende Rolle in Bildung subretinaler Fibrose spielt²⁰¹. Gesteuert wird dies vor allem über das TGF- β 2 aber auch den Akt/mTOR-Signalweg. Die Behandlung mit Rapamycin zeigte eine wirkungsvolle Reduktion der Transition von Perizyten in Myofibroblasten und bekräftigt den möglichst frühen Einsatz des mTOR-Inhibitors zur Prävention oder auch potenziellen Behandlung subretinaler Fibrose. Zusammen mit der ebenfalls wirkungsvollen Angiogenesehemmung zeigt Rapamycin einen multimodalen Therapieansatz, der deutliche Vorteile gegenüber einer reinen anti-VEGF-Behandlung haben könnte.

Einige Limitationen sind zu beachten. Die hier dargestellten Ergebnisse und Versuche sind reine *in-vitro* Daten. Die komplexe *in vivo* Situation und die Interaktion verschiedener Zellen und Wachstumsfaktoren lässt sich auf diese Weise nur annähernd simulieren und kann tatsächlich *in vivo* zu anderen oder keinen wirksamen Ergebnissen führen. Von Vorteil ist, dass im Rahmen der Untersuchungen eine primäre humane Zelllinie in Kokultur verwendet wurden, um eine möglichst realitätsnahe Situation zu simulieren. Eine andere Limitierung ist bereits weiter oben angesprochen worden: Rapamycin ist ein mTORC1-Hemmer. Die Signalkette durch mTORC2 wird hier somit nicht direkt unterbrochen. Potenziell kann jedoch der Akt-Signalweg durch mTORC2 ungehindert weiter stimuliert werden und somit auch die Expression von VEGF. Dies ist aber insbesondere bei einer zu geringen Dosierung bzw. einer zu kurzen Inkubationszeit zu erwarten. Ob die Akt-Aktivierung durch ausbleibende mTORC2-Hemmung tatsächlich eine Auswirkung auf die Angiogenesehemmung hat, ist unklar und wurde nicht untersucht. In unseren Versuchen zeigte bereits die geringste Dosis einen antimigratorischen als auch einen antiproliferativen Effekt. Sicher ist jedoch, dass eine höhere Dosis dazu führt, dass an mTORC1-gebundenes Rapamycin keinen Komplex mit mTORC2 mehr bilden kann und dadurch indirekt eine Aktivierung ausbleibt¹⁷⁷.

Als letzter und dritter Punkt ist zu bedenken, dass eine mTOR -Hemmung insgesamt sehr unspezifisch ist. Als recht zentraler Regulator vieler intrazellulärer Mechanismen, darunter auch Zellwachstum- und Proliferation, kann eine solche Hemmung potenziell zu Dysregulationen führen, die andere Konsequenzen zur Folge haben. Daher sind hier weitere Untersuchungen – insbesondere *in vivo* – erforderlich, um das Sicherheitsprofil besser zu identifizieren. Hier ist jedoch glücklicherweise anzumerken, dass Sirolimus bereits als intravitreales Medikament zur Behandlung bei der Uveitis *in-vivo* auch in Menschen getestet wurde und dabei ein gutes Sicherheitsprofil aufzuweisen scheint²⁷⁴. Alternativ kämen auch moderne Ansätze wie eine suprachoroidale Gabe in Frage²⁷⁵. Brooks et al zeigten erst kürzlich, dass suprachoroidal appliziertes liposomales Sirolimus in Kaninchenaugen ein gutes pharmakokinetisches Profil aufweist²⁷⁶. Beim uveitischen Makulaödem gibt es bereits Erfahrungen und eine FDA-Zulassung für das suprachoroidal verabreichte Medikament Xipere® (Triamcinolon) mit einer verbesserten Effektivität als die intravitreale Applikation bei gleicher Sicherheit²⁷⁷. Um dies weiter zu evaluieren, wären im nächsten Schritt *in vivo* Experimente im Tiermodell anzustreben. Sinnvoll ist aber weiterhin eine möglichst lokale Verwendung, um systemische Risiken zu reduzieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Arbeit eine signifikante Hemmung der Angiogenese in humanen retinalen Perizyten und humanen umbilikalen Endothelzellen durch Rapamycin eindeutig bestätigt. Somit könnte das Medikament potenziell Patienten helfen, die auf die herkömmliche Monotherapie nicht ansprechen (sogenannte „Non-Responder“), als auch durch die potenziell antifibrotischen Eigenschaften (zum einen durch die mTOR-Hemmung selbst und zum anderen durch die Hemmung der Perizyten) vor potenziellen Langzeitfolgen einer subretinalen Fibrose und somit vor einem langsam einsetzenden Effektivitätsverlust der reinen anti-VEGF-Therapie schützen. Mit einem Wechsel des therapeutischen Ziels von VEGF hin zu mTOR werden die aktuell bedeutendsten Gründe für ein

Therapieversagen angesprochen. Letztlich sind jedoch weitere Untersuchungen (in-vitro und in-vivo) erforderlich, um das Potenzial von Rapamycin als Monotherapie oder in Kombination mit anderen anti-VEGF-Medikamenten für die Behandlung der neovaskulären AMD vollständig zu verstehen. Mit Hinblick auf die potenziell fehlende mTORC2-Inhibition, sollte die Pharmakokinetik und insbesondere die vitreale Eliminationszeit bzw. Halbwertszeit genauer untersucht werden. Letztlich stehen vor allem klinische Studien aus, in denen auch untersucht werden sollte, ob eine Monotherapie ausreicht, oder ob eine Kombinationstherapie mit herkömmlicher intravitrealer anti-VEGF wirkungsvoller ist.

Die vorliegende Forschungsarbeit hat aufgezeigt, wie tiefgehend die duale Inhibition von Endothelzellen und Perizyten in Verbindung mit der m-TOR-Hemmung in den Mechanismus der Angiogenese eingreift. Die umfassende Literaturanalyse untermauert die Bedeutung dieser dualen Hemmungsstrategie für die Regulierung von Angiogenesevorgängen. Gleichzeitig wird die Wirksamkeit der m-TOR-Hemmung durch die Experimente in humanen retinalen Perizyten auf beeindruckende Weise bekräftigt, indem sie eine klare anti-angiogenetische Wirkung zeigt. Dies eröffnet nicht nur ein neues Verständnis für die molekularen Wege, die an der Bildung neuer Blutgefäße beteiligt sind, sondern legt auch den Grundstein für potenziell revolutionäre Ansätze zur Behandlung der neovaskulären altersbedingten Makuladegeneration. In Anbetracht der steigenden Prävalenz der altersbedingten Makuladegeneration in unserer alternden Gesellschaft sind solche Entwicklungen von größter Bedeutung, um das Sehvermögen und die Lebensqualität von Betroffenen zu verbessern. Insgesamt verweist aber diese Arbeit auf die Dringlichkeit und den Nutzen weiterer Forschungsanstrengungen, bei denen die hier gewonnen Erkenntnisse als Grundstein dienen können, um diese neuartigen Therapiekonzepte zu entwickeln.

