

Aus dem Zentrum für Augenheilkunde der Universität zu Köln,
Lehrstuhl für Experimentelle Immunologie des Auges
Direktor: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Th. Langmann

Koinhibition von PGF und VEGF hemmt deren Expression in mononukleären Phagozyten
und limitiert Neovaskularisation und Leckagen in der murinen Retina

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Carsten Balser
aus Marl

promoviert am 08. September 2020

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln im Jahr 2020.

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. T. Langmann

2. Gutachterin: Universitätsprofessorin Dr. med. S. A. Eming

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich keine Unterstützungsleistungen erhalten.

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 24/2011) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 10.05.2020

Unterschrift:

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Frau Anne Wolf von mir selbst ausgeführt worden.

Danksagung

Ich danke dem gesamten Team am Lehrstuhl für Experimentelle Immunologie des Auges für die gute Zusammenarbeit und die stetige Hilfe. Inständiger Dank gebührt meiner Supervisorin Anne Wolf, M.Sc. für die einmalig gute Betreuung und den unermüdlichen Einsatz, für den sie stets viel Geduld an den Tag legte. Zu guter Letzt danke ich Univ.-Prof. Dr. Thomas Langmann für die Ermöglichung des Forschungsprojekts und die Ermöglichung dessen Vorstellung auf mehreren Forschungskongressen.

Widmung

*Für meine geliebten Eltern Klaus und Vera Balser,
für deren end- und selbstlose Unterstützung
ich zutiefst dankbar bin*

Inhaltsverzeichnis

Erklärung	2
Danksagung	4
Widmung	5
Inhaltsverzeichnis	6
Abkürzungsverzeichnis	8
1. Einleitung	10
1.1 Aufbau und Funktion der Netzhaut	10
1.2 Retinales Pigmentepithel	11
1.3 Altersbedingte Makuladegeneration	12
1.3.1 Pathophysiologie und Stadien der AMD	13
1.3.2 Ätiologie der AMD	15
1.3.3 Therapie und Prophylaxe der AMD	16
1.4 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	17
1.5 Placental Growth Factor (PGF)	18
1.6 Mononukleäre Phagozyten	19
1.7 Zytokine	21
1.7.1 IL-6	21
1.7.2 IL-1 β	21
1.7.3 TNF α	22
1.8 Unterschiede zwischen Primaten- und Mäusenetzhaut	22
1.9 Versuchsdesign	23
1.10 Zielsetzung	24
2. Publikation	25
3. Diskussion	37
3.1 Übersicht	37
3.2 Rolle von VEGF und PGF	37
3.3 Rolle der mononukleären Phagozyten	39
3.4 Koinhibition vs. Einzelhemmung von VEGF und PGF	41

3.5	Methodik	43
3.6	Ausblick	44
4.	Zusammenfassung	45
5.	Abbildungsverzeichnis	45
6.	Literaturverzeichnis	46
7.	Lebenslauf	55

Abkürzungsverzeichnis

AMD	<i>Altersbedingte Makuladegeneration</i>
aPGF	<i>anti-Placental-Growth-Factor</i>
AREDS	<i>Age-Related Eye Disease Study</i>
ARMS2	<i>Age-Related Maculopathy Susceptibility 2</i>
aVEGF	<i>anti-Vascular Endothelial Growth Factor</i>
CCL2	<i>CC-Chemokin Ligand 2</i>
CFH	<i>Komplementfaktor H</i>
CNV	<i>Choroidale Neovaskularisation</i>
DAMPs	<i>Damage-associated molecular patterns</i>
Flt-1	<i>Fms-like tyrosine kinase-1</i>
HIF-1	<i>Hypoxie induzierter Faktor 1</i>
HTRA1	<i>Serinprotease high-temperature requirement A1</i>
IgG	<i>Immunglobulin G</i>
IgG1	<i>Immunglobulin G1</i>
IHC	<i>Immunhistochemie</i>
IL-1 β	<i>Interleukin 1 beta</i>
IL-6	<i>Interleukin 6</i>
ISH	<i>In-situ-Hybridisierung</i>
IVOM	<i>Intravitreale operative Medikamentengabe</i>
KDR	<i>Kinase insert domain receptor</i>
MPs	<i>Mononukleäre Phagozyten</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
OCT	<i>Optische Kohärenztomographie</i>
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PGF	<i>Placental Growth Factor</i>
RNA	<i>Ribonukleinsäure</i>
ROP	<i>Retinopathy of prematurity</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RPE	<i>Retinales Pigmentepithel</i>
TNF α	<i>Tumornekrosefaktor alpha</i>
TSPO	<i>Translocator protein (18 kDa)</i>

VEGF _____ *Vascular Endothelial Growth Factor*

VEGFR _____ *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*

ZNS _____ *Zentrales Nervensystem*

1. Einleitung

1.1 Aufbau und Funktion der Netzhaut

Da die in dieser Schrift thematisierte Erkrankung eine Erkrankung der Netzhaut ist, werde ich zunächst auf den Aufbau dieser eingehen. Zwar wurden die Experimente an murinen Augen durchgeführt, die folgenden Erläuterungen beziehen sich jedoch auf die Primaten-Retina. Erwähnenswerte Unterschiede zwischen Mäuse- und Primatennetzhaut sind in Kapitel 1.8 zu finden.

Die Retina, deren Hauptfunktion die Umwandlung der in das Auge einfallenden Lichtreize in ein elektrisches Potenzial ist, kleidet als ein komplexes System von mehreren Nervenzellschichten den Bulbus von innen aus. Anhand der Präsenz von Photorezeptoren unterteilt man die Netzhaut in einen blinden Teil (*Pars caeca retinae*) ohne Photorezeptoren und einen sehenden Teil (*Pars optica retinae*). Während ersterer anterior der Ora serrata liegt, kleidet letzterer den Augapfel posterior der Ora serrata aus. Die Morphologie der *Pars optica retinae* mit ihren drei hintereinander geschalteten Neuronen lässt sich gut im histologischen Korrelat einsehen. Ganz außen liegt das retinale Pigmentepithel (RPE), welches das durch den neuronalen Anteil der Netzhaut gelangte Licht schließlich absorbiert. Von der Aderhaut wird das RPE nach außen durch die Bruch-Membran (*Lamina basalis choroideae*) getrennt. Direkt an das RPE grenzen nach innen die lichtreaktiven Fortsätze der Photorezeptoren (*Stratum neuroepitheliale retinae*). Die weiter innen liegenden Perikarya der Photorezeptoren (*Stratum nucleare externum*) geben Axone ab, die im *Stratum plexiforme externum* Synapsen mit den bipolaren Zellen bilden. Die Zellkörper der bipolaren Zellen befinden sich im *Stratum nucleare internum*. Im *Stratum plexiforme internum* gehen die bipolaren Zellen wiederum Synapsen mit den Ganglienzellen ein, deren Zellkörper im *Stratum ganglionare fasciculi optici* vorzufinden sind. Die Axone der Ganglienzellen bilden letzten Endes die Nervenfaserschicht (*Stratum neurofibrarum*), deren marklosen Nervenfasern sich am Sehnervenkopf zum Sehnerven bündeln, über den die von der Netzhaut erzeugten elektrischen Impulse schließlich in Richtung Gehirn weitergeleitet werden (1, 2).

