

Angiogenesehemmung durch niedermolekulare Peptidantagonisten des
Vitronektinrezeptors — Modellversuche an der Retina der Maus

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereiches Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Björn Riecke
aus Frankfurt am Main

Gießen 2004

Aus der III. Medizinischen Klinik und Poliklinik
des Universitätsklinikums Gießen
Labor für experimentelle Retinologie

Direktor: Prof. Dr. R. G. Bretzel

Betreuer: Prof. Dr. H.-P. Hammes

Gutachter: Prof. Dr. H.-P. Hammes

Gutachter: Prof. Dr. M. Gräf

Tag der Disputation: 6.12.2004

Inhalt	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Entwicklung von Blutgefäßen	1
1.2 Mechanismen der Vaskulogenese und Angiogenese	2
1.3 Blutgefäßentwicklung und Versorgung der humanen Netzhaut	21
1.4 Bedeutung und Pathomechanismus gefäßproliferativer Netzhauterkrankungen	23
1.4.1 Pathobiochemie und Molekularbiologie diabetesinduzierter Gefäßveränderungen	24
1.4.2 Frühgeborenenretinopathie	33
1.5 cRGDFV: ein kleinmolekularer hochaffiner Vitronektin-Rezeptor-Antagonist	34
1.6 Begründung des Tierversuches und des verwendeten Modells	36
2. Fragestellung und Zielsetzung der eigenen Studien	39
3. Material und Methoden	41
3.1 Modell der sauerstoffinduzierten Retinopathie der Maus (ROP-Modell)	41
3.1.1 Versuchsaufbau	41
3.1.2 Fluoreszenzangiographien	42
3.1.3 Quantifizierung der proliferativen Retinopathie	42
3.2 Proteinbiochemische Analysen der Retina	44
3.3 Protokoll der Sekundärinterventionsansätze	48
3.4 Protokoll der Lokaltherapie	49
3.4.1 Rezeptur der Augentropfen	49
3.4.2 <i>in-vitro</i> -Adhäsionsassay	50
3.4.3 Versuche zur Penetrationsfähigkeit des RGD-Peptids: Permeationsassay	51
3.4.4 Protokoll des Augentropfen-Therapieansatzes	52
3.5 Evaluation von Nebenwirkungen	54
4. Ergebnisse	55
4.1 Modell der sauerstoffinduzierten Retinopathie der Maus (ROP-Modell)	55
4.1.1 Angiographien nicht sauerstoff-exponierter Kontrolltiere	55
4.1.2 Neovaskularisationsverlauf im ROP-Modell	56
4.2 Proteinexpressionsanalysen	60
4.2.1 Expressionsverlauf der Wachstumsfaktoren VEGF, FGF-2	60
4.2.2 Expressionsverlauf des $\alpha_v\beta_3$ -Vitronektin-Rezeptors	60
4.3 Sekundärinterventionsansatz mit subkutaner Injektion	62
4.3.1 Therapieergebnisse bei früher Sekundärintervention (I)	62
4.3.2 Therapieergebnisse bei später Sekundärintervention (II)	65
4.4 Ergebnisse der Lokaltherapie	66
4.4.1 Eigenschaften der Augentropfenlösung zur Lokaltherapie	66
4.4.2 Adhäsionsassay mit RGD-haltigen Augentropfen	66
4.4.3 Nachweis von epikorneal appliziertem FITC-RGD-Peptid in der Netzhaut	67
4.4.4 Dosisabhängige Wirkung der Augentropfen als Primärpräventionsansatz <i>in vivo</i>	68
4.5 Nebenwirkungen der Behandlung mit cRGDFV	69
5. Diskussion	70
5.1 Beschreibung des Verlaufes retinaler Neovaskularisationen und Begründung der Sekundärinterventionsansätze	70
5.2 VEGF initiiert den Neovaskularisationsprozess, FGF-2 scheint ihn zu perpetuieren; Integrine nehmen als Zielmoleküle pharmakologischer Intervention ab	70

5.3	cRGDfV inhibiert bereits aktive Neovaskularisationen in der Netzhaut, frühe Intervention ist von entscheidender Bedeutung	72
5.4	Bei Behandlung mit dem RGDfV-Peptid wurden auch bei Höchstdosierung keine Nebenwirkungen beobachtet	74
5.5	Topische Applikation mittels Augentropfen hemmt retinale Neovaskularisation <i>in vivo</i> und minimiert potentielle Nebenwirkungen	75
5.6	Die Behandlung mit dem Vitronectin-Rezeptor-Antagonist könnte als adjuvante Therapieform genutzt werden	76
6.	Zusammenfassung	77
7.	Literaturverzeichnis	79
8.	Danksagung	92

Verzeichnis der im Text verwendeten Abkürzungen

AGE	Advanced Glycation End-Products, Glykierungsfolgeprodukte
Akt	Unterform der Proteinkinase B, wird durch Phosphoinositol-3-Kinase aktiviert
Bcl-2	Familie von Genen, die ein antiapoptotisches Signal vermittelt
CD 31	platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1), Untergruppe der Ig-Superfamilie; initiiert und unterhält Zell-Zell-Adhäsion
CD 34	cluster of differentiation 34, Identifikations-/Oberflächenmarker von hämatopoietischen Vorläuferzellen
ECM	extracellular matrix, Extrazellulärmatrix
BSA	bovines Serum-Albumin
cRGD-Peptid	zyklisches Pentapeptid bestehend aus den Aminosäuren Arginin, Glycin, Asparagin, D-Phenylalanin und Valin, Vitronektin-Rezeptor-Antagonist
FGF-1	fibroblast growth factor-1, saurer Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FGF-2	fibroblast growth factor-2, basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor
flk-1	fetal liver kinase-1, VEGF-Rezeptor-2 (Maus)
flt-1	180kDa <i>fms</i> -like tyrosine kinase receptor-1, VEGF-Rezeptor-1
HMW-FITC-Dextran	hochmolekulares (2×10^6 kDa) Fluoreszein-Isothiocyanat-Dextran, verwendet zur Perfusion bei Fluoreszein-Angiographien
KDR	200kDa kinase insert domain-containing receptor, VEGF-Rezeptor-2 (Mensch)
PAI-1	plasminogen-activator-inhibitor-1, Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1
PBS	phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PDGF	platelet derived growth factor, Plättchenwachstumsfaktor
PFA	Paraformaldehyd-Lösung, verwendet wurde sie 4 %ig
SMC	smooth muscle cell, glatte Muskelzelle
TGF- β	transforming growth factor- β , transformierender Wachstumsfaktor- β
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinase, Gewebeinhibitor von Metalloproteinasen
VEGF	vascular endothelial growth factor, vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VN	Vitronektin
VPF	vascular permeability factor, VEGF

1. Einleitung

1.1 Entwicklung von Blutgefäßen

Vitales Gewebe ist in seinem Stoffwechsel von der Versorgung durch Nährstoffe und Sauerstoff abhängig. Betrachtet man den exponentiell abfallenden Sauerstoffgradienten im Gewebe in Abhängigkeit von der Entfernung eines Blutgefäßes (Torres Filho et al., 1994), so benötigt jedes Gewebe – mit Ausnahme derart bradytrophes Gewebes wie Knorpel – über eine Ausdehnung von etwa 300 µm hinaus eine Versorgung durch Blutgefäße.

Die Entwicklung von Blutgefäßen ist in den vergangenen dreißig Jahren ausgehend von der Onkologie mit zunehmender Intensität beforscht worden. In den letzten zehn Jahren hat dieses Forschungsgebiet so deutlich wie kein anderes Thema an Bedeutung gewonnen, was sich in der mehr als Verhundertfachen der Veröffentlichungen seit den frühen 90er Jahren niederschlägt. Die der Blutgefäßneubildung zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind heute weitgehend entschlüsselt, allerdings ist zur vollständigen Aufklärung weitere Forschung notwendig.

Das klassische Verständnis von Blutgefäßneubildung umfasst die Mechanismen Vaskulogenese, Angiogenese und Intussuszeption.

Vaskulogenese bezeichnet die Entstehung eines primären Blutgefäßnetzwerkes in der Frühphase der Embryogenese durch Differenzierung und Aneinanderreihung von Endothelzellvorläufern und Angioblasten (Risau und Flamme, 1995).

Angiogenese beschreibt die Bildung neuer Blutgefäße aus bereits bestehenden Kapillaren durch Sprossung, ein Prozess, der für normales Wachstum und protektive Antwort wie Wundheilung und Inflammation entscheidend ist. Physiologische Angiogenese kommt mit Ausnahme der weiblichen Reproduktionsorgane, in Organen, die physiologisches Wachstum zeigen, und bei Wundheilung beim Erwachsenen nicht vor (Hanahan und Folkman, 1996). Pathologische Angiogenese allerdings kann in einer Reihe von krankhaften Situationen wie Tumorwachstum und -metastasierung, retinalem Gefäßwachstum bei proliferativen Retinopathien, bei chronisch inflammatorischen Erkrankungen oder der Kollateralenbildung bei kardialer Ischämie auftreten.

Das intussuszeptive Gefäßwachstum beschreibt die Bildung eines Gefäßnetzwerkes durch Längsspaltung. Diese Art von Gefäßwachstum resultiert in einem komplexen Gefäßnetzwerk und entsteht über einen nicht sprossenden also im eigentlichen Sinn nicht angiogenen Mechanismus (Augustin, H. G., 2001).

1.1 Mechanismen der Vaskulogenese und Angiogenese

Die bisherige Denkweise über die Blutgefäßneubildung wurde kürzlich durch die Arbeiten der Gruppen von Isner und Rafii revolutioniert.

Sie zeigten zum einen, dass der Prozess der Vaskulogenese auch im Erwachsenenalter auftritt, zum anderen, dass Bildung und Wachstum neuer Gefäße im Adulten nicht auf Angiogenese limitiert ist, sondern beide embryonalen Mechanismen beinhaltet (Asahara et al., 1999a, Shi et al., 1998).

Die beiden Mechanismen der Blutgefäßneubildung werden nachfolgend im einzelnen beschrieben.

Vaskulogenese

Bereits zu Beginn des zwanzigsten Jahrhunderts wurde gezeigt, dass aus Embryonen isolierte Zellen ein Blutgefäßnetzwerk bilden konnten. Die Zelle, aus der sich alle Endothelzellen differenzierten, wurde Angioblast genannt (His, W. 1900). Hämangioblast war die Bezeichnung für einen gemeinsamen Vorläufer auch hämatopoietischer Zellen. Erst etwa 100 Jahre später konnte die Existenz von Hämangioblasten experimentell bestätigt werden (Choi, K., 1998).

Die integrale Beziehung zwischen den im Gefäßsystem zirkulierenden Elementen – den Blutzellen – und den Zellen, die grundlegend für Blutgefäße selbst verantwortlich sind – den Endothelzellen – ist bereits bei der Zusammensetzung embryonaler Blutinseln bestimmt. Die Zellen, die hämatopoietische Zellen hervorbringen sollen, befinden sich im Zentrum der Blutinsel und werden hämatopoietische Stammzellen genannt. Endotheliale Vorläuferzellen (EPCs), oder Angioblasten, befinden sich in der Peripherie. Die ersten Marker, die von endothelialen wie auch von hämatopoietischen Vorläuferzellen exprimiert werden, sind CD31, CD34 und der Tyrosin-Kinase-Rezeptor Typ 2 (VEGF-R2 oder KDR/Flk-1) des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) (Yamaguchi et al., 1993).

Vaskulogenese beschreibt den Vorgang der Differenzierung von Endothelzellen aus Endothelvorläuferzellen und Angioblasten und deren Aneinanderreihung zu einem ersten kapillaren Netzwerk (Risau und Flamme, 1995). Man spricht auch von einer *de novo*-Formierung. Das zunächst entstehende primitive Netzwerk differenziert sich durch

Verstärkung bestimmter Gefäße und Rückbildung anderer Gefäße („branching and pruning“) dann in ein reifes Gefäßsystem (Risau, W. 1997).

Ursprünglich nahm man an, dass Vaskulogenese nur im embryonalen Zustand stattfindet und von mesodermalen Vorläuferzellen abhängig ist. Diese Vorstellung kann heute nicht mehr aufrechterhalten werden. Am Beispiel der Tumorangiogenese lässt sich zeigen, dass das Wachstum von Gefäßen häufig eine Kombination aus Angiogenese und Vaskulogenese ist, bei der aus dem Knochenmark mobilisierte Endothelzellvorläufer zum Wachstum der Endothelzellmasse beitragen, indem sie sich an Orten der Gefäßneubildung zu Endothelzellen ausdifferenzieren. Dies entspricht einer postnatalen Vaskulogenese (Asahara et al., 1999a, Shi et al., 1998). Zum anderen demonstriert dies, dass postnatale Neovaskularisation nicht ausschließlich auf dem Aussprossen aus bestehenden Gefäßen (Angiogenese) beruht, sondern dass Bildung und Wachstum neuer Blutgefäße im Adulten beide embryonalen Mechanismen enthalten.

Angiogenese

Angiogenese, das Aussprossen neuer Blutgefäße aus präexistierenden, ist ein hochkomplexer Vorgang, der sich schrittweise vollzieht, aber nicht vollständig entschlüsselt ist. Sie stellt einen invasiven zellulären Prozess dar, der die konzertierte Aktivität vieler Moleküle wie Wachstumsfaktoren, proteolytische Enzyme, Proteine der Extrazellulärmatrix und Adhäsionsrezeptoren erfordert (Ingber und Folkman, 1989; Blood und Zetter, 1990) und dessen physiologische Kontrolle vom adäquaten zeitlichen und räumlichen Zusammenspiel von Aktivatoren und Inhibitoren und der mikrovaskulären Umgebung abhängig ist (Auerbach und Auerbach, 1994; Hanahan und Folkman, 1996).

Auf einen angiogenen Reiz erfolgt anfangs die Erweiterung der vorhandenen Gefäße und eine Steigerung der Durchlässigkeit. Proteasen aus dem umgebenden Gewebe zersetzen Teile des Stromas sowie der Basalmembran. Dies ermöglicht es den aktivierten Endothelzellen, sich zu vermehren (Proliferation) und zu wandern (Migration) und schließlich eine Röhre auszubilden (Lumenformierung). Die Endothelzellen dieser aussprossenden neuen Gefäße und mit ihnen die sie umgebenden periendothelialen Zellen und die umgebende extrazelluläre Matrix differenzieren dann weiter unter dem Einfluss des lokalen Umfeldes. Die einzelnen Schritte und ihre zugrundeliegenden molekularen Mechanismen werden nachfolgend genauer beschrieben.

Molekulare Mechanismen der Angiogenese

Im Verlauf der intensiven Angiogeneseforschung der letzten Jahre ist die Gefäßendothelzelle als die zentrale Zelle zunehmend in den Mittelpunkt gerückt und damit auch zur primären Zielzelle antiangiogener pharmakologischer Intervention geworden. Das Blutgefäßendothel bildet die innerste Schicht eines jeden Gefäßes und stellt damit die Grenzschicht zwischen zirkulierendem Blut und seiner zellulären Umwandlung dar. Der Gefäßendothelzelle kommt bei der Angiogenese eine besondere Bedeutung zu, da sie als die entscheidende Effektorzelle die neuen Blutgefäße nicht nur präformiert, sondern anschließend die Gefäßstabilisierung durch Rekrutierung periendothelialer Zellen einleitet, die Deposition der umgebenden Matrix stimuliert und eine neue stabilisierende Basalmembran bildet.

Die Betrachtung lediglich der Endothelzelle aber erklärt Gefäßwachstum nicht hinreichend. Für die Initiierung des Prozesses und das Überleben der Endothelzelle währenddessen sind Wachstumsfaktoren, ihre Rezeptoren und Adhäsionsmoleküle, für die Bildung der neuen Gefäßwand und die Initiierung eines stabilen, ruhenden Gefäßes sind periendotheliale Zellen, die umgebende extrazelluläre Matrix und entsprechende Signalproteine notwendig.

Sauerstoffsättigung reguliert das Gefäßwachstum

Gewebshypoxie ist der zentrale Stimulus für die Neubildung von Blutgefäßen. Hypoxie erhöht die Transkription über den hypoxieinduzierbaren Faktor-1 α (HIF-1 α). HIF-1 α ist ein Transkriptionsfaktor, der die Expression verschiedener Gene fördert, die bestimmte promotorbindende Elemente – die sogenannten hypoxia responsive elements (HREs) – tragen (Semenza und Wang, 1992).

VEGF ist ein angiogener Stimulationsfaktor

Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor VEGF, zeitgleich von Ferrara und Henzel (Ferrara und Henzel, 1989) und Gospodarowicz entdeckt (Gospodarowicz et al., 1989), ist in den letzten Jahren als der wichtigste angiogene Wachstumsfaktor in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. VEGF ist der entscheidende Stimulator von Gefäßneubildung, denn er ist für die Einleitung der Bildung zunächst unreifer Gefäße durch Vaskulogenese oder angiogenes Sprossen sowohl während der Entwicklung als auch im Adulten notwendig. Seine

Expression wird wie oben beschrieben über HIF-1 α durch Hypoxie gesteigert (Forsythe et al., 1996) und er ist ein entscheidender Faktor bei der Induktion und Vermittlung durch Sauerstoffarmut hervorgerufener Gefäßneubildung (Shweiki et al., 1992).

VEGF ist im Gegensatz zu den Mitgliedern der Familie der Fibroblastenwachstumsfaktoren, die mitogene Aktivität für ein breites Spektrum von Zielzellen besitzen, ein spezifisches Mitogen für Endothelzellen (Ferrara et al., 1992). Diese selektive Wirkung erklärt sich aus dem nahezu ausschließlichen Vorkommen von VEGF-Rezeptoren auf Endothelzellen. VEGF ist ein Glykoprotein von etwa 46 kDa Molekülgröße, das als Homodimer sezerniert wird und strukturelle Verwandtschaft zu PDGF (Platelet derived growth factor) aufweist (Conn et al., 1990). VEGF existiert in verschiedenen Homologen, VEGF-A bis -E, die von verschiedenen Genen des menschlichen Genoms kodiert werden. Neben seiner Beteiligung an Vaskulogenese und physiologischer Angiogenese ist VEGF-A der am besten untersuchte Vertreter der angiogenen Wachstumsfaktoren. VEGF-B bis -E sind nicht hypoxieinduzierbar (Goldberg und Schneider, 1994). VEGF-C und -D wirken auf vaskuläre und lymphatische Endothelzellen mitogen. Im Gegensatz zu VEGF-A bis -D wurde VEGF-E bisher nur bei einem Virus nachgewiesen (Meyer et al., 1999). Von VEGF-A gibt es fünf verschiedene Splice-Varianten, die unterschiedliche Bindungsverhalten an Heparinrezeptoren und an den VEGF-Corezeptor Neuropillin-1 aufweisen. Das kleinste VEGF-A-Protein besteht aus 121 Aminosäuren, das größte aus 206 Aminosäuren. Die größte biologische und auch am besten untersuchte Wirksamkeit hat das VEGF-A mit 165 Aminosäuren (Claus M., 2000). Das angiogene Signal von VEGF aktiviert Endothelzellen über einen eigenen Rezeptor und überführt sie in ihren angiogenen Phänotyp.

VEGF ist entscheidend für Blutgefäßmorphologie und -funktionalität

VEGF ist ein potenter und bedeutender Regulator des Gefäßwachstums, dessen räumliches, zeitliches und quantitatives Vorkommen sehr genau reguliert sein muss, um ein Blutgefäßdesaster zu verhindern. Die Entfernung auch nur eines VEGF-Allels zeigt gleiche Auswirkungen wie das Lahmlegen seines Rezeptors VEGFR-2, was sich durch annähernd komplettes Fehlen von Blutgefäßen in Mäusen äußert. Dies führt zu embryonaler Letalität aufgrund schwerster Gefäßanomalien, dem bisher einzigen Beispiel embryonalen Absterbens aufgrund einer Dosisreduzierung (Carmeliet et al., 1996; Ferrara et al., 1996). Obwohl die Inaktivierung des VEGF-Signals auch in der postnatalen Phase noch tödlich ist (Gerber et al.,

1999a) hat sie in älteren Tieren lediglich Auswirkungen in Geweben, die weiterhin vaskulärer Remodellierung unterliegen (Gerber et al., 1999b; Ferrara et al., 1998). Im adulten Gefäßsystem scheint VEGF zur Unterhaltung von Fenestrierungen in mikrovaskulären Bereichen beizutragen (Breier et al., 1992; Roberts und Palade, 1995).

VEGF-Rezeptor und intrazellulärer Signalweg

Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor ist ein extrazellulärer Mediator, der an hochaffine membrangebundene Rezeptoren mit Tyrosinkinase-Aktivität bindet (Jakeman et al., 1992; Thieme et al., 1995). Bisher sind vier VEGF-Rezeptoren bekannt, VEGFR-1 (flt-1), VEGFR-2 (flk-1/KDR), VEGFR-3 (flt-4) und Neuropilin 1 (NRP-1). Während VEGFR-1 und VEGFR-2 fast ausschließlich auf Blutgefäßendothelzellen zu finden sind, spielt VEGFR-3 eine wesentliche Rolle bei der Lymphangiogenese. Die membrangebundenen Rezeptoren bestehen aus einem extrazellulären, einem transmembranösen und einem intrazellulären Anteil. Der VEGFR-2 beispielweise hat Außendomänen, die mit insgesamt sieben Schleifen strukturell den Immunglobulinen (IgG) ähneln. Mit dem kurzen transmembranösen Anteil wird sichergestellt, dass das Protein in der Zellmembran verankert ist. Bindet ein Ligand wie im Fall von VEGF als Dimer an die extrazelluläre Erkennungsstelle, lagern sich zwei Rezeptoren über bestimmte Erkennungssignale ihrer extrazellulären Domänen zusammen (Abbildung 1). Geschieht dies mit zwei gleichen Rezeptoren spricht man von einem Homodimer. Es ist außerdem möglich, dass sich zwei unterschiedliche Rezeptoren, beispielsweise VEGFR-1 und VEGFR-2, nach Interaktion mit einem Liganden gruppieren. Die Bildung dieser Heterodimere kann Signalübertragung verhindern (Weiss und Schlessinger, 1998) und ist somit ein zusätzlicher Mechanismus, die Funktion einer Zelle zu steuern. Hat sich ein signalisierendes Rezeptordimer nach Bindung eines Liganden gebildet, phosphorylieren enzymatische Anteile (Kinasen) eines Rezeptors intrazelluläre Tyrosinreste des jeweiligen Partnermoleküls. Diese führen zu einer Änderung des Funktionszustandes, was als der erste Schritt der intrazellulären Signalübertragung angesehen wird.

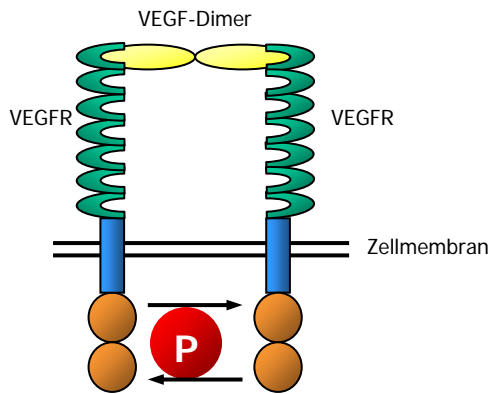


Abbildung 1
VEGF-A bindet als Dimer mit mehreren Bindungsstellen an spezifische Rezeptoren (VEGFR), von denen zwei identische ein Homodimer bilden. Die gegenseitige Phosphorylierung (P) im Bereich des inneren Rezeptoranteils ist der erste Schritt der intrazellulären Signalkette

Auf dem Weg vom Rezeptor zur DNA oder der Zellmembran der Zielzelle läuft das Signal über eine Reihe von Signalträgern, die im wesentlichen Kaskaden von Phosphorylierungsreaktionen darstellen (Abbildung 2). VEGF-Wirkungen beschränken sich nicht allein auf die Proliferation von Endothelzellen (Signalweg: Proteinkinase C, mitogen aktivierte Proteinkinase, ERK 1/2). Nach Bindung an VEGFR-2 wirkt VEGF hemmend auf die Apoptose (Akt; Bcl-2), aktiviert Migration (Proteinkinase C, Vinculin) oder beeinflusst die Transkription anderer Proteine, die an Gefäßwachstum beteiligt sind, wie beispielsweise VEGFR-1, Matrixmetalloproteinasen (MMP), endothelzellspezifische NO-Synthetase (eNOS).

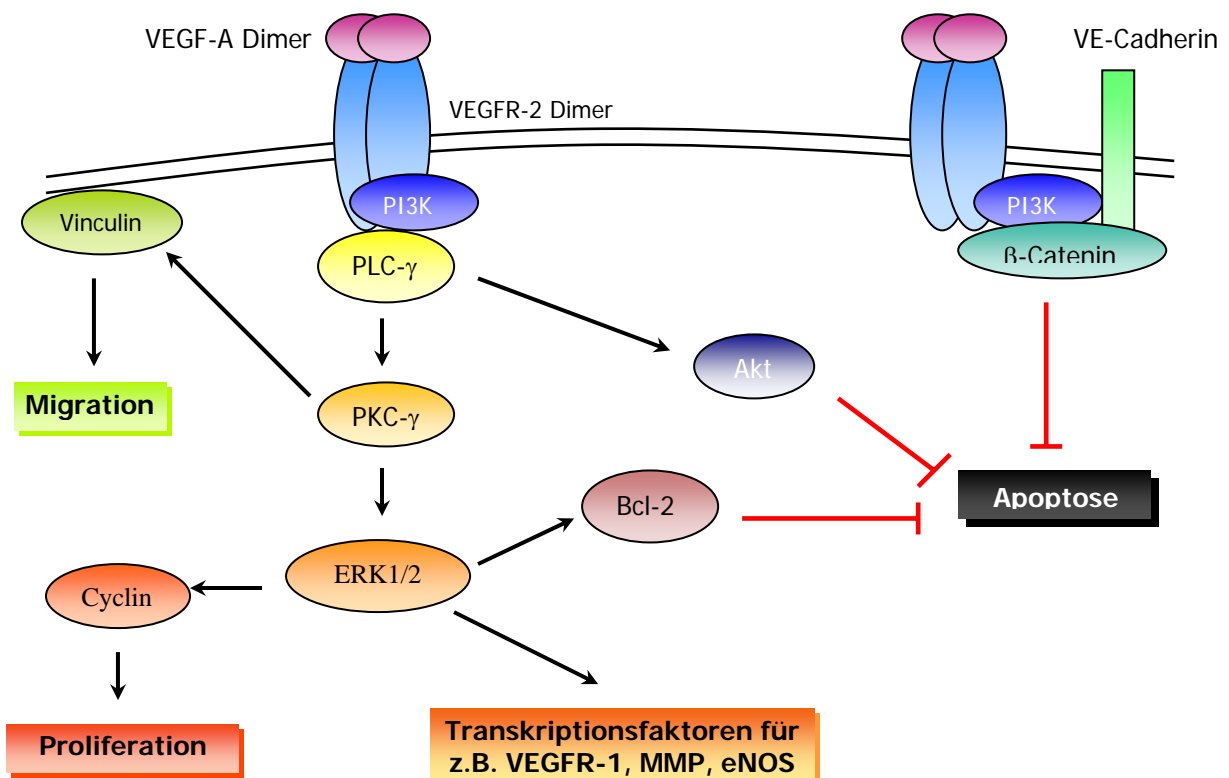


Abbildung 2
Schema intrazellulärer Signalwege des VEGFR-Dimers nach Ligierung mit dem VEGF-Dimer

VEGF-A stellt nicht nur über Bcl-2 und Akt einen Überlebensfaktor für Endothelzellen dar (Gerber et al., 1998a, 1998b), sondern auch über Wechselwirkung mit interendothelialen Proteinen. VEGF benötigt die Signaltransduktion von VE-Cadherins, einem interendothelialen Adhäsionsmolekül, um einen antiapoptotischen Reiz zu vermitteln. Dies geschieht über einen Komplex aus VEGF, VEGFR-2, PI3-Kinase, β -Catenin und VE-Cadherin (Abbildung 2). Unterbrechung dieses Signals führt zur Störung VEGF-vermittelten Überlebensreizes und Angiogenese (Carmeliet et al., 1999).

Über die Reorganisation von Adhäsionsmolekülen wie VE-Cadherin wirkt VEGF auch als ein die Gefäßpermeabilität steigernder Faktor, weshalb er auch als vascular permeability factor (VPF) bezeichnet wird (Collins et al., 1993).

Fibroblastenwachstumsfaktoren stimulieren Gefäßneubildung

Neben dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor stellen die Fibroblastenwachstumsfaktoren (FGFs) eine weitere Gruppe angiogener Wachstumsfaktoren dar. Sie konnten aufgrund ihrer starken Affinität zu Heparin oder Heparansulfaten isoliert werden (Shing et al., 1984). Fibroblastenwachstumsfaktoren sind potente multifunktionale regulative Proteine, die in der Embryonalentwicklung wichtig sind und auf eine Vielfalt von Zielzellen wirken. Im Adulten sind FGFs bei Wundheilung und neuronaler Entwicklung beteiligt.

Derzeit sind 23 Mitglieder und vier Tyrosinkinaserzeptoren dieser Familie bekannt. Zwei Vertreter dieser Gruppe zählen zu den potentesten Angiogeneseinduktoren *in vitro* und *in vivo*. Dies sind FGF-1 (saurer Fibroblastenwachstumsfaktor) und FGF-2 (basischer Fibroblastenwachstumsfaktor). FGF-2 und FGF-1 sind strukturell ähnlich und besitzen zu 53% absolute Sequenzhomologie (Esch et al., 1985). FGF-2 existiert in vier verschiedenen Formen, einem niedermolekularen, hauptsächlich zytoplasmatischen Protein mit 18 kDa (FGF-2) und drei hochmolekularen Formen (HMW-FGF-2s), die im Zellkern lokalisiert sind (Bikfalvi et al., 1997). FGFs besitzen mitogene Aktivität für eine Vielzahl von Zellen und damit keine Spezifität für Endothelzellen. Sie stimulieren die Proliferation, Migration und Differenzierung von Endothelzellen *in vitro* und induzieren Gefäßneubildung *in vivo* (Shing et al., 1985, Bikfalvi et al., 1997).

FGF-1 und FGF-2 besitzen keine Signalsequenz, die effizienten Export aus dem Zellinneren steuert. Damit bleibt die Bedeutung endogener FGFs bei entwicklungsbedingter oder pathologischer Angiogenese unsicher.

Die Aktivierung des spezifischen FGF-Rezeptors benötigt membranständige Heparansulfatproteoglykane als Corezeptoren, die damit ihrerseits regulierende Funktion besitzen (Zhang et al., 2001). In Homologie zur VEGF/VEGFR-Interaktion scheint es bei FGF und seinem Rezeptor ebenfalls eine Dimerisierung mit anschließender Autophosphorylierung und Assoziation mit intrazellulären Signalwegen zu geben (Auguste et al., 2003).

Aktivierte Endothelzellen exprimieren hauptsächlich FGFR-1 (Arbeit et al., 1996), dennoch wurde auch FGFR-2 auf Endothelzellen gefunden (Nakamura et al., 2001). In kapillärem Endothel induziert die Stimulation von FGFR-1 die Proliferation, Migration, Proteasenproduktion und Röhrenbildung während die Aktivierung von FGFR-2 die Motilität steigert (Javerzat et al., 2002).

Die Unterbrechung des FGFR-1-Signalweges führt zu einem dramatischen Rückgang von Gefäßverzweigungen und nachfolgender verminderter Gefäßdichte (Rousseau et al., 2003).

Dilatation existierender Gefäße, Anstieg der Permeabilität

Nach einem angiogenen Stimulus ist Vasodilatation der erste Schritt der Angiogenese. Sie erfolgt hauptsächlich als Antwort auf Stickstoffmonoxyd (NO). NO kann VEGF hochregulieren (Kimura et al., 2000), das seinerseits die Gefäßpermeabilität steigert (VPF) (Dvorak et al., 1995). Die biologische Bedeutung der permeabilitätssteigernden Eigenschaft von VEGF liegt in der mikrovaskulären Extravasation von Blutplasmae Proteinen. Auf diese Weise kommen Interaktionen zwischen induzierten Endothelzellproteinen und den als Folge der Hyperpermeabilität extravasierten Plasmaproteinen zustande, die perizelluläre Proteolyse und Endothelzelladhäsion steuern (Senger et al., 1996).

Auflösen des Zellverbandes

Damit aktivierte Endothelzellen unter Einfluss eines angiogenen Reizes aus bestehenden Gefäßen aussprießen können, muss der Zellverband gelockert werden. Für diesen Vorgang wird eine weitere Familie von Proteinen und ihren Rezeptoren verantwortlich gemacht. Hierbei handelt es sich um die endothelzellspezifischen Tie-Rezeptoren und ihre Liganden, die Angiopoietine.

Die Angiopoietine und ihre Rezeptoren

Trotz seiner außerordentlichen Bedeutung bei der Gefäßneubildung muss VEGF konzentriert mit anderen Faktoren wirken. Die kürzlich entdeckten Angiopoietine scheinen die wichtigsten Partner von VEGF bei der Gefäßneubildung zu sein. Derzeit sind vier Mitglieder dieser Familie (Angiopoietin-1 bis -4) bekannt.

Die Angiopoietine-1 und -2 haben herausragende Funktion bei der Bildung neuer Gefäße, so dass sie im Gegensatz zu den Angiopoietinen-3 und -4, über die derzeit noch sehr wenige Informationen vorliegen, in den Mittelpunkt des Interesses gerückt sind.

Das Angiopoietin/Tie-Rezeptor-System ist bei sekundären Phasen der Blutgefäßneubildung von entscheidender Bedeutung. Tie-Rezeptoren sind wie die VEGF-Rezeptoren endothelzell-spezifische, transmembranöse Rezeptor-Tyrosinkinasen, die bereits in der Embryonalentwicklung ausgeprägt werden (Dumont et al., 1993, Sato et al., 1995). Derzeit sind zwei Tie-Rezeptoren bekannt, Tie-1 und Tie-2. Alle Angiopoietine binden an Tie-2, für Tie-1 ist bisher kein Ligand bekannt. Es ist derzeit unklar, ob es unabhängige Liganden für Tie-1 gibt, oder ob ihn die bekannten Angiopoietine unter bestimmten Umständen miteinbeziehen, und inwieweit eine Interaktion zwischen Tie-1 und Tie-2 besteht. Die Aktivierung des Tie-2-Rezeptors erfolgt erst, wenn Angiopoietin-1 oder Angiopoietin-2 Oligomere formen (Davis et al., 2003).

Angiopoietin-1 stabilisiert Gefäßwände

Die wichtigsten Informationen über die funktionelle Bedeutung von Angiopoietin-1 und Tie-2 wurden aus knock-out-Tierexperimenten gewonnen. Embryonen, denen Angiopoietin-1 oder Tie-2 fehlen, entwickeln zwar ein annähernd normales primäres Gefäßsystem, dieses allerdings vollzieht keine weitere Remodellierung in größere und kleinere Gefäße.

In diesen Gefäßen ist die reziproke Interaktion zwischen Endothel und Umgebung gestört, was zum Fehlen einer geordneten Assoziation von Endothelzellen und periendothelialen Zellen führt. Angiopoietin-1 scheint daher nicht spezifische Reorganisationssignale zu vermitteln, sondern besitzt vielmehr eine steuernde Funktion bei der Integration von Endothelzellen und Gefäßwandzellen (Suri et al., 1996). Auf diese Weise hält Angiopoietin-1 Endothelzellen in ihrem ruhenden Zustand.