5 Literaturverzeichnis

1. Grossniklaus HE, Geisert EE, Nickerson JM. Introduction to the Retina. *Progress in molecular biology and translational science* 2015; **134**: 383-96.
2. Neurodiagnostics Laboratory @ Charité - Universitätsmedizin Berlin G. Schematic Figure - Retina (Creative Commons License - Modified by Ben Asani). 2017. <http://neurodial.de/2017/08/25/schematic-figure-retina-creative-commons-license/> (accessed December 12th 2022).
3. Keane PA, Patel PJ, Liakopoulos S, Heussen FM, Sadda SR, Tufail A. Evaluation of age-related macular degeneration with optical coherence tomography. *Survey of ophthalmology* 2012; **57**(5): 389-414.
4. Huang D, Swanson EA, Lin CP, et al. Optical coherence tomography. *Science (New York, NY)* 1991; **254**(5035): 1178-81.
5. Neurodiagnostics Laboratory @ Charité - Universitätsmedizin Berlin G. Schematic Figure - Macular OCT with Intraretinal Layers (Creative Commons License). 2017. <http://neurodial.de/2017/08/25/schematic-figure-macular-oct-with-intraretinal-layers/> (accessed December 5th 2022).
6. Welsch U, Deller T, Kummer W. Lehrbuch histologie: Elsevier, Urban & Fischer; 2014.
7. Deller T, Welsch, Ulrich and Kummer, Wolfgang. Lehrbuch Histologie: Elsevier; 2018.
8. Fruttiger M. Development of the retinal vasculature. *Angiogenesis* 2007; **10**: 77-88.
9. Joussen AM, Gardner TW, Kirchhof B, Ryan SJ. Retinal vascular disease: Springer; 2007.
10. Selvam S, Kumar T, Fruttiger M. Retinal vasculature development in health and disease. *Progress in retinal and eye research* 2018; **63**: 1-19.
11. Loges S, Fehse B, Brockmann MA, et al. Identification of the adult human hemangioblast. *Stem cells and development* 2004; **13**(3): 229-42.
12. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell* 2011; **146**(6): 873-87.
13. Benjamin LE, Hemo I, Keshet E. A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development* 1998; **125**(9): 1591-8.
14. Ashton N. Retinal angiogenesis in the human embryo. *Br Med Bull* 1970; **26**(2): 103-6.
15. Stahl A, Connor KM, Sapieha P, et al. The mouse retina as an angiogenesis model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; **51**(6): 2813-26.
16. Roth AM. Retinal vascular development in premature infants. *Am J Ophthalmol* 1977; **84**(5): 636-40.
17. Wong WL, Su X, Li X, et al. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Global health* 2014; **2**(2): e106-16.

18. Klein R, Klein BE, Linton KL. Prevalence of age-related maculopathy. The Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology* 1992; **99**(6): 933-43.
19. Friedman E. Update of the vascular model of AMD. BMJ Publishing Group Ltd; 2004. p. 161-3.
20. Leibowitz HM, Krueger DE, Mauser LR, et al. The Framingham Eye Study monograph: An ophthalmological and epidemiological study of cataract, glaucoma, diabetic retinopathy, macular degeneration, and visual acuity in a general population of 2631 adults, 1973-1975. *Survey of ophthalmology* 1980; **24**(Suppl): 335-610.
21. Khan JC, Thurlby DA, Shahid H, et al. Smoking and age related macular degeneration: the number of pack years of cigarette smoking is a major determinant of risk for both geographic atrophy and choroidal neovascularisation. *The British journal of ophthalmology* 2006; **90**(1): 75-80.
22. Smailhodzic D, Muether PS, Chen J, et al. Cumulative effect of risk alleles in CFH, ARMS2, and VEGFA on the response to ranibizumab treatment in age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2012; **119**(11): 2304-11.
23. Bird AC, Bressler NM, Bressler SB, et al. An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. *Survey of ophthalmology* 1995; **39**(5): 367-74.
24. Smith W, Assink J, Klein R, et al. Risk factors for age-related macular degeneration: Pooled findings from three continents. *Ophthalmology* 2001; **108**(4): 697-704.
25. Evans JR, Fletcher AE, Wormald RP. 28,000 Cases of age related macular degeneration causing visual loss in people aged 75 years and above in the United Kingdom may be attributable to smoking. *The British journal of ophthalmology* 2005; **89**(5): 550-3.
26. Zipfel PF, Lauer N, Skerka C. The role of complement in AMD. *Advances in experimental medicine and biology* 2010; **703**: 9-24.
27. Hageman GS, Anderson DH, Johnson LV, et al. A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2005; **102**(20): 7227-32.
28. Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, et al. Complement Factor H Polymorphism in Age-Related Macular Degeneration. *Science (New York, NY)* 2005; **308**(5720): 385-9.
29. Stanton CM, Yates JR, den Hollander AI, et al. Complement factor D in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; **52**(12): 8828-34.
30. Yates JR, Sepp T, Matharu BK, et al. Complement C3 variant and the risk of age-related macular degeneration. *New England Journal of Medicine* 2007; **357**(6): 553-61.
31. Risk factors associated with age-related macular degeneration. A case-control study in the age-related eye disease study: Age-Related Eye Disease Study Report Number 3. *Ophthalmology* 2000; **107**(12): 2224-32.

32. Neale BM, Fagerness J, Reynolds R, et al. Genome-wide association study of advanced age-related macular degeneration identifies a role of the hepatic lipase gene (LIPC). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010; **107**(16): 7395-400.
33. Bressler NM, Bressler SB, Fine SL. Age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol* 1988; **32**(6): 375-413.
34. Coleman HR, Chan CC, Ferris FL, 3rd, Chew EY. Age-related macular degeneration. *Lancet (London, England)* 2008; **372**(9652): 1835-45.
35. Crabb JW, Miyagi M, Gu X, et al. Drusen proteome analysis: an approach to the etiology of age-related macular degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002; **99**(23): 14682-7.
36. Ramrattan RS, van der Schaft TL, Mooy CM, De Bruijn W, Mulder P, De Jong P. Morphometric analysis of Bruch's membrane, the choriocapillaris, and the choroid in aging. *Investigative ophthalmology & visual science* 1994; **35**(6): 2857-64.
37. Sohn EH, Flamme-Wiese MJ, Whitmore SS, et al. Choriocapillaris degeneration in geographic atrophy. *The American journal of pathology* 2019; **189**(7): 1473-80.
38. FRIEDMAN E, SMITH TR, KUWABARA T, BEYER CK, Mimura S. Choroidal vascular patterns in hypertension. *Archives of Ophthalmology* 1964; **71**(6): 842-50.
39. Pauleikhoff D, Chen J, Chisholm I, Bird A. Choroidal perfusion abnormalities in age related macular disease. *Am J Ophthalmol* 1990; **109**(2): 211-7.
40. Curcio CA, Millican CL. Basal linear deposit and large drusen are specific for early age-related maculopathy. *Archives of ophthalmology* 1999; **117**(3): 329-39.
41. Bird A, Marshall J. Retinal pigment epithelial detachments in the elderly. *Transactions of the ophthalmological societies of the United Kingdom* 1986; **105**(6): 674-82.
42. Sheraidah G, Steinmetz R, Maguire J, Pauleikhoff D, Marshall J, Bird AC. Correlation between lipids extracted from Bruch's membrane and age. *Ophthalmology* 1993; **100**(1): 47-51.
43. Li C-M, Chung BH, Presley JB, et al. Lipoprotein-like particles and cholesteryl esters in human Bruch's membrane: initial characterization. *Investigative ophthalmology & visual science* 2005; **46**(7): 2576-86.
44. Yoshida T, Ohno-Matsui K, Ichinose S, et al. The potential role of amyloid beta in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *The Journal of clinical investigation* 2005; **115**(10): 2793-800.
45. Hageman GS, Mullins RF, Russell SR, Johnson LV, Anderson DH. Vitronectin is a constituent of ocular drusen and the vitronectin gene is expressed in human retinal pigmented epithelial cells. *Faseb j* 1999; **13**(3): 477-84.
46. Lommatzsch A, Hermans P, Weber B, Pauleikhoff D. Complement factor H variant Y402H and basal laminar deposits in exudative age-related macular degeneration. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 2007; **245**(11): 1713-6.