Ebenfalls histologisch ins Auge fallen die *Membrana limitans externa* zwischen den Perikarya der Photorezeptoren und deren Fortsätzen sowie die *Membrana limitans interna* als Begrenzung der Netzhaut zum Glaskörper (2).

Weitere an der Signalverschaltung beteiligte Hilfszellen in der Netzhaut sind die Horizontalzellen und amakrinen Zellen, deren Zellkörper im Stratum nucleare internum anzutreffen sind. Die Horizontalzellen setzen mit ihren Synapsen an den Synapsen zwischen Photorezeptoren und bipolaren Zellen an und führen so zu einer horizontalen Verbindung. Die dadurch ermöglichte laterale Hemmung verbessert das Kontrastsehen (3). Auch amakrine Zellen führen zu einer lateralen Modifizierung der Signale, indem sie mit Axonen der bipolaren Zellen und Dendriten der Ganglionzellen in Kontakt stehen (1). Einen beträchtlichen Anteil der retinalen Zellen machen darüber hinaus die Gliazellen aus. Die den Astroglia zugeordneten Müllerzellen erstrecken sich von der inneren zur äußeren Grenzmembran. Ihnen werden viele verschiedene Aufgaben zugeordnet, wie die Homöostasis des Extrazellulärraums, die mechanische Stabilisierung der Netzhaut und Schutz der Zellen vor Trauma, die Reduktion von Lichtstreuung, aber auch die Differenzierung zu neuronalen Stammzellen nach Nervenzellverlust (4).

Eine weitere wichtige Fraktion der retinalen Gliazellen stellen die Mikroglia dar (Kapitel 1.6).

Eine besondere Funktion kommt der ca. 15 Grad temporal der Papille gelegenen Makula zu. Ihre zentral gelegene Fovea übernimmt mit ihrer höchsten Dichte an Zäpfen die Hauptfunktion beim photopischen Sehen. Die durch die 1:1:1-Verschaltung der Photorezeptoren, bipolaren Zellen und Ganglienzellen ausbleibende Konvergenz der Neuronen führt zur maximalen Auflösung des Bildes im Vergleich zum Rest der Netzhaut und untermauert so die Bedeutung der Makula für das Scharfsehen.

Das verdeutlicht die enormen Einbußen der Sehstärke, die an makulären Erkrankungen leidenden Patienten hinnehmen müssen.

1.2 Retinales Pigmentepithel

Das retinale Pigmentepithel (Stratum pigmentosum retinae) ist ein einschichtiges Epithel aus hexagonalen Zellen zwischen Bruch-Membran und den Fortsätzen der Photorezeptoren. Namensgebend für das RPE ist das Melanin-haltige Pigment der Zellen.

Das Melanin absorbiert das bis zum RPE reichende Licht und verhindert so eine Reflektion dessen und damit störende visuelle Phänomene (5).

Darüber hinaus spiegelt die räumliche Nähe des RPE zu den Photorezeptoren die funktionelle Einheit beider Zelltypen wider. So phagozytieren die Zellen des RPEs alte Zellbestandteile der Photorezeptoren wie deren ständig abgestoßenen äußeren Segmente und sind damit essentiell für die deren Funktion. Außerdem spielt das RPE eine wichtige Rolle bei der Nährstoffversorgung der Photorezeptoren. Die Unabdingbarkeit intakter RPE-Zellen für das Funktionieren der Photorezeptoren wird besonders im Krankheitsbild der altersbedingten Makuladegeneration (AMD) ersichtlich (Kapitel 1.3). Eine weitere wesentliche Aufgabe des RPE ist die durch Tight Junctions zwischen den Epithelzellen verwirklichte äußere Blut-Retina-Schranke, die die Netzhaut vor oxidativem Stress schützt und eine Homöostase der Ionen gewährleistet. Die Blut-Retina-Schranke bringt durch die physiologische Abschirmung von Blutzellen ebenfalls ein Immunprivileg der Netzhaut mit sich, das bei Krankheiten wie der AMD nicht mehr gegeben ist (6).

Die Synthese und Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie dem Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) durch das RPE spielt für die Entstehung von Neovaskularisationen, wie sie bei der AMD vorkommen kann, eine wichtige Rolle (7).

Die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff sowie die Entsorgung der Stoffwechselprodukte des RPE wird unter anderem durch die Bruch-Membran sichergestellt, die als Membran zwischen RPE und Choroidea den Austausch mit den Blutgefäßen der Aderhaut vermittelt (8) .

1.3 Altersbedingte Makuladegeneration

Die altersbedingte Makuladegeneration (AMD) ist in Industrieländern die häufigste Ursache gesetzlicher Blindheit. Weltweit werden laut Schätzungen im Jahr 2020 ca. 196 Millionen Menschen von dieser Krankheit betroffen sein (9).

Die Inzidenz der AMD steigt mit zunehmendem Alter. So offenbarte eine Studie aus dem Jahr 2017 bei über 85-Jährigen in Europa eine Prävalenz der frühen AMD von 17,6%, während hingegen sie in der Altersgruppe 55-59 Jahre nur bei 3,5% lag (10). Durch den

demographischen Wandel wird in den nächsten Jahren ein starker Anstieg der Prävalenz der AMD erwartet (9).

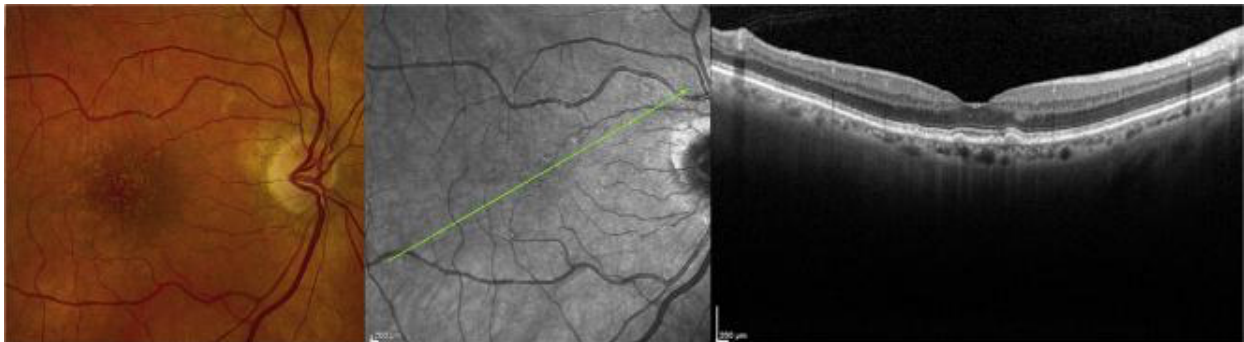


Abb. 1: Klinische Erscheinung von Drusen in einem frühen AMD-Stadium, übernommen aus (11)

Bilder einer 78 jährigen Patientin. Auf dem linken Bild sind im Bereich der Makula zahlreiche Drusen unterschiedlicher Größe bei der funduskopischen Untersuchung zu erkennen. Das mittlere IR-Bild zeigt die Position des Scans mit optischer Kohärenztomographie (OCT) (rechtes Bild), der die unter dem RPE liegenden Drusen im Querschnitt zeigt.