Angiopoietin-1 scheint in gewisser Weise die Funktion von VEGF sowohl in Bezug auf Gefäßmorphologie als auch auf Gefäßfunktion und -integrität zu kontern. Bei Untersuchungen zur Morphologie zeigte sich, dass sich die Überexpression von Angiopoietin-1 in ausgesprochener Hypervaskularisation äußert. Diese ist im Gegensatz zu VEGF, das bei Überexpression primär die Gefäßdichte erhöht, hauptsächlich auf einen Zuwachs in Gefäßgröße zurückzuführen (Detmar et al., 1998; Suri et al., 1998). In Bezug auf Gefäßfunktion und -integrität führt Überexpression von VEGF zu undichten und hämorrhagischen Gefäßen, die Überexpression von Angiopoietin-1 zu Gefäßen, die gegen Leckagen resistent sind (Thurston et al., 1999). Dieser Antagonismus des permeabilitätssteigernden VEGF-Signals ist auf einen die Interaktion von Endothelzellen und periendothelialen Zellen maximierenden Effekt Angiopoietins-1 zurückzuführen (Thurston et al., 2000) und macht Angiopoietin-1 zu einem natürlich vorkommenden Antipermeabilitätsfaktor. In adulten Gefäßgebieten, die keinen Umbauprozessen unterworfen sind, ist Angiopoietin-1 in niedrigen Dosierungen konstitutiv exprimiert. Die Unterbrechung dieses stabilisierenden Signals tritt im Zusammenhang mit der Reinitiation vaskulärer Remodellierung im Adulten, wie beispielsweise in weiblichen Reproduktionsorganen oder bei Tumorangiogenese auf.

Angiopoietin-2 vermittelt ein initiales Destabilisierungssignal

Neben Homologie zu Angiopoietin-1 zeigt Angiopoietin-2 ähnliche hohe Affinität zum Tie-2-Rezeptor, bewirkt aber keine Signalweiterleitung. Durch diese Blockade eines Angiopoietin-1/Tie-2-Signals funktioniert Angiopoietin-2 am Tie-2-Rezeptor als ein kompetitiver Antagonist von Angiopoietin-1. Die biologische Wirkung allerdings lässt sich nicht derart einfach beschreiben. Die Beobachtungen, dass die Überexpression von Angiopoietin-2 wie das Lahmlegen von Angiopoietin-1 oder Tie-2 zu embryonalem Endothelzelltod führt, belegt eine antagonisierende Wirkweise (Maisonpierre, et al., 1997). Die Tatsache, dass Angiopoietin-2 im Endothel von in Umbau begriffenen Gefäßen wie beispielsweise beim Aussprossen oder der Regression von Blutgefäßen im Ovar oder in Tumoren hochreguliert ist und das Aussprossen von Endothelzellen verstärkt (Goede et al., 1998; Stratmann et al., 1998; Maisonpierre, et al., 1997), deutet allerdings auf eine unterstützende Wirkung hin. Angiopoietin-2 trägt dazu bei, glatte Muskelzellen von Endothelzellen abzulösen und die extrazelluläre Matrix aufzulösen. Dadurch wird die Migration von Endothelzellen angeregt. Diese Beobachtungen führten zu der Hypothese, Angiopoietin-2 vermittele ein

destabilisierendes Schlüsselsignal bei der Initiation von angiogener Remodellierung (Holash et al., 1999). Derart destabilisierte Gefäße können zwei unterschiedlichen Schicksalen unterworfen sein. In Abwesenheit von Wachstumsfaktoren regredieren die destabilisierten Gefäße, bei simultaner Stimulation durch angiogene Wachstumsfaktoren wie VEGF allerdings werden sie stärker für deren angiogenen Reiz sensibilisiert und reagieren mit der Rekapitulation einer frühen embryonalen Situation, in der VEGF bereits vor dem Auftreten von Angiopoietin-1 agiert (Hanahan, D., 1997).

Damit ist die derzeitige Vorstellung von Blutgefäßmorphogenese, -aufrechterhaltung und -remodellierung wie folgt zusammenzufassen (siehe Abbildung 3).

VEGF setzt über VEGFR-2 ein Differenzierungs-, Proliferations- und Migrationssignal. Während der Embryogenese induziert dies die Differenzierung und Proliferation von Endothelzellen. Im Gegensatz dazu wird über VEGFR-1 der interendotheliale Kontakt entwickelt, Proliferation, Migration und anschließende kapilläre Lumenbildung induziert. Angiopoietin-1 rekrutiert über den Tie-2-Rezeptor periendotheliale Unterstützungszellen (Perizyten, glatte Muskelzellen, etc.), unterhält diese enge Beziehung und stabilisiert so neugebildete Gefäße. Angiopoietin-2 unterbricht als hemmender Ligand das Tie-2-Rezeptor-Signal in Endothelzellen und löst so die Gefäßwandstrukturen durch Reduktion endothelialen Kontaktes mit der extrazellulären Matrix und Dissoziation periendothelialer Zellen. Dies sensibilisiert Endothelzellen für angiogene Wachstumsfaktoren und bestimmt ebenfalls ihre Abhängigkeit von deren Überlebenssignal. Fehlt dieses Signal bei gleichbleibend hoher Expression von Angiopoietin-2 ist Gefäßregression – wahrscheinlich durch Apoptose – die Folge.

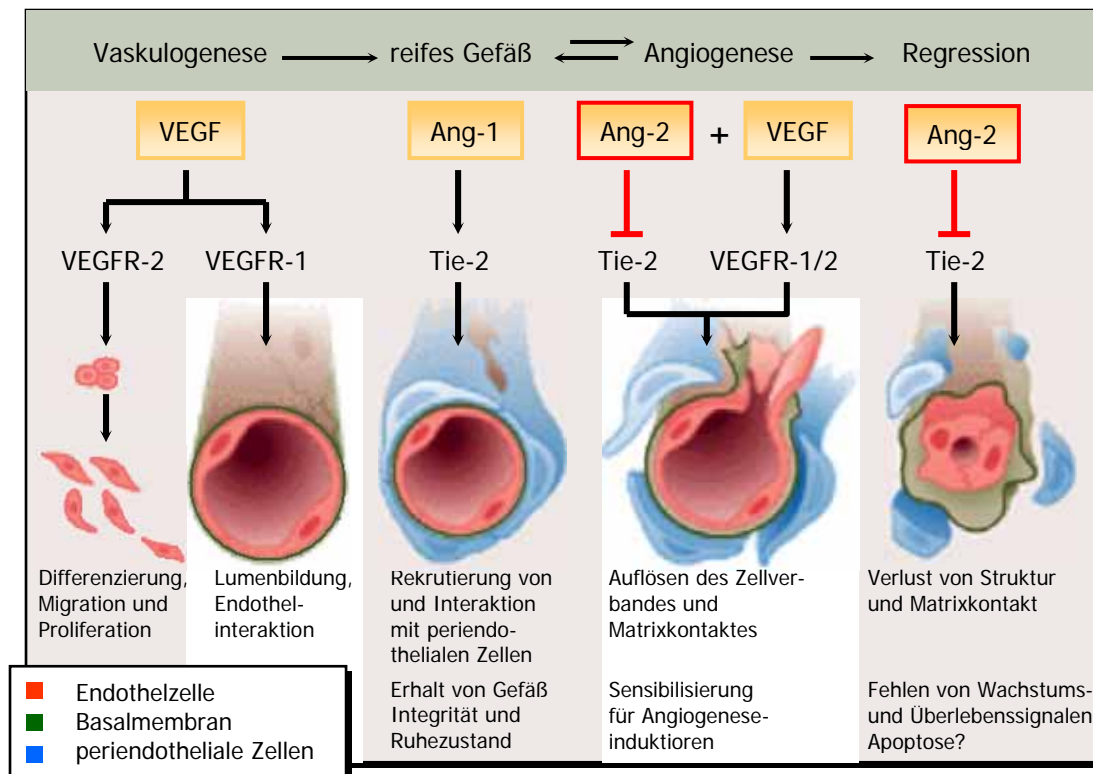


Abbildung 3

Regulation von Blutgefäßmorphogenese, -aufrechterhaltung und -remodellierung durch Rezeptor-tyrosinkinasen und ihre Liganden. Modifiziert nach Hanahan, D., 1997.

Abbau der extrazellulären Matrix

Durch die enzymatische Veränderung des perivaskulären Stromas wird stimulierten Endothelzellen der Weg zur Invasion hypoxischen Gewebes bereitet. Dieser Vorgang wird entscheidend durch Enzyme aus der Familie der Matrixmetalloproteinasen (MMPs) vermittelt (Hiraoka et al., 1998). Derzeit sind über 20 Matrixmetalloproteinasen (MMPs) bekannt, die Einfluss auf die Angiogenese und Zellproliferation haben. Natürliche Antagonisten der Matrixmetalloproteinasen sind die gewebsständigen Inhibitoren (TIMPs) (Brew et al., 2000). Zwei Enzymen aus der MMP-Unterfamilie der Gelatinasen, Gelatinase A und B (auch MMP-2 und -9) wird eine besondere Rolle bei der Angiogenese zugesprochen. Gelatinasen degradieren das in der Basalmembran vorkommende Kollagen Typ IV, sowie die Kollagentypen V, VII und X.

Für VEGF wird angenommen, dass es die Aktivität der von Endothelzellen ausgesandten MMPs moduliert und auf diese Weise in die Degradation der Extrazellulärmatrix eingreift. In *in vitro*-Studien an epidermalen Endothelzellen wurde gezeigt, dass VEGF

- a) die Ausschüttung von Gelatinase A (MMP-2) steigert,
- b) Gelatinase A durch die Hemmung der Freisetzung des Gegenspielers TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase 2) disinhibiert, und
- c) präexistierende Kollagenase durch Reduktion ihres Antagonisten TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase 1) ebenfalls disinhibiert (Lamoreaux et al., 1996).

Endothelzellaktivierung, Proliferation, Migration und Lumenbildung

Werden die physikalischen Barrieren durch die Proteolyse der extrazellulären Matrix gelockert, können sich die Endothelzellen aus dem Verband lösen. Die im adulten Organismus in Gefäßsystemen ohne Umbauprozesse ruhende Endothelzelle ist nunmehr abhängig vom Wachstums- und Überlebenssignal angiogener Faktoren wie beispielsweise VEGF oder FGF-2 und, da der interzelluläre Kontakt gelockert ist, von einer gesteigerten Beziehung zur Extrazellulärmatrix. Es setzt eine komplexe Interaktion zwischen Endothelzellen, Wachstumsfaktoren, Differenzierungsfaktoren, (z.B. den Angiopoietinen), den zugehörigen Rezeptoren und der extrazellulären Matrix ein. Unter dem angiogenen Stimulus transformieren Endothelzellen zu ihrem angiogenen Phänotyp mit veränderter Genexpression und beginnen zu proliferieren, zielgerichtet zu migrieren, sich in Strängen zu organisieren und ein Lumen auszubilden (siehe Abbildung 4). Hierbei exprimiert die Endothelzelle Zelladhäsionsmoleküle. Diese Zelladhäsionsmoleküle stellen den Kontakt zu Proteinen der Extrazellulärmatrix wie beispielsweise Vitronektin, Laminin, von-Willebrand-Faktor oder Kollagen her und sind essentiell für das Überleben der aus dem Zellverband gelösten Endothelzelle.

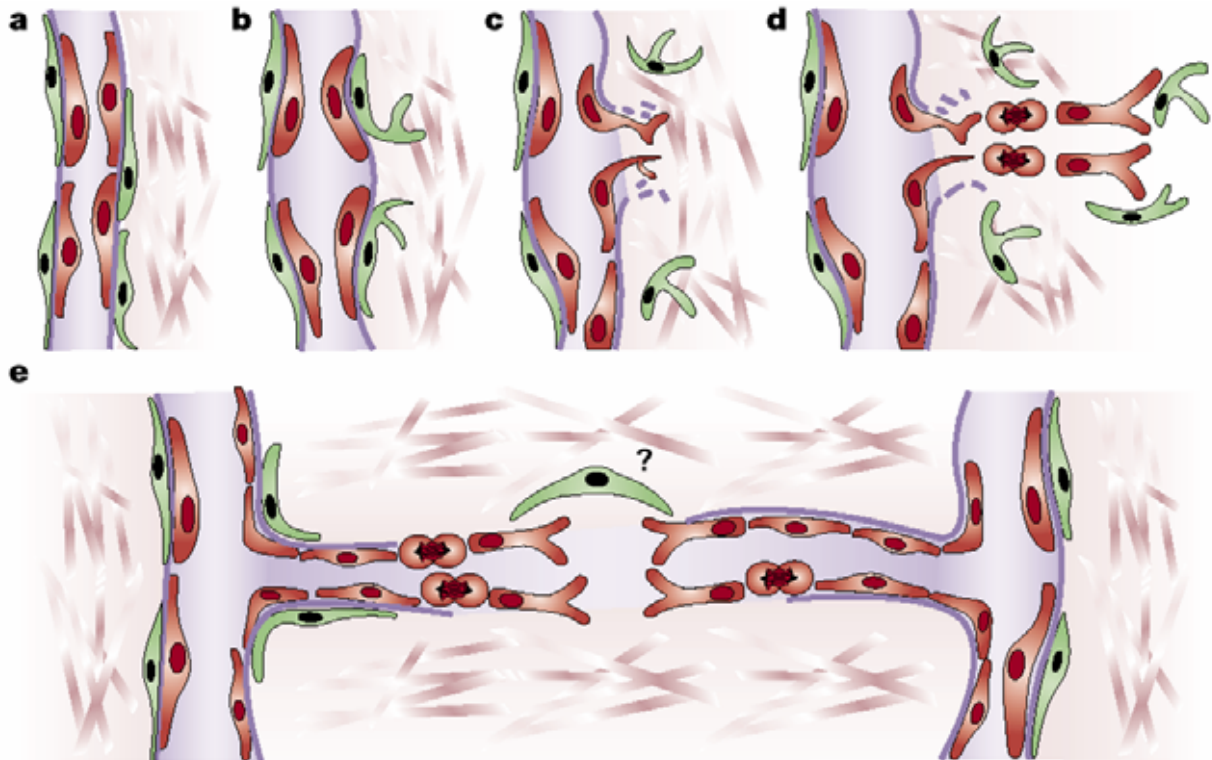


Abbildung 4

Phasen der Blutgefäßneubildung

- Blutgefäße entstehen aus präexistierenden Kapillaren oder postkapillären Venolen
- Es lösen sich Perizyten (grün) und das Gefäß dilatiert, bevor die Basalmembran und die extrazelluläre Matrix degradiert wird.
- Dies ermöglicht Endothelzellen (rot) in den perivaskulären Raum in Richtung eines angiogenen Stimulus zu migrieren.
- Endothelzellen proliferieren und reihen sich locker hintereinander.
- Hinter den Orten der Migration und Proliferation verstärken die Endothelzellen ihren Kontakt und bilden ein Lumen aus. Dies ist begleitet durch Bildung einer Basalmembran und Perizytenassoziation. Schließlich fusionieren diese Blutgefäßsprosse mit anderen und bilden ein neues Zirkulationssystem. Über diesen Fusionsmechanismus ist derzeit wenig bekannt. Modifiziert nach Bergers und Benjamin, 2003.

Integrine – Signalmoleküle von entscheidender Bedeutung

Eine besonders bedeutsame Gruppe der Zelladhäsionsmoleküle stellen die Integrine. Integrine sind eine Familie von membranständigen Rezeptoren, die Liganden an der Zelloberfläche mit dem Zytoskelett im Inneren der Zelle verbinden, sie integrieren (Hood und Cheresh, 2002). Hierbei fungieren sie als transmembranöse mechanische Verbindungselemente zwischen extrazellulärem Kontakt und intrazellulärem Mikrofilamentsystem, welches durch sie reguliert und moduliert wird. Darüber hinaus induziert die Integrinligation eine Reihe intrazellulärer Signalwege, die viele Aspekte zellulären Verhaltens wie Proliferation, Überleben / Apoptose, Zellform, Beweglichkeit, Genexpression und Differenzierung beeinflussen. Viele dieser integrininduzierten Signalwege sind denen der Rezeptoren von

Wachstumsfaktoren ähnlich oder mit ihnen gekoppelt. So sind manche zellulären Reaktionen auf Wachstumsfaktoren von der integrinvermittelten Adhärenz an Liganden abhängig (Assoian, R. K., 1997; Schwartz and Assoian, 2001).

Integrine sind transmembranöse Heterodimere, die aus einer nicht kovalent gebundenen α -Untereinheit und einer β -Untereinheit bestehen. Beide Untereinheiten besitzen eine große extrazelluläre Domäne, einen transmembranösen und einen kurzen zytoplasmatischen Anteil. Derzeit sind über 16 α - und 8 β -Untereinheiten bekannt, die sich zu mehr als 20 verschiedenen Integrinen kombinieren können (van der Flier and Sonnenberg, 2001). Aus einem weiten Spektrum von Kombinationsmöglichkeiten der Integrinuntereinheiten zeigen α_v -Integrine eine spezifische Rolle bei der Blutgefäßneubildung. Für die Heterodimere $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ wurde ein besonderes Expressionsmuster, nämlich auf Gefäßendothelzellen während Angiogenese oder Gefäßremodellierung, nachgewiesen. Im Adulten zeigen sie eine eher limitierte Verteilung: unregelmäßig auf Epithelzellen, minimal in Muskelzellen des Intestinums oder Uterus und zu einem geringen Prozentsatz auf aktivierten Leukozyten, Makrophagen oder Osteoklasten, auf denen sie zu immunologischen Funktionen oder Knochenresorptionen beitragen.

Die Expression der Integrine kann veränderlich von Wachstumsfaktoren und Zytokinen moduliert werden. FGF-2 und VEGF beispielsweise induzieren die Expression der Heterodimere $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ (Senger et al., 1996, Sepp et al., 1994). Als adhäsionsvermittelnden Ort erkennen sie eine kurze Signalsequenz aus den Aminosäuren Arginin, Glycin und Asparagin (RGD), die von vielen Proteinen der Extrazellulärmatrix (Vitronektin, Fibronektin, Fibrinogen, Thrombospondin, proteolysiertes Kollagen, von Willebrand Factor und Osteopontin) exponiert werden (Cheresh, D. A., 1987).

Die Integrin-Rezeptor-Heterodimere $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ werden spezifisch von stimulierten, proliferierenden oder migrierenden Endothelzellen, nicht aber vom ruhenden Endothel präexistierender Gefäße exprimiert und sind essentiell bei Endothelzelladhäsion, zielgerichteter Migration und dreidimensionaler Anordnung (Brooks et al., 1994a). Hierbei wird die Zelladhäsion nicht nur durch Integrine vermittelt, der durch sie hergestellte Kontakt ist für diese Prozesse unabdingbar. Über die Hemmung apoptotischer Signalkaskaden (PI3-Kinase und PKC, p53 und p21^{WAF1/CIP1}, Ras/Raf) vermitteln $\alpha_v\beta_3$ - und $\alpha_v\beta_5$ -Integrine während der angiogenen Phase ein Überlebenssignal (Stupack und Cheresh, 2002; Strömblad et al., 1996; Alavi et al., 2003). Andererseits hat die Blockade des $\alpha_v\beta_3$ -Integrins nach einem angiogenen Stimulus dramatische Folgen für das sich neu bildende Gefäß. Sie induziert eine

integrinvermittelte selektive Apoptose der proliferierenden angiogenen Gefäßzellen, ohne präexistierende ruhende Blutgefäße zu beeinflussen (Brooks et al., 1994b, Kapitel 1.5).

Gleichzeitig mit dem Beobachten einer Wachstumsfaktor-Integrin-Kaskade demonstrierten Friedlander und Mitarbeiter, dass es zwei verschiedenartige, voneinander getrennte Angiogenesepfade zu geben scheint, die aufgrund ihrer Abhängigkeit von $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ definiert werden können. Sie legten dar, dass durch die Zytokine FGF-2 und Tumornekrosefaktor α (TNF- α) induzierte Angiogenese von der Expression des $\alpha_v\beta_3$ -Integrins abhängt und durch blockierende Antikörper gegen das $\alpha_v\beta_5$ -Integrin nicht inhibiert werden kann. Gegenteilig wird durch VEGF und TGF- β (transformierender Wachstumsfaktor beta) stimulierte Angiogenese durch das $\alpha_v\beta_5$ -Integrin vermittelt und kann durch anti- $\alpha_v\beta_3$ -Antikörper nicht beeinflusst werden (Friedlander et al., 1995).

Neueste Untersuchungen zu den intrazellulären Signalwegen dieser beiden Integrine bestätigen das Vorliegen zweier verschiedener Angiogenesepfade von $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$, die durch die Induktoren FGF-2 und VEGF unterschieden werden können (Hood et al., 2003).

Die biologische Relevanz dieser verschiedenen angiogenen Signalwege ist unklar. Es wird häufig vermutet, dass es für Integrinsignalwege Kompensationsmöglichkeiten im Sinne einer überlappenden Funktion durch andere Integrine gäbe. Die Daten aus genetisch veränderten Mäusen zeigen aber, dass $\alpha_v\beta_5$ nicht für $\alpha_v\beta_3$ kompensieren kann, und dass es keine Hochregulierung anderer Integrine gibt (Reynolds et al., 2002). Es gibt also keine Hinweise einer Kompensation dieser beiden Integrine, obwohl die Möglichkeit anderer unbekannter Formen der Kompensation nicht ausgeschlossen werden kann.

Matrixdegradation und Remodellierung

Neben der Fähigkeit des $\alpha_v\beta_3$ -Integrins, mehrere Matrixmoleküle über die RGD-Sequenz zu erkennen, besitzt es regulierende Funktion bei der Aktivierung spezifischer Proteinasen, die die Basalmembran degradieren. Es besitzt die Fähigkeit, in einer RGD-unabhängigen Weise an MMP-2 (Gelatinase A) zu binden und bei der Bildung eines das Enzym aktivierenden Komplexes mitzuwirken (Brooks et al., 1996). Hierbei bindet das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin – RGD-unabhängig – aktivierte MMP-2 an Orte aktiven Gefäßwachstums. Die biologische Bedeutung liegt in der proteolytischen Freilegung und anschließenden Integrinligation von RGD-Sequenzen, die beispielsweise im nativen Kollagen für Integrine unzugänglich sind. Dies ermöglicht es angiogenen Endothelzellen zum einen, die Matrix zur Invasion zu degradieren,

und andererseits, durch die proteolytische Freilegung von Integrinbindungsstellen die zur Migration notwendige Zelladhäsion zu steigern (Eliceiri und Cheresch, 1999). Die Unterbrechung dieser Interaktion durch ein natürliches MMP-2-Fragment (PEX) hemmt nicht nur die endothelzellvermittelte Matrixremodellierung, sondern beeinflusst auch die Integrinligation durch fehlende Zugängigkeit der RGD-Bindungsstellen (Brooks et al., 1998).

Gefäßstabilisierung, –reifung und Etablierung eines ruhenden Gefäßes

Mit zunehmender Vaskularisierung hypoxischen Gewebes sinkt das Sauerstoffdefizit und der angiogene Stimulus verändert sich qualitativ.

Zur Etablierung eines funktionalen Gefäßnetzwerkes ist die Ausreifung der neu entstandenen Gefäße in reife, dauerhafte Gefäße notwendig. Dieser Reifungsprozess beinhaltet die Ausbildung einer Basalmembran, die Intensivierung interendothelialer und interzellulärer Kontakte und die Unterstützung der Endothelröhre durch periendotheliale Zellen wie Perizyten und glatte Muskelzellen.

Die Assoziation von Perizyten und glatten Muskelzellen mit neu gebildeten Blutgefäßen reguliert die Proliferationsrate, das Überleben und die Differenzierung von Endothelzellen, den Blutfluss und die Permeabilität des neuen Gefäßes (Jain, R. K, 2003). Die Isoform PDGF-BB des Plättchenwachstumsfaktors PDGF und sein Rezeptor PDGFR- β spielen eine entscheidende Rolle bei der Stabilisierung neugebildeter Gefäße, indem sie Perizyten und glatte Muskelzellen rekrutieren (Benjamin et al., 1998; Hellstrom et al., 1999). Hierbei ist die konzertierte Aktion mit dem VEGF-Signal bedeutend. Der Verlust oder die nur insuffiziente Rekrutierung periendothelialer Zellen mündet unter dem VEGF-Stimulus in Endothelzellwachstum, Hyperpermeabilität, Fragilität, Dilatation, Blutung, gestörter Perfusion und Gewebshypoxie (Hellstrom et al., 2001).

Die Intensivierung interzellulärer Kontakte wird ebenfalls durch eine Verschiebung im Angiotensin-Gleichgewicht gefördert. Der verbandauflösende Effekt Angiotensin-2 verringert sich, die gefäßwandstabilisierende Wirkung Angiotensin-1 über junctionale (Thurston et al., 2000) und adhäsive (Carlson et al., 2001) Proteine wird dominierend. Die interendothelialen Kontakte werden über VE-Cadherine maximiert und die Permeabilität gesenkt.

Endothelzellen und Perizyten beginnen, das homodimere Zytokin transformierender Wachstumsfaktor beta (TGF- β) zu produzieren (Antonelli-Orlidge et al., 1989). TGF- β spielt

eine bedeutende Rolle bei der Vermittlung struktureller Integrität neu gebildeter Gefäße. Es hemmt die Proliferation und Migration von Endothelzellen (Orlidge und D'Amore, 1987), fördert die Bildung einer neuen Basalmembran und steigert die Rekrutierung und Differenzierung glatter Muskelzellen (Pepper, M. S., 1997). Mit der Ausreifung der Gefäßwand verlieren die Endothelzellen ihre Abhängigkeit von Wachstums- und Überlebenssignalen, werden gegen exogene Faktoren resistent und gehen in ihren ruhenden Zustand über (siehe Abbildung 6).

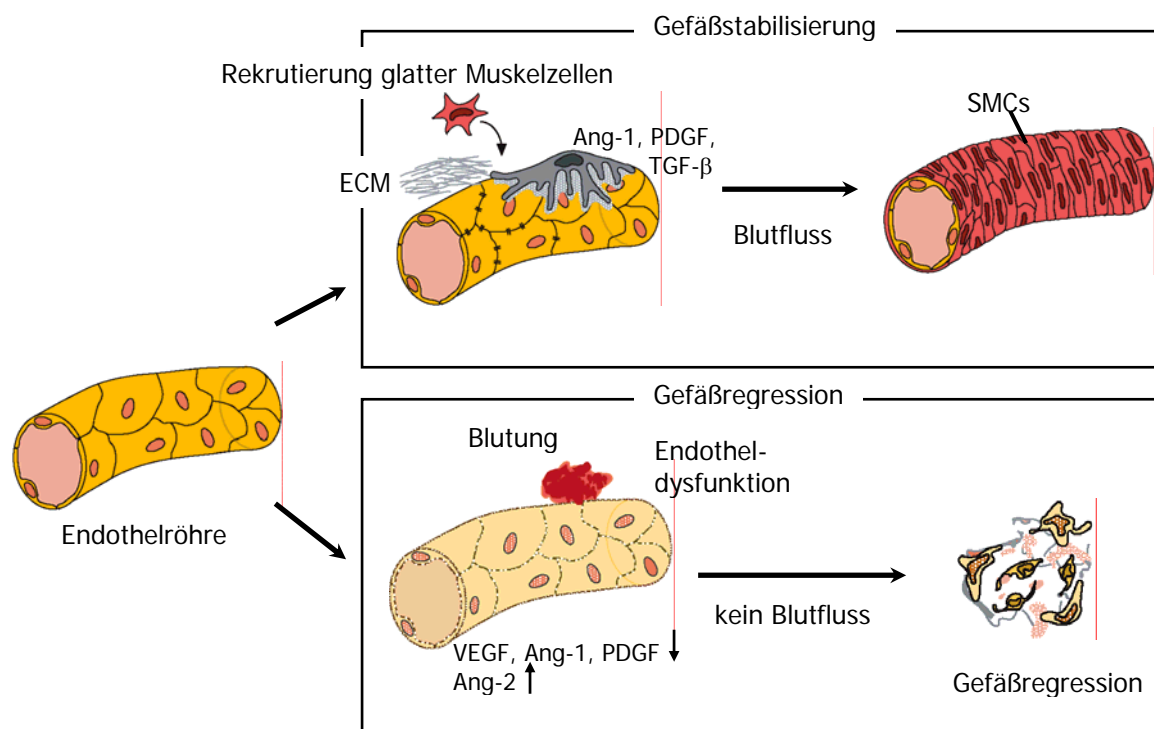


Abbildung 6

Darstellung von Gefäßetablierung und -regression. Neu gebildete Gefäße, die initial lediglich aus einem Endothelschlauch bestehen, benötigen ein ausgewogenes Verhältnis angiogener Stimulanzen, um auszureifen und dauerhaft zu bestehen. Endothelzellen gehen intensivierte Zellkontakte ein, werden durch Perizyten und glatte Muskelzellen verstärkt und Blutfluss setzt ein (oberer Kasten). Liegt ein Ungleichgewicht angiogener Faktoren oder Inhibitoren vor, bleibt die Endothelröhre ledig, vermehrt durchlässig und fragil, was zu Blutungen oder Ruptur führt. Der Blutfluss ist verringert, das Gefäß regrediert (unterer Kasten). Modifiziert nach Carmeliet, P., 2003.

Im ruhenden Zustand können Endothelzellen eine Überlebenszeit von mehreren Jahren haben. Verkürzung ihrer Lebensdauer bewirkt eine Gefäßregression, die im adulten Organismus beispielsweise im Ovar oder in der Retina bekannt ist. Bei der diabetischen Retinopathie beispielsweise kann eine pathologisch erhöhte Apoptoserate von Endothelzellen und die daraus folgende Gefäßleckage beobachtet werden (siehe Kapitel 1.4.1 Pathobiochemie und Molekularbiologie diabetesinduzierter Gefäßveränderungen).

Pathologische Angiogenese

Pathologische Angiogenese wird grundsätzlich durch ähnliche molekulare Mechanismen gesteuert, wie die physiologische Angiogenese. Allerdings zeichnet sich pathologische Angiogenese durch eine quantitativ fehlgesteuerte Gefäßbildung (verstärkte oder verminderte Angiogenese) sowie durch funktionell inadäquate Gefäße aus. Dabei liegt ein Ungleichgewicht von stimulatorischen und inhibitorischen Faktoren zugrunde. So ist physiologische Angiogenese als ein selbstlimitierender, pathologische Angiogenese aber als ein selbst perpetuierender Prozess zu begreifen, der aktiver Intervention bedarf.

Während physiologischer Angiogenese reifen neu gebildete Gefäße schnell heran und werden stabil. Bei pathologischer Angiogenese wie beispielsweise in Tumoren ist die entscheidende Balance zwischen positiver und negativer Kontrolle verloren (Bergers und Benjamin, 2003). Die Folge sind architektonisch abweichende und funktionell defiziente Blutgefäße. Sie zeigen eine unregelmäßige Form, sind dilatiert, enden teilweise blind und sind nicht in Arteriolen, Kapillaren und Venolen organisiert, sondern vereinen Charakteristika aller dieser in chaotischer Weise. Das Gefäßnetzwerk in Tumoren zeigt Hyperpermeabilität und Leckagen bis zu Hämorrhagien entsprechend der permeabilitätssteigernden Wirkung von VEGF (VFP). Periendotheliale Zellen, die normalerweise in engem Kontakt mit dem Endothel stehen, weisen eine gelockerte Beziehung auf und sind weniger zahlreich vorhanden (Morikawa et al., 2002).

Von großer Bedeutung sind die Charakteristika des umliegenden Gewebes und die Ursache der pathologischen Vaskularisation. Bei Erkrankungen wie Diabetes ist das Krankheitsbild, abhängig vom Umfeld, durch einen Untergang von Gefäßen mit Ischämien oder aber Proliferationen gekennzeichnet. Bei der Frühgeborenenretinopathie ist die Ursache eine generalisierte Hypoxie der Netzhaut (siehe Kapitel 1.4.1 Pathobiochemie und Molekularbiologie diabetesinduzierter Gefäßveränderungen und Kapitel 1.4.2 Frühgeborenenretinopathie).

1.3 Blutgefäßentwicklung und -versorgung der humanen Netzhaut

Physiologische Entwicklung des retinalen Gefäßsystems

Die retinale Vaskularisation wurde kürzlich durch die Arbeitsgruppe von Hughes detailliert beschrieben (Hughes et al., 2000). Die Entwicklung des retinalen Gefäßsystems beginnt während der 14. Schwangerschaftswoche (SSW) mit der Migration von spindelförmigen, mesenchymalen Vorläuferzellen von der Papille aus. Die Migrationswege der Zellen entsprechen in etwa dem Verlauf der späteren retinalen Gefäßstämme. Bereits eine Woche später haben sich aus den Vorläuferzellen Endothelzellen differenziert und bilden ein oberflächliches primitives Gefäßnetzwerk um die Papille. Vaskulogenese und Angiogenese verlaufen zwischen der 15. und der 20. SSW parallel. Bis zur 21. SSW ist die Vaskulogenese dann abgeschlossen. Eine Hypoxie der reifenden Netzhaut und die damit verbundene Sekretion von VEGF-A vor allem durch Astrozyten scheint der wesentliche Stimulus für Angiogenese ab der 21. SSW zu sein. Dies bedeutet, dass der äußere Plexus des retinalen Gefäßsystems sowie das komplette periphere und perifoveale Gefäßbett ausschließlich durch diesen Mechanismus entstehen. Bei Geburt ist die Gefäßentwicklung bis zum Rand der Netzhaut abgeschlossen. Während der physiologischen Entwicklung des inneren retinalen Gefäßnetzes kommt es auch zur Rückbildung von Kapillaren, wenn diese ursprünglich in einem Bereich angelegt worden waren, in dem später eine hohe Sauerstoffsättigung beispielsweise in der Umgebung von Arterien herrscht (Ashton, N., 1957). Dieser Prozess findet beim Menschen über die Geburt hinaus statt.

Blutgefäßversorgung der adulten Netzhaut

Die adulte Netzhaut wird durch zwei Gefäßsysteme versorgt. Retinale Gefäße aus der Arteria centralis retinae versorgen die inneren zwei Drittel durch ein profundes und ein superfizielles Netzwerk. Um die Sehfunktion zu gewährleisten ist die äußere Netzhaut komplett avaskulär. Sie bezieht Sauerstoff und Nährstoffe aus der chorioidalen Zirkulation. Um den Transport zu steigern, existiert eine große Anzahl fenestrierter chorioidaler Kapillaren unterhalb der Retina, die sogenannte Choriokapillaris. Plasma extravasiert aus der Choriokapillaris und sammelt sich unterhalb des retinalen Pigmentepithels (RPE), welches tight junctions und verschiedene Transportsysteme besitzt und die äußere Blut-Netzhaut-Schranke bildet. Die innere Blut-Netzhaut-Schranke wird durch das Gefäßendothel gebildet, welches sich durch engen

Zellkontakt über tight junctions auszeichnet. Die membrana limitans interna markiert die innere Oberfläche der Netzhaut und grenzt sie zum avaskulären Glaskörper hin ab. Damit ist die innere Retina als vaskularisiertes Gewebe von zwei avaskulären Geweben begrenzt und die äußere Netzhaut als avaskuläre Schicht von zwei vaskularisierten Schichten umgeben (siehe Abbildung 7).