47. Wasmuth S, Lueck K, Baehler H, Lommatzsch A, Pauleikhoff D. Increased vitronectin production by complement-stimulated human retinal pigment epithelial cells. *Investigative ophthalmology & visual science* 2009; **50**(11): 5304-9.
48. Hageman GS, Luthert PJ, Victor Chong NH, Johnson LV, Anderson DH, Mullins RF. An integrated hypothesis that considers drusen as biomarkers of immune-mediated processes at the RPE-Bruch's membrane interface in aging and age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res* 2001; **20**(6): 705-32.
49. Kernt M, Neubauer AS, Liegl R, et al. Cytoprotective effects of a blue light-filtering intraocular lens on human retinal pigment epithelium by reducing phototoxic effects on vascular endothelial growth factor- α , Bax, and Bcl-2 expression. *Journal of cataract and refractive surgery* 2009; **35**(2): 354-62.
50. Feeney-Burns L, Eldred G. The fate of the phagosome: conversion to 'age pigment' and impact in human retinal pigment epithelium. *Transactions of the ophthalmological societies of the United Kingdom* 1983; **103**: 416-21.
51. Rózanowska M, Korytowski W, Rózanowski B, et al. Photoreactivity of aged human RPE melanosomes: a comparison with lipofuscin. *Investigative ophthalmology & visual science* 2002; **43**(7): 2088-96.
52. Zhou J, Kim SR, Westlund BS, Sparrow JR. Complement activation by bisretinoid constituents of RPE lipofuscin. *Investigative ophthalmology & visual science* 2009; **50**(3): 1392-9.
53. Coffey PJ, Gias C, McDermott CJ, et al. Complement factor H deficiency in aged mice causes retinal abnormalities and visual dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**(42): 16651-6.
54. Kim YH, He S, Kase S, Kitamura M, Ryan SJ, Hinton DR. Regulated secretion of complement factor H by RPE and its role in RPE migration. *Graefes's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 2009; **247**(5): 651-9.
55. Ferris FL, Fine SL, Hyman L. Age-related macular degeneration and blindness due to neovascular maculopathy. *Archives of ophthalmology* 1984; **102**(11): 1640-2.
56. Fine AM, Elman MJ, Ebert JE, Prestia PA, Starr JS, Fine SL. Earliest symptoms caused by neovascular membranes in the macula. *Archives of ophthalmology* 1986; **104**(4): 513-4.
57. Green WR, Key 3rd SN. Senile macular degeneration: a histopathologic study. *Transactions of the American Ophthalmological Society* 1977; **75**: 180.
58. Green WR, Enger C. Age-related macular degeneration histopathologic studies: the 1992 Lorenz E. Zimmerman Lecture. *Ophthalmology* 1993; **100**(10): 1519-35.
59. Bressler SB, Silva JC, Bressler NM, Alexander J, Green WR. Clinicopathologic correlation of occult choroidal neovascularization in age-related macular degeneration. *Archives of ophthalmology* 1992; **110**(6): 827-32.
60. Ambati J, Ambati BK, Yoo SH, Ianchulev S, Adamis AP. Age-related macular degeneration: etiology, pathogenesis, and therapeutic strategies. *Survey of ophthalmology* 2003; **48**(3): 257-93.

61. Michaelson IC. The mode of development of the vascular system of the retina with some observations on its significance for certain retinal disorders. *Trans Ophthalmol Soc UK* 1948; **68**: 137-80.
62. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science (New York, NY)* 1983; **219**(4587): 983-5.
63. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science (New York, NY)* 1989; **246**(4935): 1306-9.
64. Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *The New England journal of medicine* 1994; **331**(22): 1480-7.
65. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, et al. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *The Journal of biological chemistry* 1991; **266**(18): 11947-54.
66. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 1999; **13**(1): 9-22.
67. Nowak DG, Amin EM, Rennel ES, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) splicing from pro-angiogenic to anti-angiogenic isoforms: a novel therapeutic strategy for angiogenesis. *The Journal of biological chemistry* 2010; **285**(8): 5532-40.
68. Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *The Journal of biological chemistry* 1992; **267**(36): 26031-7.
69. Keyt BA, Berleau LT, Nguyen HV, et al. The carboxyl-terminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. *The Journal of biological chemistry* 1996; **271**(13): 7788-95.
70. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature medicine* 2003; **9**(6): 669-76.
71. Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane A, et al. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene* 1990; **5**(4): 519-24.
72. Terman BI, Carrion ME, Kovacs E, Rasmussen BA, Eddy RL, Shows TB. Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 1991; **6**(9): 1677-83.
73. de Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science (New York, NY)* 1992; **255**(5047): 989-91.
74. Guo D, Jia Q, Song HY, Warren RS, Donner DB. Vascular endothelial cell growth factor promotes tyrosine phosphorylation of mediators of signal transduction that contain SH2 domains.

- Association with endothelial cell proliferation. *The Journal of biological chemistry* 1995; **270**(12): 6729-33.
75. Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA, Ferrara N. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *The Journal of biological chemistry* 1994; **269**(41): 25646-54.
76. Hiratsuka S, Minowa O, Kuno J, Noda T, Shibuya M. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998; **95**(16): 9349-54.
77. Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 1995; **376**(6535): 66-70.
78. Fong GH, Zhang L, Bryce DM, Peng J. Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice. *Development (Cambridge, England)* 1999; **126**(13): 3015-25.
79. Kendall RL, Thomas KA. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993; **90**(22): 10705-9.
80. Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 1998; **92**(6): 735-45.
81. Neufeld G, Cohen T, Shraga N, Lange T, Kessler O, Herzog Y. The neuropilins: multifunctional semaphorin and VEGF receptors that modulate axon guidance and angiogenesis. *Trends in cardiovascular medicine* 2002; **12**(1): 13-9.
82. Giger RJ, Cloutier JF, Sahay A, et al. Neuropilin-2 is required in vivo for selective axon guidance responses to secreted semaphorins. *Neuron* 2000; **25**(1): 29-41.
83. Li J, Perrella MA, Tsai JC, et al. Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by interleukin-1 beta in rat aortic smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry* 1995; **270**(1): 308-12.
84. Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G, Levi BZ. Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *The Journal of biological chemistry* 1996; **271**(2): 736-41.
85. Soh EY, Sobhi SA, Wong MG, et al. Thyroid-stimulating hormone promotes the secretion of vascular endothelial growth factor in thyroid cancer cell lines. *Surgery* 1996; **120**(6): 944-7.
86. Shifren JL, Mesiano S, Taylor RN, Ferrara N, Jaffe RB. Corticotropin regulates vascular endothelial growth factor expression in human fetal adrenal cortical cells. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 1998; **83**(4): 1342-7.
87. Ferrara N, Chen H, Davis-Smyth T, et al. Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nature medicine* 1998; **4**(3): 336-40.
88. Grugel S, Finkenzeller G, Weindel K, Barleon B, Marme D. Both v-Ha-Ras and v-Raf stimulate expression of the vascular endothelial growth factor in NIH 3T3 cells. *The Journal of biological chemistry* 1995; **270**(43): 25915-9.

89. Rak J, Mitsuhashi Y, Bayko L, et al. Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer research* 1995; **55**(20): 4575-80.
90. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992; **359**(6398): 843-5.
91. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Molecular and cellular biology* 1996; **16**(9): 4604-13.
92. Semenza G. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochemical pharmacology* 2002; **64**(5-6): 993-8.
93. Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, Pode D, Keshet E. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *The Journal of clinical investigation* 1999; **103**(2): 159-65.
94. Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* 1998; **273**(21): 13313-6.
95. Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, et al. Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *The Journal of Experimental Medicine* 1990; **172**(6): 1535-45.
96. Broxmeyer HE, Cooper S, Li ZH, et al. Myeloid progenitor cell regulatory effects of vascular endothelial cell growth factor. *International journal of hematology* 1995; **62**(4): 203-15.
97. Gerber HP, Hillan KJ, Ryan AM, et al. VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development (Cambridge, England)* 1999; **126**(6): 1149-59.
98. Lee S, Chen TT, Barber CL, et al. Autocrine VEGF signaling is required for vascular homeostasis. *Cell* 2007; **130**(4): 691-703.
99. Aiello LP, Northrup JM, Keyt BA, Takagi H, Iwamoto MA. Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor in retinal cells. *Archives of ophthalmology* 1995; **113**(12): 1538-44.
100. Aiello LP, Pierce EA, Foley ED, et al. Suppression of retinal neovascularization in vivo by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995; **92**(23): 10457-61.
101. Klettner A, Roider J. Comparison of bevacizumab, ranibizumab, and pegaptanib in vitro: efficiency and possible additional pathways. *Investigative ophthalmology & visual science* 2008; **49**(10): 4523-7.
102. Heier JS, Khanani AM, Ruiz CQ, et al. Efficacy, durability, and safety of intravitreal faricimab up to every 16 weeks for neovascular age-related macular degeneration (TENAYA and LUCERNE): two randomised, double-masked, phase 3, non-inferiority trials. *The Lancet* 2022; **399**(10326): 729-40.