1.3.1 Pathophysiologie und Stadien der AMD

Erst 2013 wurde auf Grundlage der AREDS-Studie (Age-Related Eye Disease Study) eine Einteilung der AMD-Stadien anhand funduskopischer Gesichtspunkte unter der Gesamtbezeichnung ‚altersbedingte Makuladegeneration‘ eingeführt (12). Ein funduskopisches Charakteristikum der AMD ist das Auftreten von sogenannten Drusen. Drusen werden auf eine zunehmende phagozytische Funktionseinschränkung der RPE-Zellen zurückgeführt (13). Durch ihre Lage in der Netzhaut sind die äußeren Segmente der Photorezeptoren sowie das RPE ständigem oxidativem Stress durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) ausgesetzt. Als Ursache werden die Nähe zur hochvariablen choroidalen Hämodynamik sowie die Photooxidation durch die ständigen Lichtstimuli vermutet (14). Die zunehmend eingeschränkte metabolische Aktivität des RPE führt zur Akkumulation von Abbauprodukten als extrazellulärer Debris, der innerhalb des RPE, oder zwischen RPE und Bruch-Membran funduskopisch als Drusen imponiert. Als Bestandteile der Drusen konnten Apolipoprotein B und E, Cholesterol, Amyloid, diverse inflammatorische Proteine sowie Bestandteile des Komplementsystems gefunden werden (5). Gerade letzteres wird als ein grundlegender Bestandteil der Pathophysiologie

der AMD in Verdacht gezogen. So zeigten genetische Analysen von AMD-Patienten die Assoziation der Erkrankung mit veränderten Genen der Komplementfaktoren H, B, I, 2, 3 sowie 9 (12, 13).

In Einklang mit den Bestandteilen der Drusen wird das komplexe entzündliche Geschehen der AMD vor allem auf die Aktivierung des Komplementsystems, das Einwandern von Makrophagen, die Aktivierung von Mikroglia sowie das Ausschütten von inflammatorischen Molekülen zurückgeführt (14).

Die AREDS-Studie ordnet der Frühform der AMD mittelgroße Drusen der Größe ≥ 63 - <125 μm zu, bei gleichzeitiger Abwesenheit sichtbarer RPE-Veränderungen. Die Diagnose intermediäre AMD kann gestellt werden bei Präsenz großer Drusen (≥ 125 μm) oder schon bei mittelgroßen Drusen, wenn funduskopisch RPE-Veränderungen vorliegen.

Im Gegensatz zu oben genannten funduskopischen Auffälligkeiten wird das Vorhandensein kleiner Drusen $<63\mu\text{m}$, auch Drupelets genannt, als Korrelat einer physiologisch alternden Netzhaut ohne erhöhtes AMD-Risiko gewertet (12).

Die Spätform der AMD lässt sich in zwei Formen unterteilen. Die geographische Atrophie ist gekennzeichnet durch irreversiblen Untergang von parafovealen und später auch fovealen Photorezeptoren, RPE sowie der Lamina choroidocapillaris und führt damit wie die exsudative Form im Verlauf zum Zentralskotom und Blindheit (16, 17).

In 10% der fortgeschrittenen AMD-Stadien spricht man von der exsudativen Form, die durch das Einsprossen von Endothelzellen aus der Lamina choroidocapillaris in den subretinalen Raum mit nachfolgender Gefäßneubildung gekennzeichnet ist. Dem pathologischen Wachstum der neuen Gefäße liegt eine Hochregulierung des Gefäß-Wachstumsfaktors VEGF als Folge des Defekts der RPE-Zellen und der Schäden der Bruch-Membran zugrunde (19). Durch die Möglichkeit der OCT-Angiographie hat sich in den letzten Jahren die Klassifizierung der choroidalen Neovaskularisation (CNV) ausgebaut. Während bei der Typ-1-CNV die Neovaskularisationen unter dem RPE zu finden sind, ist der fortgeschrittene Typ 2 durch pathologische Gefäßneubildungen in der sensorischen Netzhaut definiert (19). Der Fragilität der neuen Gefäße ist es geschuldet, dass die CNV häufig mit Exsudaten, die in der Fluoreszenz-Angiographie den Leckagen entsprechen, einhergeht. Nicht nur die Leckagen, sondern auch RPE-Ablösungen machen die Patienten der feuchten Form der AMD anfälliger für in Blindheit endende Verläufen (19).

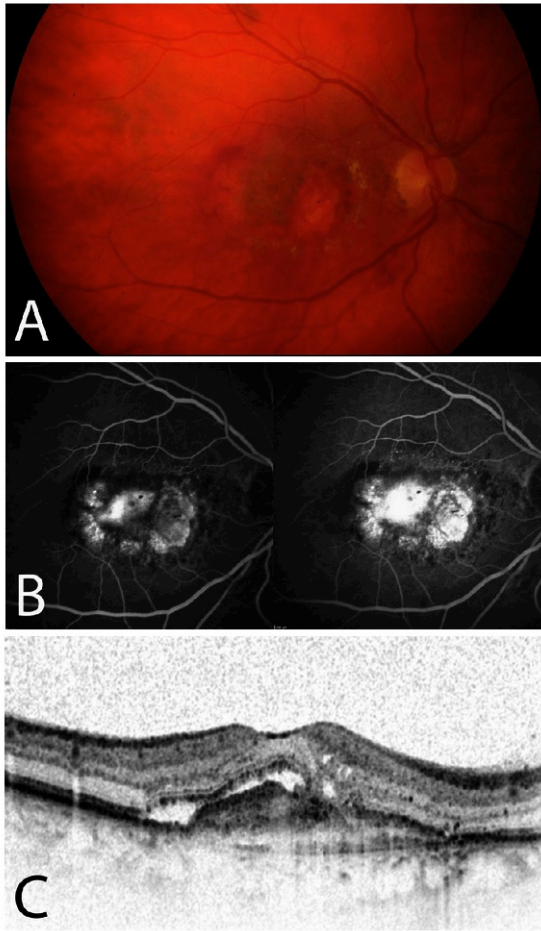


Abb. 2: Aktive CNV bei exsudativer AMD, übernommen aus (20)

Das Fundusfoto (A) zeigt subretinale Blutungen und fibrovaskuläres Gewebe im Rahmen einer CNV. In der Fluoreszenz-Angiographie (B) sind die Leckagen aus den neuen Gefäßen im Bereich der Makula zu erkennen. Der OCT-Scan (C) imponiert mit einer Abhebung des RPE, subretinaler Flüssigkeit, subretinalen hyperreflektiven Ablagerungen sowie intraretinalen Zysten.