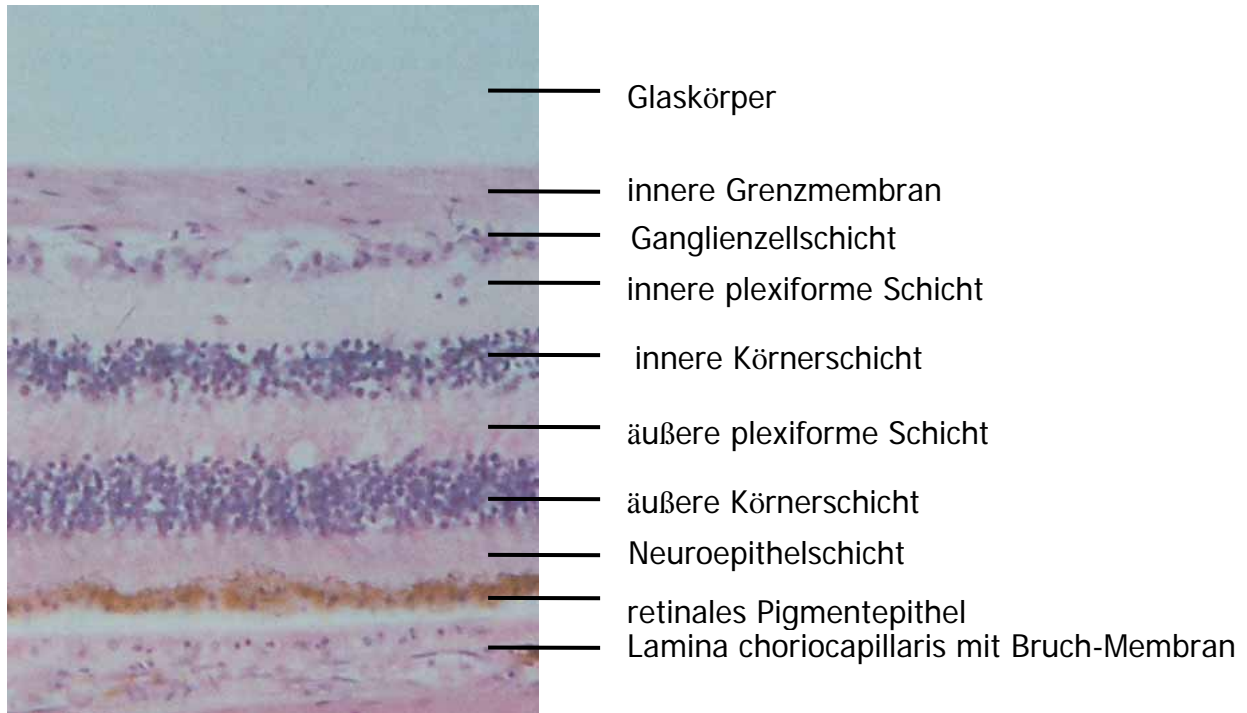


Abbildung 7

Histologischer Schnitt durch die humane Netzhaut (Hämtoxylin-Eosin-Färbung)

Aus: Benninghoff Anatomie, Hrsg. Drenckhahn / Zenker, Band 2, 15. Auflage, Seite 731, Urban & Schwarzenberg 1994, ISBN 3-541-00255-7

In keinem anderen Gewebe ist die arteriovenöse Sauerstoffdifferenz so hoch wie in der Netzhaut. Dies bedeutet, dass sie außerordentlich sensibel auf veränderte Sauerstoffversorgung reagiert.

1.4. Bedeutung und Pathomechanismus gefäßproliferativer Netzhauterkrankungen

Pathologische Gefäßneubildung am Auge

Der Begriff Angiogenese wird zumeist als Überbegriff für die molekularen und zellulären Mechanismen, die für das Bestehen und Neuwachsen von Gefäßen verantwortlich sind, genutzt. Soll das ungewollte pathologische Wachstum neuer Gefäße beschrieben werden, wird der Terminus "Angiogenese" in der ophthalmologischen Literatur häufig mit Neovaskularisation gleichgesetzt. Zwar können alle Gefäßbereiche des Auges von Neovaskularisation betroffen sein, die unkontrollierte Blutgefäßneubildung in der Netzhaut als das die Photorezeptoren beherbergende Organ allerdings kann die bedeutendsten Folgen nach sich ziehen. Retinale Neovaskularisationen können durch Glaskörperblutung, Netzhautablösung und Glaukombildung zu schwerer Beeinträchtigung des Sehvermögens führen (Patz, A., 1980) und damit ist Angiogenese für den Großteil der irreversiblen Blindheit der westlichen Welt verantwortlich.

Ischämie ist auch bei der Entwicklung retinaler Neovaskularisationen initialer Stimulus

Bereits vor über fünfzig Jahren wurde Ischämie als die für Blutgefäßneubildung verantwortliche Kraft erkannt (Michaelson, I., 1948). Die Formulierung dieser These basierte auf Beobachtungen an Netzhäuten. Retinale Ischämie als Folge von Gefäßveränderungen oder -verschlüssen ist ein gemeinsames Merkmal von Erkrankungen, bei denen retinale Neovaskularisationen erscheinen. Diese sind diabetische Retinopathie, Frühgeborenenretinopathie, Zentralvenenverschluss und Venenastverschlüsse. Sie werden als ischämische Retinopathien und aufgrund des gemeinsamen pathologischen Folgemechanismus auch als angioproliferative Netzhauterkrankungen bezeichnet.

Bei ischämischen Netzhauterkrankungen wird durch Hypoxie eine erhöhte Expression des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors induziert (Pe`er et al., 1995) und diese tritt zeitlich vor der Entwicklung erster Neovaskularisationen auf (Pierce et al., 1995). Die Synthese und Sekretion von VEGF findet in retinalen Perizyten, Endothelzellen, retinalem Pigmentepithel und möglicherweise auch anderen Zelltypen statt (Aiello et al., 1994a) und kann initial durch die Wiederherstellung normaler Sauerstoffversorgung rückgängig gemacht werden (Aiello et al., 1994b). Am Beispiel der diabetischen Retinopathie konnte gezeigt

werden, dass VEGF im Vergleich zu nicht-angioproliferativen Stadien in Phasen der aktiven Gefäßneubildung vermehrt nachzuweisen ist (Aiello et al., 1994a).

Pathologische okuläre VEGF-Induktion allerdings muss nicht notwendigerweise ein reguläres Gefäß hervorbringen, sondern kann zu einer abnormen angiogenen Reaktion mit Leckagen und Hämorrhagien führen (Adamis et al., 1994). Diese Beobachtungen zeigen zum einen, dass die inadäquate Induktion von VEGF ohne die Gesamtheit des angiogenen Programms zu unreifen und undichten Gefäßen – die ihrerseits Krankheiten hervorrufen können – führt und andererseits, dass Gewebshypoxie nicht notwendigerweise eine reguläre angiogene Antwort im Sinne eines funktionalen Blutgefäßes hervorbringt.

Die herausragende Bedeutung der Integrine in der Angiogenese wurden im Einklang mit anderen Forschungsergebnissen auch bei okulärer Gefäßneubildung belegt (Friedlander et al., 1996).

1.4.1 Pathobiochemie und Molekularbiologie diabetesinduzierter Gefäßveränderungen

Die diabetische Mikroangiopathie stellt neben dem Hauptgrund für Nierenfunktionsstörungen und Nervenschädigungen die häufigste Ursache für eine wesentliche Sehbehinderung beziehungsweise Erblindung dar.

Bereits zu frühen Zeitpunkten der Erkrankung verursacht die Hyperglykämie einen abnormen Blutfluss und gesteigerte Gefäßpermeabilität. Diese sind Auswirkungen erhöhter Aktivität von Vasodilatoren wie Stickstoffmonoxid beziehungsweise vermehrter Bildung von Permeabilitätsfaktoren wie dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor VEGF. Die durch erhöhte Glukose induzierten quantitativen und qualitativen Veränderungen der extrazellulären Matrix tragen zu einem irreversiblen Anstieg der Gefäßpermeabilität bei.

Mit Erkrankungsfortschritt tritt ein mikrovaskulärer Zellverlust – teilweise als Folge des programmierten Zelltodes – ein und es kommt zu progressiven Kapillarverschlüssen aufgrund Überproduktion extrazellulärer Matrix und der Deposition extravasierter Plasmaproteine. Diese Veränderungen führen in der Netzhaut zu Ödem, Ischämie und hypoxieinduzierter Gefäßneubildung.

Im folgenden wird der aktuelle Wissensstand über die bei Fortschreiten der Erkrankung stattfindenden Veränderungen sowohl auf pathobiochemischer und pathophysiologischer als

auch auf mikromorphologischer Ebene zusammengefasst und die daraus erwachsenden Folgen beschrieben.

Mechanismen der hyperglykämieinduzierten Gefäßschädigungen

Großangelegte prospektive klinische Studien legen einen klaren Zusammenhang von chronischer Hyperglykämie und mikrovaskulärer diabetischer Komplikationen dar (The Diabetes Control and Complication Trial (DCCT) Research Group, 1993; UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group, 1998) In den letzten Jahren wurden vier Hypothesen, wie Hyperglykämie diabetische Komplikationen hervorruft, aufgestellt aber erst kürzlich wurde deren gemeinsames Verbindungsglied entschlüsselt. Diese vier Hypothesen sind: gesteigerter Aldosereduktase-Weg, vermehrte Produktion von Glykierungsfolgeprodukten (AGEs), Aktivierung von Proteinkinase C (PKC)-Isoformen und gesteigerter Hexoseamin-Weg (Brownlee, M., 2001).

Gesteigerter Aldosereduktase-Weg

Aldosereduktase katalysiert die NADPH-abhängige Reduktion einer Reihe von Carbonylverbindungen, darunter Glukose. Aldosereduktase hat eine niedrige Affinität für Glukose und in Normoglykämie wird nur ein sehr geringer Anteil über diesen Weg verstoffwechselt. Im hyperglykämischen Milieu allerdings, führt gesteigerte intrazelluläre Glukose unter Verbrauch von $\text{NADPH}+\text{H}^+$ zu erhöhter Konversion zu Sorbitol. Dieser $\text{NADPH}+\text{H}^+$ -Verbrauch wird durch eine Oxidation des reduzierten Glutathions ausgeglichen. Ist die glukoseinduzierte Aktivität der Aldosereduktase ausreichend hoch, reduziertes Glutathion zu verbrauchen, wird oxidativer Stress verstärkt oder induziert (Abbildung 8). Sorbitol wird anschließend unter Bildung von NADH zu Fruktose oxidiert. Das zytosolische Verhältnis von $\text{NADH}+\text{H}^+$ und NAD^+ ändert sich folglich zugunsten des $\text{NADH}+\text{H}^+$.

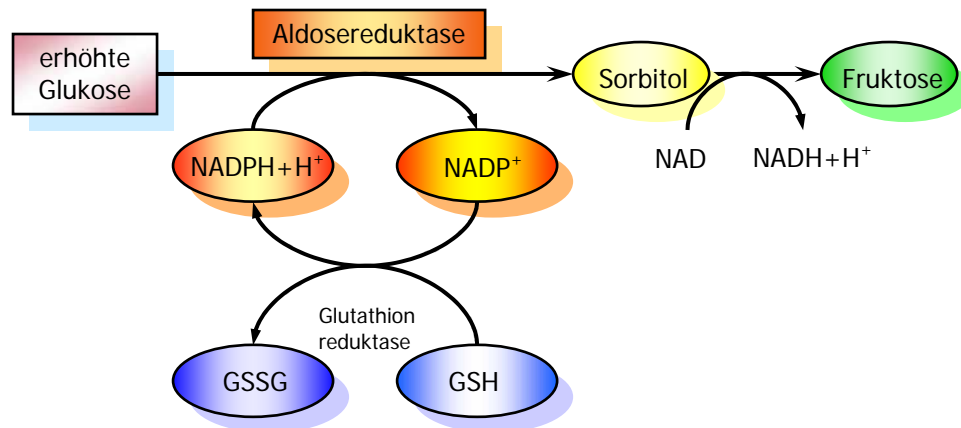


Abbildung 8

Der Aldosereduktase-Weg. Die Aldosereduktase reduziert Glukose unter Oxidation von $\text{NADPH}+\text{H}^+$ zu Sorbitol. In Zellen, in denen die Aldosereduktase-Aktivität ausreichend ist, reduziert Glutathion (GSH) zu verbrauchen, ist der oxidative Stress erhöht. Modifiziert nach Brownlee, M., 2001.

Verstärkte Bildung von Glykierungsfolgeprodukten durch intrazelluläre Dicarbonyl-Vorläufer

Chronische Hyperglykämie moduliert die Glykosylierung von Proteinen durch klassische enzymatische Glykosylierungswege und durch nichtenzymatische Reaktion oder Glykierung. Die Stoffwechselintermediate und -endprodukte dieser Glykierungskaskade stellen eine Gruppe heterogener Zucker-Aminosäure-Addukte, die zusammengefasst als Glykierungsfolgeprodukte (AGEs) bezeichnet werden. AGEs entstehen extra- und intrazellulär auf verschiedene Weise. Extrazellulär entstehen sie durch Reaktion von Glukose und extrazellulären Proteinen (Glykosylierung). Die Bildung von intrazellulären AGEs aus von Glukose generierten Dicarbonyl-Intermediaten vollzieht sich jedoch um ein Vielfaches schneller (Glykierung). Hierbei reagieren Glyoxal, Methylglyoxal und 3-Desoxy-glukoson mit Aminogruppen intrazellulärer Proteine. Die zugrundeliegenden biochemischen Mechanismen sind beschrieben (Brownlee, M., 1993): Glukose ist wie die anderen zirkulierenden Zucker Galaktose und Fruktose in der Lage, *in vivo* molekularen Sauerstoff zu reduzieren und durch nukleophile Addition an Aminogruppen ein Aldimin zu generieren. Dieses als Schiff'sche Base agierende Intermediat formiert stabilere Produkte, die Amadori-Produkte genannt werden (Bunn und Higgins, 1981). Intramolekulare Isomerisierung führt zur Bildung eines α -Ketoaldehyds, das eine hochreaktive Dicarbonylverbindung darstellt (Wells-Knecht et al., 1995; siehe Abbildung 9). Diese Dicarbonylverbindungen reagieren in der irreversiblen "Glykierung" mit freien Aminogruppen zu vielseitigen Metaboliten, den sogenannten Glykierungsfolgeprodukten (AGEs).

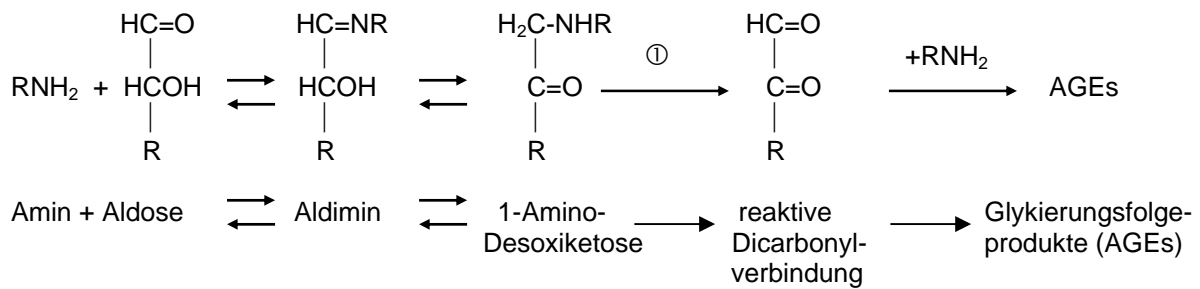


Abbildung 9

Bildung von Glykierungsfolgeprodukten (AGEs). Modifiziert nach Brownlee et al., 1993.

Diese Reaktionskaskade läuft metallionkatalysiert ab. Bei dem Reaktionsschritt ① werden reaktive Sauerstoffzwischenprodukte abgespalten.

Mechanismen der pathologischen Veränderungen durch AGEs

Die Produktion intrazellulärer AGE-Vorläufer haben über drei Mechanismen zellschädigende Wirkung (siehe Abbildung 10):

Durch AGEs modifizierte

- intrazelluläre Proteine haben veränderte Funktion ①;
- extrazelluläre Matrixkomponenten interagieren abnormal untereinander oder mit ihren Rezeptoren (Integrine) auf Zellen ②;
- Plasmaproteine binden an AGE-Rezeptoren auf Endothelzellen und Makrophagen, was die Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) und eine veränderte Genexpression über den Transkriptionsfaktor NF-κB induziert ③.

① intrazelluläre AGE-Bildung verändert Proteinfunktionen

Wie andere Hydroxyaldehyde können Glukose wie auch AGEs *per se* durch Autooxidation Wasserstoffperoxyd und Hydroxylradikale bilden. Diese metallkatalysierte Oxidation verursacht molekulare und strukturelle Schäden an Proteinen (Hunt et al., 1988) und hat damit direkte Auswirkungen auf deren biologische Funktion. Der Fibroblasten-Wachstumsfaktor-1 beispielsweise ist eines der bedeutendsten durch AGEs modifizierten Proteine in Endothelzellen (Giardino et al., 1994).

② AGEs verändern Matrix-Matrix- und Zell-Matrix-Interaktionen

Glykierungsfolgeprodukte verursachen quantitative und qualitative Veränderungen der extrazellulären Matrix. Auf diese Weise verändern sie Matrix-Matrix- als auch Zell-Matrix-Interaktionen. Die durch AGEs vermittelte intermolekulare Vernetzung von Kollagen oder

dessen kovalente Verbindung an Plasmaproteine oder AGEs ruft eine Expansion in der molekularen Anordnung hervor (Kent et al., 1985, Tanaka et al., 1988, Brownlee et al., 1985). Für die für Blutgefäße bei Diabetes typische Lumenverengung wird teilweise die Akkumulation subendothelialer AGE-gebundener Plasmaproteine verantwortlich gemacht. Auch die Quer- und Linearvernetzung des basalmembranständigen Kollagens IV zu einem physiologischen Netzwerk wird durch AGE-Bindung gehemmt (Tsilibary et al., 1988). AGEs verändern darüber hinaus Signaltransduktionswege von Zellen zur ihrer extrazellulären Umgebung durch Modifikation von Liganden der extrazellulären Matrix. So wird beispielsweise Vitronektin in Netzhäuten diabetischer Ratten durch AGEs morphologisch und funktional verändert und könnte so zur Bildung azellulärer Kapillaren bei diabetischer Retinopathie beitragen (Hammes et al., 1996a). Endothelzellen beispielweise zeigen eine gestörte Adhäsions- und Migrationsfähigkeit auf glykiertem Kollagen IV und Laminin (Haitoglou et al., 1992). Diese Funktionen spielen bei der Bildung neuer Blutgefäße eine entscheidende Rolle.

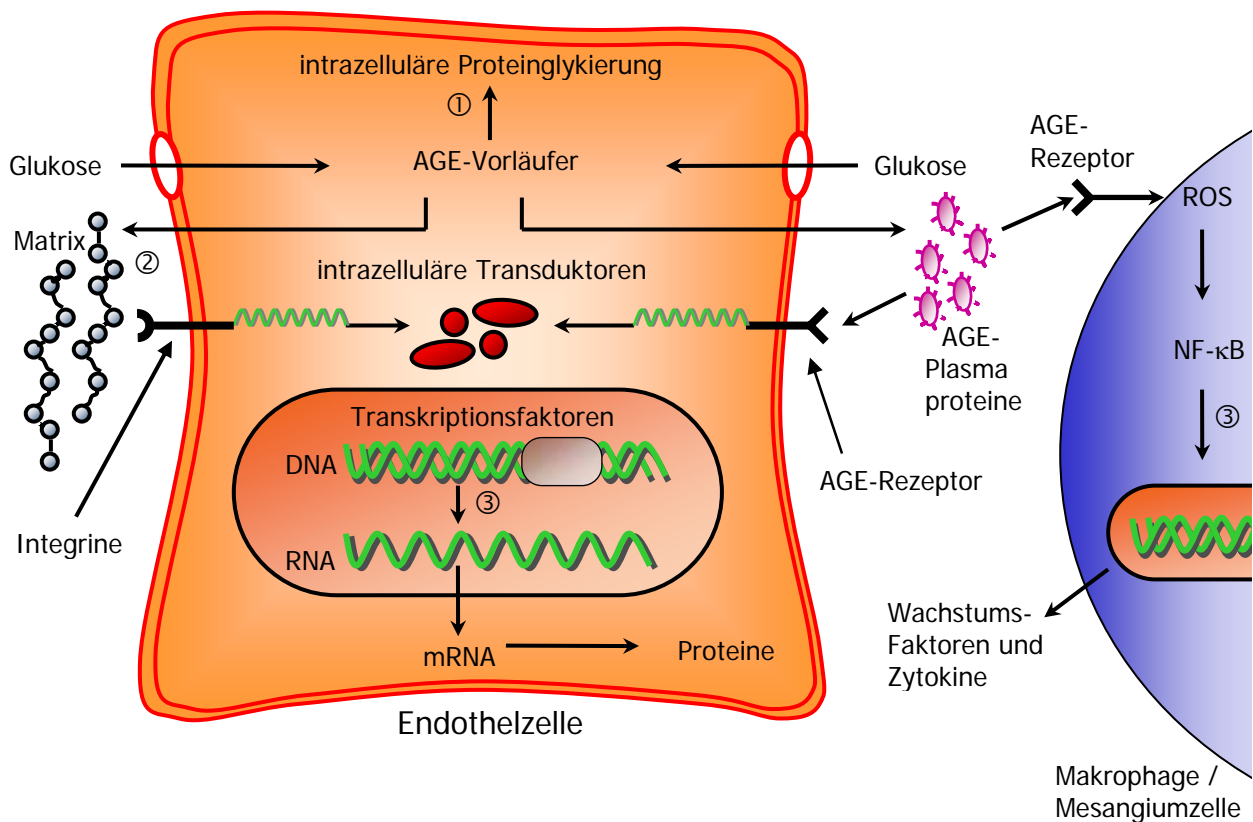


Abbildung 10
 Mechanismen, durch die die intrazelluläre Generierung von Glykierungsfolgeprodukten (AGEs) zellschädigend wirkt. Modifiziert nach Brownlee, M., 2001.

③ AGE-Rezeptor vermittelt pathologische Veränderungen der Genexpression

Als Rezeptor für AGEs auf Oberflächen von Endothelzellen wurde ein aus der Superfamilie der Immunglobuline stammendes Protein identifiziert (Schmidt et al., 1992). Binden AGEs auf diese Weise an Endothelzellen, werden reaktive Sauerstoffradikale (ROS) gebildet. Diese aktivieren den Transkriptionsfaktor NF κ B, ein pleiotroper Regulator vieler Gene, als Antwort auf Zellschädigungen (Yan et al., 1994; Abbildung 10). So wird beispielsweise die Genexpression von Thrombomodulin und Tissue factor verändert, die ihrerseits prokoagulatorischen Einfluss auf die Endothelzelloberfläche haben (Esposito et al., 1989).

Aktivierung der Proteinkinase C

Gesteigerte intrazelluläre Glukolyse führt zur *de novo* Synthese von Diacylglycerol (DAG), das die Proteinkinase C (PKC) organspezifisch aktiviert (Koya, D. und King, G. L., 1998). Hyperglykämie aktiviert die PKC direkt über die Ligation des AGE-Rezeptors und den gesteigerten Aldosereduktase-Weg (Keogh, et al., 1997), wahrscheinlich über vermehrte Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS). Die Folgen der PKC-Aktivierung bei Diabetes haben umfassende Auswirkungen auf zahlreiche zelluläre Funktionen (Brownlee, M., 2001). Der Blutfluss wird über die gegensinnige Regulierung von endothelialer Stickoxydsynthetase (eNOS) und Endothelin-1 verändert, die Gefäßpermeabilität über den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor VEGF gesteigert. Die lokale Hämostase (über PAI-1) und die Produktion der Blutgefäßmatrix (über TGF- β) sind ebenso verändert.

Verstärkter Stoffwechsel über den Hexoseamin-Weg

Der vermehrte Umsatz über den Hexoseamin-Weg bei exzessiv hohen intrazellulären Glukosekonzentrationen wurde ebenfalls mit diabetischen Komplikationen assoziiert. Bei diesem Stoffwechselweg wird Fruktose-6-Phosphat aus der Glykolyse entfernt und in aktive UDP-N-Acetylglukosamine (UDP-GlcNAc) überführt (siehe Abbildung 11, grüner Kasten). Die intrazelluläre Glykosylierung von Transkriptionsfaktoren durch die Übertragung dieser reaktiven N-Acetylglukosamine hat beispielsweise gesteigerte PAI-1- und TGF- β 1-Expression zur Folge (Du et al., 2000, Kolm-Litty et al., 1998).

Mitochondriale Überproduktion von Superoxyd als der zugrundeliegende Mechanismus

Der den vier Wegen hyperglykämieinduzierter Schädigungen zugrunde liegende Mechanismus wurde kürzlich entschlüsselt (Nishikawa et al., 2000). Es handelt sich um die Überproduktion von Peroxydationen durch die mitochondriale Atmungskette. Ab einem bestimmten Schwellenwert des transmembranösen Protonengradienten ist die intrazelluläre Produktion von Peroxydationen deutlich gesteigert (Korshunow et al., 1997). Nishikawa und Mitarbeiter fanden heraus, dass Hyperglykämie den Protonengradienten als eine Folge der Überproduktion von Elektronenspendern aus dem Krebs-Zyklus ($\text{NADH} + \text{H}^+$ und FADH_2) über diesen Schwellenwert hinaus steigert. Dies wiederum ruft eine vermehrte Bildung von Peroxydationen in Endothelzellen hervor, die ihrerseits die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als das Enzym einer gemeinsamen Endstrecke aller vier oben genannten Mechanismen hemmen (Du et al., 2000, Abbildung 11). Es kommt zum einen zu einem Ableiten der Stoffwechselforgänger aus der Glykolyse in die beschriebenen Wege eines Glukoseübermetabolismus, andererseits zu einer Pseudohypoxie aufgrund oxidativen Stresses, da die zellulären Reduktionsäquivalente (reduziertes Gluthation) vermehrt verbraucht werden.

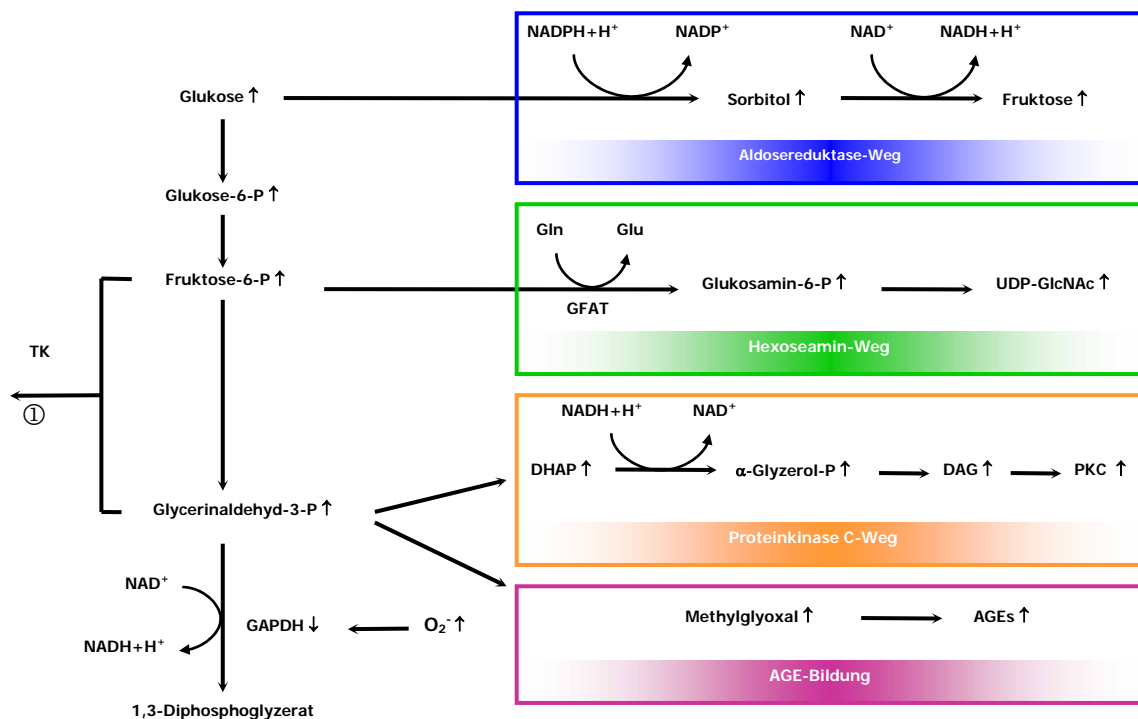


Abbildung 11

Potentieller Mechanismus, durch den hyperglykämieinduzierte mitochondriale Überproduktion von Peroxydationen die vier Wege hyperglykämischer Schädigungen aktiviert. Exzessiv gebildete Peroxydationen hemmen das glykolytische Enzym Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und führen damit zu einer gesteigerten Umsetzung der Prämetaboliten in den Wegen eines Glukoseübermetabolismus. Modifiziert nach Hammes et al., 2003.

Die Bedeutung der Entschlüsselung der Zusammenhänge hyperglykämieinduzierter Gefäßschädigungen wird durch Erfolge in tierexperimentellen Arbeiten belegt. Hammes und Mitarbeiter haben gezeigt, dass das Thiaminderivat Benfotiamin die thiaminabhängige Transketolase (TK), ein Enzym, das Fruktose-6-Phosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat im Pentosephosphatzyklus umsetzt, aktiviert und auf diese Weise zwei zentrale Metaboliten aus der Glykolysekaskade ableitet (Abbildung 11, Stoffwechselweg ①). Auf diese Weise hemmt Benfotiamin die durch Diabetes induzierte Bildung von AGEs, Aktivität von PKC und NF- κ B und den gesteigerten Hexoseamin-Weg. Oral verabreichtes Befotiamin inhibiert experimentelle diabetische Retinopathie von Ratten durch Hemmung der Bildung azellulärer Kapillaren (Hammes et al., 2003).

Oxidativer Stress führt zu mikromorphologischen Veränderungen

Die beschriebenen, streng mit Hyperglykämie assoziierten Reaktionswege Glukoseautooxidation, gesteigerter Aldosereduktase-Weg, Proteinglykierung und Aktivierung der Protein-kinase C-Isoformen führen zu einem Anstieg der Bildung reaktiver Sauerstoffradikale (ROS). Dies weist darauf hin, dass oxidativer Schaden der zentrale Weg von Hyperglykämie zu retinalen Gefäßschädigungen ist (Giugliano et al., 1996). Die pathobiochemische Grundlage der Dysfunktionen von Endothelzellen, Perizyten und anderen Zellen ist vorangehend beschrieben.

Mikromorphologisch ist eine der ersten Läsionen bei Diabetes der Verlust von Perizyten. Perizytenverlust ist charakteristischerweise verbunden mit konsekutiver Induktion von Endothelzellproliferation, sobald beide Zellarten chronisch erhöhter Blutglukose ausgesetzt werden (Ansari et al., 1998; Paget et al., 1998). Hierbei führen mild erhöhte Glukosewerte zunächst zu Perizytenverlust, während Endothelzellen unbeeinflusst bleiben (Hammes et al., 1998). Die Folge des Perizytenuntergangs ist die Entstehung azellulärer Kapillaren in bereits frühen Stadien der Erkrankung.

Über die Ausschüttung vasoaktiver Substanzen wie beispielsweise des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) steigt die Gefäßpermeabilität und es kommt infolge vermehrter Extravasation von Plasmaproteinen und durch AGE-Modifizierung der extrazellulären Matrix zu einer mikroskopisch sichtbaren Verdickung der kapillären Gefäßwand.

Abnormale retinale Blutflussautoregulation

Betrachtet man die makrovaskuläre Pathophysiologie bei diabetischer Retinopathie, gibt es Hinweise, dass die retinale Autoregulationsfähigkeit im Sinne einer Unfähigkeit zur hyperoxischen Vasokonstriktion bei Diabetes gestört ist (Grunwald et al., 1984a). So reduziert beispielsweise die Atmung 100%igen Sauerstoffs den retinalen Blutfluss in normalen Augen um 61%, um 53% in diabetischen Augen ohne Retinopathie, um 38% in Augen mit Hintergrundretinopathie und um nur 24% in Augen mit proliferativer Retinopathie (Grunwald et al., 1984b). Ebenso ist die retinale arteriovenöse Passagezeit bei Atmung 100%igen Sauerstoffs, die unter Hyperoxie bei gesunden Probanden deutlich verlängert ist, bei Diabetes unbeeinflusst (Harris et al., 1996). Dieser Verlust der Autoregulationsfähigkeit als Antwort auf einen erhöhten Sauerstoffpartialdruck lässt vermuten, retinales Gewebe ist bei Diabetes in gesteigertem Maße hypoxisch im Verhältnis zum Erkrankungsgrad (Kohner et al., 1995; Dahl-Jorgensen, K., 1998). Weiterhin könnte es anzeigen, dass die Fähigkeit der Reduktion des retinalen Blutflusses als Reaktion auf ein gesteigertes Sauerstoffangebot mit stärkerer Krankungsausprägung zunehmend gestört ist.

Progredienter Kapillarverlust bei Diabetes

In-vivo-Untersuchungen bezüglich der Kapillardichte und der Blutfließgeschwindigkeit belegen einen Kapillarverlust in der perifovealen Region mit Fortschritt der Erkrankung (Fallon et al., 1986; Rimmer et al., 1989; Sinclair, S. H., 1991). Der perifoveale interkapilläre Bereich und die foveale avaskuläre Zone sind bei Diabetikern deutlich größer als bei nicht diabetischen Patienten (Arend et al., 1994; Arend et al., 1995a). Diese Bereiche sind bei Patienten mit Sehkraftverlust weiterhin vergrößert und deuten auf eine frühe Phase der Erkrankung hin, denn es liegt eine Korrelation zwischen Sehschärfenverlust und verringerter Kapillardichte bereits bei sehr milder Retinopathie vor (Arend et al., 1995b; Arend et al., 1997). Zusammenfassend deutet der derzeitige Kenntnisstand auf eine lokalisierte Photorezeptorschämie, Hypoxie und reduzierte Zellfunktion als Folge der Vergrößerung der fovealen avaskulären Zone und des interkapillären Bereiches hin. Auch eine bei Diabetikern nicht verringerte Blutfließgeschwindigkeit (Arend et al., 1995b) in den verbleibenden perifovealen Kapillaren ist für die adäquate Versorgung der Makula nicht ausreichend, da die Kapillardichte stetig mit dem Erkrankungsfortschritt abnimmt.

Hyperglykämieinduzierte Gefäßveränderungen führen zu lokaler Hypoxie der Netzhaut

Die vorangehend beschriebenen vielschichtigen Mechanismen hyperglykämieinduzierter Blutgefäßveränderungen haben als gemeinsame pathophysiologische Konsequenz die lokale Sauerstoffunterversorgung retinalen Gewebes. Diese induziert den Folgepathomechanismus der unkontrollierten Blutgefäßneubildung.