103. Rofagha S, Bhisitkul RB, Boyer DS, Sadda SR, Zhang K. Seven-year outcomes in ranibizumab-treated patients in ANCHOR, MARINA, and HORIZON: a multicenter cohort study (SEVEN-UP). *Ophthalmology* 2013; **120**(11): 2292-9.
104. Daniel E, Toth CA, Grunwald JE, et al. Risk of scar in the comparison of age-related macular degeneration treatments trials. *Ophthalmology* 2014; **121**(3): 656-66.
105. Ishikawa K, Kannan R, Hinton DR. Molecular mechanisms of subretinal fibrosis in age-related macular degeneration. *Experimental eye research* 2016; **142**: 19-25.
106. Grossniklaus HE, Green WR. Histopathologic and ultrastructural findings of surgically excised choroidal neovascularization. Submacular Surgery Trials Research Group. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill : 1960)* 1998; **116**(6): 745-9.
107. ERBER R, THURNHER A, KATSEN AD, et al. Combined inhibition of VEGF and PDGF signaling enforces tumor vessel regression by interfering with pericyte-mediated endothelial cell survival mechanisms. *The FASEB Journal* 2004; **18**(2): 338-40.
108. Jaffe GJ, Ciulla TA, Ciardella AP, et al. Dual Antagonism of PDGF and VEGF in Neovascular Age-Related Macular Degeneration: A Phase IIb, Multicenter, Randomized Controlled Trial. *Ophthalmology* 2017; **124**(2): 224-34.
109. Siedlecki J, Asani B, Wertheimer C, et al. Combined VEGF/PDGF inhibition using axitinib induces α SMA expression and a pro-fibrotic phenotype in human pericytes. *Graefes's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 2018; **256**(6): 1141-9.
110. Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C. Endothelial/pericyte interactions. *Circulation research* 2005; **97**(6): 512-23.
111. Allt G, Lawrenson J. Pericytes: cell biology and pathology. *Cells tissues organs* 2001; **169**(1): 1-11.
112. Sims DE. The pericyte—a review. *Tissue and Cell* 1986; **18**(2): 153-74.
113. Díaz-Flores L, Gutiérrez R, Varela H, Rancel N, Valladares F. Microvascular pericytes, a review of their morphological and functional characteristics. *Histology and histopathology* 1991.
114. Shepro D, Morel NM. Pericyte physiology. *The FASEB Journal* 1993; **7**(11): 1031-8.
115. Ross R, Glomset J, Kariya B, Harker L. A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1974; **71**(4): 1207-10.
116. Heldin CH, Eriksson U, Ostman A. New members of the platelet-derived growth factor family of mitogens. *Archives of biochemistry and biophysics* 2002; **398**(2): 284-90.
117. Waterfield MD, Scrase GT, Whittle N, et al. Platelet-derived growth factor is structurally related to the putative transforming protein p28sis of simian sarcoma virus. *Nature* 1983; **304**(5921): 35-9.
118. Betsholtz C, Johnsson A, Heldin CH, et al. cDNA sequence and chromosomal localization of human platelet-derived growth factor A-chain and its expression in tumour cell lines. *Nature* 1986; **320**(6064): 695-9.

119. Li X, Ponten A, Aase K, et al. PDGF-C is a new protease-activated ligand for the PDGF alpha-receptor. *Nature cell biology* 2000; **2**(5): 302-9.
120. LaRoche WJ, Jeffers M, McDonald WF, et al. PDGF-D, a new protease-activated growth factor. *Nature cell biology* 2001; **3**(5): 517-21.
121. Reigstad LJ, Varhaug JE, Lillehaug JR. Structural and functional specificities of PDGF-C and PDGF-D, the novel members of the platelet-derived growth factors family. *The FEBS journal* 2005; **272**(22): 5723-41.
122. Ustach CV, Huang W, Conley-LaComb MK, et al. A novel signaling axis of matriptase/PDGF-D/ss-PDGFR in human prostate cancer. *Cancer research* 2010; **70**(23): 9631-40.
123. Ustach CV, Kim HR. Platelet-derived growth factor D is activated by urokinase plasminogen activator in prostate carcinoma cells. *Molecular and cellular biology* 2005; **25**(14): 6279-88.
124. Cooper JA, Bowen-Pope DF, Raines E, Ross R, Hunter T. Similar effects of platelet-derived growth factor and epidermal growth factor on the phosphorylation of tyrosine in cellular proteins. *Cell* 1982; **31**(1): 263-73.
125. Bowen-Pope DF, Ross R. Platelet-derived growth factor. II. Specific binding to cultured cells. *The Journal of biological chemistry* 1982; **257**(9): 5161-71.
126. Pike LJ, Bowen-Pope DF, Ross R, Krebs EG. Characterization of platelet-derived growth factor-stimulated phosphorylation in cell membranes. *The Journal of biological chemistry* 1983; **258**(15): 9383-90.
127. Demoulin JB, Essaghir A. PDGF receptor signaling networks in normal and cancer cells. *Cytokine Growth Factor Rev* 2014; **25**(3): 273-83.
128. Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes & development* 2008; **22**(10): 1276-312.
129. Kourembanas S, Morita T, Liu Y, Christou H. Mechanisms by which oxygen regulates gene expression and cell-cell interaction in the vasculature. *Kidney international* 1997; **51**(2): 438-43.
130. Harlan JM, Thompson PJ, Ross RR, Bowen-Pope DF. Alpha-thrombin induces release of platelet-derived growth factor-like molecule(s) by cultured human endothelial cells. *The Journal of cell biology* 1986; **103**(3): 1129-33.
131. Bowen-Pope DF, Malpass TW, Foster DM, Ross R. Platelet-derived growth factor in vivo: levels, activity, and rate of clearance. *Blood* 1984; **64**(2): 458-69.
132. Armulik A, Genov  G, Betsholtz C. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Developmental cell* 2011; **21**(2): 193-215.
133. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* 2017; **168**(6): 960-76.
134. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan K-L. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature cell biology* 2011; **13**(2): 132-41.

135. Rousseau A, Bertolotti A. An evolutionarily conserved pathway controls proteasome homeostasis. *Nature* 2016; **536**(7615): 184-9.
136. Zhao J, Zhai B, Gygi SP, Goldberg AL. mTOR inhibition activates overall protein degradation by the ubiquitin proteasome system as well as by autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2015; **112**(52): 15790-7.
137. Kim D-H, Sarbassov DD, Ali SM, et al. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 2002; **110**(2): 163-75.
138. Hara K, Maruki Y, Long X, et al. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* 2002; **110**(2): 177-89.
139. Kim D-H, Sarbassov DD, Ali SM, et al. GβL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Molecular cell* 2003; **11**(4): 895-904.
140. Sancak Y, Thoreen CC, Peterson TR, et al. PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Molecular cell* 2007; **25**(6): 903-15.
141. Haar EV, Lee S-i, Bandhakavi S, Griffin TJ, Kim D-H. Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nature cell biology* 2007; **9**(3): 316-23.
142. Wang L, Harris TE, Roth RA, Lawrence JC. PRAS40 regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding. *Journal of Biological Chemistry* 2007; **282**(27): 20036-44.
143. Peterson TR, Laplante M, Thoreen CC, et al. DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell* 2009; **137**(5): 873-86.
144. Bond P. Regulation of mTORC1 by growth factors, energy status, amino acids and mechanical stimuli at a glance. *Journal of the International Society of Sports Nutrition* 2016; **13**(1): 8.
145. Inoki K, Li Y, Xu T, Guan K-L. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes & development* 2003; **17**(15): 1829-34.
146. Tee AR, Manning BD, Roux PP, Cantley LC, Blenis J. Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberlin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb. *Current biology* 2003; **13**(15): 1259-68.
147. Long X, Lin Y, Ortiz-Vega S, Yonezawa K, Avruch J. Rheb binds and regulates the mTOR kinase. *Current biology* 2005; **15**(8): 702-13.
148. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, et al. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Molecular cell* 2008; **30**(2): 214-26.
149. Shah OJ, Wang Z, Hunter T. Inappropriate activation of the TSC/Rheb/mTOR/S6K cassette induces IRS1/2 depletion, insulin resistance, and cell survival deficiencies. *Current biology* 2004; **14**(18): 1650-6.