1.3.2 Ätiologie der AMD

Die Ätiologie der AMD ist bisweilen nicht ganz geklärt. Fest steht, dass der Entstehung der Makuladegeneration multifaktorielle Ursachen zugrunde liegen.

Auf der einen Seite stehen Umweltfaktoren und Lebensgewohnheiten wie das Rauchen, Adipositas oder eine Antioxidans-arme Ernährung im Verdacht, das Risiko des Onsets der Erkrankung zu erhöhen sowie deren Progression zu beschleunigen (15, 18). Eine Überschneidung zwischen Risikofaktoren von Herz-Kreislauf-Erkrankungen und denen der AMD ist daher nicht verwunderlich (22). Der namensgebende Risikofaktor Alter sowie eine positive Familienanamnese bleiben jedoch die wichtigsten Risikofaktoren (23). Es wurde interessanterweise berichtet, dass zumindest in der weißen amerikanischen Bevölkerung Frauen ein im Vergleich zu Männern 1,3-fach höheres Risiko haben, eine Spätform der AMD zu entwickeln (24).

Auf der anderen Seite kommt genetischen Faktoren eine große Bedeutung für die Entstehung der AMD, die zu den am besten genetisch definierten komplexen

Erkrankungen gezählt wird, zu (23). So wurden bereits über 30 mit der AMD assoziierte Genorte gefunden (15). Dabei sind zwei Haupt-Genorte für über 50% der Vererbbarkeit der AMD verantwortlich. Zum einen handelt es sich um die den Komplement-Faktor H kodierenden Gene auf Chromosom 1q und zum anderen die Proteine ARMS2 sowie HTRA1 kodierenden Gene auf Chromosom 10q (16, 19).

1.3.3 Therapie und Prophylaxe der AMD

Die Therapiemöglichkeiten zwischen der exsudativen und der non-exsudativen Form der AMD unterscheiden sich enorm. Bei ersterer besteht das therapeutische Management aufgrund des Fehlens einer anerkannten Therapie lediglich in der regelmäßigen Beobachtung und dem frühen Aufdecken eventueller neu entstandenen Neovaskularisationen. Mit Hilfe des Amsler-Gitters kann der Patient auch zu Hause Veränderungen in Form von Metamorphopsien oder Skotomen frühzeitig bemerken (25). Eine in den „Kinderschuh“ steckende Therapie der geographischen Atrophie ist die Transplantation allogener Stammzellen unter die Netzhaut. Erste klinische Studien zeigen zwar Erfolg bei fortgeschrittener AMD, jedoch mit großer Einschränkung durch fehlendes Langzeitüberleben der transplantierten Zellen, Komplikationen der lebenslangen immunsuppressiven Therapie oder ungewollte Zellproliferationen im Glaskörper nach Transplantation (26).

Eine weitere in klinischer Forschung steckende Therapie-Option der trockenen AMD sind personalisierte immunologische Ansätze, die sich je nach Genetik spezifischer Antikörpern gegen verschiedene Komplementfaktoren bedienen (27). Laser-Therapie der frühen trockenen AMD konnte in der LEAD-Studie nicht signifikant die Progression der Erkrankung verlangsamen (28).

Im Gegensatz dazu kann die neovaskuläre AMD medikamentös behandelt werden. Durch die intravitreale Applikation von VEGF-Hemmern wird seit 2004 der Neovaskularisation und folglich auch den zu Metamorphopsien führenden Leckagen entgegengesteuert. Momentan sind in Deutschland mehrere anti-VEGF Drugs auf dem Markt: das zuerst eingeführte Pegaptanib ist ein RNA-Aptamer und bindet die VEGF-165 Isoform (29). Es wurde in den letzten Jahren jedoch weitgehend von den neueren sowie effektiveren VEGF-Hemmern Ranibizumab, Bevacizumab sowie Aflibercept ersetzt. Ersteres inhibiert

als rekombinantes humanisiertes monoklonales Fab-Fragment des Immunglobulin G1 (IgG1) die VEGF-A Isoform (30). Bevacizumab ist im Gegensatz zu Ranibizumab ein vollständiges rekombinantes humanisiertes IgG1-Molekül, welches ebenfalls kovalent an die VEGF-A Isoform bindet (31). Das zuletzt zugelassene Aflibercept hingegen ist eine Fusion aus Bindungsstellen der humanen VEGF-Rezeptoren 1 und 2 sowie des IgG1-Fc-Fragments. Durch seine Struktur wirkt es als Trap von VEGF-A, VEGF-B sowie dem Placental Growth Factor (PGF) (32). Ein Vergleich der drei VEGF-Hemmer konnte zeigen, dass der Trap-Mechanismus von Aflibercept mit einer höheren Affinität zu VEGF einhergeht (33).

Die früher vermehrt durchgeführte retinale Photokoagulation und die photodynamische Therapie der feuchten AMD sind wegen der hohen Gefahr makulärer Schäden und der hohen Rezidivrate in den Hintergrund gerückt (25).

Für die Prophylaxe der Progression der AMD kann neben dem Unterlassen des Rauchens auch die tägliche Einnahme von Vitamin C (500mg), Vitamin E (400 IU), Beta-Carotin (15mg), Zinkoxid (80mg) und Kupferoxid (2mg) erwogen werden (32, 33).

1.4 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) ist ein zentrales Element der Pathogenese von Netzhauterkrankungen, die mit Neovaskularisationen einhergehen (7). Neben der exsudativen AMD spielt VEGF auch bei der diabetischen Retinopathie, retinalen Gefäßverschlüssen und der Retinopathia praematurorum (ROP) eine bedeutende Rolle. Neben den sechs Hauptformen VEGF A-F sowie PGF findet man beim Menschen durch alternatives Spleißen auch u.a. VEGF-165 oder VEGF-121 vor (36).

In der Netzhaut wird dem RPE, Astrozyten, Müllerzellen, dem vaskulären Endothel, Ganglienzellen sowie den Mikroglia die Fähigkeit der VEGF-Produktion und -Sekretion zugeschrieben, wobei der Anteil der einzelnen Strukturen an der Gesamtsekretion nicht ganz klar ist (30, 31).

Während in der Entwicklung VEGF wichtig für das Gefäßwachstum ist, übt der konstitutiv produzierte Wachstumsfaktor im Erwachsenen wichtige Funktionen aus für das

Überleben von Endothelzellen, der Aderhaut und dem Schutz von RPE-Zellen, Müllerzellen, Photorezeptoren und anderen retinalen Nervenzellen (38).

Die Rolle von VEGF in der Pathogenese der CNV ist auf das vermehrte Wachstum von Endothelzellen sowie eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität zurückzuführen (36).