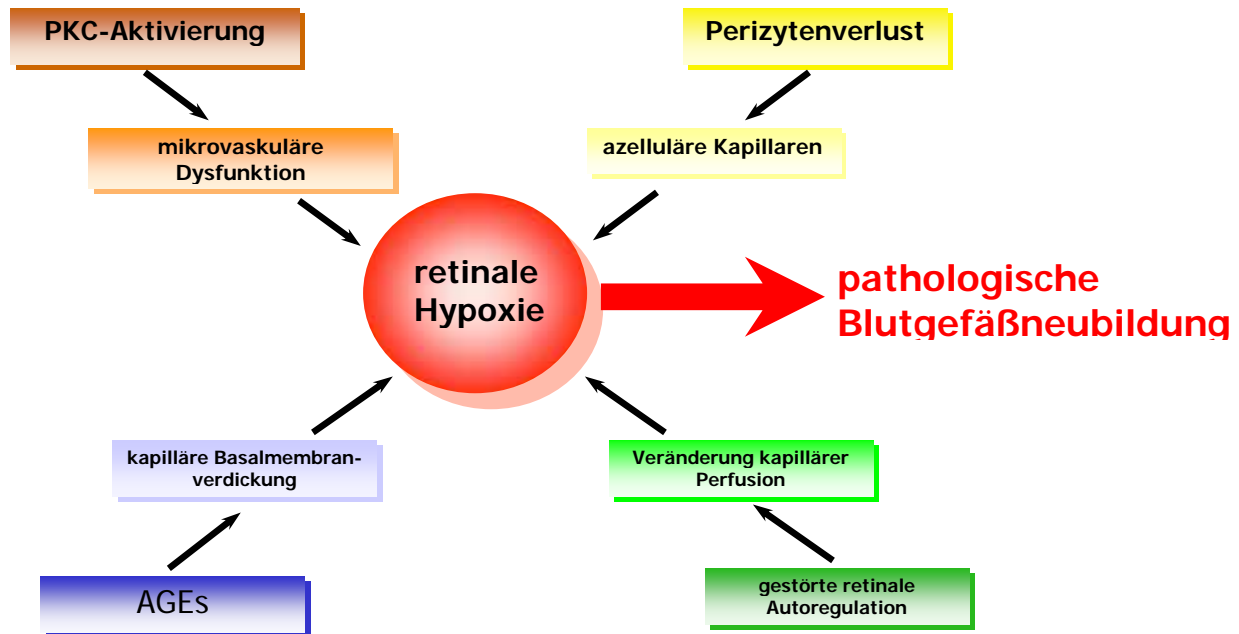


Abbildung 12
Hyperglykämieinduzierte Gefäßveränderungen führen zu lokaler retinaler Ischämie mit der Folge der pathologischen Gefäßneubildung.

1.4.2 Frühgeborenenretinopathie

Während bei diabetischer Retinopathie lokale Ischämien zu Angioproliferationen führen, ist bei der Frühgeborenenretinopathie (retinopathy of prematurity, ROP) eine generalisierte retinale Ischämie die treibende Kraft der Neovaskularisation. Geht man davon aus, dass Angiogenese der Netzhaut überwiegend durch die Hypoxie der zunehmend reifen und aktiven Neurone und Gliazellen geregelt wird, dann ist es verständlich, warum ein Überangebot an Sauerstoff die retinale Vaskularisation bei Frühgeborenen verzögert beziehungsweise zum Stillstand bringt. Dieses Überangebot kommt durch die Umstellung des fetalen Kreislaufes mit einem arteriellen Sauerstoffpartialdruck von weniger als 30 mmHg auf deutlich höhere

Werte nach Geburt zustande, die über 80 mmHg erreichen können, wenn das Frühgeborene zusätzlich mit Sauerstoff beatmet werden muss (Staubach und Lagréze, 2002).

Trotz intensiver Kontrolle und Aufklärung bei der Sauerstoffbeatmung von Frühgeborenen liegt bei Kindern, die ein Geburtsgewicht von unter 1000g haben, die Inzidenz der Frühgeborenenretinopathie bei etwa 70% und 25% entwickeln das ROP-Stadium 3 mit in den Glaskörper einwachsender Neovaskularisation. Nach sechs Jahren liegt die mittlere Sehschärfe der Kinder mit diesem ROP-Stadium nach Laserkoagulation bei 0,5 (Staubach und Lagréze, 2002).

1.5. cRGDfV: ein kleinmolekularer hochaffiner Vitronektin-Rezeptor-Antagonist

Wie bei den Mechanismen der Angiogenese (Kapitel 1.2) beschrieben wurde, enthalten Matrixmoleküle kurze Sequenzen aus den Aminosäuren Arginin, Glycin und Asparagin (RGD), die die Bindungsstelle für zellständige Integrine darstellen. Die für Überleben und räumliche Anordnung von angiogenen Endothelzellen entscheidenden $\alpha_v\beta_3$ - und $\alpha_v\beta_5$ -Integrinrezeptoren vermitteln deren Adhäsion ebenfalls über diese RGD-Bindungsstelle (Cheresh, D. A., 1987).

Im Jahr 1991 wurde ein kleinmolekularer zyklischer Peptidantagonist aus den fünf Aminosäuren Arginin, Glycin, Asparagin, D-Phenylalanin und Valin (cRGDfV) entwickelt (der kleingeschriebene Buchstabe symbolisiert eine D-Aminosäure), der durch Ligation des Integrinrezeptors die Zelladhäsion *in vitro* inhibiert (Aumailly et al., 1991). Das zyklische RGDfV-Peptid blockiert dabei hochaffin und selektiv die Bindungsstelle des $\alpha_v\beta_3$ -Integrins (Aumailly et al., 1991) und des $\alpha_v\beta_5$ -Integrins (Pfaff et al., 1994). Für beide Integrine ist eine für Angiogenese notwendige Wirkung *in vivo* und speziell bei neovaskulären Augenerkrankungen nachgewiesen und die durch sie vermittelte Gefäßneubildung kann *in vivo* sehr effektiv durch Ligation mit cRGDfV gehemmt werden (Friedlander et al., 1995; Hammes et al., 1996b; Friedlander et al., 1996). Hierbei bewirkt die Unterbrechung der Integrin-Matrix-Interaktion das Starten eines Apoptoseprogramms über PI3-Kinase und Akt. Lösliche RGD-Peptide besitzen allerdings eine integrinunabhängige Wirkung, die programmierten Zelltod zur Folge haben kann. Sie blockieren kompetitiv eine Sequenz in der intrazellulären Procaspase 3, einem proapoptotischen Protein, was zu einer Auffaltung dieses Enzyms führt, das seinerseits ein Apoptoseprogramm einleitet (Buckley et al., 1999).

Kürzlich wurde ein neues Modell vorgestellt, in dem unligierte Integrine Apoptose durch direkte Rekrutierung von intrazellulärer Caspase 8 induzieren (Stupack et al., 2001). Liganden aus der extrazellulären Matrix blockieren dieses Apoptosesignal, RGD-Peptidantagonisten allerdings scheinen dies nicht zu tun (Stupack et al., 2001; Cheresh und Stupack, 2002), siehe Abbildung 13.

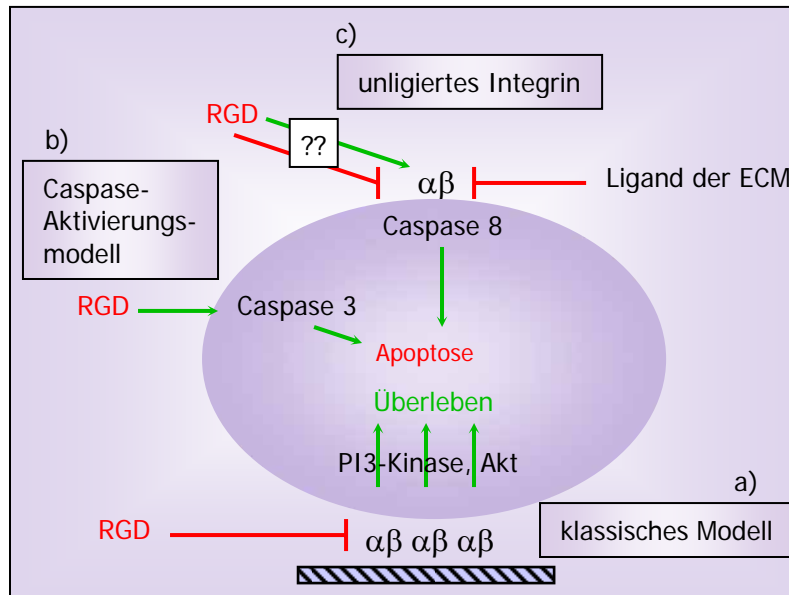


Abbildung 13
Drei Modelle für endotheliale Apoptose.

a) Das klassische Modell, in dem Integrinaktivierung durch Liganden der extrazellulären Matrix ein Überlebenssignal vermittelt. Ligationsinhibitoren (beispielsweise lösliche RGD-Peptide) durchbrechen dieses Signal (Brooks et al., 1994b).

b) Das Caspasemodell, in dem RGD-Peptide direkt Caspase aktivieren und ohne die Beteiligung (positiv oder negativ) von Integrinen Apoptose induzieren (Buckley et al., 1999).

c) Das Modell der unligierten Integrine, oder des "integrinvermittelten Zelltodes" (Stupack et al. 2001, Cheresh und Stupack, 2002) in dem unligierte Integrine direkt Caspase 8 aktivieren. Modifiziert nach Hynes, R. O., 2002.

Da die Integrin-Rezeptoren $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ selektiv von aktivierten, proliferierenden und migrierenden Endothelzellen exprimiert werden und cRGDFV ein hochaffiner und selektiver Vitronectin-Rezeptor-Antagonist ist, limitiert sich dieser adhäsionsinhibierende Effekt nach bisherigen Beobachtungen ausschließlich auf die neue Gefäße bildenden angiogenen Endothelzellen. Präexistierende ruhende Blutgefäße, in denen keine Angiogenese stattfindet, sind davon unbeeinflusst (Brooks et al., 1994b; Friedlander et al., 1995).

Inwieweit die integrinabhängigen Wirkungen zur in Antiangiogenese-Experimenten beobachteten Apoptose beitragen ist derzeit unklar.

Bisherige Studien mit RGD-Peptidantagonisten

Erste *in vivo* Experimente mit dem cRGDFV-Pentapeptid zeigten, dass physiologische retinale Vaskulo- und Angiogenese dramatisch gehemmt werden kann, wenn es neugeborenen Mäusen in den ersten vier Lebenstagen systemisch verabreicht wird (Friedlander et al., 1996). Im Rahmen der bei Nagern erst postnatal stattfindenden retinalen Gefäßentwicklung vollziehen sich Vaskulogenese und Angiogenese in der Mausnetzhaut auch noch nachgeburtlich.

Erste Versuche mit dem kleinmolekularen Pentapeptid bezüglich pathologischer retinaler Angiogenese demonstrierten, dass dieser Vitronektin-Rezeptor-Antagonist retinale Neovaskularisationen bis zu 76 % inhibiert, wenn eine Therapie vor dem Beginn des Angiogeneseprozesses initiiert wird (Primärpräventionsansatz) (Hammes et al., 1996b). Dabei wurde der Peptidantagonist mittels subkutaner Injektion systemisch appliziert.

1.6. Begründung des Tierversuches und des verwendeten Modells

Die Neubildung von Blutgefäßen ist ein komplexer Vorgang, der die Interaktion von Endothel mit dem umgebenden Gewebe voraussetzt. *In vitro*-Systeme, die sich zweidimensionaler Endothelzellkulturen bedienen, sind deshalb zur Charakterisierung intravitale und damit räumlicher angiogener Aktivitäten nur bedingt geeignet. Bei den sogenannten Gelkulturen wird Endothelzellen zwar die Möglichkeit geboten, eine Matrix zu invadieren und Angiogenese unter dreidimensionalen Bedingungen zu vollziehen (Montesano et al., 1983), *in vivo* aber besteht die Endothelzellen umgebende Extrazellulärmatrix aus einer heterogenen Gruppe verschiedener Matrixproteine (Vitronektin, Laminin, Fibronektin, Fibrinogen, von-Willebrand-Faktor). Da diese Heterogenität und die häufig organspezifische Zusammensetzung in *in vitro*-Systemen nur unzureichend nachvollzogen werden kann, Angiogenese aber entscheidend von der Interaktion von Endothelzellen und der umgebenden physiologischen Matrix abhängt, ist die Gefäßneubildung *in vitro* nur bedingt aussagekräftig über die Gesamtheit der Mechanismen innerhalb eines Organismus.

Desweiteren werden in Zellkulturen nur einzelne Zelltypen und ihre Reaktionen betrachtet. Die Neubildung von Blutgefäßen bis hin zum murenen Gefäß beinhaltet ein fein abgestimmtes und genau reguliertes Zusammenspiel mehrerer Zelltypen wie Perizyten und glatten Muskelzellen oder gewebstypische Zellarten wie beispielsweise retinales Pigmentepithel. Von

ihnen werden Rezeptoren exprimiert oder Mediatoren sezerniert, die bei der Initiierung der Angiogenese und auch deren Limitierung eine Rolle spielen. Potentielle redundante Systeme von Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, Adhäsions- und Matrixmolekülen können wie die Interaktion von verschiedenen Rezeptoren oder systemische oder parakrine Einwirkungen auch anderer Zelltypen in *in vitro*-Systemen nicht miteinbezogen werden.

Einem *in vivo*-System kommt insofern eine besondere Bedeutung zu, da es die Gefäßneubildung unter den Bedingungen aller dieser Einflussgrößen betrachtet.

Begründung des Modells der sauerstoffinduzierten Retinopathie der Maus

Für die Studien zur *in vivo*-Angiogenese unter pathologischen Bedingungen diente das Modell der sauerstoffinduzierten Retinopathie der Maus. Es wurde für Studien angioproliferativer Netzhauterkrankungen entwickelt und erwies sich bereits als sehr effektiv bei der Untersuchung der pathophysiologischen Vorgänge dieser Krankheitsentität.

Dieses von Smith und Mitarbeitern etablierte Tiermodell stellt einen einfachen Weg dar, die retinale VEGF-Expression durch Exposition neugeborener Mäuse in 75%ige Hyperoxie für fünf Tage (siehe Kapitel 3.1.1) zu beeinflussen (Smith et al., 1994). Die retinale VEGF-Expression wird vorübergehend supprimiert, was in Wachstumshemmung neuer Blutgefäße und sogar Regression bestehender Gefäße durch selektive Apoptose von Endothelzellen mündet (Alon et al., 1995; Pierce et al., 1996). Nach Rückkehr in Normoxie wird die nunmehr untervaskularisierte Netzhaut hypoxisch. Dies verursacht eine exzessive Ausschüttung von VEGF, was deutliche Angiogenese hervorruft. Die neugebildeten Gefäße allerdings sind hyperpermeabel, neigen zu Hämorrhagien, wachsen in abnormer Weise und haben bedeutende Auswirkungen auf die Netzhaut.

Mit diesem Modell ischämischer Retinopathie simuliert man nicht nur nächstmögliche Analogie zur humanen Frühgeborenenretinopathie (ROP), sondern ahmt ebenfalls entscheidende Aspekte der proliferativen diabetischen Retinopathie nach. Es belegt die potentiell ROP-induzierende Sauerstofftherapie unreifer Frühgeborener sowie die Notwendigkeit einer genauesten VEGF-Regulation.

Das Mausmodell sauerstoffinduzierter Retinopathie

- a) erlaubt es, das gesamte Spektrum vaskulärer Evolution zu beobachten, da sich die bereits gut erforschte physiologische Gefäßentwicklung der Mäusenetzhaut (Connolly et al., 1988) über die ersten zwei postnatalen Wochen erstreckt,
- b) ist verlässlich reproduzierbar,
- c) ist genau quantifizierbar,
- d) ermöglicht es, das Gefäßsystem mittels Fluoreszein-Angiographien zuverlässig darzustellen,
- e) lässt einen therapeutischen Effekt verlässlich analysieren und
- f) simuliert mit dem Entwicklungsstadium retinaler Gefäße der neugeborenen Maus das vier bis fünf Monate alter frühgeborener Kinder (Gestastionsalter).

2. Fragestellung und Zielsetzung der eigenen Studien

Ziel der hier dargestellten Untersuchungen war es, die Dynamik der pathologischen Gefäßneubildung in der Netzhaut anhand der Expression von Wachstumsfaktoren, deren Rezeptoren und ihres Erfolgsproteins zu untersuchen und im besonderen einen Beitrag zur medikamentösen Behandlung einer bereits aktiven proliferativen Retinopathie zu leisten.

Mit Hilfe eines kleinmolekularen Vitronektin-Rezeptor-Antagonisten wurden spezifisch aktivierte, proliferierende und migrierende Blutgefäßendothelzellen in ihrer Adhäsion an der Extrazellulärmatrix gehemmt und so die Gefäßneubildung beeinträchtigt.

Als Modellorganismus für die Untersuchung dieses Krankheitsbildes diente die neugeborene Maus, da sich hier *in vivo* die Induktion von retinalen Gefäßproliferationen (Neovaskularisationen) und deren Inhibitionserfolg zuverlässig erforschen lässt.

Es wurde sich für das Modell der Sauerstoff-induzierten Retinopathie der Maus entschieden (Smith et al., 1994), da mit diesem Modell pathologische Situationen gefäßproliferativer Netzhauterkrankungen wie zum Beispiel der Frühgeborenenretinopathie, der proliferativen diabetischen Retinopathie – es gibt bisher kein *in vivo*-Modell zur Studie der Spätkomplikation der Stoffwechselerkrankung –, der exsudativen Form der altersabhängigen Makuladegeneration oder ischämischer retinaler Venenokklusionen nachgeahmt werden können. Desweiteren hat sich dieser Ansatz bereits als ein reproduzierbares und quantifizierbares Modell retinaler Neovaskularisationen erwiesen.

In einem ersten Teil sollte der Effekt eines systemisch applizierten zyklischen Pentapeptid-antagonisten, bestehend aus den Aminosäuren Arginin, Glycin, Asparagin, D-Phenylalanin und Valin (c-RGDfV), auf einen bereits aktiven Prozess retinaler Neovaskularisationen evaluiert werden. Hierzu wurde die Kinetik präretinaler Gefäße nach Sauerstoffexposition und insbesondere die Effektivität der Therapie in Relation zum Zeitpunkt ihres Beginns untersucht.

Hiermit sollte ein Beitrag zu der Frage geleistet werden, ob bei bereits aktiver Angiogenese eine effektive Sekundärintervention betrieben werden kann. Dieser klinisch relevanten Fragestellung liegt die Tatsache zugrunde, dass Patienten mit proliferativen Augenerkrankungen wie beispielsweise proliferative diabetische Retinopathie (PDR) oder

Frühgeborenenretinopathie (ROP) erst nach langer Krankheitsdauer mit symptomatisch gewordener Ausprägung (Visusminderung) auffällig werden.

Weiterhin wurden potentielle Nebenwirkungen einer solchen Therapie auf Organe wie das Herz, das Angiogenese als Reparationsmechanismus beispielsweise bei ischämischer Herz-erkrankung benötigt, evaluiert.

In einem zweiten Teil der Studie sollte die Wirksamkeit einer topischen Applikation des Wirkstoffs direkt am Auge mittels lokal aufgetragener Augentropfen untersucht werden. Dieser Therapieansatz sollte bis jetzt unbekannte, aber mögliche Nebenwirkungen der systemischen Gabe minimieren und den therapeutischen Effekt angiostatischer Agenzien maximieren.

Des weiteren sollte eine klinisch möglichst einfach durchführbare Langzeit-Applikationsform gefunden werden, da systemische Gaben oder wiederholte intraokuläre Injektionen über einen längeren Zeitraum mit Nebenwirkungen behaftet sein können beziehungsweise nicht durchführbar sind.

3. Material und Methoden

3.1. Modell der sauerstoffinduzierten Retinopathie in der Maus (ROP-Modell)

3.1.1 Versuchsaufbau

Alle Studien an Mäusen wurden in Übereinkunft mit den Richtlinien für die Verwendung von Tieren in ophthalmologischer Forschung der Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) durchgeführt.

Um das Bild einer gefäßproliferativen Retinopathie hervorzurufen, wurde nach dem Modell der Sauerstoff-induzierten Retinopathie in der Maus verfahren (Smith *et al.*, 1994). Neugeborene Mäuse des Stammes C57BL/6 (bezogen von Charles River Wiga Deutschland, Sulzfeld) wurden beginnend am postnatalen Tag P 7 für fünf Tage 75 %iger Hyperoxie ausgesetzt. Zusammen mit ihrer Mutter und ausreichend Nahrung wurden sie über diesen Zeitraum in einem Inkubator (Stuart Scientific, Redhill, UK) gehalten, der es ermöglichte, einen natürlichen zwölfstündigen Licht-Dunkelheit-Rhythmus einzuhalten. Der Inkubator wurde mit einem Heyer-Sauerstoff-System verbunden, das eine Justierung der Sauerstoffkonzentration auf $75 \% \pm 2 \%$ ermöglichte. Die Sauerstoffkonzentration wurde mittels kontinuierlicher Oximetrie mit einem Mini-Ox III Oxygen Monitor, Catalyst Research, Owing Mills, Maryland, USA gemessen. Der Sauerstoff-Zuleitung wurde ein Luftbefeuchtungs-Element (Précise 100, Medicap, Medizintechnik GmbH, Ulrichstein, Deutschland) zur Anfeuchtung des zugeführten Sauerstoffes nachgeschaltet. Während der Hyperoxiephase von fünf Tagen wurde der Inkubator nicht geöffnet. Tiere aus Würfen, die die 2 % Toleranz nicht einhielten, wurden nicht in die Auswertung miteinbezogen. Am Tag P 12 wurde der gesamte Wurf dem Inkubator entnommen und in 20,9 % Sauerstoff enthaltende Raumluft rückgeführt.

Die Hälfte der Tiere eines Wurfes wurde mittels einer nicht toxischen Farbe gekennzeichnet und der Therapie mit dem Pentapeptid zugeordnet, während die verbleibenden unmarkierten Tiere als Kontrollgruppe fungierten.

Am Ende einer Therapie wurden die Tiere gewogen.

3.1.2 Fluoreszenzangiographien

Um das Gefäßsystem sowie Beginn und Verlauf retinaler Neovaskularisationen nach Sauerstoffexposition qualitativ beurteilen zu können, wurden Fluoreszein-Angiographien der Netzhaut zu verschiedenen Zeitpunkten angefertigt: am Tag P11 (letzter Tag der Hyperoxiephase), von Tag P 12 bis P 14 alle 12 Stunden, an den Tagen P 17, P 19, P 22 und P 26 (postexpositionelle Hypoxiephase).

Um den Zeitverlauf der Neovaskularisationen und den Behandlungserfolg einer durchgeführten Therapie qualitativ zu erfassen, wurden jeweils nach Abschluss der Therapie Fluoreszein-Angiographien hergestellt.

Hierzu wurden die jungen Mäuse mit Äther tief narkotisiert und 1 ml einer 50 mg 2×10^6 kD Fluoreszein-Dextran (Sigma) enthaltenden Phosphat-gepufferten Kochsalzlösung (PBS) durch linksventrikuläre intrakardiale Injektion perfundiert. Jeweils das rechte Auge wurde nach Enukleation in 4 %-iger Paraformaldehyd-Lösung (PFA) für mindestens drei Stunden fixiert. Das fixierte Auge wurde auf Höhe der vermuteten Ora serrata zirkulär eröffnet und Linse und Glaskörper entfernt. Die Netzhaut wurde vorsichtig durch zirkulär fortschreitende Ablösung von Sklera und Chorioidea isoliert. Es wurde möglichst viel retinales Pigmentepithel von der Netzhaut entfernt. Anschließend wurde die isolierte Retina durch vier zentral gerichtete Einschnitte auf einem Objektträger flach ausgebreitet und in Kayser`s Glycerol-Gelatine (Sigma, Deisenhofen) unter einem Deckgläschen eingebettet. Die Netzhaut wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop (Olympus BH-2, Hamburg, Deutschland, Exzitationsfrequenz 485 nm) bei zweifacher Vergrößerung betrachtet und fotodokumentiert.

3.1.3 Quantifizierung der proliferativen Retinopathie

Um die Reaktion auf Hyperoxie sowie den Behandlungserfolg quantitativ zu analysieren, wurde jeweils das linke Auge eines Tieres vor der Perfusion mit HMW-FITC-Dextran enukleiert, mindestens 24 Stunden in 4 %-iger Paraformaldehyd-Lösung fixiert und anschließend nach einem modifizierten Standardprotokoll wie nachfolgend aufgelistet in Paraffin eingebettet.

Werkstoff	Bemerkung
80% Ethanol	1 Stunde
96% Ethanol	1 Stunde
99,6% Ethanol	1 Stunde
n-Butylacetat-Lösung I	ein Teil n-Butylacetat, zwei Teile 99%iges Ethanol, 1 Stunde
n-Butylacetat-Lösung II	zwei Teile n-Butylacetat, ein Teil 99%iges Ethanol, 1 Stunde
n-Butylacetat-Lösung III	reines n-Butylacetat, 2 x 30 Minuten
Paraplast I	über Nacht bei 100°C
Paraplast II	3 Stunden bei 100°C

Anschließend erfolgte die Paraffineinbettung in Paraplast-Gewebe-Einbettungsmittel (Medim-Plast, Medim-Histotechnologie GmbH, Gießen). Die Augen wurden mit horizontal verlaufender Linsen-Nerv-Achse eingebettet, so dass das anschließende Schneiden am Mikrotom axiale Schnitte ergab. Es wurde nicht nach nasal und temporal orientiert, da nicht veröffentlichte Daten keinen Unterschied der Neovaskularisationen einzelner Quadranten zeigten. Die 6 µm dicken Folgeschnitte wurden nach einem modifizierten Standardprotokoll mit Hämatoxylin-Eosin wie folgt gefärbt.

Werkstoff	Bemerkung
Rothihistol	zwei mal 5 Minuten (Carl Roth GmbH, Karlsruhe; Xylol-Ersatz)
99,9% Ethanol	zwei Minuten
96% Ethanol	zwei Minuten
80% Ethanol	zwei Minuten
70% Ethanol	zwei Minuten
50% Ethanol	zwei Minuten
aqua dest.	kurzes Abspülen
Mayer´s Hämalaun	5 Minuten (Mayer´s Hämalaun-Lösung, Merck AG, Darmstadt)
warmes Wasser	10 Minuten Bläuen
aqua dest.	kurzes Abspülen
Eosin	4 Minuten
50% Ethanol	zwei Minuten
70% Ethanol	zwei Minuten
80% Ethanol	zwei Minuten
96% Ethanol	zwei Minuten

99,9% Ethanol	zwei Minuten
Rothihistol	zwei mal 5 Minuten
Depex	Eindecken der Schnitte unter einem Deckglas (Depex-Einschlußmittel, BDH Laboratory Supplies, Poole, BH15 1TD, England)

Ein Auge ergab zwischen 150 und 200 Schnitte. Pro Auge wurden 15 Schnitte, acht auf der einen Seite der Sehnervmündung, sieben auf der anderen Seite ausgewertet, wobei jeder dritte Serienschnitt gewählt wurde. Auf diese Weise wurde ein Netzhautausschnitt von 126 + 144 μm in jeweils 18 μm Intervallen abgedeckt. Die so gewählten Schnitte beinhalteten etwa gleiche Länge der quer getroffenen Netzhaut (im 10 % Intervall der durchschnittlichen Netzhautlänge) und zeigten so einen repräsentativen Ausschnitt der Retina. Schnitte, die den Sehnerv darstellten, wurden nicht in die Auswertung miteinbezogen, da physiologische Blutgefäße, die vom Sehnerv ausstrahlen, zwar von Neovaskularisationen unterscheidbar sind, die Zählkriterien aber erfüllen und so den Fehler erhöhen. Als Parameter präretinaler Neovaskularisationen wurden die Zellkerne von Endothelzellen neu entstandener Gefäße auf der vitrealen Seite der membrana limitans interna gezählt. Die Schnitte wurden bei einer Vergrößerung von 400 X und in Unkenntnis der Präparatidentität ausgewertet. Sämtliche Ergebnisse wurden anhand der Mittelwerte und deren Standardabweichung (SEM) sowie Varianz mit dem Student's t-Test für unverbundene Stichproben (GraphPad, InStat, San Diego, CA, USA) analysiert.

Um den Verlauf der Angiogenese in dem verwendeten Hypoxiemodell zu untersuchen, wurden Augen an verschiedenen Zeitpunkten nach Sauerstoffexposition ausgewertet. Als Zeitpunkte wurden die Tage P 12, 14, 17, 19, 22 und 28 gewählt.

Pro Zeitpunkt wurden Schnitte der Augen von mindestens zehn Tieren ausgezählt.

3.2 Proteinbiochemische Analysen der Retina

Zur weiterführenden Untersuchung der molekularen Mechanismen der Angiogenese im Verlauf dieses hypoxiegetriebenen Modells wurde die Expression zweier Wachstumsfaktoren und dem αv -Integrin im Verlauf der postexpositionellen Hypoxiephase betrachtet. Dafür wurde das Verfahren der Western-Blot-Analyse gewählt.

Mit dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) und dem basischen Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF-2) wurden zwei angiogene Wachstumsfaktoren ausgewählt, für die auch in diesem Modell eine entscheidende Bedeutung nachgewiesen wurde.

Um die Expression der genannten Induktor- und Effektormoleküle als Funktion der postexpositionellen Zeit aufzuschlüsseln, wurden diverse Zeitpunkte im Verlauf des Hypoxiemodells gewählt, an denen die Proteine semiquantitativ analysiert wurden:

- Tag P 11 (letzter Tag der Hyperoxiephase)
- unmittelbar nach Entnahme aus dem Sauerstoff (P 12 + 0 Stunden)
- sechs Stunden danach (P12 + 6 Stunden)
- zwölf Stunden später (P 12 + 18 Stunden)
- an den Tagen P 13, 14, 15, 17 und 26

Protokoll zur Probenaufbereitung und Proteinextraktion

<u>Werkstoff</u>	<u>Bemerkung</u>
250 µl sample buffer	Suspendieren von je vier isolierten Netzhäuten, Mazeration durch fünf Ultraschallimpulse, bei 10.000 U / min 10 Minuten Zentrifugieren, Versetzen des Überstandes mit
β-Mercaptoethanol	(Bio-Rad Laboratories GmbH, München), Bromphenolblau im Verhältnis mit je einem Teil Farbstoff auf 18 Teile Probenüberstand (5 % β-Mercaptoethanol und 5 % Bromphenolblau auf 90 % Probe).
Wasserbad	fünfmütiges Kochen zur Denaturierung Zentrifugieren, um Kondenswasser rückzuführen, auf Eis stellen

Zur anschließenden Gel-Elektrophorese wurde jede Probetasche eines Gels (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) mit jeweils 7,5 µl Probe bei einer Proteinkonzentration von 2,5 µg / µl beziehungsweise mit 5 µl eines Vergleichsmarkers (wide range, Sigma, Deisenhofen) beschickt. Der Marker wurde vor Beschickung des Gels nach Anweisung des Herstellers vorbereitet. Die innere Kammer des Gel-Elektrophorese-Apparates (Sigma, Deisenhofen) sowie die Wanne wurde mit running buffer (s.u.) gefüllt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte über 1,6 Stunden bei angelegter Gleichspannung von 80 Volt (63mA).

Im anschließenden der Übertragung des Proteins auf eine Immobililan-P-Membran (Milipore) dienenden Elektrobplot-Verfahren wurden das Gel 15 Minuten in Transfer-Puffer (s.u.)

äquibriert, kurz in Methanol eingelegt, fünf Minuten in destilliertem Wasser und zehn Minuten in Transfer-Puffer gewaschen. Auf das gewaschene Gel wurde unter Vermeidung von Lufteinschluß die Immobilan-P-Membran gelegt und beides zwischen beidseits vier Lagen großzügig mit Transfer-Puffer getränkten Whatman-Filterpapiers (Nr. 1003917, Whatman International Ltd., Maidstone, England) zwischen Anoden- und Kathodenplatte einer Blotting-Bank (Sigma, Deisenhofen) eingeschlossen. In dieser Anordnung wurden die aufgetrennten Proteine unter vier Kilogramm Beschwerung durch einstündiges Anlegen von 126 mA pro Gel (80 Volt) vom Gel auf die Membran übertragen. Die Membran wurde nach Entnahme 5 Sekunden in Methanol eingelegt, 15 Minuten in destilliertem Wasser und fünf Minuten in 0,1 % Tween-PBS-Lösung (phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung) gewaschen. Danach wurde sie 30 Minuten in 5% fettfreier Milch (Reformhaus) in PBS geblockt und erneut einmal zehn Minuten und zweimal fünf Minuten in PBS-Tween gewaschen. Jetzt wurde der Primärantikörper in der Konzentration 0,1 µg / ml in PBS für eine Stunde auf die Membran gegeben und diese anschließend zum Reaktionsstop wieder einmal zehn und zweimal fünf Minuten in PBS-Tween gewaschen. Zur Detektion des Primärantikörpers beziehungsweise des Markers wurde nun eine Stunde mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (s.u.) inkubiert. Der Sekundärantikörper zur Identifizierung des Primärantikörpers wurde im Verhältnis 1:200 und der Sekundärantikörper gegen den Marker im Verhältnis 1:300 verdünnt. Zum Reaktionsstop wurde abermals einmal zehn und zweimal fünf Minuten mit PBS-Tween gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit dem ECL-System (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) nach Herstelleranleitung einminütig inkubiert. Die Membran wurde nach Ablauf der ECL-Lösung in Frischhaltefolie eingeschlagen und zur Analyse mittels Schwärzung eines Röntgenfilms (DuPont, Vaihingen) mit einer Expositionszeit von zwei Minuten geröntgt. Zu semiquantitativen Vergleichszwecken wurden die Signalintensitäten mit dem CUE-2 Bildanalyseprogramm (Olympus) bestimmt und in arbitrary units (AU, Grauintensitäten in Relation zu einem bestimmten Grauwert) angegeben.

Aufstellung der zum Western-Blot-Verfahren verwendeten Substanzen:

Primärantikörper:

anti- α_v -Antikörper RMV 7	polyklonal aus Hase gegen Maus, Dr. Beat Imhof, Genf (Imhof et al., 1997)
anti-VEGF-Antikörper	polyklonal aus Hase gegen Maus, Santa Cruz, Ismaning
anti-FGF-2-Antikörper	polyklonal aus Hase gegen Maus, Santa Cruz Biotechnology Ismaning

Sekundärantikörper:

anti-Maus-POD-Antikörper	monoklonal zur Detektion des Primärantikörpers, DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg
horseradish-peroxidase-POD	polyklonaler Antikörper zur Detektion der Markerbanden, gegen Hase, DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg

sonstige Substanzen:

Sample buffer	475 μ l destilliertes Wasser, 125 μ l 0,5 molarer Tris Puffer (Sigma, Deisenhofen) (pH 6,8), 100 μ l Glycerol (Merck, Darmstadt), 200 μ l 10 %iges SDS, (Sigma, Deisenhofen)
verwendete Gele	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Running buffer	3 g Tris-base, 14,4 g Glycin (Merck, Darmstadt), 1 g SDS, (Sigma, Deisenhofen), 1 Liter destilliertes Wasser
Transfer-Puffer	2,9 g Glycin, 5,8 g Tris-base, 0,37 g SDS, (Sigma, Deisenhofen) 200 ml Methanol (Merck, Darmstadt), 1 Liter destilliertes Wasser
PBS-Tween	0,1 % Tween 20 in PBS, Merck KGaA, Darmstadt
Elektrophoresekammer	Sigma, Deisenhofen

3.3 Protokoll der Sekundärinterventionsansätze

Nachdem die Kinetik der präretinalen Neovaskularisationen nach Sauerstoffexposition histologisch untersucht worden war (siehe Kapitel 4.1.2), wurden dementsprechend zum Sekundärinterventionsansatz zwei Zeitpunkte des Therapiebeginns festgelegt.