150. Feng Z, Hu W, De Stanchina E, et al. The regulation of AMPK β 1, TSC2, and PTEN expression by p53: stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways. *Cancer research* 2007; **67**(7): 3043-53.
151. Sancak Y, Peterson TR, Shaul YD, et al. The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science (New York, NY)* 2008; **320**(5882): 1496-501.
152. Kim E, Goraksha-Hicks P, Li L, Neufeld TP, Guan K-L. Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nature cell biology* 2008; **10**(8): 935-45.
153. Sancak Y, Bar-Peled L, Zoncu R, Markhard AL, Nada S, Sabatini DM. Regulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell* 2010; **141**(2): 290-303.
154. Bar-Peled L, Schweitzer LD, Zoncu R, Sabatini DM. Regulator is a GEF for the rag GTPases that signal amino acid levels to mTORC1. *Cell* 2012; **150**(6): 1196-208.
155. Bodine SC. mTOR signaling and the molecular adaptation to resistance exercise. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 2006; **38**(11): 1950-7.
156. Waterfield M, Downward J. Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* 1994; **370**: 527-32.
157. Toker A, Cantley LC. Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* 1997; **387**(6634): 673-6.
158. Fruman DA, Meyers RE, Cantley LC. Phosphoinositide kinases. *Annual review of biochemistry* 1998; **67**: 481.
159. Yang G, Murashige DS, Humphrey SJ, James DE. A Positive Feedback Loop between Akt and mTORC2 via SIN1 Phosphorylation. *Cell Rep* 2015; **12**(6): 937-43.
160. Holz MK, Ballif BA, Gygi SP, Blenis J. mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell* 2005; **123**(4): 569-80.
161. Porstmann T, Santos CR, Griffiths B, et al. SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. *Cell metabolism* 2008; **8**(3): 224-36.
162. Düvel K, Yecies JL, Menon S, et al. Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Molecular cell* 2010; **39**(2): 171-83.
163. Peterson TR, Sengupta SS, Harris TE, et al. mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. *Cell* 2011; **146**(3): 408-20.
164. Ben-Sahra I, Howell JJ, Asara JM, Manning BD. Stimulation of de novo pyrimidine synthesis by growth signaling through mTOR and S6K1. *Science (New York, NY)* 2013; **339**(6125): 1323-8.
165. Kwiatkowski D. Tuberous sclerosis: from tubers to mTOR. *Annals of human genetics* 2003; **67**(1): 87-96.
166. Tee AR, Fingar DC, Manning BD, Kwiatkowski DJ, Cantley LC, Blenis J. Tuberous sclerosis complex-1 and-2 gene products function together to inhibit mammalian target of

- rapamycin (mTOR)-mediated downstream signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2002; **99**(21): 13571-6.
167. Hsieh AC, Liu Y, Edlind MP, et al. The translational landscape of mTOR signalling steers cancer initiation and metastasis. *Nature* 2012; **485**(7396): 55-61.
168. Thoreen CC, Chantranupong L, Keys HR, Wang T, Gray NS, Sabatini DM. A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. *Nature* 2012; **485**(7396): 109-13.
169. Liu P, Gan W, Chin YR, et al. PtdIns (3, 4, 5) P3-Dependent Activation of the mTORC2 Kinase Complex PtdIns (3, 4, 5) P3 Activates mTORC2 by Binding the SIN1-PH Domain. *Cancer discovery* 2015; **5**(11): 1194-209.
170. Yu Y, Yoon SO, Poulogiannis G, et al. Phosphoproteomic analysis identifies Grb10 as an mTORC1 substrate that negatively regulates insulin signaling. *Science (New York, NY)* 2011; **332**(6035): 1322-6.
171. Hsu PP, Kang SA, Rameseder J, et al. The mTOR-regulated phosphoproteome reveals a mechanism of mTORC1-mediated inhibition of growth factor signaling. *Science (New York, NY)* 2011; **332**(6035): 1317-22.
172. Harrington LS, Findlay GM, Gray A, et al. The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins. *The Journal of cell biology* 2004; **166**(2): 213-23.
173. Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, et al. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nature cell biology* 2004; **6**(11): 1122-8.
174. Li X, Gao T. mTORC 2 phosphorylates protein kinase C ζ to regulate its stability and activity. *EMBO reports* 2014; **15**(2): 191-8.
175. Sarbassov DD, Ali SM, Kim D-H, et al. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Current biology* 2004; **14**(14): 1296-302.
176. Thomanetz V, Anglikar N, Cloëtta D, et al. Ablation of the mTORC2 component rictor in brain or Purkinje cells affects size and neuron morphology. *Journal of Cell Biology* 2013; **201**(2): 293-308.
177. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science (New York, NY)* 2005; **307**(5712): 1098-101.
178. Karar J, Maity A. PI3K/AKT/mTOR pathway in angiogenesis. *Frontiers in molecular neuroscience* 2011; **4**: 51.
179. Phung TL, Ziv K, Dabydeen D, et al. Pathological angiogenesis is induced by sustained Akt signaling and inhibited by rapamycin. *Cancer cell* 2006; **10**(2): 159-70.
180. Dimmeler S, Zeiher AM. Akt takes center stage in angiogenesis signaling. *Circulation research* 2000; **86**(1): 4-5.
181. Fukumura D, Kashiwagi S, Jain RK. The role of nitric oxide in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2006; **6**(7): 521-34.

182. Fukumura D, Gohongi T, Kadambi A, et al. Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2001; **98**(5): 2604-9.
183. Kasuno K, Takabuchi S, Fukuda K, et al. Nitric oxide induces hypoxia-inducible factor 1 activation that is dependent on MAPK and phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *Journal of Biological Chemistry* 2004; **279**(4): 2550-8.
184. Serban D, Leng J, Cheresh D. H-ras regulates angiogenesis and vascular permeability by activation of distinct downstream effectors. *Circulation research* 2008; **102**(11): 1350-8.
185. Zwerts F, Lupu F, De Vriese A, et al. Lack of endothelial cell survivin causes embryonic defects in angiogenesis, cardiogenesis, and neural tube closure. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 2007; **109**(11): 4742-52.
186. Tran J, Master Z, Yu JL, Rak J, Dumont DJ, Kerbel RS. A role for survivin in chemoresistance of endothelial cells mediated by VEGF. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2002; **99**(7): 4349-54.
187. Eng C, Sehgal S, Vézina C. Activity of rapamycin (AY-22, 989) against transplanted tumors. *The Journal of antibiotics* 1984; **37**(10): 1231-7.
188. Vezina C, Kudelski A, Sehgal S. Rapamycin (AY-22, 989), a new antifungal antibiotic I. taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *The Journal of antibiotics* 1975; **28**(10): 721-6.
189. Martel R, Klicius J, Galet S. Inhibition of the immune response by rapamycin, a new antifungal antibiotic. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 1977; **55**(1): 48-51.
190. Brown EJ, Albers MW, Bum Shin T, Keith CT, Lane WS, Schreiber SL. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin–receptor complex. *Nature* 1994; **369**(6483): 756-8.
191. Sabatini DM, Erdjument-Bromage H, Lui M, Tempst P, Snyder SH. RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell* 1994; **78**(1): 35-43.
192. Sabers CJ, Martin MM, Brunn GJ, et al. Isolation of a Protein Target of the FKBP12-Rapamycin Complex in Mammalian Cells (*). *Journal of Biological Chemistry* 1995; **270**(2): 815-22.
193. Morath C, Arns W, Schwenger V, et al. Sirolimus in renal transplantation. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2007; **22**(suppl_8): viii61-viii5.
194. McCormack FX, Inoue Y, Moss J, et al. Efficacy and safety of sirolimus in lymphangioleiomyomatosis. *N Engl J Med* 2011; **364**(17): 1595-606.
195. Weiss B, Widemann BC, Wolters P, et al. Sirolimus for progressive neurofibromatosis type 1-associated plexiform neurofibromas: a neurofibromatosis Clinical Trials Consortium phase II study. *Neuro Oncol* 2015; **17**(4): 596-603.
196. Śmiałek D, Jóźwiak S, Kotulska K. Safety of Sirolimus in Patients with Tuberous Sclerosis Complex under Two Years of Age-A Bicenter Retrospective Study. *J Clin Med* 2023; **12**(1).