Einen nennenswerter Trigger für vermehrte VEGF-Gen-Transkription sowie Translation stellen unter Hypoxie erhöhte Level des Hypoxie-induzierten Faktor -1 (HIF-1) dar (39). Darüber hinaus wurde auch der Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) als Trigger für VEGF-Sekretion identifiziert (40).

Die beiden in die Angiogenese eingebundenen VEGF-Rezeptoren sind zum einen der VEGFR-1, auch Fms-like Tyrosine Kinase-1 (Flt-1) genannt, und zum anderen der VEGFR-2 oder Kinase Insert Domain Receptor (KDR). In der menschlichen Netzhaut können VEGFR-1 sowie -2 von neuronalen, vaskulären und Müllerzellen exprimiert werden. Während VEGF-A an beide Rezeptoren binden kann, sind PGF und VEGF-B nur mit dem VEGFR-1 und VEGF C-E mit VEGFR-2 assoziiert (36).

1.5 Placental Growth Factor (PGF)

Ein weiteres Mitglied der VEGF-Familie ist der Plazenta-Wachstumsfaktor (PGF), ein Homolog zum VEGF. Den Namen trägt das Molekül, da es zwei Jahre nach VEGF-Entdeckung in der menschliche Placenta entdeckt wurde (41). Bis dato wurden mit PGF 1-4 vier Isoformen des Wachstumsfaktors beschrieben (36, 37).

Wie dem VEGF wird auch PGF schon längere Zeit eine wichtige Rolle im Rahmen der choroidalen Neovaskularisation zugeschrieben (44). So wurden bei Patienten mit feuchter AMD, Glaukom oder diabetischer Retinopathie erhöhte Level von PGF im Glaskörper und der Netzhaut gefunden (45). Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass die Hemmung von PGF die choroidale Neovaskularisation dämpft (40, 41).

Der Bildungsort von PGF im Auge ist bislang noch nicht vollständig geklärt. In einem Modell der diabetischen Retinopathie konnte dem RPE zusätzlich zur VEGF-Bildung die Fähigkeit der PGF-Exprimierung zugeschrieben werden (48). In einer anderen Studie vermuten Forscher auf Basis immunhistochemischer Färbung, dass mononukleäre Phagozyten (MPs) zur PGF-Exprimierung in der Lage sind (46). Das mögliche

Zusammenspiel zwischen Makrophagen bzw. Mikroglia und PGF wird durch eine Studie mit diabetischer Retinopathie deutlich, in der die Verminderung der Chemotaxis dieser Immunzellen durch PGF-Inhibierung erzielt werden konnte (49). Die Aktivierung der Makrophagen durch PGF scheint sich in konsekutiv erhöhten Leveln ausgeschütteter proinflammatorischer Zytokine zu äußern (50). In Larynx-Karzinom-Proben konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der Makrophagen durch von Tumorzellen ausgeschüttetem PGF zum Tumorwachstum beitrugen (51). Neben der Expression von PGF und Aktivierung durch diesen scheint ein weiterer Aspekt des Zusammenspiels zwischen PGF und Makrophagen die Tatsache zu sein, dass PGF das Überleben der Makrophagen zu unterstützen scheint (52).

1.6 Mononukleäre Phagozyten

Mononukleäre Phagozyten umfassen als Oberbegriff verschiedene phagozytierende Zellen des Immunsystems wie Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und Mikroglia (53).

Im Gegensatz zu Makrophagen sind Mikroglia ortsständige Immunzellen des zentralen Nervensystems (ZNS) und somit auch der Netzhaut. Im physiologischen Zustand trifft man die Mikroglia nur in den inneren Netzhautschichten an, wo sie mit ihren Fortsätzen die Umgebung nach Molekülen abtasten, die mit Schäden oder Pathogenen zusammenhängen (DAMPs oder PAMPs) (54). Mikroglia sind zur Phagozytose absterbender Nervenzellen oder Synapsen fähig und sind somit unabdingbar für die Bewahrung der Umwelt der Nervenzellen sowie der Integrität der Synapsen (54, 55).

Die Aktivierung von Mikroglia und sich daraus ergebene inflammatorische Prozesse sind ein Kennzeichen verschiedener inflammatorischer und degenerativer Netzhauterkrankungen wie die AMD, die diabetische Retinopathie, das Glaukom, die Uveitis, die Retinopathia pigmentosa und die juvenile Retinoschisis (13).

Im Falle der AMD wandern die aktivierten amöboid-förmigen Mikroglia von den inneren Netzhaut-Schichten nach außen in den subretinalen Raum und tragen dort durch die Sekretion von Zytokinen wie IL-6, IL-1 β , TNF α und CCL2 zur Entzündung und letzten Endes zur Entstehung von Atrophie und Neovaskularisation bei. Neben den Mikroglia kommt es auch zu einer Akkumulation von Makrophagen aus dem Blut.

Der Grund für die Immunreaktion der MPs ist das geschädigte Gewebe, an die sogenannte Toll-like-Rezeptoren der MPs binden (56). Neben der Ausschüttung von Zytokinen tragen Mikroglia auch durch vermehrt gebildete Komplementfaktoren an der Entstehung der Inflammation bei (57).

MPs scheinen eng mit den Wachstumsfaktoren VEGF und PGF in Zusammenhang zu stehen. So konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass MPs wohl in der Lage sind VEGF und PGF zu exprimieren (30, 31, 46). Die Wachstumsfaktoren scheinen aber nicht nur von MPs produziert zu werden, sondern sie beeinflussen auch das Verhalten dieser Zellen. So konnte in einem CNV-Modell gezeigt werden, dass die Blockade des VEGF-Rezeptors die Infiltration von Mikroglia hemmte (58). Auch die Inhibierung von PGF führte in einer Studie über die diabetischen Retinopathie zu einer verminderten Chemotaxis der MPs (49).

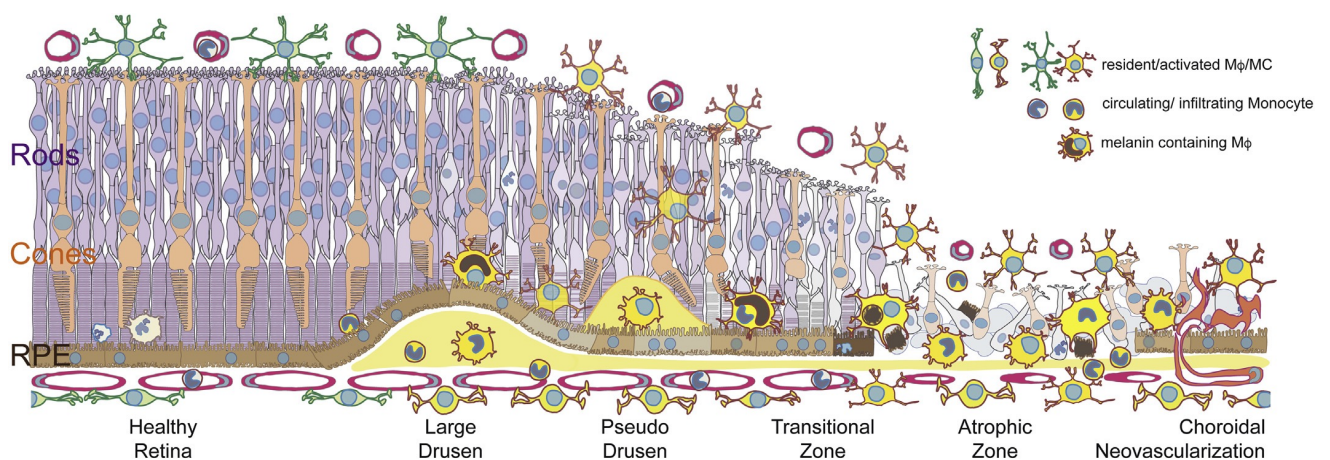


Abb. 3: Akkumulation von mononukleären Phagozyten bei der AMD, übernommen aus (59)