Nach dem Protokoll des Mausmodells für sauerstoffinduzierte Retinopathie (wie unter 3.1.1 beschrieben) mit Hyperoxie behandelte Mäuse wurden in einem Sekundärinterventionsansatz I vom Tag P 14 bis Tag P 19 einer zwei Tage nach Rückkehr in Normoxie einsetzenden Therapie zugeführt. Diese Behandlung sah eine zweimal pro Tag subkutan verabreichte Dosierung des zyklischen Vitronektin-Rezeptorantagonisten (cRGDfV-Peptid, Bachem Biochemica GmbH, Heidelberg) von 10, 20, 50 und 100 µg vor. Diese Dosierungen entsprechen bei einem idealisierten durchschnittlichen Körpergewicht einer 14 Tage alten Maus von 5 Gramm einer Tagesmenge von 2 x 2, 4, 10 und 20 mg / kg Körpergewicht. Das zyklische RGDfV-Peptid wurde in einem Applikationsvolumen von jeweils 50 µl physiologischer Kochsalzlösung in den entsprechenden Mengen gelöst. In vorher durchgeführten Studien (Hammes et al., 1996b) wurde gezeigt, dass ein zyklisches RADfV-Kontrollpeptid keinen adhäsions- oder angiogenesehemmenden Effekt hat und sich wie physiologische Kochsalzlösung verhält. Dementsprechend wurde jeweils die Hälfte der Tiere eines Wurfes mit dem RGD-Peptid behandelt, die übrige Hälfte wurde als Kontrollgruppe mit physiologischer Kochsalzlösung scheinbehandelt.

Am Tag P 19 wurden die Tiere nach fünftägiger Therapie in tiefer Narkose geopfert und wie beschrieben (3.1.2, 3.1.3) ausgewertet (Abbildung 14).

In einem Sekundärinterventionsansatz II wurde dieselbe Therapie um weitere drei Tage verzögert, so dass sie erst fünf Tage nach Rückkehr in Raumluft an Tag P 17 einsetzte. Diese Behandlung wurde ebenfalls fünf Tage durchgeführt. Am Tag P 22 wurden die Tiere wie beschrieben geopfert und ausgewertet (Abbildung 14).

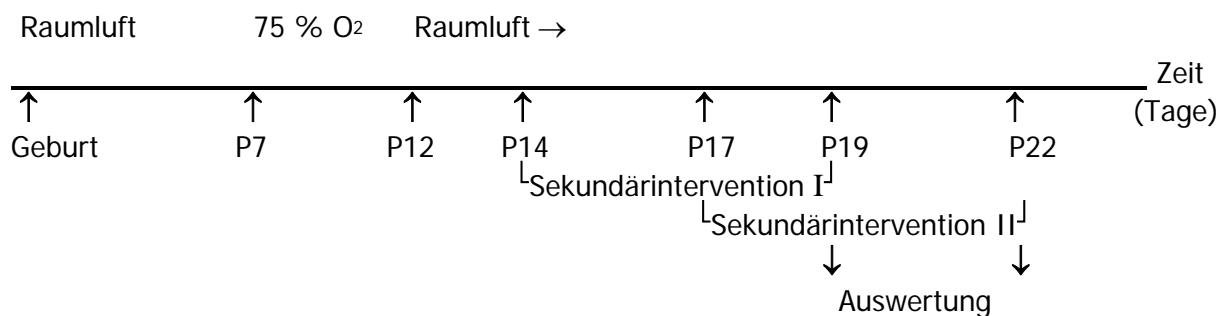


Abbildung 14 Zeitleiste der Sekundärinterventionsansätze I und II

3.4 Protokoll der Lokalthherapie

3.4.1 Rezeptur der Augentropfen

Eine eigens für das zyklische Pentapeptid entwickelte Augentropfenlösung als Transportmedium wurde nach einem Protokoll von Fr. Dr. Kreiner, München, hergestellt (KreCo, Kreiner Consulting Gesellschaft für wissenschaftlich-technisches Projektmanagement mbH, München). Diese Augentropfen weisen ihr zufolge eine sehr gute Korneagängigkeit auf.

Wäßrige Augentropfen auf Hydroxyethylzellulose-Basis

Benzalkoniumchlorid	0,010 g
Editinsäure, Dinatriumsalz · 2 H ₂ O	0,015 g
Natriumdisulfit	0,075 g
Mannit	2,000 g
Natriumchlorid	0,450 g
Hydroxyethylzellulose	0,900 g
Aqua ad injectabilia	100 ml

Nach Zubereitung der Augentropfenlösung wurde diese durch ein 20 µm Faserfilter filtriert. Die Augentropfen wurden direkt vor Beginn einer jeden Therapie frisch angefertigt. Für die Behandlungsgruppe wurde die Lösung mit der entsprechenden Konzentration des Peptids versetzt, die scheinbehandelten Kontrolltiere erhielten die Transportlösung ohne Wirkstoff.

3.4.2 *in vitro*-Adhäsions-Assay

Der anti-adhäsive Effekt des verwendeten cRGDfV-Peptids auf $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Rezeptor-tragende Zellen wurde in einem Adhäsions-Assay in früheren Studien dargelegt (Hammes et al., 1996b). Zur Klärung der Frage, ob sich die anti-adhäsiven Fähigkeiten des Wirkstoffs in der oben (3.4.1) beschriebenen Augentropfenlösung veränderten, wurde ein Adhäsions-Assay mit dem zyklischen RGDfV-Peptid in dieser Transportlösung durchgeführt. Hierzu wurde die Adhäsionsinhibition von humanen Fibroblasten der Zellreihe HEP 2, die den $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Rezeptor exprimieren, auf Vitronektin durch cRGDfV in Augentropfenlösung konzentrationsabhängig untersucht und mit dem Effekt der reinen Augentropfenlösung ohne Wirkstoff verglichen.

Hierbei wurde nach demselben Protokoll für Adhäsions-Assays verfahren, wie es in früheren Studien zu dem Peptid verwendet wurde (Hammes et al., 1996; Germer et al., 1998). Entlang einer Konzentrationsreihe wurden jeweils drei wells mit 50 μ l coating buffer (s.u.) beziehungsweise Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) beschichtet. Diese wurden eine Stunde lang bei 37°C inkubiert und anschließend mit 200 μ l PBS pro well gewaschen. Nach dem Blocken mit je 200 μ l 3 %-igem bovinen Serum-Albumin (BSA) in PBS wurden sie über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach erfolgte zweimaliges Waschen mit je 200 μ l PBS. Jedes well wurde mit 50.000 HEP 2 Fibroblastenzellen in 50 μ l Adhäsionsmedium (s.u.) beschickt. Zusätzlich wurde cRGDfV-Peptid in einer Konzentrationsreihe von 10 ng bis 10 μ g / ml beziehungsweise die reine Augentropfenlösung in den entsprechenden Verdünnungen zugegeben. Anschließend wurde für 3 - 4 Stunden bei 37°C inkubiert, bis die Zellen adhären waren. Nach zweimaligem Waschen mit 200 μ l PBS bei Raumtemperatur wurden die adhären Zellen mit 50 μ l Adhäsionssubstrat (s.u.) pro well 3 - 4 Stunden bei 37°C erneut inkubiert. Diese Reaktion wurde gestoppt durch Hinzugabe von 25 μ l Stop-Reagenz (s.u.) je well. Die Emission wurde bei 485 nm gemessen (Fluoreszenz-ELISA-Lesegerät, SLT Instruments, Crailsheim).

Aufstellung der verwendeten Reagenzien

coating buffer:	15 mM Na ₂ CO ₃ ; 35 mM NaHCO ₃ (pH 9,6)
PBS:	8g NaCl, 1,49 g Na ₂ HPO ₄ , 0,2g KCl, 0,2 KH ₂ PO ₄ (pH 7,4)
BSA:	Sigma, Deisenhofen
Adhäsionsmedium:	500 ml RPMI serumfrei, 5 ml Natriumpyruvat-Glutamin, Penicillin, Streptomycin, 50 ml 3 %-iges BSA in PBS (steril)
Adhäsionssubstrat:	50 mM Natriumcitrat (pH 5) mit 0,25% Triton-X-100; 3,75 mM p-Nitrophenyl-N-acetyl-(-D-glucosamid) (Sigma, Deisenhofen)
Stop-Reagenz:	50 mM Glycin / 5 mM EDTA (pH 10,4)

3.4.3 Versuche zur Penetrationsfähigkeit des RGD-Peptids: Permeations-Assay

Zur Fragestellung, ob das epikorneal aufgetropfte RGD-Peptid die Netzhaut erreicht, wurde ein in vivo-Permeationsassay entwickelt. C57Bl6-Mäuse wurden nach dem oben beschriebenen (3.1.1) Protokoll für sauerstoffinduzierte Retinopathie behandelt. Am Tag P12 direkt nach Entnahme aus der Hyperoxie wurden 20 Tiere gleichmäßig auf fünf Gruppen verteilt und entsprechend behandelt.

Eine erste Gruppe (AT 50) erhielt durch stündliche epikorneale Applikation zehnmal 5 µg Fluoreszein-Isothiocyanat- (FITC) markiertes RGDfV-Peptid in Augentropfen-Lösung.

Eine zweite Gruppe (s.c. 50) wurde mit einer Gesamtmenge von ebenfalls 50 µg FITC-RGD behandelt, diese wurde jedoch zeitgleich mit der letzten Applikation in der Gruppe AT 50 als Bolus subkutan verabreicht.

Eine dritte Gruppe (AT 25) wurde zweistündlich durch insgesamt fünfmalige epikorneale Verabreichung von je 5 µg FITC-RGD-Peptid in Augentropfenlösung zu jeweils jeder zweiten Verabreichung in der AT 50-Gruppe versorgt.

In einer vierten Gruppe (s.c. 25) wurde mit einer einmaligen subkutanen Injektion von 25 µg FITC-markiertem RGD-Peptid in 50 µl physiologischer NaCl-Lösung zeitgleich der letzten Verabreichung in den AT-Gruppen behandelt (Abbildung 15).

Eine fünfte Gruppe (Kontrollgruppe) wurde mit 50 µl subkutan gespritzter physiologischer Kochsalzlösung je Tier zum Zeitpunkt der letzten Injektion der s.c.-Gruppen scheinbehandelt.

Zeit vor
E nukleation
/ h

10	5 µg e.a.					e.a. = epikorneal aufgetropft
9	5 µg e.a.		5 µg e.a.			s.c. = subkutan gespritzt
8	5 µg e.a.					
7	5 µg e.a.		5 µg e.a.			
6	5 µg e.a.					
5	5 µg e.a.		5 µg e.a.			
4	5 µg e.a.					
3	5 µg e.a.		5 µg e.a.			
2	5 µg e.a.					
1	5 µg e.a.	50 µg s.c.	5 µg e.a.	25 µg s.c.	50 µl NaCl s.c.	
0						
Gruppe:	50 AT	50 s.c.	25 AT	25.s.c	NaCl-Kontrolle	

Abbildung 15, Protokoll der Verabreichung von Fluoreszein-Isothiocyanat-markiertem cRGDfV-Peptid im Rahmen des Permeations-Assays

Zum Zeitpunkt $t = 0$ erfolgte bei allen Tieren die E nukleation der Augen und deren Auswertung.

Jeweils eine Stunde nach der letzten Applikation (subkutan oder epikorneal) wurden die Augen der Tiere enukleiert und dreimalig für je fünf Minuten in Phosphat-gepufferter physiologischer Kochsalzlösung (PBS) gewaschen. Anschließend wurden die Augen für zehn Minuten in 4 %iger Paraformaldehyd-Lösung (PFA) kurzfixiert und die Netzhaut wie oben beschrieben (3.1.2) isoliert. Die jeweils acht Retinae der fünf verschiedenen Gruppen wurden "gepoolt" und unter Kühlung in Eiswasser mittels Ultraschall mazeriert. Die Proben wurden zur Trennung von eventuell vorhandenen retinalen Pigmentepithelanteilen drei Minuten bei 2.000 G zentrifugiert und der klare Überstand wurde zur Messung in jeweils eine Vertiefung einer 96 well-Platte pipettiert. Das Probenvolumen wurde mit jeweils 100 µl Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung diluiert. Anschließend wurde die Emission bei einer Wellenlänge von 538 nm bei einer Exzitationsfrequenz von 485 nm in einem Fluoreszenz-ELISA-Lesegerät (SLT Instruments, Crailsheim) gemessen und mit den Werten einer Konzentrationsreihe von 300 pg bis 10 µg / ml FITC-RGD in PBS verglichen. Kontrollmessungen wurden für die verwendeten Substanzen physiologische Kochsalzlösung, Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung, 4 %ige Paraformaldehyd-Lösung und Augentropfenlösung durchgeführt. Der gesamte Versuch zur Permeation des RGD-Peptids wurde in derselben Weise erneut durchgeführt.

3.4.4 Protokoll des Augentropfen-Therapieansatzes

In diesem zweiten Therapieansatz sollte die Wirksamkeit einer topischen Applikation des Wirkstoffs direkt am Auge mittels epikorneal aufgetragener Augentropfen untersucht werden. Dazu wurde das Protokoll der verzögert einsetzenden Therapie im Sekundärinterventionsansatz (3.4) modifiziert. Es wurde das Protokoll eines Primärpräventionsansatzes in diesem Modell verwendet (Hammes et al., 1996b). Hierzu wurden C57Bl6-Mäuse, die entsprechend des Protokolls für sauerstoffinduzierte Retinopathie einer Hyperoxiephase (3.1.1) exponiert wurden, eingesetzt. Diesmal allerdings wurden sie sofort nach der Rückkehr in Normoxie am Tag P 12 beginnend fünf Tage lang behandelt (Abbildung 16).

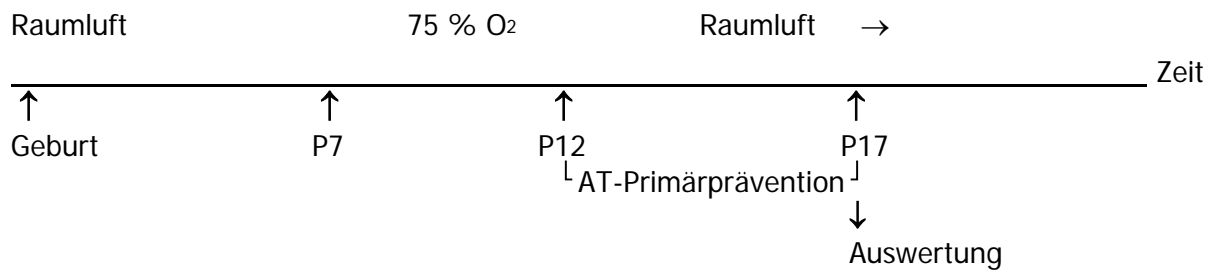


Abbildung 16 Zeitleiste des Augentropfen-Therapieansatzes als Primärprävention

Da die Augenlider zwölf Tage alter Mäuse noch nicht spontan geöffnet sind, mussten sie durch nicht traumatisierende stumpfe Trennung, manchmal nur durch vorsichtigen simultanen Zug an Ober- und Unterlid, vollständig voneinander separiert werden, um fortan die Augentropfenlösung adäquat aufzutropfen zu können. Zu Beginn einer jeden Therapie wurde die Augentropfenlösung frisch hergestellt und filtriert. Jeweils die Hälfte der Tiere eines Wurfes wurde mit der mit dem Peptid-Antagonisten versetzten Augentropfenlösung behandelt und entsprechend markiert, die übrige Hälfte wurde als Kontrollgruppe mit reiner Augentropfenlösung scheinbehandelt. Zum Verabreichen der Augentropfen wurden 10 µl fassende Eppendorf-Pipetten verwendet, mit Hilfe derer die Tropfen ohne direkten Kontakt zum Auge aufgebracht wurden. Die Spitzen der Pipetten wurden nach jeder Applikation gegen neue sterile Spitzen ausgetauscht. Die Häufigkeit der Verabreichung wurde durch das maximale Volumen, das ein Auge zwölf Tage alter Mäuse zuverlässig aufzunehmen vermochte, bestimmt. Das Applikationsvolumen wurde auf 2,5 µl pro Auge festgelegt. Um wirksame Dosierungen an der Netzhaut zu erzielen, wurde bei einer maximalen Menge von 2 µg RGD-Peptid in 1 µl Augentropfenlösung die Applikationsfrequenz auf sechs mal pro Tag festgesetzt. Im Rahmen dieser Vorgaben wurde der Augentropfen-Therapieansatz konzentrationsabhängig mit drei Dosierungen, 6 x 2µg, 4µg und 10 µg RGD-Peptid entsprechend einer Gesamtdosis von 12, 24 und 60 µg pro Tag untersucht. Am Tag P 17 wurden die Tiere nach fünftägiger Therapie in tiefer Narkose geopfert und wie beschrieben (3.1.2, 3.1.3) ausgewertet.

3.5 Evaluation von Nebenwirkungen

Die Untersuchung der Auswirkungen des RGDfV-Peptidantagonisten auf intraretinale Blutgefäße sowie neuroretinale Elemente wie Ganglionzellen oder Zellen der inneren Körnerschicht der heranwachsenden Maus belegte, dass auch bei Höchstdosis von 200 µg / d keine unerwünschten Nebenwirkungen auftraten (Hammes et al., 1996a).

In der vorliegenden Studie wurden die Tiere anhand von Inspektion, Körpergewicht, Körpergewichtszunahme und durch histologische Betrachtung einiger Organe (Herz, Niere, Netzhaut) auf Nebenwirkungen untersucht. Im Speziellen wurde die Gesamtquerschnittsfläche der vorhandenen Blutgefäße in histologischen Querschnitten von Herz und Niere analysiert und verglichen. Hierzu wurden die Blutgefäße FITC-perfundierter Organe unter Wahrung korrespondierender Felder in 6 µm dicken histologischen Schnitten mittels Epifluoreszenz dargestellt und mit einem Bildanalyseprogramm mit unbehandelten Tieren verglichen (FITC-Filterkombination, Olympus Blt-2 CCD-Kamera, CUE-2-Bildanalyseprogramm, Olympus). Die Bildaufnahme und Speicherung im Computer erfolgte bei 25facher Vergrößerung. Die Auswertung der Kapillardichte im Herz wurde in 25 Präparaten von je zehn Tieren vorgenommen. In den Nieren wurden die Anzahl und die Gesamtfläche der Glomerula pro Gesichtsfeld in 25 Feldern von je zehn Tieren bestimmt.

4. Ergebnisse

4.1 Modell der sauerstoffinduzierten Retinopathie der Maus (ROP-Modell)

4.1.1 Angiographien nicht sauerstoff-exponierter Kontrolltiere

Mittels Perfusion der Netzhäute mit Fluoreszein-Isothiocyant-Dextran und anschließender Anregung im Fluoreszenz-Mikroskop ließen sich sowohl das retinale Gefäßsystem als auch neovaskuläre Gefäße darstellen und beurteilen. Bei der Größe des fluoreszierenden Moleküls wurden keine Extravasationen beobachtet. Die Angiographie einer nicht exponierten 17 Tage alten Maus als Normalkontrolle (Abbildung 17) zeigt ein regelrecht verzweigtes Gefäßnetzwerk ohne hypovaskularisierte Bereiche oder abnorme Gefäßdilataationen.

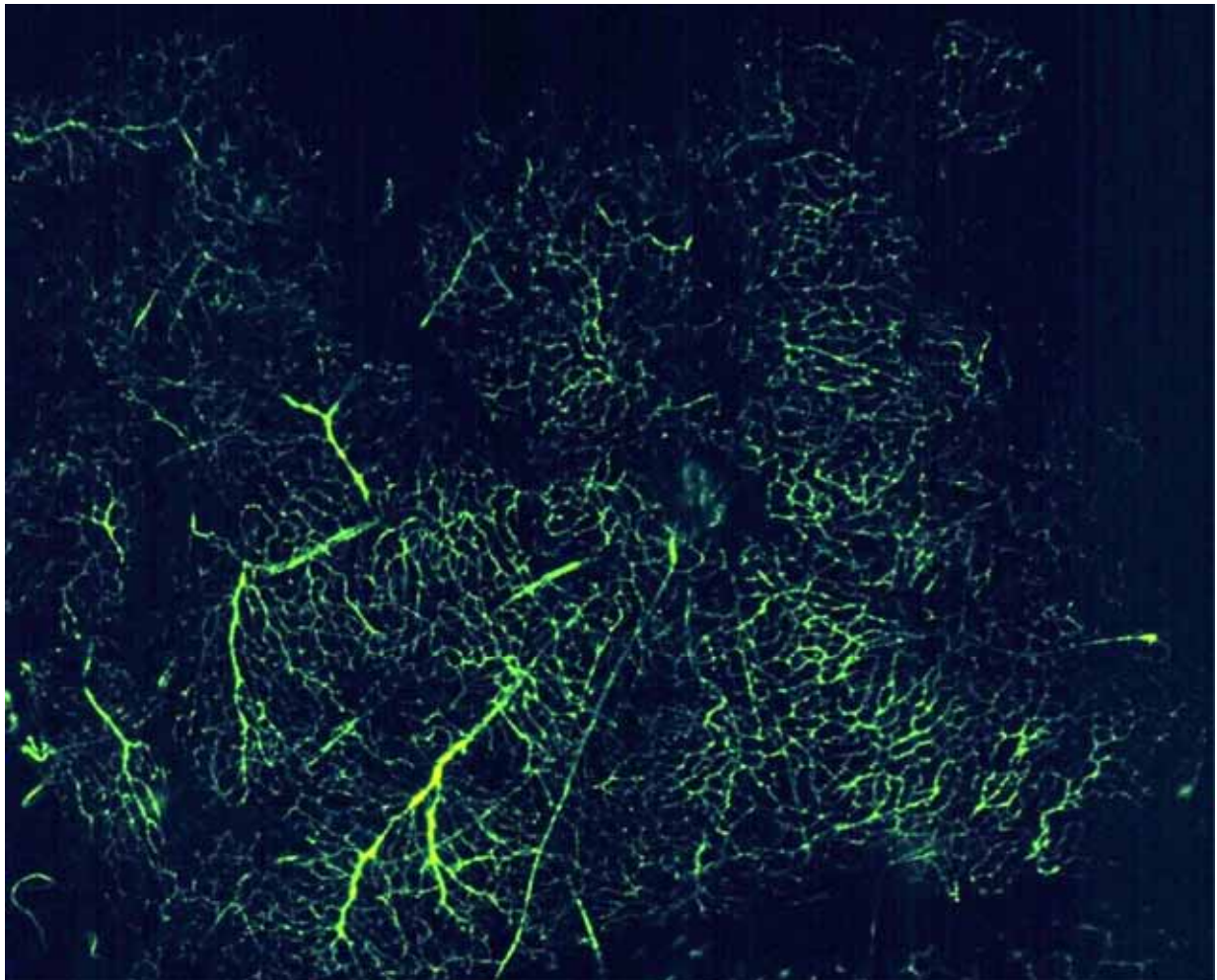


Abbildung 17
Netzhaut einer 17 Tage alten Maus ohne Sauerstoffexposition

4.1.2 Neovaskularisationsverlauf im ROP-Modell

Angiographischer Nachweis einer zentral hypovaskulären Zone und Lokalisationsbestimmung der Neovaskularisationen

Mit Hilfe der an verschiedenen Tagen angefertigten Fluoreszein-Angiographien konnte der Angiogeneseverlauf qualitativ beurteilt werden. Bei allen mit 75 %igem Sauerstoff behandelten Tieren ließen sich zentrale hypo- bis avaskuläre Zonen nachweisen (siehe Abbildungen 18 - 20). Die Neovaskularisationen waren hauptsächlich in der mittleren Peripherie zu beobachten.

Angiogeneseverlauf qualitativ

In Angiographien von elf Tage alten Tieren (letzter Tag der Hyperoxiephase) wurden zentral liegende hypo- bis avaskuläre Zonen beobachtet. Insgesamt stellte sich ein gering ausgebildetes Gefäßnetzwerk dar. Angiographien am Tag P 12 zeigten noch ausgeprägtere Bilder (Abbildung 18 A und B). Erste retinale Neovaskularisationen als Reaktion auf die relative Hypoxie wurden fluoreszenzangiographisch 36 - 48 Stunden nach Rückführung der Tiere in Normoxie beobachtet (Abbildung 18 C und D). Hierbei waren deutliche Gefäßdilataationen sichtbar.

Am Tag P 17 zeigten sich neben einer zentralen hypovaskulären Zone viele polytop auftretende neovaskuläre Knäuel, die hauptsächlich in der mittleren Peripherie zu beobachten waren (Abbildung 19). Das angiographisch beurteilte Maximum an Neovaskularisationen fand sich am Tag P 19. Hier gab es nicht nur den Nachweis maximaler, polytop auftretender neovaskulärer Konglomerate, sondern darüber hinaus eine Reduzierung der zentral hypovaskulären Zone mit deutlichen Gefäßneubildungen (Abbildung 20). Am postnatalen Tag 22 wurde eine Regression neuer Gefäße mit beginnender Rückkehr zu einem eher normal verzweigten Gefäßnetzwerk beobachtet. Angiographien von exponierten 28 Tage alten Mäusen zeigten ein annähernd normal gestaltetes Gefäßsystem, wie es einer nicht exponierten Maus gleichen Alters entspricht.

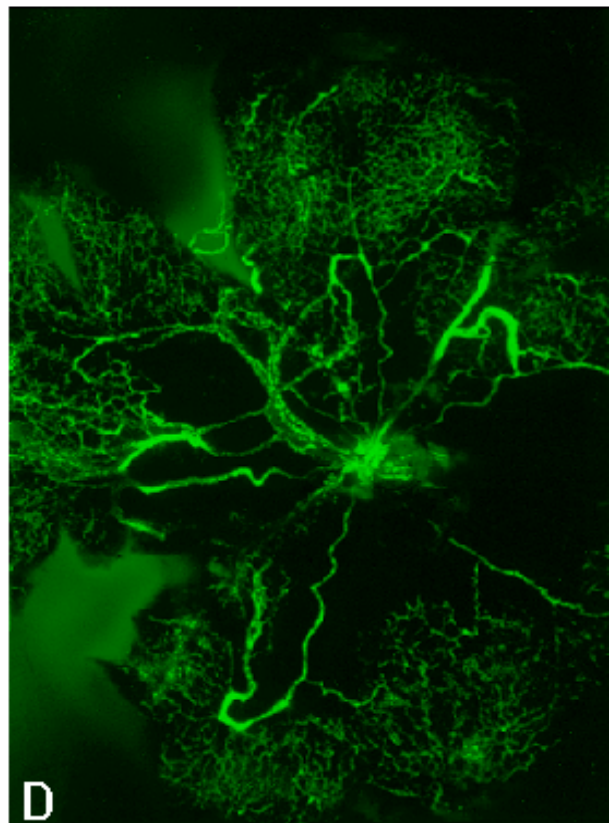
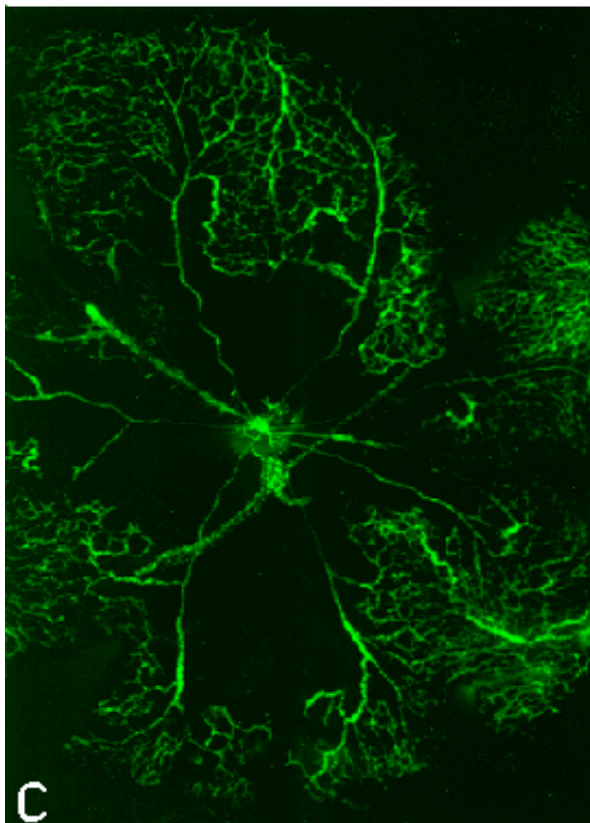
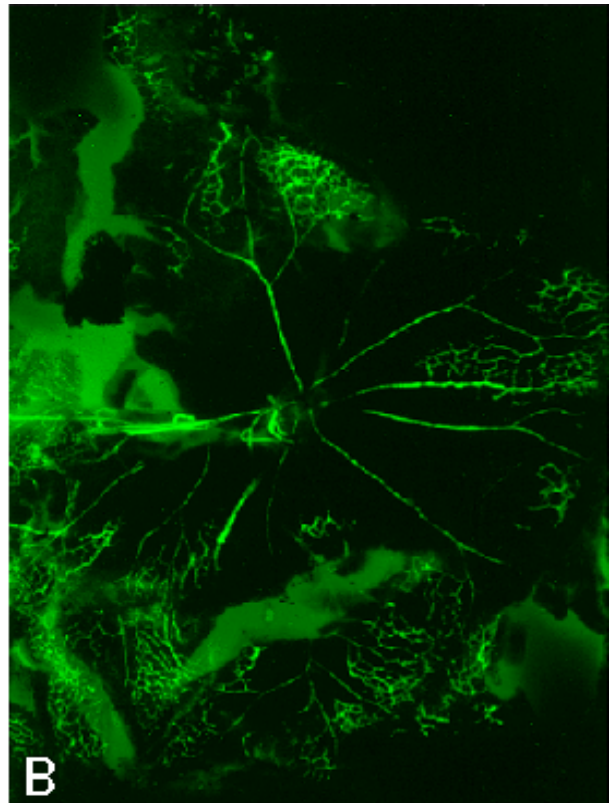
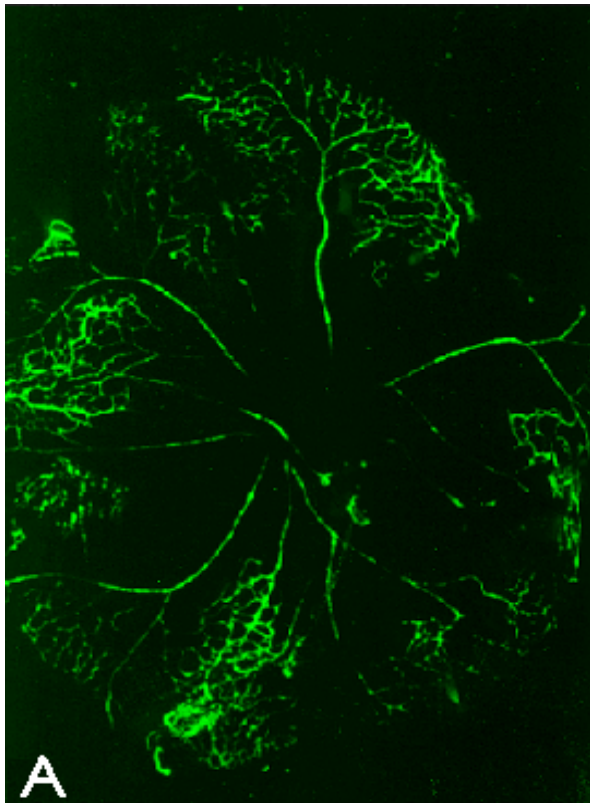


Abbildung 18, angiographische Darstellung retinaler Gefäße

- A Netzhaut einer elf Tage alten Maus, nach viertägiger Hyperoxiedauer
- B Netzhaut am Tag P12, unmittelbar nach Beendigung der fünftägigen Hyperoxiephase
- C Gefäßdarstellung nach 24 Stunden Hypoxiedauer
- D Angiographie nach 48 Stunden Hypoxie

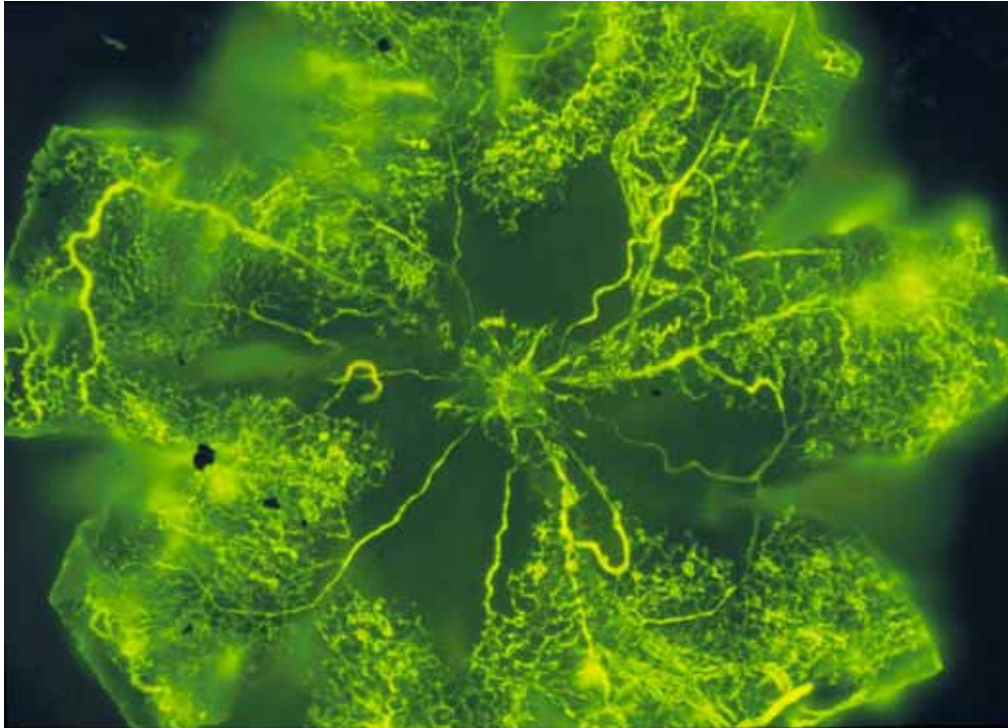


Abbildung 19

Gefäßdarstellung einer 17 Tage alten exponierten Maus

zentral hypovaskuläre Zone, deutlich erkennbare knäuelartige Neovaskularisationen in der mittleren Peripherie aller vier Quadranten und sichtbare Kaliberschwankungen

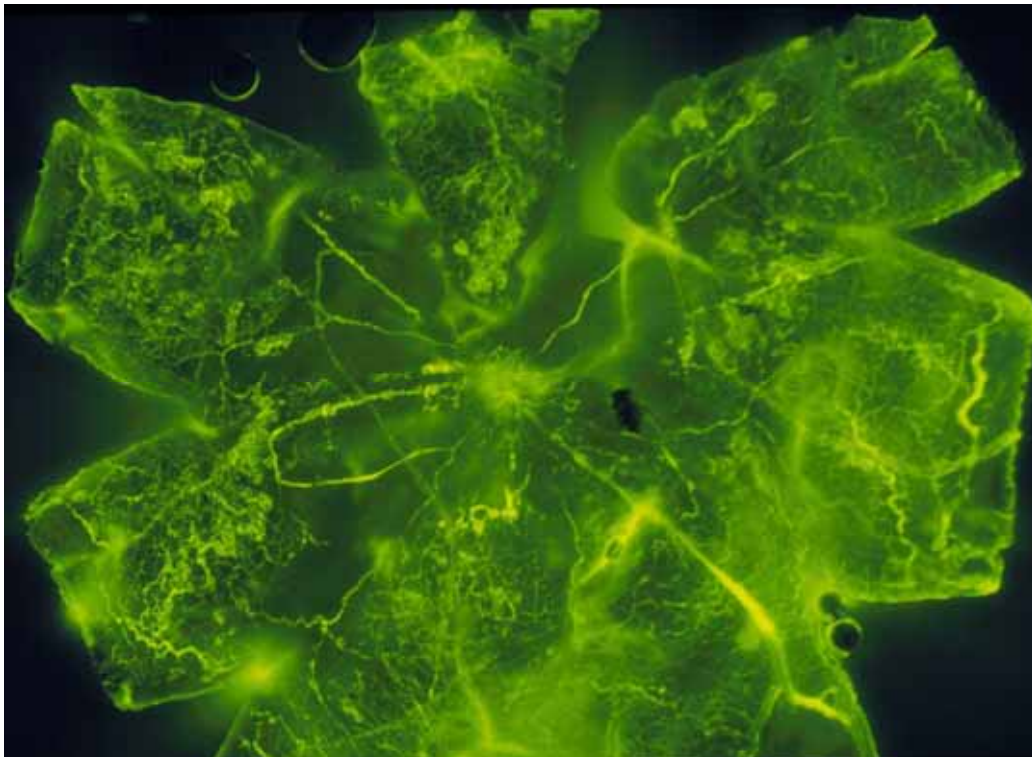


Abbildung 20

Angiographie einer 19 Tage alten exponierten Maus

massive, polytype Neovaskularisationskonglomerate, geringere zentrale hypovaskuläre Zone

Angiogeneseverlauf quantitativ (histologische Auswertung)

Um den Verlauf der Angiogenese als Funktion der postexpositionellen Zeit zu charakterisieren, wurden Augen sauerstoffexponierter Tiere an verschiedenen Zeitpunkten nach Rückkehr in Normoxie histologisch ausgewertet.