197. Lamming DW, Ye L, Katajisto P, et al. Rapamycin-induced insulin resistance is mediated by mTORC2 loss and uncoupled from longevity. *Science (New York, NY)* 2012; **335**(6076): 1638-43.
198. Zhong H, Chiles K, Feldser D, et al. Modulation of hypoxia-inducible factor 1 α expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer research* 2000; **60**(6): 1541-5.
199. Guba M, von Breitenbuch P, Steinbauer M, et al. Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nature medicine* 2002; **8**(2): 128-35.
200. Land SC, Tee AR. Hypoxia-inducible factor 1 α is regulated by the mammalian target of rapamycin (mTOR) via an mTOR signaling motif. *Journal of Biological Chemistry* 2007; **282**(28): 20534-43.
201. Zhao Z, Zhang Y, Zhang C, et al. TGF- β promotes pericyte-myofibroblast transition in subretinal fibrosis through the Smad2/3 and Akt/mTOR pathways. *Experimental & Molecular Medicine* 2022; **54**(5): 673-84.
202. Chopra R, Preston GC, Keenan TD, et al. Intravitreal injections: past trends and future projections within a UK tertiary hospital. *Eye* 2022; **36**(7): 1373-8.
203. Jaffe GJ, Elliott D, Wells JA, Prenner JL, Papp A, Patel S. A phase 1 study of intravitreal E10030 in combination with ranibizumab in neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2016; **123**(1): 78-85.
204. Liegl R, Koenig S, Siedlecki J, Haritoglou C, Kampik A, Kernt M. Temsirolimus inhibits proliferation and migration in retinal pigment epithelial and endothelial cells via mTOR inhibition and decreases VEGF and PDGF expression. *PloS one* 2014; **9**(2): e88203.
205. Uemura A, Ogawa M, Hirashima M, et al. Recombinant angiopoietin-1 restores higher-order architecture of growing blood vessels in mice in the absence of mural cells. *The Journal of clinical investigation* 2002; **110**(11): 1619-28.
206. Suri C, McClain J, Thurston G, et al. Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1. *Science (New York, NY)* 1998; **282**(5388): 468-71.
207. Sadiq MA, Hanout M, Sarwar S, et al. Platelet-derived growth factor inhibitors: a potential therapeutic approach for ocular neovascularization. *Retinal Pharmacotherapeutics* 2016; **55**: 310-6.
208. Giddabasappa A, Lalwani K, Norberg R, et al. Axitinib inhibits retinal and choroidal neovascularization in in vitro and in vivo models. *Experimental eye research* 2016; **145**: 373-9.
209. Siedlecki J, Wertheimer C, Wolf A, et al. Combined VEGF and PDGF inhibition for neovascular AMD: anti-angiogenic properties of axitinib on human endothelial cells and pericytes in vitro. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 2017; **255**(5): 963-72.
210. Schrimpf C, Duffield JS. Mechanisms of fibrosis: the role of the pericyte. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2011; **20**(3): 297-305.

211. Chang F-C, Chou Y-H, Chen Y-T, Lin S-L. Novel insights into pericyte–myofibroblast transition and therapeutic targets in renal fibrosis. *Journal of the Formosan Medical Association* 2012; **111**(11): 589-98.
212. Armulik A, Genové G, Mäe M, et al. Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature* 2010; **468**(7323): 557-61.
213. Strutz F. The fibroblast--a (trans-) differentiated cell? *Nephrol Dial Transplant* 1995; **10**(9): 1504-6.
214. Ross R, Everett NB, Tyler R. Wound healing and collagen formation. VI. The origin of the wound fibroblast studied in parabiosis. *J Cell Biol* 1970; **44**(3): 645-54.
215. Wiggins R, Goyal M, Merritt S, Killen PD. Vascular adventitial cell expression of collagen I messenger ribonucleic acid in anti-glomerular basement membrane antibody-induced crescentic nephritis in the rabbit. A cellular source for interstitial collagen synthesis in inflammatory renal disease. *Lab Invest* 1993; **68**(5): 557-65.
216. Alcorn D, Maric C, McCausland J. Development of the renal interstitium. *Pediatr Nephrol* 1999; **13**(4): 347-54.
217. Liu M, Howes A, Lesperance J, et al. Antitumor activity of rapamycin in a transgenic mouse model of ErbB2-dependent human breast cancer. *Cancer research* 2005; **65**(12): 5325-36.
218. Saito K, Matsumoto S, Yasui H, et al. Longitudinal imaging studies of tumor microenvironment in mice treated with the mTOR inhibitor rapamycin. *PloS one* 2012; **7**(11): e49456.
219. Liang C-C, Park AY, Guan J-L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature protocols* 2007; **2**(2): 329-33.
220. Stratman AN, Malotte KM, Mahan RD, Davis MJ, Davis GE. Pericyte recruitment during vasculogenic tube assembly stimulates endothelial basement membrane matrix formation. *Blood* 2009; **114**(24): 5091-101.
221. Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, et al. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer research* 1988; **48**(17): 4827-33.
222. Spitzer MS, Wallenfels-Thilo B, Sierra A, et al. Antiproliferative and cytotoxic properties of bevacizumab on different ocular cells. *The British journal of ophthalmology* 2006; **90**(10): 1316-21.
223. Wertheimer C, Kassumeh S, Piravej NP, et al. The Intraocular Lens as a Drug Delivery Device: In Vitro Screening of Pharmacologic Substances for the Prophylaxis of Posterior Capsule Opacification. *Investigative ophthalmology & visual science* 2017; **58**(14): 6408-18.
224. Asani B, Siedlecki J, Wertheimer C, et al. Anti-angiogenic properties of rapamycin on human retinal pericytes in an in vitro model of neovascular AMD via inhibition of the mTOR pathway. *BMC ophthalmology* 2022; **22**(1): 138. (Zitierte Abbildungen und Tabellen sind teilweise bereits in diesem Manuskript veröffentlicht und entsprechend gekennzeichnet - CC BY 4.0 Lizenz)