Schema eines Querschnitts der äußeren Netzhaut zur Einwanderung von Mikroglia und Makrophagen hin zu den Drusen, der atrophischen Zone oder der choroidalen Neovaskularisation. Die gewebsständigen Mikroglia verändern ihre ramifizierte Form zur amöboiden Form im aktivierten Zustand, in welchem sie in die sonst Mikroglia-freien äußeren Netzhautschichten migrieren. Darüber hinaus sind im Vergleich zur gesunden Netzhaut (linke Seite) weiter rechts gut der Untergang der Photorezeptoren, des RPE sowie das Einsprossen von Blutgefäßen aus der Aderhaut bei der exsudativen AMD zu erkennen.

1.7 Zytokine

Zytokine sind eine Gruppe von Proteinen, die bei jeder akuten oder chronischen Entzündung mitwirken, indem sie das Wachstum und die Differenzierung von (Immun-)Zellen vermitteln und regulieren. Neben Makrophagen und Mikroglia sind unter anderem auch Lymphozyten, Fibroblasten und Killerzellen an ihrer Sekretion beteiligt (60). In der Netzhaut wurde darüber hinaus neben den Mikroglia auch den RPE-Zellen die Fähigkeit der Zytokin-Ausschüttung mittels Inflammasom zugeschrieben (61). Zu den Zytokinen zählt man vor allem die Interleukine, die Interferone, Tumornekrosefaktoren und koloniestimulierende Faktoren (60).

1.7.1 IL-6

Das von den MPs ausgeschüttete IL-6 trägt durch sein angiogenes Potential zur Entstehung der CNV bei (62). IL-6 scheint so sehr in Verbindung mit der Neovaskularisation zu stehen, dass es bei Patienten mit exsudativer AMD besser mit dem Ausmaß des Makulaödems korrelierte als die VEGF-Level (63).

Darüber hinaus sorgt IL-6 dafür, dass das sonst durch die Abwehr von einwandernden Leukozyten bestehende Immunprivileg des subretinalen Raums erlischt, was die Akkumulation weiterer MPs begünstigt (59, 64).

1.7.2 IL-1 β

IL-1 β wird bei der AMD von mononukleären Phagozyten sowie dem PRE exprimiert. Wie IL-6 fördert auch IL-1 β die Entstehung der CNV (59, 65). Außerdem besitzt IL-1 β neurotoxische Eigenschaften, welche im Rahmen der Entzündung zum Verlust der Zapfen und Stäbchen beitragen (66, 67).

1.7.3 TNF α

Auch das von mononukleären Phagozyten ausgeschüttete TNF α trägt mit seinen angiogenen Eigenschaften zur Neovaskularisation im Rahmen der feuchten AMD bei (59, 68). Durch die Hemmung des Transkriptionsfaktors OTX2 im RPE kommt es durch hohe TNF α -Level zur Degeneration von Photorezeptoren (69).

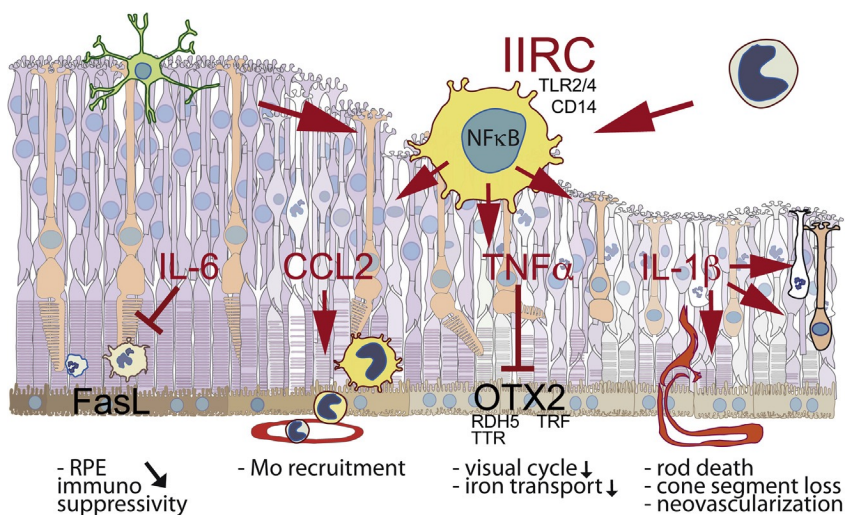


Abb. 4: Infiltrierende mononukleäre Phagozyten schütten inflammatorische Zytokine aus, übernommen aus (59)

1.8 Unterschiede zwischen Primaten- und Mäusenetzhaut

Nagetiere sind aufgrund der anatomischen Ähnlichkeit zu den Menschen und guten Erforschung ein unverzichtbarer Bestandteil der Forschung geworden (70). So ist auch über den Sehsinn der Maus, deren Netzhaut sich im grundlegenden Aufbau nicht von Primaten unterscheidet, relativ viel bekannt (1). Bereits in den 90ern wurde beispielsweise das laserinduzierte CNV-Modell an der murinen Netzhaut entwickelt und gilt seitdem als Standard der VEGF-Forschung *in vivo* (59, 60).

Wie auch beim Menschen findet sich im zentralen Bereich der Mäuse-Netzhaut eine im Vergleich zur Peripherie erhöhte Dichte an Photorezeptoren und eine dünnere Bruch-Membran, auch wenn der Gradient zwischen Peripherie und Zentrum kleiner im Vergleich zum Menschen ist (73). Die Autoren dieser Studie schlussfolgern, dass

ausgehend von der Photorezeptoren-Dichte die zentrale Mäuse-Netzhaut den peripheren Anteilen der humanen Makula nahek kommt, in denen sich ja oft erste AMD-Frühzeichen zeigen. Wie auch der Mensch weist die Maus Stäbchen und Zapfen in der Netzhaut auf. Während es beim Menschen mit dem Rot-, Grün- und Blaurezeptoren drei Zapfenarten gibt, fehlen die Rotzapfen bei Mäusen komplett (1, 46).