Der Verlauf der Neovaskularisationen ist in Abbildung 21 graphisch dargestellt. Direkt zu Beginn der Hypoxiephase (P 12) gab es keine präretinalen neovaskulären Gefäße. Am Tag P14 lag der Durchschnitt vitreal der membrana limitans interna liegender Endothelzellkerne bei $23 (\pm 2,1)$, am Tag P17 bei $77,2 (\pm 2,0)$, um am Tag P 19 ein Maximum von $81,5 (\pm 2,2)$ zu erreichen. Anschließend beginnt eine Regression der neugebildeten Gefäße über $21,5 (\pm 0,1)$ präretinale Endothelzellkerne am Tag P22 bis zum vollständigen Verschwinden am Tag P 28 bei allen Tieren. Pro Zeitpunkt wurden Schnitte der Augen von zehn Tieren ausgezählt. Die Ergebnisse sind in Mittelwert und Standardabweichungen (SEM) angegeben.

Anzahl
neovaskulärer
Kerne / Schnitt

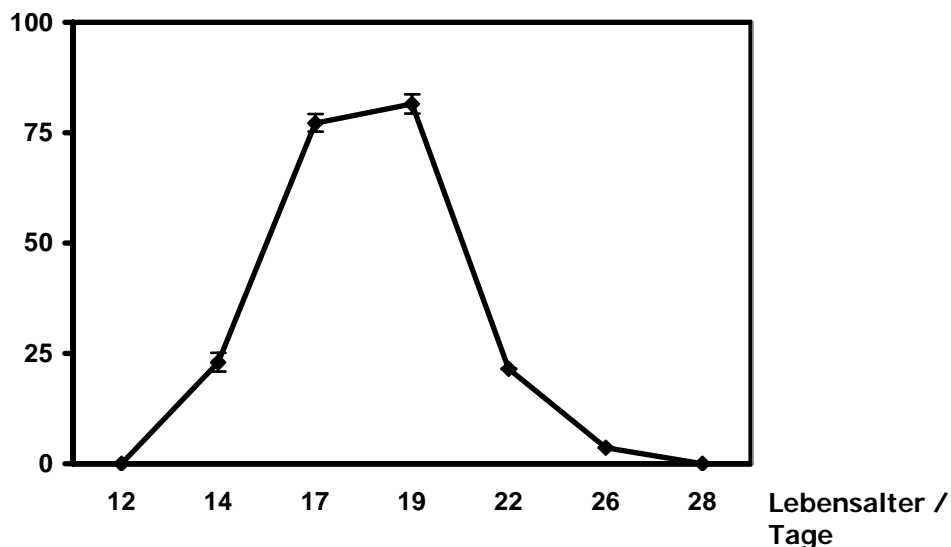


Abbildung 21

Angiogeneseverlauf in Bezug auf den Beginn der Hypoxiephase (P12).

Anzahl präretinaler Endothelzellkerne zu den Zeitpunkten P12 (0 ± 0), P14 ($23 \pm 2,1$), P17 ($77,2 \pm 2,0$), P19 ($81,5 \pm 2,2$), P22 ($21,5 \pm 0,1$), P26 ($3,6 \pm 0,1$) und P28 (0 ± 0). Angaben in Mittelwerten und deren Standardabweichungen (SEM).

4.2 Proteinexpressionsanalysen

4.2.1 Expressionsverlauf der Wachstumsfaktoren VEGF, FGF-2

Das VEGF-Protein war bereits nach kurzer Hypoxiedauer (P12 + 6 Stunden) am stärksten nachweisbar und sank dann schnell auf basale Werte um den Tag P14 ab (Abbildung 22).

Der Fibroblasten-Wachstumsfaktor-2 zeigte allerdings ein anderes Erscheinungsmuster. Seine Expression war während der Zeitspanne vom Tag P12 bis zum Tag P15 stark nachweisbar. Am Tag P17, dem Zeitpunkt maximaler Neovaskularisation in diesem Modell, zeigte FGF-2 einen weiteren Anstieg und blieb während der gesamten Neovaskularisationsperiode erhöht (Abbildung 22).

4.2.2 Expressionsverlauf des $\alpha_v\beta_3$ -Vitronektin-Rezeptors

Der $\alpha_v\beta_3$ -Vitronektin-Rezeptor war bereits kurz nach Hypoxiebeginn am ausgeprägtesten nachweisbar (P12 + 6 Stunden). Die Integrin-Spiegel blieben bis zum Tag P14 erhöht und sanken anschließend für die folgenden Tage P15 bis P 26 auf basale Werte ab (Abbildung 22). In Abbildung 23 ist die Expression von VEGF, FGF-2 und des α_v -Integrins in Relation zur β -Aktin-Expression der sich entwickelnden normalen Mausnetzhaut semiquantitativ dargestellt.

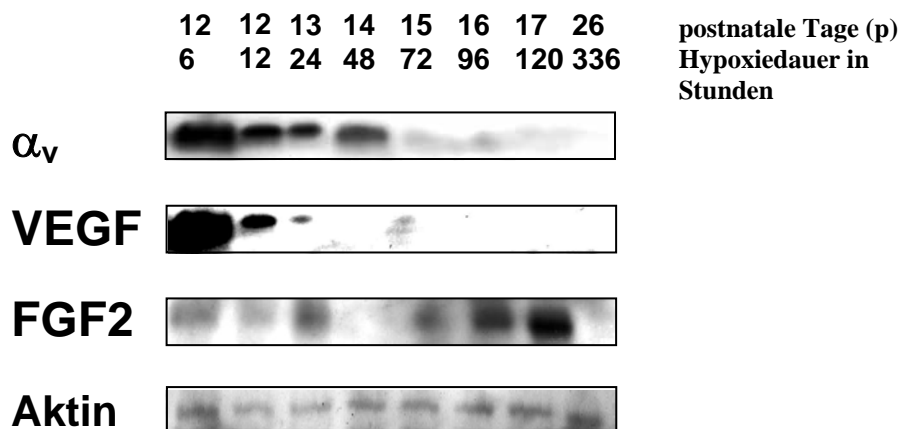


Abbildung 22

Verlauf der Expression des α_v -Integrins, des VEGF- und FGF-2-Proteins während retinaler Neovaskularisation nach Exposition in Hyperoxie

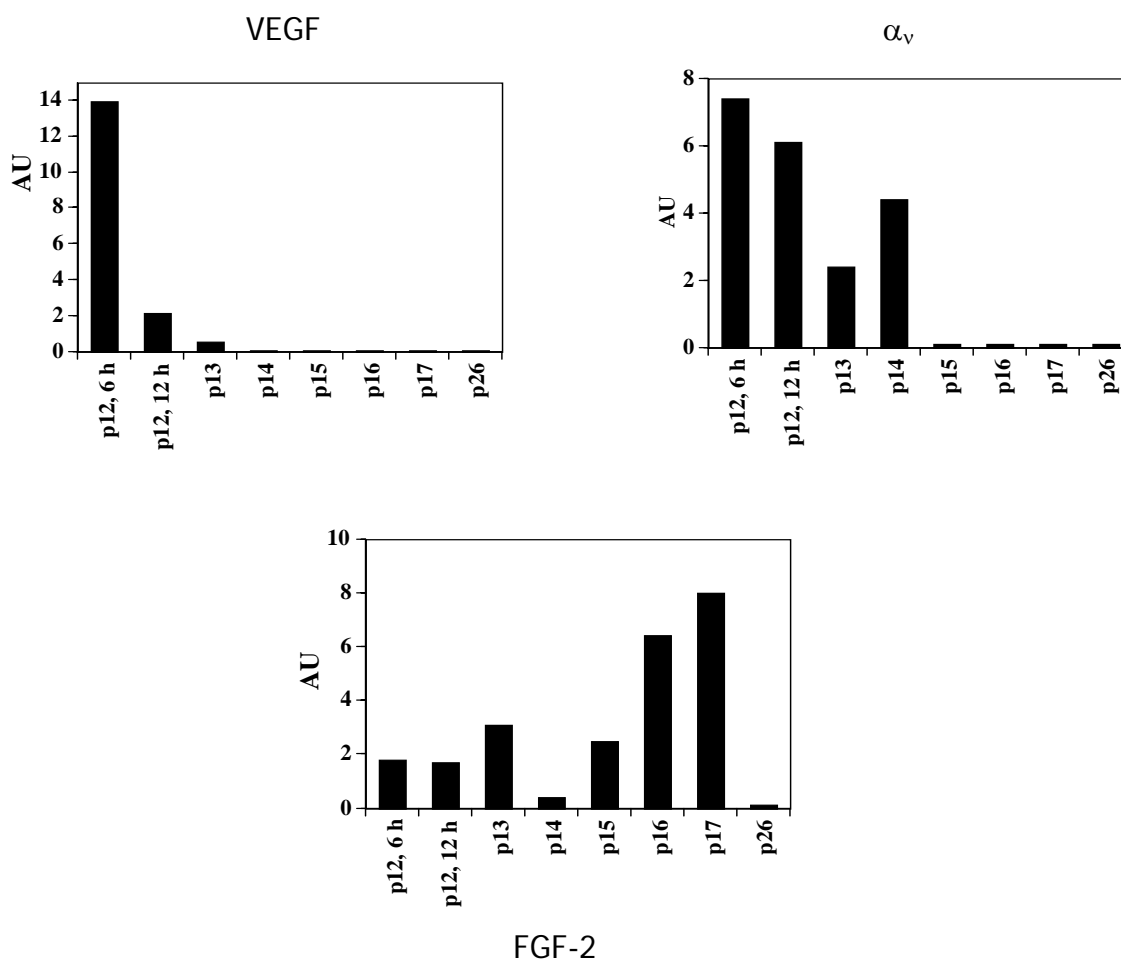


Abbildung 23

Semi-quantitative Evaluation der Proteinexpressionen in Relation zu β -Aktin in arbitrary units (AU, Grauintensitäten in Relation zu einem bestimmten Grauwert); p=postnatale Tage

4.3 Sekundärinterventionsansatz mit subkutaner Injektion

4.3.1 Therapieergebnisse bei früher Sekundärintervention (I)

Fluoreszenz-Angiographien nach subkutaner RGD-Behandlung

In allen Augen von Tieren dieser Versuchsreihen konnten zentral hypo- bis avaskuläre Zonen als Nachweis hyperoxischer Gefäßrarefizierung beobachtet werden.

In den Angiographien der Tiere des Sekundärinterventionsansatzes I (Therapie vom Tag P 14 bis P 19) ließen sich bei der Höchstdosierung (2 x 100 µg pro Tag) ausgeprägte qualitative Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Tieren feststellen. Die behandelten Tiere zeigten am Tag P19 angiographisch deutlich geringere Ausprägungen neovaskulärer Anhäufungen (Vergleich Abbildung 24 und Abbildung 20).

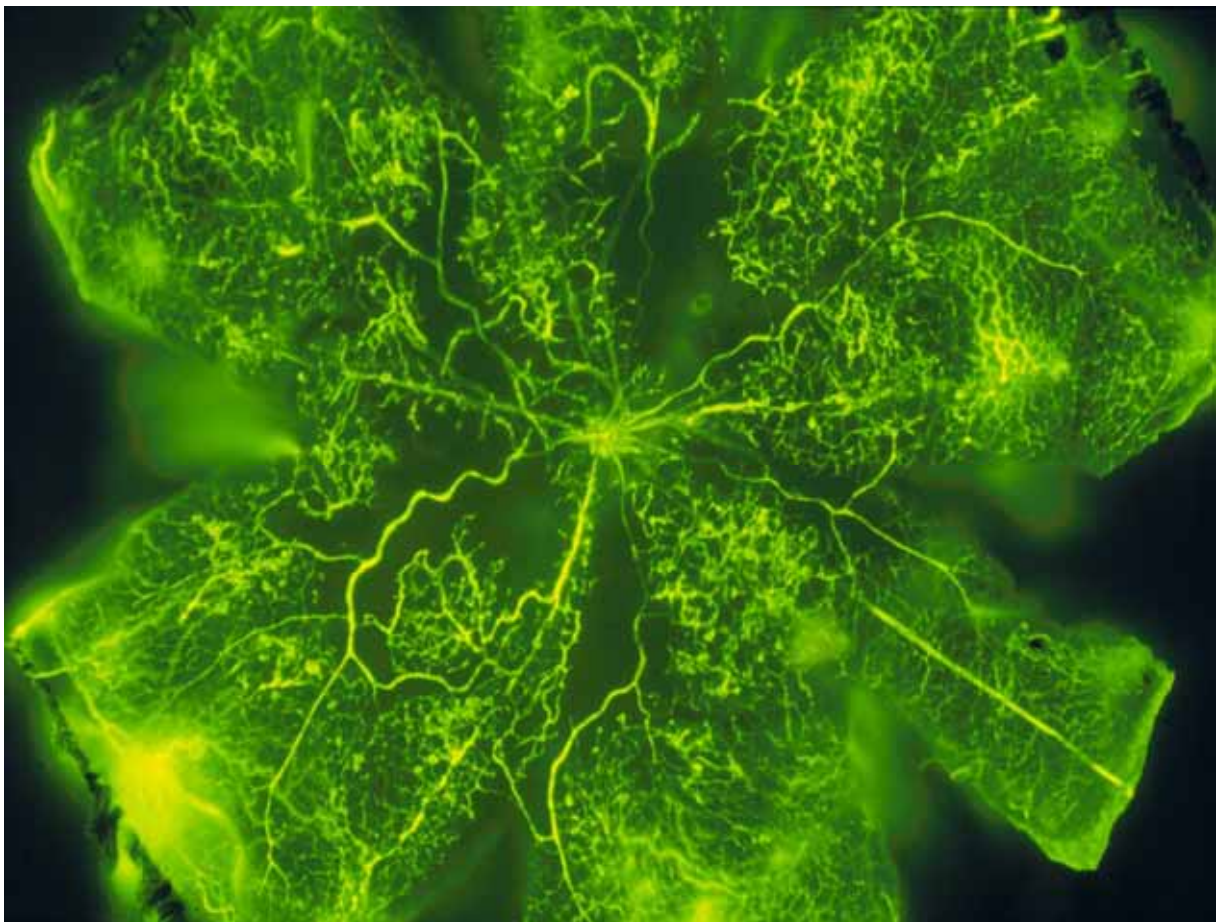


Abbildung 24

Angiographie einer 19 Tage alten sauerstoffexponierten Maus nach Behandlung mit 2 x 100 µg RGD-Peptid pro Tag im Sinne des Sekundärinterventionsansatzes I (P14-P19)

Im verzögerten Sekundärinterventionsansatz war fluoreszenzangiographisch qualitativ kein Unterschied im Vorkommen von neovaskulären Knäulen zwischen behandelten und unbehandelten Tieren bei keiner der verabreichten Dosierungen festzustellen. Insgesamt zeigten diese Angiographien weniger neovaskuläre Konglomerate als diejenigen des frühen Sekundärinterventionsansatzes.

Dosisabhängige Wirkung im frühen Sekundärinterventionsansatz (I)

Bei der um zwei Tage nach Hypoxiebeginn einsetzenden subkutanen Behandlung mit dem Vitronektin-Rezeptor-Antagonisten zeigte sich ein stark dosiskorrelierender Inhibitionseffekt. Bei der Auswertung der 17 Tage alten Tiere wurde bei der niedrigsten verabreichten Dosierung von $2 \times 10 \mu\text{g}$ pro Tag (entspricht $2 \times 2 \text{ mg} / \text{kg}$ Körpergewicht) kein signifikanter Unterschied zwischen dem Vorkommen von präretinalen Neovaskularisationen behandelter und scheinbehandelter Mäuse beobachtet (Anzahl präretinaler Kerne behandelte Tiere: $78,83 \pm 2,38$, bei 60 ausgezählten Schnitten vs. der scheinbehandelter Tiere von $77,53 \pm 2,91$, bei 105 ausgezählten Schnitten). Effektive therapeutische Dosierungen begannen bei einer Menge von $2 \times 20 \mu\text{g}$ pro Tag ($2 \times 4 \text{ mg} / \text{kg}$ Körpergewicht), die eine Reduktion ungewollter Gefäßneubildung um 20,8 % (behandelt: $56,40 \pm 2,57$, bei 120 ausgezählten Schnitten vs. scheinbehandelt: $71,25 \pm 2,08$, bei 120 ausgezählten Schnitten, $p < 0,001$) bewirkte. Mit steigender Dosierung stieg auch der Therapieerfolg: Die Tiere, die mit zweimal täglich $50 \mu\text{g}$ Peptid systemisch versorgt wurden, zeigten eine Angiogeneseinhibition von 36 % ($59,85 \pm 3,04$ präretinaler Endothelzellkerne behandelte Tiere bei 75 ausgezählten Schnitten vs. $93,5 \pm 3,7$ scheinbehandelter Mäuse bei 75 ausgezählten Schnitten, $p < 0,001$). Eine maximale Gefäßneubildungshemmung wurde bei der höchsten verabreichten Dosierung von $2 \times 100 \mu\text{g}$ pro Tag beobachtet. Der Therapieerfolg belief sich auf 56,9 % ($29,35 \pm 2,39$ bei 75 ausgezählten Schnitten vs. $68,08 \pm 3,21$, bei 60 ausgezählten Schnitten) im Vergleich zu scheinbehandelten Kontrollen, siehe Abbildung 25.

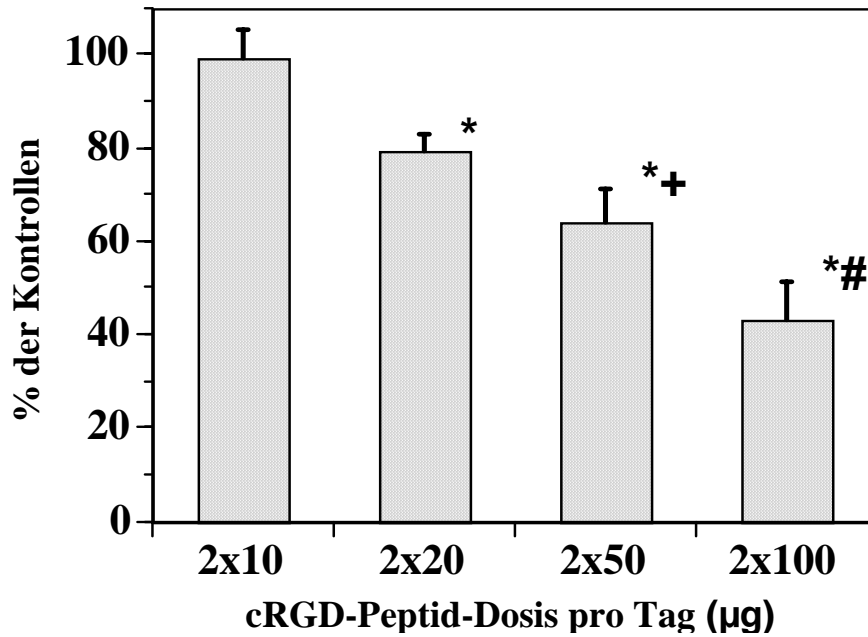


Abbildung 25

Dosisabhängiger Effekt der subkutanen RGD-Therapie auf Angiogenese im Bereich ihres stärksten Anstieges, Ergebnisse des frühen Sekundärinterventionsansatzes (P14 - P19);

Angaben in % der Kontrollen \pm Standardabweichung des Mittelwertes (SEM)

* statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0.05$) gegenüber scheinbehandelten Kontrollen

+ statistisch signifikanter Unterschied versus 2 x 20 µg / Tag ($p < 0.05$)

statistisch signifikanter Unterschied versus 2 x 50 µg / Tag ($p < 0.05$)

4.3.2 Therapieergebnisse bei später Sekundärintervention (II)

Bei der um fünf Tage nach Rückführung in Normoxie verzögerten Therapie (P 17 bis P 22) wurde keine signifikante Reduktion präretinaler Neovaskularisationen im Vergleich zu den Kontrollen beobachtet. Ein therapeutischer Effekt konnte mit keiner der verabreichten Dosierungen erzielt werden, auch nicht bei den wirksamsten Dosierungen früher einsetzender Therapien, siehe Abbildung 26.

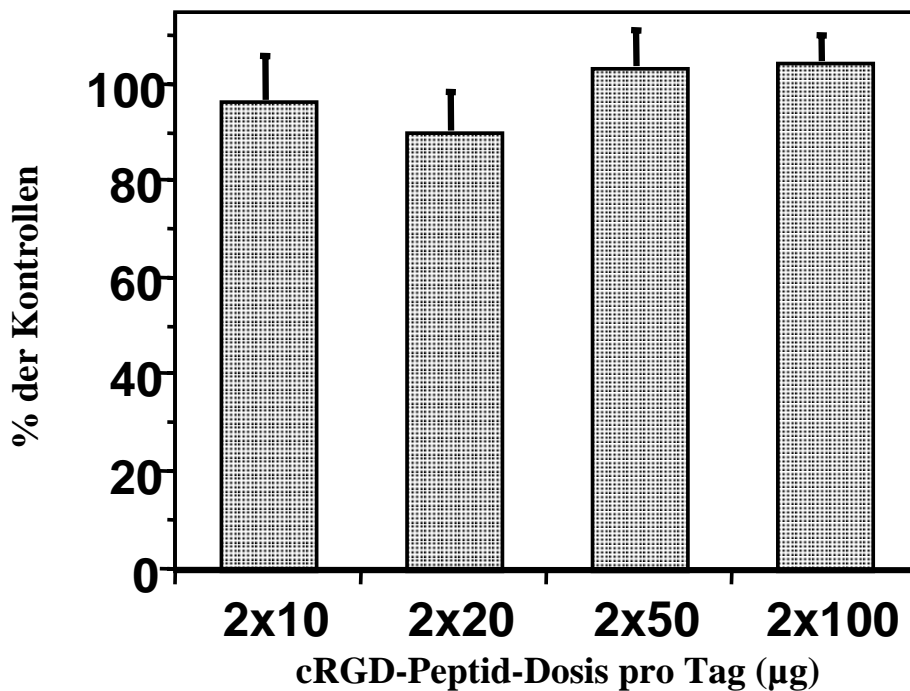


Abbildung 26

Effekt der subkutanen RGD-Therapie auf Angiogenese im Bereich ihres Maximums in dem Modell der sauerstoffinduzierten Retinopathie Ergebnisse des späten Sekundärinterventionsansatzes (II), (P17-P22); Angaben in % der Kontrollen \pm Standardabweichung des Mittelwertes (SEM).

4.4 Ergebnisse der Lokalthherapie

4.4.1 Eigenschaften der Augentropfen-Lösung zur Lokalthherapie

Das Peptid löste sich in der speziell hergestellten Augentropfenlösung bis zu den verwendeten Maximaldosen von 2 µg Peptid pro 1µl Lösung vollständig. Ein Ausfällen oder Wirkungsverlust wurde auch nach mehrmonatiger Aufbewahrung bei 7° C nicht beobachtet. Die jungen Mäuse reagierten nach Zugabe des Peptids zu keiner Zeit gereizt oder mit inflammatorischen Reaktionen im Sinne einer Konjunktivitis auf die Augentropfenlösung.

4.4.2 Adhäsions-Assay mit RGD-haltigen Augentropfen

Wie die Abbildung 27 zeigt, setzt der anti-adhäsive Effekt des RGD-Peptids bei einer Konzentrationen von 0,1 µg / ml ein. Bei 1 µg / ml ist ein adhäsionsinhibitorischer Effekt von über 90 % auf die den $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Rezeptor tragenden HEP 2-Fibroblasten in ihrer Adhäsion auf Vitronektin in vitro zu beobachten.

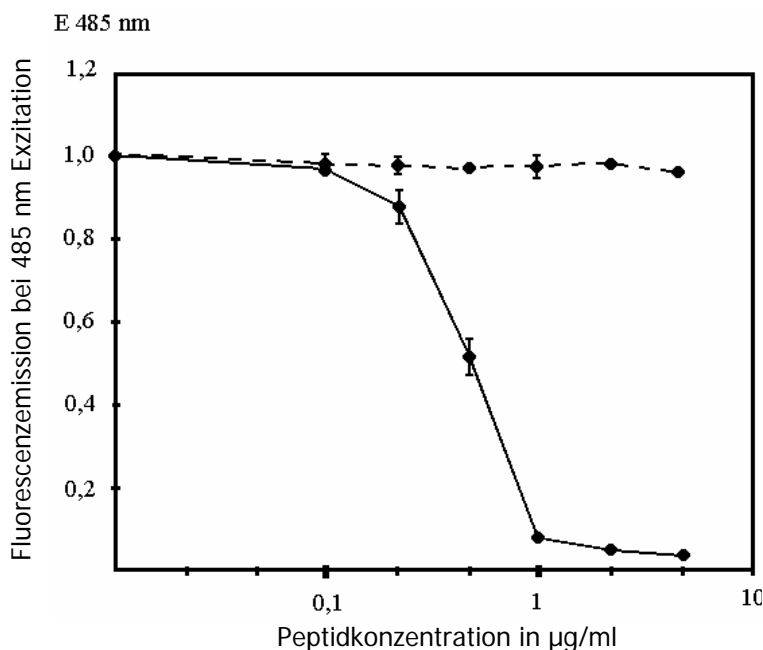


Abbildung 27

Graphische Darstellung der anti-adhäsiven Wirkung des Peptids in Augentropfen-Lösung

- - - Augentropfenlösung ohne Wirkstoff

— Augentropfenlösung mit cRGDfv-Peptid

4.4.3 Nachweis von epikorneal appliziertem FITC-RGD-Peptid in der Netzhaut (Permeationsassay)

Die Auswertung der Netzhäute aus dem Versuch zur Permeation des RGD-Peptids durch das Mausauge ist in Abbildung 28 graphisch dargestellt.

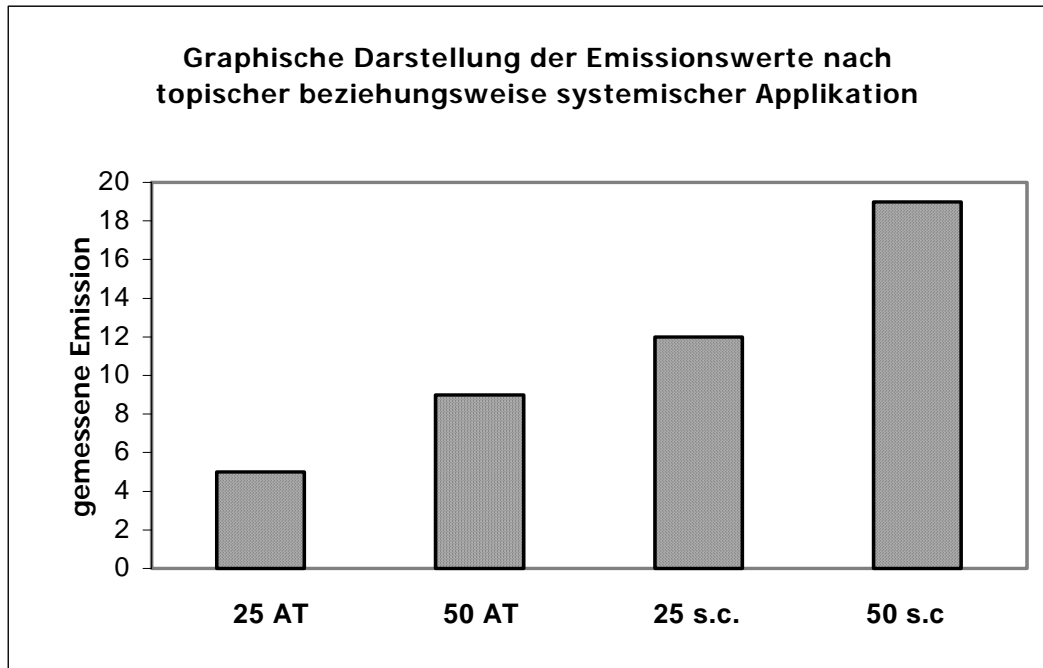


Abbildung 28

Die gemessenen Emissionswerte der Vergleichskonzentrationsreihe sind in Tabelle 1 dargestellt.

10 µg	1101
3 µg	349
1 µg	129
300 ng	34
100 ng	12
30 ng	4
10 ng	2
3 ng	1
1 ng	1
300 pg	1
blank	0

Tabelle 1

Emissionswerte des FITC-markierten RGD-Peptids in PBS in Relation zur Konzentration

Linke Spalte: Konzentration des Peptids pro 1 ml

Rechte Spalte: gemessene Emissionswerte

4.4.4 Dosisabhängige Wirkung der Augentropfen als Primärpräventionsansatz *in vivo*

Bei der direkt nach Hypoxiebeginn einsetzenden Behandlung mit dem Vitronektin-Rezeptor-Antagonisten mittels epikorneal applizierter Augentropfen zeigte sich ein stark dosisabhängiger hemmender Effekt auf präretinale Neovaskularisationen.

Bei der niedrigsten verabreichten Dosierung von 12 µg pro Tag, was einer Dosis von 2,4 mg / kg Körpergewicht entspricht, wurde ein signifikanter Inhibitionseffekt von 16,4 % beobachtet (Anzahl präretinaler Endothelzellkerne der behandelten Tiere: 44,80 ± 2,12, bei 45 ausgezählten Schnitten vs. derer scheinbehandelter Tiere: 53,60 ± 2,77, bei 60 ausgezählten Schnitten, $p < 0,01$).

Bei einer Dosierung von 24 µg pro Tag und Tier wurde eine Reduktion neuer Gefäße um 28,9 % analysiert (behandelt: 39,68 ± 2,19, bei 90 ausgezählten Schnitten vs. scheinbehandelt: 55,84 ± 2,89, bei 90 ausgezählten Schnitten, $p < 0,001$).

Ein maximaler therapeutischer Inhibitionseffekt wurde bei der Höchstdosierung von 60 µg pro Tag ermittelt. Die Reduktion neuer Gefäße vitreal der membrana limitans interna betrug 48,2 % (behandelt: 32,14 ± 1,67, bei 90 ausgezählten Schnitten vs. scheinbehandelt 62,00 ± 2,32, bei 90 ausgezählten Schnitten, $p < 0,01$), siehe Abbildung 29.

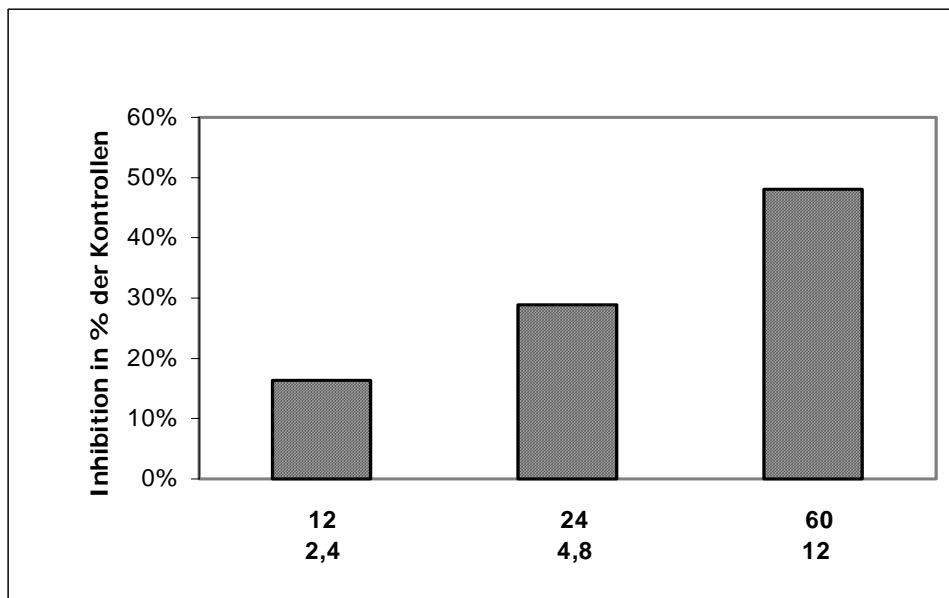


Abbildung 29

Inhibition retinaler Angiogenese mit lokal applizierten cRGD-Peptid-Augentropfen *in vivo*.

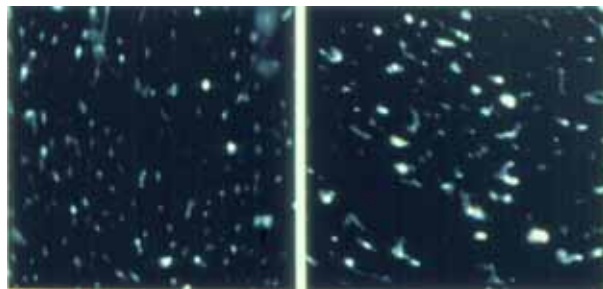
Die pro Tag verabreichten Peptiddosierungen sind in absoluten Mengen (oben; in µg) und auf Körpergewicht bezogen (unten; in mg/kg) angegeben.

4.5 Nebenwirkungen der Behandlung mit cRGDfV

Die Entwicklung der Tiere, beurteilt anhand Inspektion, Verhalten der Tiere, Analyse des Körpergewichts und dessen Verlauf (Körpergewichtszunahme), wurde durch die Therapie mit dem zyklischen RGD-Peptid nicht beeinflusst. Die histologische Begutachtung verschiedener parenchymatöser Organe (Herz, Niere, Leber, Lunge, Gehirn) ergab keine pathologischen Veränderungen. Signifikante Änderungen in der Kapillardichte im Myokard oder in der Niere im Sinne einer Gesamtquerschnittsverminderung waren auch bei Höchstdosis (200 µg RGD-Peptid/d) nicht festzustellen (Abbildung 30).