225. Stratman AN, Malotte KM, Mahan RD, Davis MJ, Davis GE. Pericyte recruitment during vasculogenic tube assembly stimulates endothelial basement membrane matrix formation. *Blood* 2009; **114**(24): 5091-101.
226. Ciulla TA, Hussain RM, Taraborelli D, Pollack JS, Williams DF. Longer-Term Anti-VEGF Therapy Outcomes in Neovascular Age-Related Macular Degeneration, Diabetic Macular Edema, and Vein Occlusion-Related Macular Edema: Clinical Outcomes in 130 247 Eyes. *Ophthalmol Retina* 2022; **6**(9): 796-806.
227. Curtis LH, Hammill BG, Qualls LG, et al. Treatment patterns for neovascular age-related macular degeneration: analysis of 284 380 Medicare beneficiaries. *American journal of ophthalmology* 2012; **153**(6): 1116-24. e1.
228. Maguire MG, Martin DF, Ying G-s, et al. Five-year outcomes with anti-vascular endothelial growth factor treatment of neovascular age-related macular degeneration: the comparison of age-related macular degeneration treatments trials. *Ophthalmology* 2016; **123**(8): 1751-61.
229. Liu M, Howes A, Lesperance J, et al. Antitumor activity of rapamycin in a transgenic mouse model of ErbB2-dependent human breast cancer. *Cancer research* 2005; **65**(12): 5325-36.
230. Falcon BL, Barr S, Gokhale PC, et al. Reduced VEGF Production, Angiogenesis, and Vascular Regrowth Contribute to the Antitumor Properties of Dual mTORC1/mTORC2 Inhibitors. *Cancer Research* 2011; **71**(5): 1573-83.
231. Xue Q, Nagy JA, Manseau EJ, Phung TL, Dvorak HF, Benjamin LE. Rapamycin inhibition of the Akt/mTOR pathway blocks select stages of VEGF-A164-driven angiogenesis, in part by blocking S6Kinase. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2009; **29**(8): 1172-8.
232. Stahl A, Paschek L, Martin G, et al. Rapamycin reduces VEGF expression in retinal pigment epithelium (RPE) and inhibits RPE-induced sprouting angiogenesis in vitro. *FEBS letters* 2008; **582**(20): 3097-102.
233. Zhang H, Berel D, Wang Y, et al. A comparison of Ku0063794, a dual mTORC1 and mTORC2 inhibitor, and temsirolimus in preclinical renal cell carcinoma models. *PloS one* 2013; **8**(1): e54918.
234. Kuhn JG, Chang SM, Wen PY, et al. Pharmacokinetic and tumor distribution characteristics of temsirolimus in patients with recurrent malignant glioma. *Clinical cancer research* 2007; **13**(24): 7401-6.
235. Tahergorabi Z, Khazaei M. A review on angiogenesis and its assays. *Iran J Basic Med Sci* 2012; **15**(6): 1110-26.
236. Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C. Endothelial/pericyte interactions. *Circulation research* 2005; **97**(6): 512-23.
237. Rogers MA, Fantauzzo KA. The emerging complexity of PDGFRs: activation, internalization and signal attenuation. *Biochem Soc Trans* 2020; **48**(3): 1167-76.

238. Ball SG, Shuttleworth CA, Kielty CM. Vascular endothelial growth factor can signal through platelet-derived growth factor receptors. *J Cell Biol* 2007; **177**(3): 489-500.
239. Mamer SB, Chen S, Weddell JC, et al. Discovery of High-Affinity PDGF-VEGFR Interactions: Redefining RTK Dynamics. *Sci Rep* 2017; **7**(1): 16439.
240. Mandal A, Pal D, Agrahari V, Trinh HM, Joseph M, Mitra AK. Ocular delivery of proteins and peptides: Challenges and novel formulation approaches. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2018; **126**: 67-95.
241. Sundaram P, Kurniawan H, Byrne ME, Wower J. Therapeutic RNA aptamers in clinical trials. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2013; **48**(1): 259-71.
242. BusinessWire. Ophthotech Announces Results from Third Phase 3 Trial of Fovista® in Wet Age-Related Macular Degeneration. August 14, 2017. <https://www.businesswire.com/news/home/20170814005286/en/Ophthotech-Announces-Results-Phase-3-Trial-Fovista%C2%AE> (accessed June 28th, 2018 2018).
243. Bhutto IA, McLeod DS, Hasegawa T, et al. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in aged human choroid and eyes with age-related macular degeneration. *Experimental eye research* 2006; **82**(1): 99-110.
244. Rogers MA, Campaña MB, Long R, Fantauzzo KA. PDGFR dimer-specific activation, trafficking and downstream signaling dynamics. *Journal of Cell Science* 2022; **135**(17): jcs259686.
245. Kerbel RS. Tumor angiogenesis. *New England Journal of Medicine* 2008; **358**(19): 2039-49.
246. Yang S, Xin X, Zlot C, et al. Vascular endothelial cell growth factor-driven endothelial tube formation is mediated by vascular endothelial cell growth factor receptor-2, a kinase insert domain-containing receptor. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2001; **21**(12): 1934-40.
247. Zhang J, Chu M. Differential roles of VEGF: Relevance to tissue fibrosis. *Journal of cellular biochemistry* 2019; **120**(7): 10945-51.
248. Riesterer O, Zingg D, Hummerjohann J, Bodis S, Pruschy M. Degradation of PKB/Akt protein by inhibition of the VEGF receptor/mTOR pathway in endothelial cells. *Oncogene* 2004; **23**(26): 4624-35.
249. Kim DD, Kleinman DM, Kanetaka T, et al. Rapamycin inhibits VEGF-induced microvascular hyperpermeability in vivo. *Microcirculation* 2010; **17**(2): 128-36.
250. Luo Y, Liu L, Rogers D, et al. Rapamycin inhibits lymphatic endothelial cell tube formation by downregulating vascular endothelial growth factor receptor 3 protein expression. *Neoplasia* 2012; **14**(3): 228-37.
251. Dhrami-Gavazi E, Balaratnasingam C, Lee W, Freund KB. Type 1 neovascularization may confer resistance to geographic atrophy amongst eyes treated for neovascular age-related macular degeneration. *International journal of retina and vitreous* 2015; **1**: 1-12.

252. Christenbury JG, Phasukkijwatana N, Gilani F, Freund KB, Sadda S, Sarraf D. Progression of macular atrophy in eyes with type 1 neovascularization and age-related macular degeneration receiving long-term intravitreal anti-vascular endothelial growth factor therapy: an optical coherence tomographic angiography analysis. *Retina (Philadelphia, Pa)* 2018; **38**(7): 1276-88.
253. Huang D, Jia Y, Rispoli M, Tan O, Lumbroso B. OCT angiography of time course of choroidal neovascularization in response to anti-angiogenic treatment. *Retina (Philadelphia, Pa)* 2015; **35**(11): 2260.
254. Muakkassa NW, Chin AT, De Carlo T, et al. Characterizing the effect of anti-vascular endothelial growth factor therapy on treatment-naïve choroidal neovascularization using optical coherence tomography angiography. *Retina (Philadelphia, Pa)* 2015; **35**(11): 2252-9.
255. Ahn J, Kim H, Woo SJ, et al. Pharmacokinetics of intravitreally injected bevacizumab in vitrectomized eyes. *Journal of ocular pharmacology and therapeutics* 2013; **29**(7): 612-8.
256. Mudumba S, Bezwada P, Takanaga H, et al. Tolerability and pharmacokinetics of intravitreal sirolimus. *J Ocul Pharmacol Ther* 2012; **28**(5): 507-14.
257. Dodd KM, Yang J, Shen MH, Sampson JR, Tee AR. mTORC1 drives HIF-1 α and VEGF-A signalling via multiple mechanisms involving 4E-BP1, S6K1 and STAT3. *Oncogene* 2015; **34**(17): 2239-50.
258. Ding Y, Shan L, Nai W, et al. DEPTOR Deficiency-Mediated mTORc1 Hyperactivation in Vascular Endothelial Cells Promotes Angiogenesis. *Cellular Physiology and Biochemistry* 2018; **46**(2): 520-31.
259. Luo X, Yang S, Liang J, et al. Choroidal pericytes promote subretinal fibrosis after experimental photocoagulation. *Dis Model Mech* 2018; **11**(4).
260. Bressler NM, Frost LA, Bressler SB, Murphy RP, Fine SL. Natural course of poorly defined choroidal neovascularization associated with macular degeneration. *Archives of ophthalmology* 1988; **106**(11): 1537-42.
261. Wong T, Chakravarthy U, Klein R, et al. The natural history and prognosis of neovascular age-related macular degeneration: a systematic review of the literature and meta-analysis. *Ophthalmology* 2008; **115**(1): 116-26. e1.
262. Wilgus TA, Ferreira AM, Oberyzyz TM, Bergdall VK, DiPietro LA. Regulation of scar formation by vascular endothelial growth factor. *Lab Invest* 2008; **88**(6): 579-90.
263. Nissen NN, Polverini PJ, Koch AE, Volin MV, Gamelli RL, DiPietro LA. Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *The American journal of pathology* 1998; **152**(6): 1445-52.
264. Brown LF, Yeo K, Berse B, et al. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. *The Journal of experimental medicine* 1992; **176**(5): 1375-9.