1.9 Versuchsdesign

Der dieser Arbeit zugrunde liegendes Modell ist das Modell der laserinduzierten CNV (siehe Abb. 5). Die Induktion einer CNV durch den Laser wurde bereits im Jahr 1998 entwickelt und gilt als der Standard des CNV-Modells im Tierversuch (71). Nach Laserkoagulation der Retina erfolgte die intravitreale Injektion von entweder Immunglobulin G (IgG), anti-VEGF (aVEGF), anti-PGF (aPGF), aVEGF und aPGF kombiniert oder Aflibercept. Je nach Versuch wurden die behandelten Augen nach sechs Stunden, oder nach drei oder sieben Tagen analysiert. Fundusfluoreszenzangiographie und immunhistochemische Färbung der CNV und der subretinalen Mikroglia erfolgten für jede Gruppe nach drei und sieben Tagen post Laser. Zur Analyse der Korrelation der von MPs sezernierten Zytokine mit in der Immunhistochemie (ICH) beobachteten Migration der MPs erfolgte für jede Gruppe die Analyse der Flatmounts mit dem ELISA sechs Stunden und drei Tage post Laserkoagulation.

Um den Effekt von VEGF und PGF auf MPs auf zellulärer Ebene zu untersuchen, klärten wir mit der In-situ-Hybridisierung (ISH) zunächst die Fragestellung, ob VEGF und PGF auch von eingewanderten MPs transkribiert werden. Im Anschluss wurde dann der Effekt der einzelnen oder gemeinsamen Hemmung von VEGF und PGF auf deren eigene Transkription in MPs analysiert – ebenfalls mit ISH. Um die Transkription mit der Expression zu korrelieren erfolgte zu guter Letzt die Bestimmung von VEGF und PGF in den Flatmounts mittels ELISA.

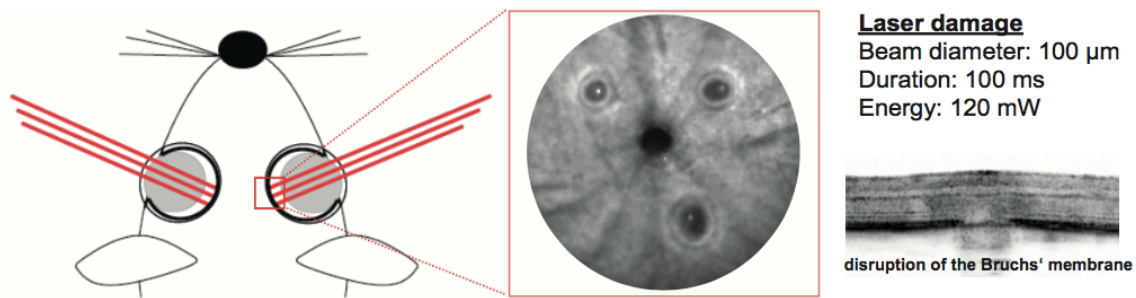


Abb. 5: Das Modell der laserinduzierten CNV

Für die laserinduzierte CNV wurden jeweils beide Augen der Maus gelasert (Bild links). Dabei wurden je nach Versuch entweder drei um die Sehnervpapille angeordnete (mittleres Bild) oder 20 in der Netzhaut verteilte Läsionen mit dem YAG-Laser erzeugt. Ziel der Laserkoagulation mit dem YAG-Laser war die Ruptur der Bruch-Membran (Bild rechts), unter der es dann durch die zerstörte Blut-Retina-Schranke zum Einsprossen von choroidalen Gefäßen kommt.

1.10 Zielsetzung

Im Hinblick auf die sehr eingeschränkten therapeutischen Möglichkeiten der AMD ist der Bedarf nach neuen Therapieansätzen immens. Die Modulation des Immunsystems mit entsprechenden Wirkstoffen wäre eine sinnvolle Strategie zur Behandlung einer Erkrankung, bei deren Pathogenese die Parainflammation eine große Rolle spielt (13).

In der vorliegenden Arbeit haben wir es uns zum Ziel gesetzt am Modell der laserinduzierten CNV den immunologischen Effekt der Hemmung von VEGF-A und PGF in Bezug auf das Verhalten der mononukleären Phagozyten unter Einzelgabe und in kombinierter Verabreichung der Komponenten (v.a. durch Aflibercept) zu evaluieren. Insbesondere wollen wir zeigen, dass die kombinierte Inhibierung von VEGF-A und PGF durch deren synergistischen Effekte im Hinblick auf CNV und fluoreszenzangiographischen Leckagen effektiver ist. Wir erhofften uns etwas mehr zur Rolle der Mikroglia im scheinbar komplexen Regulationsprozess der Wachstumsfaktoren herauszufinden. So könnte letzten Endes die Hemmung der Wachstumsfaktoren als ein potentes immunologisches Mikroglia-modulierendes Target bei der Therapie der verschiedenen Formen der AMD verstanden werden.

2. Publikation

Balser et al. *Journal of Neuroinflammation*
<https://doi.org/10.1186/s12974-019-1419-2>

(2019) 16:26

Journal of Neuroinflammation

RESEARCH

Open Access

Co-inhibition of PGF and VEGF blocks their expression in mononuclear phagocytes and limits neovascularization and leakage in the murine retina



Carsten Balser^{1†}, Anne Wolf^{1†}, Marc Herb² and Thomas Langmann^{1,3*} 

Abstract

Background: Age-related macular degeneration (AMD) is a leading cause of visual impairment in the elderly. The neovascular (wet) form of AMD can be treated with intravitreal injections of different anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) agents. Placental growth factor (PGF) is another member of the VEGF family of cytokines with pro-angiogenic and pro-inflammatory effects. Here, we aimed to compare single and combined inhibition of VEGF-A and PGF in the laser-induced mouse model of choroidal neovascularization (CNV) with a focus on the effects on retinal mononuclear phagocytes.

Methods: CNV was induced in C57BL/6J mice using a YAG-Laser. Immediately after laser damage antibodies against VEGF-A (aVEGF), anti-PGF (aPGF), aVEGF combined with aPGF, aflibercept, or IgG control were injected intravitreally in both eyes. Three and 7 days after laser damage, the vascular leakage was determined by fluorescence angiography. Lectin staining of retinal and RPE/choroidal flat mounts was used to monitor CNV. In situ mRNA co-expression of Iba1, VEGF and PGF were quantified using in situ hybridization. Retinal and RPE/choroidal protein levels of VEGF and PGF as well as the pro-inflammatory cytokines IL-6, IL1-beta, and TNF were determined by ELISA.

Results: Early (day 3) and intermediate (day 7) vascular leakage and CNV were significantly inhibited by PGF and VEGF-A co-inhibition, most effectively with the trap molecule aflibercept. While VEGF-A blockage alone had no effects, trapping PGF especially with aflibercept prevented the accumulation of reactive microglia and macrophages in laser lesions. The lesion-related mRNA expression and secretion of VEGF-A and PGF by mononuclear phagocytes were potentially suppressed by PGF and partially by VEGF-A inhibition. Protein levels of IL-6 and IL1-beta were strongly reduced in all treatment groups.