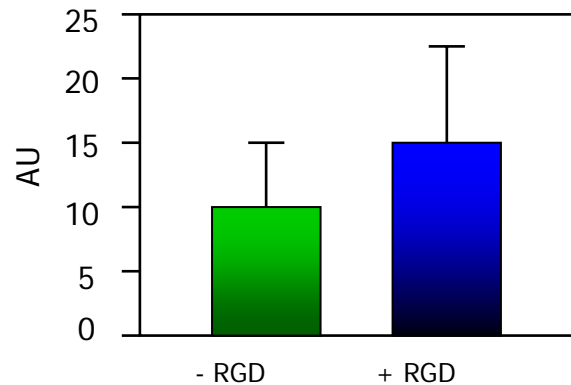
In der Niere gab es keine Unterschiede bezüglich Anzahl und Gesamtfläche der Glomerula im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen.

a) Myokard

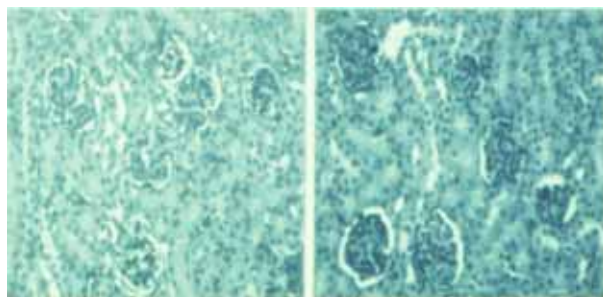


- RGD

+ RGD



b) Niere



- RGD

+ RGD

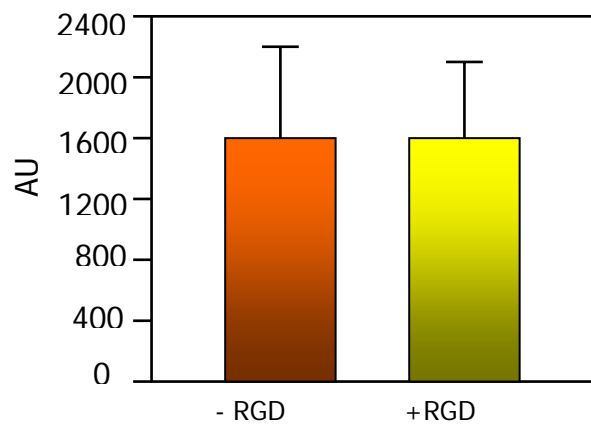


Abbildung 30

Gegenüberstellung der Gefäßquerschnittsfläche im Myokard und in der Niere von unbehandelten (links) und mit RGD-Peptid (200 µg/d) behandelten Tieren (rechts), angegeben in AU = arbitrary units (Grauintensitäten über einem bestimmten Grauwert im CUE-2-Bildanalyseprogramm, Olympus)

5. Diskussion

5.1 Beschreibung des Verlaufes retinaler Neovaskularisationen und Begründung der Sekundärinterventionsansätze

Die vorliegenden Daten stellen erstmals den Verlauf retinaler Neovaskularisationen in dem Mausmodell sauerstoffinduzierter ischämischer Retinopathie dar. Sie zeigen, dass retinale Neovaskularisationen in diesem Modell etwa 24 Stunden nach Einsetzen des angiogenen Stimulus Hypoxie beginnen. Der stärkste Anstieg, gleichzusetzen mit der größten neovaskulären Aktivität, findet zwischen dem zweiten (P 14) und fünften (P 17) post-expositionellen Tag statt. Die Neovaskularisationen erreichen ihr Maximum zwischen den Tagen P 17 und P 19 (fünfter und siebter Tag der Hypoxiephase) und bilden sich zunächst schneller, anschließend etwas langsamer bis etwa dem 16ten postexpositionellen Tag (P 28) vollständig zurück.

Zur Klärung der Frage, ob bei bereits aktiver Angiogenese eine effektive Sekundärintervention möglich ist, sollte die Effektivität einer Therapie in Relation zu dem Zeitpunkt ihres Beginns evaluiert werden. Hierzu wurden aus der ermittelten Kinetik retinaler Neovaskularisationen zwei Therapieansätze zur Sekundärintervention entwickelt. In einem frühen Sekundärinterventionsansatz (I) beginnend vom Tag P14 sollte in den Prozess bereits aktiver Neovaskularisation eingegriffen werden. Dieser Zeitpunkt des Einsetzens einer Therapie sollte den ermittelten maximalen Anstieg der Gefäßneubildung erreichen. Ein weiter verzögerter Sekundärinterventionsansatz sollte vom Tag P 17 an die Neovaskularisationen im Bereich ihres Maximums hemmen.

5.2 VEGF initiiert den Neovaskularisationsprozess, FGF-2 scheint ihn zu perpetuieren; Integrine nehmen als Zielmoleküle pharmakologischer Intervention ab

VEGF ist hauptsächlich in der Initialphase der neovaskulären Reaktion vorhanden und verringert sich im weiteren Verlauf. FGF2 allerdings erscheint während der maximalen neovaskulären Antwort maximal hochreguliert und zeigte keine wesentlichen Schwankungen im weiteren Verlauf.

VEGF ist ein bedeutender Induktor okulärer Neovaskularisationen, der über hochaffine VEGF-Rezeptoren wirkt (De Vries et al., 1992; Millauer et al., 1993; Breier et al., 1995).

Kürzlich wurde im ROP-Modell der Maus demonstriert, dass die VEGF-mRNA-Expression in Müller- und Ganglionzellen bereits zwölf Stunden nach Beginn der Hypoxiephase auf etwa das Dreifache ansteigt und am Tag P 17 immer noch um etwa 1,5-fach erhöht ist. Dies deutete darauf hin, dass VEGF nicht nur bei der Initiierung retinaler Gefäßproliferationen eine Rolle spiele (Pierce et al., 1995). Dieser Expressionsverlauf der mRNA ist nicht konform mit den vorliegenden Daten des Zeitverlaufes der VEGF-Proteinexpression. Aus diesen lässt sich vermuten, die Translation der VEGF-mRNA könne durch hemmende Mechanismen, die aus der Verbesserung der retinalen Hypoxiesituation resultieren, beeinflusst werden. Eine Begründung könnte der durch sinkende Ischämie verursachte Wegfall des von Shima und Levy beobachteten mRNA-stabilisierenden Effekts von Hypoxie sein (Shima et al, 1995; Levy et al., 1996).

Im Gegensatz dazu wird FGF2 als der zweite Wachstumsfaktor, der in Relation zu den retinalen Neovaskularisationen in dem Hypoxiemodell untersucht wurde, während des gesamten Angiogeneseprozesses exprimiert. FGF2 ist während der maximalen neovaskulären Reaktion auch bei Abwesenheit VEGFs gesteigert, was darauf hinweisen könnte, FGF-2 spiele eine Rolle bei der Fortführung der gefäßneubildenden Reaktion auf die Sauerstoffunterversorgung.

Diese Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen überein, die eine Erhöhung von FGF2 in Netzhäuten bei proliferativen Erkrankungen belegen (Sivalingam et al., 1990; Hanneken et al., 1991). Die zeitlich verschiedene Expression und Verbreitung beider Wachstumsfaktoren in dem Hypoxiemodell widerspricht einem direkten Zusammenhang gegenseitiger Induktion. Basierend auf *in vitro* Daten erscheint es möglich, dass FGF-2 Endothelzellen durch Erhöhung der Expression der Rezeptor-Tyrosinkinase flk-1 für VEGF sensibilisiert (Pepper und Mandriota., 1998). Vorläufige Ergebnisse in dem Maus-Hypoxiemodell deuten jedoch darauf hin, dass flk-1 parallel zu VEGF beginnend am Tag P14 herunterreguliert wird (Hammes et al., unveröffentlichte Beobachtungen).

Interessanterweise sind α_v -Integrine bereits während der frühen Neovaskularisationsphase deutlich gesteigert und fehlen vollständig in der Phase, wenn neu gebildete Gefäße zu regredieren beginnen.

Experimente mit blockierenden Antikörpern in der Hühner-Chorioallantoismembran oder im Kornea-pocket-assay suggerieren, durch FGF-2 induzierte Angiogenese führe zu der Expression des $\alpha_v\beta_3$ -Integrins, während die Stimulation durch VEGF die Expression des $\alpha_v\beta_5$ -Integrins induziere (Friedlander et al., 1995). Eine solch deutliche Unterscheidung

zwischen zwei verschiedenen Wachstumsfaktor-abhängigen Signalwegen der Integrininduktion wurde in dem Modell der Sauerstoff-induzierten Retinopathie der Maus nicht beobachtet. Die Gesamtheit der α_v -Integrin-Proteine korreliert vielmehr mit der VEGF-Expression als mit der FGF-2s. Die Herunterregulation des α_v -Integrins, die nach dem Tag P14 beobachtet wurde, untermauert die Bedeutung des VEGF-abhängigen Signalweges bei der Initiierung der ischämieinduzierten proliferativen Retinopathie, während ein α_v -Integrin-unabhängiger aber FGF2-abhängiger Signalweg während der Fortführung dieses Prozesses bedeutend zu sein scheint.

5.3 cRGDfV inhibiert bereits aktive Neovaskularisationen in der Netzhaut, frühe Intervention ist von entscheidender Bedeutung

Aufgrund der zahlreichen Faktoren, die fakultativ auf der Ebene der Induktion des Angiogeneseprozesses beteiligt sein können, ist deren spezifische Blockade als angiostatisches Prinzip problematisch. Ein Verfahren, das an dem weiter distal gelegenen, gemeinsam genutzten Effektormechanismus angreift, sollte als Antiangiogeneseprinzip besser geeignet sein. Integrinblockierende Antikörper (Brooks et al., 1994b; Friedlander et al., 1995) haben in Hinblick auf die klinische Anwendung den Nachteil, dass die systemische Gabe mit potentiellen Nebenwirkungen assoziiert ist und wiederholte intraokuläre Injektionen nicht praktikabel sind. Eine Alternative stellt das kleinmolekulare zyklische RGDfV-Peptid dar, das hochspezifisch für aktivierte Endothelzellen ist, einen vergleichbaren Effekt als Vitronektin-Rezeptor-Antagonist wie Antikörper entfaltet und deren systemische Gabe möglich ist. Die Molekülgröße dieses RGD-Peptids ist mit 611 Da wesentlich geringer als zum Beispiel das großmolekulare Antikörper gegen Zytokine, deren Rezeptoren oder Integrine, was die Möglichkeit einer topische Applikation eröffnet.

Vorausgehende Versuche mit dem cRGDfV-Peptid in dem Mausmodell sauerstoffinduzierter ischämischer Retinopathie zeigten, dass die Antagonisierung der Integrinrezeptor-Ligand-Beziehung ein potenter Weg ist, präventiv antiangiogen vorzugehen (Hammes et al., 1996b). Die Daten der vorliegenden Studie lassen vermuten, die Unterbrechung dieses Signals zwischen Endothelzelle und umgebender Matrix sei ein gutes Ziel pharmakologischer Sekundärintervention bei bereits bestehenden und stattfindenden retinalen Neovaskulari-

sationen. Sie belegen erstmals, dass man mit diesem Therapieansatz in einen bereits aktiven retinalen Neovaskularisationsprozess intervenieren kann.

In Einklang mit dem Verlauf der Integrinexpression und deren progressiver Herunterregulierung mit Abnahme der Gewebsischämie ist eine antiangiogene Sekundärintervention mit dem Integrin-antagonisierenden zyklischen RGDfV-Peptid nur während der frühen Phase der Neovaskularisierung effektiv.

Die vorliegenden Beobachtungen stimmen mit anderen Beobachtungen an Maus-Tumormodellen überein, dass angiogene Endothelzellen immer noch empfänglich für Ligationsinhibition sind, wenn sie in den Zellzyklus eingetreten sind (Brooks et al., 1994b). Diese Arbeitsgruppe verabreichte zyklische RGD-Peptide intravenös 24 Stunden nach Einsetzen der Angiogenese und beobachteten in den darauffolgenden 24 bis 48 Stunden eine gesteigerte Apoptoserate sowie eine signifikante Regression des umgebenden Gewebes. Diese Daten sowie die vorgelegten Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine Verzögerung des Beginns einer Antiintegrintherapie deren Erfolg nicht ausschließt, so lange Integrine als deren Zielmoleküle exprimiert werden. Dennoch, so demonstriert die vorliegende Studie, ist die möglichst frühzeitige Intervention bei diesem Therapieansatz von entscheidender Bedeutung. Mit dem zyklischen RGDfV-Pentapeptid können bereits aktive Neovaskularisationen zum Zeitpunkt ihrer stärksten Zunahme effektiv gehemmt werden (Sekundärinterventionsansatz I), ab dem Zeitpunkt ihrer maximalen Ausprägung allerdings verliert dieser Ansatz seine inhibierende Wirkung (Sekundärinterventionsansatz II). Damit wird für die klinische Situation eindeutig gezeigt, dass für eine im Vergleich zu einer präventiven Therapie später einsetzende interventionelle Therapie die möglichst frühzeitige Behandlung für den maximal möglichen Erfolg entscheidend ist.

Mit dem Erfolg einer verzögerten Therapie wird weiterhin das Denkmodell unterstützt, das Überleben von Endothelzellen hänge von der durch Integrine vom Vitronektin-Rezeptortyp vermittelten Adhäsion ab (Meredith et al., 1993).

Überlappende Funktionalität und Kompensation sind zwei Aspekte der Integrindynamik, die kürzlich durch Bader und Mitarbeiter gesteigerte Aufmerksamkeit erfuhren. Die Arbeitsgruppe berichtete über die bereits intrauterine Letalität von Mäusen mit einer Nullmutation für die α_v -Integrin-Teildomäne aufgrund plazentarer Defekte. Zwanzig Prozent dieser Mäuse entwickelten sich zeitgerecht, zeigten aber intensive Angiogenese, die zu schwerwiegenden Defekten wie zerebraler und intestinaler Hämorrhagien führten (Bader et al., 1998). Diese Beobachtungen lassen auf eine Organspezifität des α_v -Integrin-Systems und

eine mögliche Kompensation durch andere Integrine schließen. Die Effizienz einer Ligationsinhibition des α_v -Integrin-Systems bei proliferativen Retinopathien kann auf diese Weise in Einklang mit den Daten von Knock-out-Experimenten gebracht werden, da sich postnatale und pathologische Angiogenese in spezifischen Organen wie der Netzhaut bezüglich der Mechanismen der Initiierung und Fortführung von physiologischer Angiogenese im Rahmen der Entwicklung unterscheidet.

5.4 Bei Behandlung mit dem zyklischen RGDfV-Peptid wurden auch bei Höchstdosierung keine Nebenwirkungen beobachtet

Wie bereits gezeigt wurde, hat die Behandlung mit dem RGD-Peptid auch in hohen Dosierungen keinen Einfluss auf intraretinale vaskuläre und nicht-vaskuläre Parameter. Im Speziellen wurde bereits dargelegt, dass die Anzahl an Ganglionzellen und Zellen der inneren Körnerschicht, sowie der Gesamtquerschnitt der die innere plexiforme Schicht durchziehenden intraretinalen Kapillaren bei behandelten und bei unbehandelten Tieren identisch war (Hammes et al., 1996b).

Die Begutachtung verschiedener parenchymatöser Organe (Lunge, Hirn, Herz, Niere, Leber) ergab keine histopathologischen Veränderungen. Die Analyse der Gefäßdichte im Sinne einer Gesamtquerschnittsverminderung ergab keine signifikanten Veränderungen in stark vaskularisationsabhängigen Organen wie Herz und Niere. Diese Beobachtungen demonstrieren, dass die getestete Höchstdosis von 80 mg / kg Körpergewicht pro Tag keinen Effekt auf präexistierende Blutgefäße hat.

Das Ausbleiben von Nebenwirkungen bei systemischer Verabreichung des zyklischen RGDfV-Peptids deckt sich mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen. Friedlander und Mitarbeiter entdeckten in der Zeit bis zwei Monate nach systemischer Behandlung der Maus mit demselben Wirkstoff ebenfalls keine systemischen oder okulären histopathologischen Veränderungen (Friedlander et al., 1996).

Ein nicht zu vernachlässigendes Problem ist, dass in Zusammenhang mit einer chronischen antiangiogenen Therapie eventuell auftretende Nebenwirkungen in den kurzen Phasen eines Tiermodells nur sehr unwahrscheinlich beobachtet werden.

Diese Tatsache erhöht für die Übertragung in die klinische Situation zweifelsfrei die Notwendigkeit für hochspezifische Interventionsziele, die ausschließlich auf angiogenen

Blutgefäßen exprimiert werden. Darüber hinaus gibt es den offensichtlichen Aspekt der Interaktion mit physiologischen Formen der Gefäßneubildung in verschiedenen Situationen. Die Wundheilung eines Patienten, der antiangiogene Therapeutika erhält, könnte ungünstig beeinflusst werden. Dasselbe gilt für die Angiogenese des Reproduktionstraktes wie beispielsweise bei der Gelbkörperreife oder der Embryonalentwicklung. Das Wachstum Neugeborener könnte ebenfalls durch einen Angiogenesehemmer beeinträchtigt werden (Gerber et al., 1999a), was Berücksichtigung bei der Behandlung der Frühgeborenenretinopathie finden muss.

Die potentielle Beeinflussung physiologischer Angiogenesevorgänge ist auch bei bisher fehlendem Nachweis eines Effektes auf präexistierende Gefäße nach wie vor zu beachten.

5.5 Topische Applikation mittels Augentropfen hemmt retinale Neovaskularisationen *in vivo* und minimiert potentielle Nebenwirkungen

Um systemische Nebenwirkungen der antiangiogenen Therapie mit dem Vitronektin-Rezeptor-Antagonisten zu minimieren und klinisch nicht durchführbare wiederholte intraokuläre Injektionen als alternative lokale Applikationsform zu umgehen, wurde das Konzept der topischen Applikation mittels epikorneal aufgetragener Augentropfen entwickelt.

Die adhäsionsblockierenden Eigenschaften des Pentapeptids wurden durch die speziell angefertigte Augentropfenlösung nicht verändert. Dies belegen die Ergebnisse des *in vitro*-Adhäsions-Assays. Der Nachweis Fluoreszein-markierten Peptids in dem *in vivo*-Permeations-Assays bestätigt die Penetration des Wirkstoffes bis zur Netzhaut nach epikornealer Applikation. Der stark dosiskorrelierende Inhibitionseffekt auf retinale Neovaskularisationen in dem Mausmodell Hypoxie induzierter ischämischer Retinopathie demonstriert, dass der Wirkstoff in therapeutisch wirksamen Dosierungen an der Netzhaut vorliegt. Hiermit wurde erstmals ein Inhibitionserfolg retinaler Angiogenese nach epikornealer Applikation demonstriert.

Mit hochfrequenter topischer Applikation können in diesem Ansatz effektive Wirkspiegel an der Netzhaut erreicht werden, ohne einen vergleichbar hohen systemischen Anteil hervorzurufen. Damit wird die Wahrscheinlichkeit potentieller – bisher unbeobachteter – systemischer Nebenwirkungen auf ein Minimum reduziert und der therapeutische Effekt dieses angiostatischen Agens maximiert. Des Weiteren werden die Nebenwirkungen einer als

Langzeittherapieform problematischen intraokularen Injektion sowie die potentiell mit Nebenwirkungen behaftete systemische Verabreichung umgangen. Stattdessen wird eine auch bei häufiger und längerer Anwendung einfach durchführbare Langzeittherapie ermöglicht.

5.6 Die Behandlung mit dem Vitronektin-Rezeptor-Antagonist könnte als adjuvante Therapieform genutzt werden

Derzeit gibt es keine medikamentöse Therapie der diabetesbedingten Gefäßproliferationen am Auge. Die Photokoagulation durch Laser ist die bisher einzige effektive Therapie der diabetischen Retinopathie vor dem Eintreten des Visusverlustes (Early Treatment Diabetic Retinopathy Studie (ETDRS) Group, 1991; Lee und Olk, 1991). Ziel der destruktiven panretinalen Photokoagulation ist es, die durch den progressiven Kapillarverschluss entstandenen minderperfundierten Netzhautareale bewusst flächig zu zerstören, um die Freisetzung endothelspezifischer Wachstumsfaktoren zu unterbinden und damit den Reiz für die weitere Entwicklung für Neovaskularisationen auszuschalten. Neben der Destruktion zwar hypoxischen aber dennoch vitalen Gewebes hat die Laserphotokoagulation weitere Nebenwirkungen. Es kann beispielsweise zu Gesichtsfeldausfällen, Nachtblindheit, einem Zusammenbruch der Blut-Netzhaut-Schranke und nachfolgendem Makulaödem sowie irreversibler Sehverschlechterung kommen. Dabei reduziert die Laserphotokoagulation das Risiko eines schweren Sehverlustes nur um etwa 50% (Klein et al., 1987).

Die Photokoagulation zielt auf die Ablation von Neovaskularisationen, beseitigt aber nicht die zugrundeliegenden angiogenen Stimuli. Als Folge ist das Wiederauftreten pathologischer Gefäßneubildungen ein häufig beobachtetes Problem.

Hieraus resultiert die Notwendigkeit, eine effektivere, spezifischere und weniger destruktive Therapie zu entwickeln. Der Ansatz mit dem Vitronektin-Rezeptor-Antagonisten könnte eine komplementäre Therapie für die Laserphotokoagulation auch im Sekundärinterventionsansatz darstellen.

6. Zusammenfassung

Die vorgelegten Studien zeigen, dass die systemische Verabreichung eines kleinmolekularen, hochselektiven und spezifischen Vitronektin-Rezeptor-Antagonisten einen bereits aktiven Angiogeneseprozess in einem *in vivo*-Modell sauerstoffinduzierter Retinopathie sehr effektiv inhibieren kann.

Mit der selektiven Blockierung von angiogenen Endothelzellen werden die möglichen Wirkungen auf ruhendes Endothel minimiert und eine Langzeittherapie ohne wesentliche Nebenwirkungen möglich. Die potentielle Beeinflussung physiologischer Angiogenesevorgänge ist auch bei bisher fehlendem Nachweis eines Effektes auf präexistierende Gefäße nach wie vor zu beachten.

Die antiangiogene Wirkung ist um so stärker, je frühzeitiger die Therapie einsetzt. Eine voll entwickelte Angiogenese ist mit Vitronektin-Rezeptor-Antagonisten nicht mehr inhibierbar. Dies kann auf abnehmendem Hypoxiereiz infolge der bisher bereits stattgefundenen Gefäßneubildung oder auf einer abnehmenden Suszeptibilität des zu inhibierenden Vitronektin-Rezeptor-Systems beruhen. Wahrscheinlicher allerdings ist die den Ergebnissen zufolge stattfindende Herunterregulierung der Rezeptorexpression. So schließt eine Verzögerung des Beginns der Antiintegrintherapie deren Erfolg nicht aus, solange Integrine als deren Zielmoleküle exprimiert werden. Eine möglichst frühzeitige Sekundärintervention ist für den Therapieerfolg in diesem Ansatz demnach von entscheidender Bedeutung.

Obwohl die Übertragung dieser Ergebnisse hinsichtlich der Expression der Integrinrezeptoren als Zielmoleküle auf die humane Situation diskutiert werden muss, ist bereits gezeigt worden, dass α_v -Integrine bei aktiver oder bereits vorhandener Neovaskularisation in Augen von Patienten mit proliferativer diabetischer Retinopathie exprimiert werden (Casaroli Marano et al., 1995).

Da das Auge als gutes Modellsystem dient, die molekularen Signale der Angiogenese in einem spezifischen Gewebe mit dem, was für andere Gewebe bekannt ist, zu vergleichen und gegenüberzustellen, könnten aus der vorliegenden Studie Rückschlüsse auf die Inhibition bereits stattfindender extraretinaler Angiogenese gezogen werden.

Um systemische Nebenwirkungen der antiangiogenen Therapie mit dem Vitronektin-Rezeptor-Antagonisten zu minimieren und klinisch nicht durchführbare, wiederholte intraokuläre Injektionen als alternative lokale Applikationsform zu umgehen, wurde das Konzept der topischen Applikation mittels epikorneal aufgetragener Augentropfen entwickelt.

Es wurde gezeigt, dass der Wirkstoff sein adhäsionsblockierendes Potential in der speziell entwickelten Augentropfenlösung uneingeschränkt beibehält und nach epikornealer Verabreichung in therapeutischen Dosierungen an die Netzhaut vordringt. Dabei hemmt der kleinmolekulare Peptid-Antagonist potent und selektiv präretinale, hypoxieinduzierte Neovaskularisationen. Hochfrequente Applikation, die mit dieser Darreichungsform problemlos zu erfüllen ist, ermöglicht konstante suffiziente therapeutische Konzentrationen an der Netzhaut bei minimalem Risiko systemischer Nebenwirkungen.

Für die klinische Perspektive ist zweierlei festzuhalten:

1. Mit kleinmolekularen Integrin-Antagonisten kann die effektive Unterdrückung eines bereits aktiven Neovaskularisationsprozesses ohne erkennbare Nebenwirkungen erzielt werden.
2. Die Methode der topischen Verabreichung des Wirkstoffes mittels Augentropfen ermöglicht es, potentielle bisher unbekannte Nebenwirkungen zu minimieren und den therapeutischen Effekt zu maximieren. Sie stellt eine klinisch durchführbare Langzeit-Applikationsform dar, die systemische Verabreichung und intraokuläre Injektionen umgeht.

7. Literaturverzeichnis

- Adamis, A.P., Miller, J.W., Bernal, M.T., D'Amico, D.J., Folkman, J., Yeo, T.K., Yeo, K.T. (1994). Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am. J. Ophthalmol.*, **118**, 445-450
- Aiello, L. P., Ferrara, N., King, G., L. (1994a). Hypoxic regulation and bioactivity of vascular endothelial growth factor: characterization of retinal microvascular pericytes and pigment epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **35**, 1868
- Aiello, L. P., Avery, R. L., Arrig, P. G., Keyt, B. A., Jampel, H. D., Shah S. T., Paquale, L. R., Thieme, H., Iwamoto, M. A., Park, J. E., Nguyen, H. V., Aiello L. M., Ferrara. N., King, G. L., (1994b). Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N. Engl. J. Med.*, **331**, 1480-1487
- Alavi, A., Hood, J.D., Frausto, R., Stupack, D.G. and Cheresch, D.A. (2003). Role of Raf in vascular protection from distinct apoptotic stimuli. *Science*, **301**, 94–96
- Alon, T., Hemo, I., Itin, A., Pe'er, J., Stone, J., Keshet, E. (1995). Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat. Med.*, **10**, 1024-1028
- Ansari, N.H., Zhang, W., Fulep, E., Mansour, A. (1998). Prevention of pericyte loss by trolox in diabetic rat retina. *J.Toxicol. Environ. Health. A.*, **54**, 467-475
- Antonelli-Orlidge, A., Saunders, K.B., Smith, S.R. and D'Amore P.A. (1989). An activated form of transforming growth factor beta is produced by cocultures of endothelial cells and pericytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 4544–4548
- Arbeit, J. M., Olson, D. C., Hanahan, D. (1996). Upregulation of fibroblast growth factors and their receptors during multi-stage epidermal carcinogenesis in K14-HPV16 transgenic mice. *Oncogene*, **13**, 1847-1857
- Arend, O., Wolf, S., Remky, A., Sponsel, W.E., Harris, A., Bertram, B., Reim, M. (1994). Perifoveal microcirculation with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, **232**, 225-231
- Arend, O., Remky, A., Harris, A., Bertram, B., Reim, M., Wolf, S. (1995a). Macular microcirculation in cystoid maculopathy of diabetic patients. *Br. J. Ophthalmol.*, **79**, 628-632
- Arend, O., Wolf, S., Harris, A., Reim, M. (1995b). The relationship of macular microcirculation to visual acuity in diabetic patients. *Arch. Ophthalmol.*, **113**, 610-614
- Arend, O., Remky, A., Evans, D., Stuber, R., Harris, A. (1997). Contrast sensitivity loss is coupled with capillary dropout in patients with diabetes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **38**, 1819-1824
- Asahara, T., Masuda, H., Takahashi, T., Kalka, C. Pastore, C., Silver, M., Kearne, M., Magner, M., Isner, J. M. (1999a). Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascula-

- rization. *Circ. Res.*, **85**, 221-228
- Asahara, T., Takahashi, T., Masuda, H, Kalka, C., Chen, D., Iwaguro, H., Inay, Y., Silver, M., and Isner, J. M. (1999b). VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J.*, **18**, 3964-3972
- Ashton, N. (1957). Retinal vascularization in health and disease. *Am. J. Ophthalmol.*, **44**, 7-17
- Assoian, R. K. (1997). Anchorage-dependent cell cycle progression. *J. Cell. Biol.*, **136**, 1-4
- Auerbach, W., and Auerbach, R. (1994). Angiogenesis inhibition: a review. *Pharmacol. Ther.* **63**, 265-311
- Auguste, P., Javerzat, S., Bikfalvi, A. (2003). Regulation of vascular development by fibroblast growth factors. *Cell Tissue Res.*, **314**, 157-166
- Augustin, H. G. (2001). Tubes, branches and pillars. The many ways of forming a new Vasculature. *Circ. Res.*, **89**, 645-647
- Aumailley, M., Gurrath, M., Müller, G., Calvete, J., Timpl, R., and Kessler, H. (1991). Arg-Gly-Asp constrained within cyclic pentapeptides: Strong and selective inhibitors of cell adhesion to vitronectin and laminin fragment P1. *FEBS Lett.* **291**, 50-54
- Bader, B.L., Rayburn, H., Crowley, D., Hynes, R.O. (1998). Extensive vasculogenesis, angiogenesis, and organogenesis precede lethality in mice lacking all alpha v integrins. *Cell*, **13**, 507-19
- Bergers, G. and Benjamin, L. E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer*, **3**, 401-410
- Benjamin, LE., Hemo, I., Keshet, E. (1998). 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*, **125**, 1591-1598
- Bikfalvi, A., Klein, S., Pintucci, G., Rifkin, D.B. (1997). Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocr. Rev.*, **18**, 26-45
- Blood, C. H. and Zetter, B. A. (1990). Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis. *Biochem. Biophys. Acta* **1032**, 89-116
- Breier, G., Albrecht, U., Sterrer, S., Risau, W. (1992). Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development*, **114**, 521-532
- Breier, G., Clauss, M., Risau, W. (1995). Coordinate expression of vascular endothelial growth factor receptor-1 (flt-1) and its ligand suggests a paracrine regulation of murine vascular development. *Dev Dyn.*, **204**, 228-39
- Brew, K., Dinakarpanian, D., Nagase, H. (2000). Tissue inhibitors of metalloproteinases: Evolution, structure and function. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1477**, 267-283

- Brooks, P. C., Clark, R. A. F. & Cheresh, D. A. (1994a). Requirement of vascular integrin $\alpha_v\beta_3$ for angiogenesis. *Science* **264**, 569-571
- Brooks, P. C., Montgomery, A. M. P., Rosenfeld, M., Reisfeld, R. A., Hu, T., Klier, G., and Cheresh, D. A. (1994b). Integrin $\alpha_v\beta_3$ antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell*, **79**, 5-17
- Brooks, P.C., Stromblad, S., Sanders, L.C., von Schalscha, T.L., Aimes, R.T., Stetler-Stevenson, W.G., Quigley, J.P., Cheresh, D.A. (1996). Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell*, **85**, 683-693
- Brooks, P.C., Silletti, S., von Schalscha, T.L., Friedlander, M., and Cheresh, D.A. (1998). Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metallo-proteinase fragment with integrin binding activity. *Cell*, **92**, 391-400
- Brownlee, M., Vlassara, H., Cerami, A. S. (1985) Non-enzymatic glycosylation products on collagen covalently trap low-density lipoprotein. *Diabetes*, **34**, 938-941
- Brownlee, M. (1993). Lilly Lecture 1993. Glycation and diabetic complications. *Diabetes*, **43**, 836-841
- Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, **414**, 813-820
- Buckley, C. D., Pilling, D., Henriquez, N. V., Parsonage, G., Threlfall, K., Scheel-Toellner, D., Simmons, D. L., Akbar, A. N., Lord, J. M. und Salmon, M (1999). RGD peptides induce apoptosis by direct caspase-3 activation. *Nature* **397**, 534-539
- Bunn, H. F., Higgings, P. J. (1981). Reaction of monosaccharides with proteins: possible evolutionary significance. *Science*, **213**, 222-224
- Carlson, T. R., Feng, Y., Maisonpierre, P. C., Mrksich, M. and Morla, A. O. (2001). Direct cell adhesion to the angiopoietins mediated by integrins. *J. Biol. Chem.*, **276**, 26516-26525
- Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kiekens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoeck, A., Harpal, K., Eberhardt, C., Declercq, C., Pawling, J., Moons, L., Collen, D., Risau, W., Nagy, A. (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, **380**, 435- 439
- Carmeliet, P., Lampugnani, M.G., Moons, L., Breviario, F., Compernelle, V., Bono, F., Balconi, G., Spagnuolo, R, Oosthuysen, B., Dewerchin, M., Zanetti, A., Angellilo, A., Mattot, V., Nuyens, D., Lutgens, E., Clotman, F., de Ruiter, M. C., Gittenberger-de Groot, A., Poelmann, R., Lupu, F., Herbert, J.- M., Collen, D., and Dejana, E. (1999). Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell*, **98**, 147-157
- Carmeliet, P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nature Med.*, **9**, 653-660

- Casaroli Marano, R. P., Preißner, K. T., Vilaro, S. (1995). Fibronectin, laminin, vitronectin and their receptors at newly-formed capillaries in proliferative diabetic retinopathy. *Exp. Eye Res.*, **60**, 5-17
- Cheresh, D. A. (1987) Human endothelial cells synthesize and express an Arg-Gly-Asp-directed adhesion receptor involved in attachment to fibrinogen and von Willebrand factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 6471–6475
- Cheresh, D. A. and Stupack, D. G. (2002). Integrin-mediated death: an explanation of the integrin-knockout phenotype? *Nat. Med.*, **8**, 193–194
- Choi, K. (1998). Hemangioblast development und regulation. *Biochem. Cell. Biol.*, **76**, 947-956
- Clauss, M. (2000). Molecular biology of the VEGF and the VEGF receptor family. *Sem. Thromb. Hemostasis*, **26**, 561-569
- Collins, P. D., Connolly, D. T., Williams, T. J. (1993). Characterization of the increase in vascular permeability induced by vascular permeability factor in vivo. *Br. J. Pharmacol.*, **109**, 195-199
- Conn, G., Bayne, M. L., Soderman, D. D., Kwok, P. W., Sullivan, K. A., Palisi, T. M., Hope, D. A., and Thomas, K. A. (1990). Amino acid and cDNA sequences of a vascular endothelial cell mitogen that is homologous to platelet-derived growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 2628-2632
- Connolly, S. E., Hores, T. A., Smith, L. E. H., D`Amore, P. A. (1988). Characterization of vascular development in the mouse retina. *Microvasc. Res.* **36**, 275-290
- Dahl-Jorgensen, K. (1998). Diabetic microangiopathy. *Acta. Paediatr. Suppl.*, **425**, 31-4
- Davis, S., Papadopoulos, N., Aldrich, T. H., Maisonpierre, P. C., Huang, T., Kovac, L., Xu, A., Leidich, R., Radziejewska, E., Rafique, A., Goldberg, J., Jain, V., Bailey, K., Karow, M., Fandl, J., Samuelsson, S. J., Ioffe, E., Rudge, J. S., Daly, T. J., Radziejewski, C., Yancopoulos, G. D. (2003). Angiopoietins have distinct modular domains essential for receptor binding, dimerization and superclustering. *Nat. Struct. Biol.*, **10**, 38-44
- Detmar, M., Brown, L. F., Schon, M. P., Elicker, B. M., Velasco, P., Richard, L., Fukumura, D., Monsky, W., Claffey, K. P., Jain, R. K. (1998). Increased microvascular density and enhanced leukocyte rolling and adhesion in the skin of VEGF transgenic mice. *J Invest Dermatol.*, **111**, 1-6
- De Vries, C., Escobedo, J. A., Ueno, H., Houck, K., Ferrara, N. and Williams, L. T. (1992). The *fms*-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science*, **255**, 989-991
- Du, X. L., Edelstein, D., Rosetti, L., Fantus, I. G., Goldberg, H., Ziyadeh, F., Wu, J. and Brownlee, M. (2000). Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexoseamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 12222-12226