265. Bloch SB, Lund-Andersen H, Sander B, Larsen M. Subfoveal fibrosis in eyes with neovascular age-related macular degeneration treated with intravitreal ranibizumab. *American journal of ophthalmology* 2013; **156**(1): 116-24. e1.
266. Kuiper EJ, Hughes JM, Van Geest RJ, et al. Effect of VEGF-A on expression of profibrotic growth factor and extracellular matrix genes in the retina. *Investigative ophthalmology & visual science* 2007; **48**(9): 4267-76.
267. Luo J, Liang Y, Kong F, et al. Vascular endothelial growth factor promotes the activation of hepatic stellate cells in chronic schistosomiasis. *Immunology and cell biology* 2017; **95**(4): 399-407.
268. Jiang L, Xu L, Mao J, et al. Rheb/mTORC1 signaling promotes kidney fibroblast activation and fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology* 2013; **24**(7): 1114-26.
269. Bridle KR, Popa C, Morgan ML, et al. Rapamycin inhibits hepatic fibrosis in rats by attenuating multiple profibrogenic pathways. *Liver Transplantation* 2009; **15**(10): 1315-24.
270. Lawrence J, Nho R. The role of the mammalian target of rapamycin (mTOR) in pulmonary fibrosis. *International journal of molecular sciences* 2018; **19**(3): 778.
271. Korfhagen TR, Le Cras TD, Davidson CR, et al. Rapamycin prevents transforming growth factor- α -induced pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2009; **41**(5): 562-72.
272. Yoshizaki A, Yanaba K, Yoshizaki A, et al. Treatment with rapamycin prevents fibrosis in tight-skin and bleomycin-induced mouse models of systemic sclerosis. *Arthritis & Rheumatism* 2010; **62**(8): 2476-87.
273. Geissler EK, Schlitt HJ. The potential benefits of rapamycin on renal function, tolerance, fibrosis, and malignancy following transplantation. *Kidney international* 2010; **78**(11): 1075-9.
274. Nguyen QD, Merrill PT, Sepah YJ, et al. Intravitreal sirolimus for the treatment of noninfectious uveitis: evolution through preclinical and clinical studies. *Ophthalmology* 2018; **125**(12): 1984-93.
275. Yeh S, Khurana RN, Shah M, et al. Efficacy and Safety of Suprachoroidal CLS-TA for Macular Edema Secondary to Noninfectious Uveitis: Phase 3 Randomized Trial. *Ophthalmology* 2020; **127**(7): 948-55.
276. Brooks D, Linares-Alba MA, Garcia-Santisteban R, et al. Pharmacokinetics of Sirolimus in a Novel Liposome Delivery System in Selected Ocular Tissues and Plasma Following a Single Subconjunctival Injection in Dutch Belted Rabbits. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* 2022; **38**(6): 424-32.
277. Yeh S, Khurana RN, Shah M, et al. Efficacy and safety of suprachoroidal CLS-TA for macular edema secondary to noninfectious uveitis: phase 3 randomized trial. *Ophthalmology* 2020; **127**(7): 948-55.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen meinen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Promotionsarbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Prof. Dr. med. Claudia Priglinger für die Möglichkeit dieses Forschungsvorhaben zu erfüllen, die hervorragende Betreuung und die wertvollen Ideen und Ratschläge, die mich weitergebracht haben.

Ein ebenfalls besonderer Dank gilt meinem Mitbetreuer, PD Dr. med Jakob Siedlecki, der mich unermüdlich bei jedem noch so kleinen Problem unterstützt hat und stets eine Quelle der Motivation und Inspiration war und auch bleibt.

Nicht zuletzt danke ich auch dem gesamten Laborteam unter Führung von Prof. Dr. med. Andreas Ohlmann bei der Unterstützung zur Durchführung der Experimente.

Meinen Eltern danke ich für die fortwährende Unterstützung und Ermutigung bei der Arbeit an dieser Dissertation.

Affidavit & Erklärung der Übereinstimmung



Eidesstattliche Versicherung

Asani, Ben

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

In vitro-Evaluation neuer Therapiestrategien bei neovaskulärer AMD: Inhibition von Angiogenese und Fibrose jenseits von anti-VEGF

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 04.03.2025

Ort, Datum

Ben Asani

Unterschrift Ben Asani



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Dekanat Medizinische Fakultät
Promotionsbüro



**Erklärung zur Übereinstimmung der gebundenen Ausgabe der
Dissertation mit der elektronischen Fassung**

Ihr Name: Ben Asani

Hiermit erkläre ich, dass die elektronische Version der eingereichten Dissertation mit dem Titel

in Inhalt und Formatierung mit den gedruckten und gebundenen Exemplaren übereinstimmt.

München, 04.03.2025

Ort, Datum

Ben Asani

Unterschrift Ben Asani

Übereinstimmung abgegebener Exemplare

Stand: 17.11.2024

Publikationsliste

Asani, B., Siedlecki, J., Wertheimer, C., Liegl, R., Wolf, A., Ohlmann, A., ... & Priglinger, C. (2022). Anti-angiogenic properties of rapamycin on human retinal pericytes in an in vitro model of neovascular AMD via inhibition of the mTOR pathway. *BMC ophthalmology*, 22(1), 1-9.

Asani, B., Siedlecki, J., Schworm, B., Mayer, W. J., Kreutzer, T. C., Luft, N., & Priglinger, S. G. (2020). 3D Heads-up display vs. standard operating microscope vitrectomy for rhegmatogenous retinal detachment. *Frontiers in Medicine*, 7, 615515.

Asani, B., Holmberg, O., Schiefelbein, J.B. *et al.* Evaluation of OCT biomarker changes in treatment-naïve neovascular AMD using a deep semantic segmentation algorithm. *Eye*(2024)

Siedlecki, J., **Asani, B.**, Wertheimer, C., Hillenmayer, A., Ohlmann, A., Priglinger, C., ... & Eibl-Lindner, K. (2018). Combined VEGF/PDGF inhibition using axitinib induces α SMA expression and a pro-fibrotic phenotype in human pericytes. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 256, 1141-1149.

Koch, V., Holmberg, O., Spitzer, H., Schiefelbein, J., **Asani, B.**, Hafner, M., & Theis, F. J. (2022, September). Noise transfer for unsupervised domain adaptation of retinal OCT images. In *International Conference on Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention* (pp. 699-708). Cham: Springer Nature Switzerland.

Frishberg, A., Milman, N., Alpert, A., Spitzer, H., **Asani, B.**, Schiefelbein, J. B., ... & Shen-Orr, S. S. (2023). Reconstructing disease dynamics for mechanistic insights and clinical benefit. *Nature Communications*, 14(1), 6840.

Siedlecki, J., Klaas, J. E., Keidel, L. F., **Asani, B.**, Luft, N., Priglinger, S. G., & Schworm, B. (2022). Progression of pachychoroid neovascularopathy into aneurysmal type 1 choroidal neovascularization or polypoidal choroidal vasculopathy. *Ophthalmology Retina*, 6(9), 807-813.

Eckardt, F., Mittas, R., Horlava, N., Schiefelbein, J., **Asani, B.**, Michalakis, S., ... & Schworm, B. (2023). Deep Learning based retinal layer segmentation in optical coherence tomography scans of patients with inherited retinal diseases. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*.