- Dumont, D.J., Gradwohl, G.J., Fong, G.H., Auerbach, R., Breitman, M.L. (1993). The endothelial-specific receptor tyrosine kinase, tek, is a member of a new subfamily of receptors. *Oncogene*, **8**, 1293-301
- Dvorak, H.F., Brown, L.F., Detmar, M., Dvorak, A.M. (1995). Vascular permeability factor / vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am. J. Pathol.*, **146**, 1029-39
- Early Treatment Diabetic Retinopathy Studie (ETDRS) Group (1991). Results and summary. *Ophthalmology*, (Suppl. 5), **98**, 739-840
- Eliceiri, B. P. and Cheresh, D. A. (1999). The role of av integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. *J. Clin. Invest.*, **103**, 1227-1230
- Esch, F., Baird, A., Ling, N., Veno, N., Hill, F., Denoroy, L., Klepper, R., Gospodarowicz, D., Bohlen, P., Guillemin, R. (1985). Primary structure of bovine pituitary basic fibroblast growth factor (FGF) and comparison with the amino-terminal sequence of bovine brain acidic FGF. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 6507-6511
- Esposito, C., Gerlach, H., Brett, J., Stern, D., Vlassara H. (1989). Endothelial receptor-mediated binding of glucose-modified albumin is associated with increased monolayer permeability and modulation of cell surface coagulant properties. *J. Exp. Med.*, **170**, 1387-1407
- Fallon, T.J., Chowienczyk, P., Kohner, E.M. (1986). Measurement of retinal blood flow in diabetes by the blue-light entoptic phenomenon. *Br. J. Ophthalmol.*, **70**, 43-46
- Ferrara, N. and Henzel, W. J. (1989). Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **161**, 851-858
- Ferrara, N., Houck, K., Jakeman, L., Leung, D. W. (1992). Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr. Rev.* **13**, 18-32
- Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O'Shea, K.S., Powell-Braxton, L., Hillan, K.J., Moore, M.W. (1996). Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*, **380**, 439-442
- Ferrara, N., Chen, H., Davis-Smyth, T., Gerber, H.P., Nguyen, T.N., Peers, D., Chisholm, V., Hillan, K.J., Schwall, R.H. (1998). Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nat. Med.*, **4**, 336-340
- Forsythe, J.A., Jiang, B.H., Iyer, N.V., Agani, F., Leung, S.W., Koos, R.D., Semenza, G.L. (1996). Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 4604-4613
- Friedlander, M., Brooks, P. C., Shaffer, R. W., Kincaid, C. M., Varner, J. A., Cheresh, D.A. (1995). Definition of two angiogenic pathways by distinct α_v integrins. *Science* **270**,

- Friedlander, M., Theesfeld, C. L., Sugita, M., Fruttiger, M., Thomas, M. A., Chang, S., and Cheresch, D. A. (1996). Involvement of integrins $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ in ocular neovascular diseases. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **93**, 9764-9769
- Gerber, H. P., Dixit, V., and Ferrara, N. (1998a). Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, **273**, 13313-13316
- Gerber, H. P., McMurtrey, A., Kowalski, J., Yan, M., Keyt, B. A., Dixit, V., and Ferrara, N. (1998b). Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J. Biol. Chem.*, **273**, 30336-30343
- Gerber, H.P., Hillan, K.J., Ryan, A.M., Kowalski, J., Keller, G.A., Rangell, L., Wright, B.D., Radtke, F., Aguet, M., Ferrara, N. (1999a). VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development*, **126**, 1149-1159
- Gerber, H.P., Vu, T.H., Ryan, A.M., Kowalski, J., Werb, Z., Ferrara, N. (1999b). VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat. Med.*, **5**, 623-628
- Germer, M., Kanse, S. M., Kirkegaard, T., Kjoller, L., Felding-Habermann, B., Goodman, S., Preissner, K. T. (1998). Kinetic analysis of integrin-dependent cell adhesion on vitronectin – the inhibitory potential of plasminogen activator inhibitor-1 and RGD-peptides. *Eur. J. Biochem.* **253**, 669-674
- Giardino, I, Edelstein, D., Brownlee, M. (1994). Nonenzymatic glycolysation in vitro and in bovine endothelial cells alters basic fibroblast growth factor activity. A model for intracellular glycosylation in diabetes. *J. Clin. Invest.*, **94**, 110-117
- Giugliano, D., Ceriello, A., Paolisso, G. (1996). Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care*, **19**, 257-267
- Goede, V., Schmidt, T., Kimmina, S., Kozian, D., Augustin, H.G. (1998). Analysis of blood vessel maturation processes during cyclic ovarian angiogenesis. *Lab Invest.*, **78**, 1385-1394
- Goldberg, M. A. and Schneider, T. J. (1994). Similarities between the oxygen-sensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin. *J. Biol. Chem.*, **269**, 4355-4359
- Gospodarowicz, D., Abraham, J. A., Schilling, J. (1989). Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 7311-7315
- Grunwald, J.E., Riva, C.E., Petrig, B.L., Sinclair, S.H., Brucker, A.J. (1984a). Effect of pure O₂-breathing on retinal blood flow in normals and in patients with background diabetic retinopathy. *Curr. Eye. Res.*, **3**, 239-241

- Grunwald, J.E., Riva, C.E., Brucker, A.J., Sinclair, S.H., Petrig, B.L. (1984b). Altered retinal vascular response to 100% oxygen breathing in diabetes mellitus. *Ophthalmology*, **91**, 1447-1452
- Haitoglou, C. S., Tsilibary, E. C., Brownlee, M., Charonis, A. S. (1992). Altered cellular interactions between endothelial cells and nonenzymatically glycosylated laminin / type IV collagen. *J. Biol. Chem.*, **267**, 12404-12407
- Hammes, H.-P., Brownlee, M., Jonczyk, A., Sutter, A., and Preissner, K. T. (1996a). Subcutaneous injection of a cyclic peptide antagonist of vitronectin receptor-type integrins inhibits retinal neovascularization. *Nat. Med.* **2**, 529-533
- Hammes, H. P., Weiss, A., Hess, S., Araki, N., Horiuchi, S., Brownlee, M. und Preißner, K. T., (1996b). Modification of vitronectin by advanced glycation alters functional properties in vitro and in the diabetic retina. *Lab. Invest.*, **75**, 325-338
- Hammes, H.-P., Lin, J., Bretzel, R. G., Brownlee, M., and Breier, G. (1998). Upregulation of the vascular endothelial growth factor / vascular endothelial growth factor receptor system in experimental background diabetic retinopathy of the rat. *Diabetes*, **47**, 401-406
- Hammes, H.-P., Du, X., Edelstein, D., Taguchi, T., Matsumura, T., Ju, Q., Lin, J., Bierhaus, A., Nawroth, P., Hannak, D., Neumaier, M., Bergefeld, R., Giardino, I. und Brownlee, M. (2003). Benfotiamin block three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy. *Nat. Med.*, **9**, 294-299
- Hanahan, D. and Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, **86**, 353-364
- Hanahan, D. (1997). Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* **277**, 48-50
- Hanneken, A., de Juan, E. Jr., Luttj, G. A., Fox, G. M., Schiffer, S., Hjelmeland, L.M. (1991). Altered distribution of basic fibroblast growth factor in diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol.*, **109**, 1005-11
- Harris, A., Arend, O., Danis, R.P., Evans, D., Wolf, S., Martin, B.J. (1996). Hyperoxia improves contrast sensitivity in early diabetic retinopathy. *Br. J. Ophthalmol.*, **80**, 209-213
- Hellstrom, M., Kaln, M., Lindahl, P., Abramsson, A., Betsholtz, C. (1999). Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development*, **126**, 3047-3055
- Hellstrom, M., Gerhardt, H., Kalen, M., Li, X., Eriksson, U., Wolburg, H., Betsholtz, C. (2001). Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J. Cell Biol.*, **153**, 543-553
- Hiraoka, N., Allen, E. Apel, I. J., Gyetko, M. R., and Weiss, S. J. (1998). Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolytic enzymes. *Cell* **95**, 365-377

- His W. (1900). Leoithoblast und Angioblast der Wirbelthiere. *Abhandl K S Ges Wiss Math Phys.*, **22**, 171–328
- Holash, J., Maisonpierre, P. C., Copmton, D., Boland, P., Alexander, C. R., Zagzag, D. Yancopoulos, G. D., Wiegand, S. J. (1999). Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science*, **284**, 1994-1998
- Hood, J. D. and Cheresch, D. A. (2002). Role of integrins in cell invasioin and migration. *Nat. Rev. Cancer*, **2**, 91-100
- Hood, J. D., Frausto, R., Kiosses, W. B., Schwartz, M. A. and Cheresch, D. A. (2003). Differential av integrin–mediated Ras-ERK signaling during two pathways of Angiogenesis. *J. Cell Biol.*, **162**, 933-943
- Hughes, S., Yang, H., Chan-Ling, T. (2000). Vascularization of the human fetal retina: roles of vasculogenesis and angiogenesis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **41**, 1217-28
- Hunt, J. V., Dean, R. T., Wolf S. P. (1988). Hydroxy radical production and antioxidative glycosylation: glucosyl autooxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing. *Biochemistry*, **256**, 205-212
- Hynes, R. O. (2002). A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis. *Nat. Med.*, **8**, 918-921
- Imhof, B. A., Weerasinghe, D., Brown, E. J., Lindberg, F. P., Hammel, P., Piali, L., Dessing, M., Gisler, R. (1997). Cross talk between alpha(v)beta3 and alpha4beta1 integrins regulates lymphocyte migration on vascular cell adhesion molecule 1. *Eur. J. Immunol*, **27**, 3242-3252
- Ingber, D. E. and Folkman, J. (1989). How does extracellular matrix control capillary morphogenesis? *Cell*, **58**, 803-805
- Jain, R. K. (2003). Molecular regulation of vessel maturation. *Nat. Med.*, **9**, 685-693
- Jakeman, L. B., Winer, J., Bennet, G. L., Altar, C. A., Ferrara, N. (1992). Binding sites for vascular endothelial growth factor are localized on endothelial cells in adult rat tissues. *J. Clin. Invest.* **89**, 244-253
- Javerzat, S., Auguste, P. and Bikfalvi, A. (2002). The role of fibroblast growth factors in vascular development *Trends Mol. Med.*, **8**, 483-489
- Kent, M. J. C., Light, N. D. Bailey, A. J. (1985). Eidence for glucose-mediated covalent cross-linking of collagen after glycosylation in vitro. *Biochem. J.*, **225**, 745-752
- Keogh, R. J., Dunlop, M. E. und Larkins, R. G. (1997). Effect of inhibition of aldose reductase on glucose flux, diacylglycerol formation , protein kinase C, and phospholipase A2 activation. *Metabolism*, **46**, 41-47
- Kimura, H., Weisz, A., Kurashima, Y., Hashimoto, K., Ogura, T., D'Acquisto, F., Addeo, R., Makuuchi, M, Esumi, H. (2000). Hypoxia response element of the human vascular

- endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide. *Blood*, **95**, 189-197
- Klein, R., Klein, B. E., Moss, S. E., Davis, M. D., DeMets, D. L. (1987). The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. VI. Retinal photocoagulation. *Ophthalmology*, **94**, 747-53
- Kohner, E.M., Patel, V., Rassam, S.M. (1995). Role of blood flow and impaired autoregulation in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetes*, **44**, 603-607
- Kolm-Litty, V., Sauer, U., Nerlich, A., Lehmann, R. und Schleicher, E. D. (1998). High glucose-induced transforming growth factor beta production is mediated by the hexoseamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. *J. Clin. Invest.*, **191**, 160-169
- Korshunow, S. S., Skulachev, V. P. und Starkov, A. A. (1997). High protonic potential Activates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett.*, **416**, 15-18
- Koya, D. und King, G. L. (1998). Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes*, **47**, 859-866
- Lamoreaux, W. J., Fitzgerald, M. E. C., Reiner, A., Hasty, K. A., and Charles, S. T. (1996). Vascular endothelial growth factor increases release of gelatinase A and decreases release of tissue inhibitor of metalloproteinases by microvascular endothelial cells in vitro. *Microvasc. Res.*, **55**, 29-42
- Lee, C. M. und Olk, R. J. (1991). Modified grid laser photocoagulation for diffuse diabetic macular edema. Long-term visual results. *Ophthalmology*, **98**, 1594-1602
- Levy, A.P., Levy, N.S., Goldberg, M.A. (1996). Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia. *J. Biol. Chem.*, **271**, 2746-2753
- Maisonpierre, P. C., Suri, C., Jones, P. F., Bartunkova, S., Wiegand, S. J., Radziejewski, C., Compton, D., McClain, J., Aldrich, T. H., Papadopoulos, N., Daly, T. J., Sato, T. N., Yancopoulos, G. D. (1997) Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie-2 that disrupts *in vivo* angiogenesis. *Science* **277**, 55-60
- Meredith, J. E. Jr., Fazeli, B., Schwartz, M.A. (1993). The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol Biol Cell.*, **4**, 953-61
- Meyer, M., Clauss, M., Lepple-Wienhues, A., Waltenberger, J., Augustin, H.G., Ziche, M., Lanz, C., Buttner, M., Rziha, H.J., Dehio, C. (1999). A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *EMBO J.*, **18**, 363-374
- Michaelson, I. C. (1948). The mode of development of the vascular system of the retina, with some observation in its significance for certain retinal diseases. *Eye* **68**, 137-180
- Millauer, B., Wizigmann-Voos, S., Schnurch, H., Martinez, R., Moller, N.P., Risau, W.,

- Ullrich, A. (1993). High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell*, **26**, 835-46
- Montesano, R., Orci, L., and Vassalli, P. (1983). In vitro rapid organization of endothelial cells into capillary-like networks is promoted by collagen matrices. *J. Cell Biol.* **97**, 1648-1652
- Morikawa, S., Baluk, P., Kaidoh, T., Haskell, A., Jain, R.K., McDonald, D.M. (2002). Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *Am. J. Pathol.*, **160**, 985-1000
- Nakamura, T., Mochizuki, Y., Kanetake, H., Kanda, S. (2001). Signals via FGF receptor 2 regulate migration of endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **289**, 801-6
- Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X. L., Yamagishi, S., Matsumura, T., Kaneda, Y., Yorek, M. A., Beebe, D., Oates, P. J., Hammes, H.-P., Girardino, I., Brownlee, M. (2000). Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*, **404**, 787-790
- Orlidge, A. and D'Amore, P.A. (1987). Inhibition of capillary endothelial cell growth by pericytes and smooth muscle cells. *J. Cell. Biol.*, **105**, 1455-1462
- Paget, C., Lecomte, M., Ruggiero, D., Wiernsperger, N., Lagarde, M. (1998). Modification of enzymatic antioxidants in retinal microvascular cells by glucose or advanced glycation end products. *Free Radic. Biol. Med.*, **25**, 121-129
- Patz, A. (1980). Studies on retinal neovascularization. Friedenwald Lecture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **19**, 1133-1138
- Pe`er, J., Shweiki, D., Itin, A., Hemo, I., Gnessin, H., Keshet, E. (1995). Hypoxia-induced expression of vascular endothelial growth factor by retinal cells is a common factor in neovascularizing ocular diseases. *Lab. Invest.* **72**, 638-645
- Pepper, M.S. (1997) Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. *Cytokine Growth Factor Rev.*, **8**, 21-43
- Pepper, M. S., Mandriota, S. J. (1998). Regulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1) expression in vascular endothelial cells. *Exp Cell Res.*, **15**, 414-25
- Pfaff, M., Tangemann, K., Muller, B., Gurrath, M., Muller, G., Kessler, H., Timpl, R., Engel, J. (1994). Selective recognition of cyclic RGD peptides of NMR defines conformation by alpha IIb beta 3, alpha V beta 3, alpha 5 beta 1 integrins. *J. Biol. Chem.* **269**, 20233-20238
- Pierce, E. A., Avery, R. L., Foley, E. D., Aiello, L. P. & Smith, L. E. H. (1995). Vascular endothelial growth factor / vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 905-909
- Pierce, E. A., Foley, E. D. & Smith, L. E. (1996). Regulation of vascular endothelial growth factor by oxygen in a model of retinopathy of prematurity. *Arch. Ophthalmol.*, **114**, 1219-1228 [Erratum erschienen in *Arch. Ophthalmol.*, **115**, 427 (1996)]

- Reynolds, L.E., Wyder, L., Lively, J.C., Taverna, D., Robinson, S.D., Huang, X., Sheppard, D., Hynes, R.O., Hodivala-Dilke, K.M. (2002). Enhanced pathological angiogenesis in mice lacking beta3 integrin or beta3 and beta5 integrins. *Nat. Med.*, **8**, 27-34
- Rimmer, T., Fallon, T.J., Kohner, E.M. (1989). Long-term follow-up of retinal blood flow in diabetes using the blue light entoptic phenomenon. *Br. J. Ophthalmol.*, **73**, 1-5
- Roberts, W. G., Palade, G. E. (1995). Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J. Cell Sci.*, **108**, 2369-79
- Risau, W., (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, **386**, 671-674
- Risau, W., Flamme, I. (1995). Vasculogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **11**, 73-91
- Rousseau, B., Larrieu-Lahargue, F., Bikfalvi, A., Javerzat, S. (2003). Involvement of fibroblast growth factors in choroidal angiogenesis and retinal vascularization. *Exp. Eye. Res.*, **77**, 147-56
- Sato, T. N., Tozawa, Y, Deutsch, U., Wolburg-Buchholz, K. Fujiwara, Y., Gendron-Maguire, M., Gridley, T., Wolburg, H., Risau, W., Qin, Y. (1995). Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature*, **376**, 70-74
- Schmidt, A.M., Vianna, M., Gerlach, M., Brett, J., Ryan, J., Kao, J., Esposito, C., Hegarty, H., Hurley, W., Clauss, M. (1992). Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. *J. Biol. Chem.*, **267**, 14987-14997
- Schwartz, M.A., Assoian, R.K. (2001). Integrins and cell proliferation: regulation of cyclin-dependent kinases via cytoplasmic signaling pathways. *J. Cell. Sci.*, **114**, 2553-60
- Semenza, G.L. and Wang, G.L. (1992). A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 5447-5454
- Senger, D. R., Ledbretter, S. R., Claffey, K. P., Papadopoulos-Sergiou, A., Peruzzi, C. A., Detmar, M. (1996). Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor / vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the $\alpha_v\beta_3$ integrin, osteopontin, and thrombin. *Am. J. Pathol.* **149**, 293-306
- Sepp, N. T., Li, L-J., Lee, K. H., Brown, E. J., Caughman, S. W., Lawley, T. J., Swerlik, R. A. (1994). Basic fibroblast growth factor increases expression of the $\alpha_v\beta_3$ integrin complex on human microvascular endothelial cells. *J. Invest. Dermatol.* **103**, 295-299
- Shi, Q., Rafii, S., Wu, M.H.-D., Wijelath, E.S., Yu, C., Ishida, A., Fujita, Y., Kothari, S., Mohle, R., Sauvage, L.R., Moore, M.A.S., Storb, R.F., Hammond, W.P. (1998). Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood*, **92**, 362-367
- Shima, D.T., Deutsch, U., D'Amore, P.A. (1995). Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human epithelial cells is mediated by increases in mRNA stability. *FEBS Lett.*, **370**, 203-208

- Shing, Y., Folkman, J., Sullivan, R., Butterfield, C., Murray, J., Klagsbrun, M. (1984). Heparin-affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. *Science*, **223**, 1296– 1298
- Shing, Y., Folkman, J., Haudenschild, C., Lund, D., Crum, R., Klagsbrun, M. (1985). Angiogenesis is stimulated by a tumor-derived endothelial cell growth factor. *J. Cell. Biochem.*, **29**, 275– 287
- Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D., and Keshet, E. (1992). Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* **359**, 843-845
- Sinclair, S.H. (1991). Macular retinal capillary hemodynamics in diabetic patients. *Ophthalmology*, **98**, 1580-1586
- Sivalingam, A., Kenney, J., Brown, G. C., Benson, W. E., Donoso, L. (1990). Basic fibroblast growth factor levels in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol.*, **108**, 869-72
- Smith, L. E. H., Wesolowski, E., McLellan, A., Kostyk, S. K., D`Amato, R., Sullivan, R., D`Amore, P. A. (1994). Oxygen induced retinopathy in the mouse. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.*, **35**, 101-110
- Staubach, F. und Lagrèze, W. A. (2002). Frühgeborenenretinopathie. *Monatsschr. Kinderheilkd.*, **150**, 302-308
- Stratmann, A., Risau, W., Plate, K. H. (1998). Cell type-specific expression of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 suggests a role in glioblastoma angiogenesis. *Am. J. Pathol.* **153**, 1459-66
- Strömblad, S., Becker, J. C., Yebra, M., Brooks, P. C. and Cheresh, D. A. (1996). Suppression of p53 activity and p21 WAF1/CIP1 expression by vascular cell integrin $\alpha v \beta 3$ during angiogenesis. *J. Clin. Invest.*, **98**, 426-433
- Stupack, D. G., Puente, X. S., Boutsaboualoy, S., Storgard, C. M. and Cheresh, D. A. (2001). Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins. *J. Cell Biol.*, **155**, 459-470
- Stupack, D. G. and Cheresh, D. A. (2002). Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *J. Cell Sci.*, **115**, 3729-3738
- Suri, C., Jones, P. F., Patan, S., Bartunkova, S., Maisonpierre, P. C., Davis, S., Sato, T. N., and Yancopoulos, G. D. (1996). Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* **87**, 1171-1180
- Suri, C., McClain, J., Thurston, G., McDonald, D. M., Zhou, H., Oldmixon, E. H., Sato, T. N., Yancopoulos, G. D. (1998). Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1. *Science*, **282**, 468-471
- Tanaka, S., Avigad, G., Brodsky, B., Eikenberry, E. F. (1988). Glycation induces expansion of the molecular packing of collagen. *Mol Biol.*, **203**, 495-505

- The Diabetes Control and Complication Trial Research Group (1993). The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *New Engl. J. Med.*, **329**, 977-986
- Thieme, H., Aiello, L. P., Ferrara, N., King, G. L. (1995). Comparative analysis of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors on retinal and aortic microvascular endothelial cells. *Diabetes* **44**, 98-103
- Thurston, G., Suri, C., Smith, K., McClain, J., Sato, T. N., Yancopoulos, G. D., McDonald, D. M. (1999). Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science*, **286**, 2511-2514
- Thurston, G., Rudge, J.S., Ioffe, E., Zhou, H., Ross, L., Croll, S.D., Glazer, N. Holash, J, McDonald, D.M., Yancopoulos, G.D. (2000). Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nat. Med.*, **6**, 460-463
- Torres Filho I. P., Leunig, M., Yuan, F., Intaglietta, M., Jain, R. K. (1994). Noninvasive measurement of microvascular and interstitial oxygen profiles in a human tumor in SCID mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 2081-2085
- Tsilibary, E. C., Charonis, A. S., Reger, L. A., Wohlhueter, R. M., Furcht, L. T. (1988). The effect of nonenzymatic glycosylation on the binding of the main noncollagenous NC1 domain to type IV collagen. *J. Biol. Chem.*, **263**, 4302-4308
- van der Flier, A. and Sonnenberg, A. (2001). Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res.*, **305**, 285-298
- Weiss, A., Schlessinger, J. (1998) Switching signals on or off by receptor dimerization. *Cell*, **94**, 277-280
- Wells-Knecht, K.J., Zyzak, D.V., Litchfield, J.E., Thorpe, S.R., Baynes, J.W. (1995). Mechanism of autoxidative glycosylation : identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose. *Biochemistry*, **34**, 3702-3709
- Yamaguchi, T.P., Dumont, D.J., Conlon, R.A., Breitman, M.L., Rossant J. (1993). flk-1, andflt- related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors. *Development*, **118**, 489-498
- Yan, S.D., Schmidt, A.M., Anderson, G.M., Zhang, J., Brett, J., Zou, Y.S., Pinsky, D., Stern, D. (1994). Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J. Biol. Chem.*, **269**, 9889-9897
- Zhang, Z., Coomans, C., David, G. (2001). Membrane heparan sulfate proteoglycan-supported FGF2-FGFR1 signaling: evidence in support of the "cooperative end structures" model. *J. Biol. Chem.*, **276**, 41921-41929

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Professor Dr. H.-P. Hammes für die Überlassung des Themas, viele anregende Diskussionen und die fachliche und persönliche Unterstützung.

Matthias Germer danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei den *in-vitro*-Adhäsionsassays.

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich während der langen Studienjahre immer unterstützt haben.

Alle Mitglieder der Forschungsgruppe für experimentelle Retinologie der III. Medizinischen und Poliklinik der Justus Liebig-Universität Gießen haben durch ihre Gesprächsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Dafür möchte ich mich bei allen sehr herzlich bedanken.

Inhibition of angiogenesis with low molecular weight antagonists of the vitronectin type integrin receptor – *in-vivo*-studies in the murine retina

Purpose: Microvascular abnormalities in diabetes as well as retinopathy of prematurity and other ischemic retinopathies lead to the uncontrolled formation of new blood vessels in the hypoxic retina. In the murine model of hypoxia induced retinopathy small peptide antagonists of the vitronectin type integrin receptor (VNR) inhibit retinal neovascularization (RNV) highly effective when systemic treatment is initiated prior to the onset of angiogenesis (Hammes et al., 1996). Clinically relevant questions remain whether this approach is effective on preexisting and active retinal neovascularization and whether antagonists of the VNR can be topically administered as long as systemic applications carry the risks of side effects and repeated intraocular injections are impracticable within the clinical setting. The aim of this study was to investigate a) the dynamics of integrin and growth factor expression in the murine model of oxygen induced retinopathy, b) ligation inhibition of the VNR as a secondary intervention after the onset of angiogenesis and c) the efficacy of the RGD-antagonist in inhibiting RNV when topically applied by the means of eye drops.

Methods: Seven day old mice were exposed to 75% of oxygen for five days. After the return to room air the kinetics of angiogenesis in the retina was studied by analyzing a) the expression of α_v -type integrins, vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor-2 by performing western blot analysis and b) the time course of neovascularization by performing fluorescein angiographies and quantitative histology. Based on the findings systemic treatment with varying doses of RGD-peptide was initiated with a delay of two or five days after the return to room air and was continued for five days. In a topical application trial the peptide antagonist was epicorneally administered in a specially developed eye drop solution. The effect of the treatments was evaluated by fluorescein angiographies and quantitative histology.

Results: Immediately after induction of hypoxia, expression of α_v -type integrins was highest and then rapidly declined. VEGF expression was high during the initial phase of angiogenesis and then declined to baseline levels, while bFGF was continuously present throughout the neovascularization period. Maximal extent of angiogenesis was noted between day p17 and p19. Early secondary intervention treatment reduced preretinal neovascularizations in a dose dependent manner with a maximum of 56%. Delayed secondary intervention had no inhibitory effect of preretinal neovascularization, even at the maximum efficient dose of earlier treatments. No side effects have been observed by histological examination of parenchymal organs such as heart or kidney. RGD-eye drop treatment reduced preretinal endothelial cell nuclei dose dependently with a maximum of 48%.

Conclusion: With low molecular weight integrin antagonists the effective inhibition of an ongoing process of angiogenesis can be achieved without detectable side effects. Timely intervention is of crucial importance for the efficacy of this approach. The findings indicate that angiogenesis related α_v -integrin expression is VEGF- rather than FGF-2-dependent, and the efficacy of RGD-treatment in proliferative retinopathy is only effective as long as the α_v -integrin target is predominantly expressed. The cRGDfV-antagonist used is a small pentapeptide of which size and biochemical properties enable topical application and lead to sufficient concentrations in the retina to inhibit angiogenesis after epicorneal administration. The topical application by the means of eye drops has the potential of maximizing the therapeutic effect of angiostatic agents while minimizing possible, yet unknown, systemic side effects. It reflects a clinically feasible long term application method that circumvents systemical delivery and intraocular injections.

Angiogenesehemmung durch niedermolekulare Peptidantagonisten des Vitronektinrezeptors — Modellversuche an der Retina der Maus

Einleitung: Mikrovaskuläre Veränderungen bei Diabetes mellitus sowie Frühgeborenenretinopathie und andere ischämische Netzhauterkrankungen führen zu unkontrollierter Gefäßneubildung in der hypoxischen Netzhaut. Im Mausmodell hypoxieinduzierter Retinopathie hemmen niedermolekulare Peptidantagonisten des Integrinrezeptors vom Vitronektintyp (VNR) retinale Neovaskularisationen (RNV) sehr effektiv, wenn eine systemische Behandlung vor dem Einsetzen der Angiogenese begonnen wird (Hammes et al., 1996). Klinisch relevante Fragestellungen sind, ob dieser Ansatz bei präexistierenden und aktiven retinalen Neovaskularisationen effektiv ist und, ob VNR-Peptidantagonisten topisch appliziert werden können, da anhaltende systemische Verabreichung das Risiko unerwünschter Wirkungen birgt und wiederholte intraokuläre Injektionen klinisch impraktikabel sind. Zielsetzung war es, a) die Dynamik der Integrin- und Wachstumsfaktorexpression in dem Mausmodell sauerstoffinduzierter Retinopathie, b) die Ligationshemmung des VNR als Sekundärinterventionsansatz nach dem Beginn der Angiogenese und c) die hemmende Kapazität des RGD-Peptidantagonisten auf präretinale Neovaskularisationen nach topischer Applikation in Form von Augentropfen zu untersuchen.

Methoden: Sieben Tage alte Mäuse wurden für fünf Tage 75%igem Sauerstoff ausgesetzt. Nach der Rückkehr in Raumluft wurde die Kinetik retinaler Angiogenese a) durch Western-Blot-Analyse der Expression des α_v -Integrins sowie des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors und des Fibroblastenwachstumsfaktors und b) mittels Fluoreszenzangiographien und quantitativer Histologie an verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Den Ergebnissen zufolge wurde die fünftägige systemische Therapie verschiedener Dosierungen des RGD-Peptids mit einer Verzögerung von zwei beziehungsweise fünf Tagen nach der Rückkehr in Raumluft eingeleitet. In einem Augentropfen-Therapieansatz wurde der Peptid-Antagonist in einer speziell hergestellten Lösung topisch appliziert. Das jeweilige Therapieergebnis wurde mittels Fluoreszenzangiographien und quantitativer Histologie evaluiert.

Ergebnisse: Direkt nach Beginn der Hypoxiephase war die α_v -Integrinexpression am ausgeprägtesten, es folgte ein schneller Rückgang. Die VEGF-Expression war während der initialen Angiogeneseperiode erhöht und sank anschließend auf basale Werte, während FGF-2 während der gesamten Angiogeneseperiode ausgeprägt war. Maximale Gefäßneubildung wurde zwischen dem Tag p17 und p19 beobachtet. Der frühe Sekundärinterventionsansatz reduzierte präretinale Neovaskularisationen dosisabhängig mit einer maximalen Hemmung von 56%. Die weiter verzögerte Therapie zeigte auch mit der Maximaldosis keinen Effekt. Bei der histologischen Begutachtung parenchymatöser Organe wie Herz oder Niere wurden keine Nebenwirkungen beobachtet. Die Augentropfentherapie erbrachte eine dosisabhängige Wirkung mit einem Maximaleffekt von 48%.

Schlussfolgerung: Mit niedermolekularen Integrin-Peptidantagonisten kann eine wirkungsvolle Inhibition eines aktiven Angiogeneseprozesses ohne erkennbare Nebenwirkungen erzielt werden. Frühzeitige Intervention ist hierbei von entscheidender Bedeutung. Nach den Ergebnissen ist die angiogeneseassoziierte α_v -Integrinexpression eher VEGF- als FGF-2 abhängig und die Effektivität der RGD-Therapie bei angioproliferativer Retinopathie ist nur solange gegeben, wie das Zielmolekül exprimiert wird. Größe und biochemische Eigenschaften des Peptids ermöglichen seine topische Applikation und wirkungsvolle Hemmkonzentrationen an der Netzhaut. Dieser Ansatz ermöglicht es, potentielle Nebenwirkungen zu minimieren und den therapeutischen Effekt zu maximieren. Er stellt eine klinisch durchführbare Langzeitapplikationsform dar, die systemische Verabreichung und intraokuläre Injektionen umgeht.

CURRICULUM VITAE

Björn Riecke
Pestalozzistraße 10
10625 Berlin

Persönliche Angaben

Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Alter:	29 Jahre
Geburtstag:	02.08.1974
Geburtsort:	Frankfurt am Main

Schulbildung

1980 – 1984	Astrid-Lindgren Grundschule, Dietzenbach, Hessen
1984 – 1986	Förderstufe Bachschule Offenbach, Offenbach am Main
1986 – 1993	Leibnizgymnasium Offenbach, Abschluß Abitur

Studium

1993 – 1999	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität zu Gießen Praktisches Jahr an der Justus-Liebig-Universität Gießen, Wahlfach Mund- Kiefer- und Gesichtschirurgie
Oktober 1999	Beginn des Studiums der Zahnmedizin an der Freien Universität zu Berlin
28.10.1999	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2001	Studium der Zahnmedizin an der Humboldt Universität Berlin
12.11.2004	Approbation als Zahnarzt

Vorträge und Veröffentlichungen zum Thema

Postervortrag zum 103. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin in Wiesbaden, 05.-09. April 1997; Hammes, H.-P., Riecke, B., Chavakis, E., Lin, J., Brownlee, M., Preissner, K. T.: "Sekundärintervention von Retina-Neovaskularisationen durch subkutane Injektion eines zyklischen RGD-Peptid-Antagonisten", abstract in *Medizinische Klinik* (1997), 92, S. 149

Ausgezeichnet von der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin mit dem 1. Posterpreis und 5.000 DM.

Vortrag zum Kongress der Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), 10.-15. Mai 1998, Ft. Lauderdale, Florida, USA; Riecke, B., Chavakis, E., Brownlee, M., Preissner, K. T., Hammes, H.-P.: "Targeting active neovascularization with cyclic RGD-peptides in the ROP-model", abstract in *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* (1998), 39, p. 652

Postervortrag zur 33. Jahrestagung der Deutschen Diabetes-Gesellschaft in Leipzig, 21.-23. Mai 1998; Riecke, B., Chavakis, E., Bretzel, R. G., Brownlee, M., Preissner, K. T., Hammes, H.-P.: "Blockade aktiver Neovaskularisationen mit zyklischen RGD-Antagonisten in dem Mausmodell der O₂-induzierten Retinopathie", abstract in *Diabetes und Stoffwechsel*, (1998) Supplement-Heft, S. 59, Mai 1998

Vortrag zum Kongress der Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), 9.-14. Mai 1999, Ft. Lauderdale, Florida, USA; Riecke, B., Chavakis, E., Brownlee, M., Preissner, K. T., Hammes, H.-P.: "Cyclic RGD-peptide eye drops inhibit proliferative retinopathy in the ROP-model", abstract in *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* (1999), 40, p. 172

Vortrag zur Eleventh European Students' Conference at the medical school of the Humboldt University of Berlin, Charité, Berlin, 22.-25. November 2000; Riecke, B., Chavakis, E., Alt, A. Preissner, K. T., Brownlee, M., Hammes, H.-P.: "Inhibition of active proliferative retinopathy with integrin antagonists and success of topical application"

Ausgezeichnet mit dem dritten Preis des MLP-Future-Awards und 2.000 DM.

Abstract unter www.esc-berlin.com/11th/winners

Originalartikel

Riecke, B., Chavakis, E., Bretzel, R. G., Linn, T., Preissner, K. T., Brownlee, M., Hammes, H.-P. (2001). Topical application of integrin antagonists inhibits proliferative retinopathy. *Horm. Metabolic Res.*, **33**, 307 – 311

Chavakis, E., Riecke, B., Lin, J., Linn, T., Bretzel, R. G., Preissner, K. T., Brownlee, M., Hammes, H.-P. (2002). Kinetics of integrin expression in the mouse model of proliferative retinopathy and success of secondary intervention with cyclic RGD peptides. *Diabetologia*, **45**, 262-267