Conclusions: Retinal inhibition of PGF in combination with VEGF-A prevents vascular leakage and CNV possibly via modulating their own expression in mononuclear phagocytes. PGF-related, optimized strategies to target inflammation-mediated angiogenesis may help to increase efficacy and reduce non-responders in the treatment of wet AMD patients.

Keywords: Age-related macular degeneration, Neovascular AMD, Choroidal neovascularization, Retinal degeneration, Microglia, Aflibercept, Vascular endothelial growth factor (VEGF), Placental growth factor (PGF), Laser CNV

* Correspondence: thomas.langmann@uk-koeln.de

[†]Carsten Balser and Anne Wolf contributed equally to this work.

¹Laboratory for Experimental Immunology of the Eye, Department of Ophthalmology, University of Cologne, Faculty of Medicine and University Hospital Cologne, 50931 Cologne, Germany

³Center for Molecular Medicine Cologne (CMMC), University of Cologne, 50931 Cologne, Germany

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2019 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

Age-related macular degeneration (AMD) is a frequent cause of visual impairment in the Western world, leading to considerable limitations in the daily life of elderly people [1]. There is no treatment available for dry AMD, and the only approved therapy for neovascular AMD is effective in inhibiting the vascular endothelial growth factor (VEGF) [2]. The fact that patients are refractory to anti-VEGF (aVEGF) treatments and that adverse events may occur underlines the need for new therapeutic strategies [3].

The pathogenesis of AMD is primarily characterized by a loss of retinal pigment epithelium (RPE) function. As a consequence, progressive degeneration of photoreceptors occurs and a strong immunological response is mounted in the retina and RPE/choroid. This latent para-inflammation is characterized by local microgliosis, infiltration of inflammatory macrophages in the subretinal space, and dysregulation of the complement system [4]. In the healthy retina, resident microglia are required for the maintenance of synapses and thereby help to preserve tissue integrity [5]. However, by producing pro-angiogenic cytokines and growth factors including VEGF and placental growth factor (PGF), mononuclear phagocytes may also play a role in neovascularization [6]. Therefore, modulation of the pro-inflammatory state of microglia and macrophages may be a therapeutic strategy for retinal degenerative diseases [7].

There are currently different therapeutic biologics neutralizing ocular VEGF. Bevacizumab and ranibizumab only bind VEGF-A, whereas aflibercept is capable of targeting both, VEGF and PGF dimers [8]. Several studies suggest that PGF, also a member of the VEGF family, plays a crucial role in immune cell-related neovascularization as shown by genetic deletion of PGF in mice [9]. PGF plays a role in several retinal vascular diseases as has been excellently reviewed recently [10]. Thus, increased PGF has been identified in ocular fluids and tissue from patients with diabetic retinopathy [11, 12], glaucoma [13], and neovascular AMD [14, 15]. High PGF levels are also present in the murine laser model of choroidal neovascularization, and PGF inhibition by either antibodies [16, 17] or trap molecules [18, 19] limits CNV.

Today, there is only limited information which cell types produce PGF in the diseased retina. In diabetic conditions with retinal edema, the RPE has been identified as a possible source for PGF [20, 21]. As there seems to be a direct interplay between PGF, VEGF receptors, and mononuclear phagocytes, these retinal immune cells could also be a potential producer of PGF. Interestingly, PGF but not VEGF triggers chemotaxis of phagocytes in a model of diabetic retinopathy [22]. In other non-retinal inflammatory conditions, PGF potently

stimulates monocyte chemotaxis and expression of pro-inflammatory cytokines [23] as well as macrophage survival [24].

In this report, we analyzed the retinal effects of individual and combined intravitreal inhibition of PGF and VEGF using antibodies and the VEGF/PGF trap aflibercept. We specifically focused on the temporal behavior and role of mononuclear phagocytes in the production of PGF and VEGF. We show that microglia and macrophages co-express both angiogenic factors after laser treatment and that aflibercept is highly efficient to limit PGF expression and choroidal neovascularization.

Methods

Animals

Experiments were performed with 8–10-week-old C57BL/6J mice of both sexes [20]. Animals were housed in an air-conditioned environment with 12-h light-dark schedule and had access to water and food ad libitum. All experimental procedures complied with the German animal welfare law, which is in line with the European Community law, and the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. The animal protocols used in this study were reviewed and approved by the governmental body responsible for animal welfare in the state of North Rhine-Westphalia, Germany (application no. 81-02.04.2017.A430).

Laser coagulation

Laser coagulation of the retina was performed by using a slit-lamp-mounted diode laser system by Quantel Medical Vitra (532-nm green laser). For laser treatment, mice were anesthetized by intraperitoneally injecting ketamine hydrochloride (100 mg/kg body weight, Ketavet; Pfizer Animal Health) and xylazine hydrochloride (5 mg/kg body weight, 2% Rompun; Bayer HealthCare) diluted in 0.9% sodium chloride. The pupils of the mice were dilated using phenylephrine 2.5%–tropamide 0.5% before laser treatment. For fundus fluorescence angiography (FFA), immunohistochemistry (IHC), and in situ hybridization (ISH), three laser burns (energy 125 mW, duration 100 ms, spot size 100 μ m) were equally placed around the optic nerve of both eyes [25]. For ELISA measurements of cytokines, the number of laser burns applied per eye was 20. To validate rupture of Bruch's membrane, post-laser retinal structure and laser lesion size were analyzed in vivo using HRA/OCT. In case of media opacities precluding accurate laser application (pre-existing corneal scar or cataract), insufficient disruption of Bruch's membrane, or hemorrhages, these eyes were excluded from analyses.

Drug administration

Animal cages were randomly allocated to the experimental groups. The following compounds (all diluted in 1× PBS) were injected intravitreally immediately after laser pulse application: 1.5 µl of either Aflibercept (10 µg/µl, Eylea, Bayer HealthCare), anti-VEGF-A (5 µg/µl, goat anti-mouse VEGF-AA IgG, AF493-NA, R&D Systems), anti-PGF (5 µg/µl, polyclonal rabbit anti-PGF antibody, ab9542, Abcam), anti-VEGF and anti-PGF combined (each 5 µg/µl), or IgG control (10 µg/µl, normal goat IgG control (AB-108-C, R&D systems). Therefore, a 34-gauge needle was inserted into the vitreous space approximately 1.5 mm below the limbus and the compounds were administered bilaterally with a NanoFil syringe (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA).

Fundus fluorescein angiography (FFA)

Vascular leakage was analyzed 3 and 7 days after laser damage. After anesthesia of the animals and dilatation of the pupils, the vascular leakage was determined with the FA-mode of the HRA/OCT device (Spectralis™). One hundred microliters of 2.5% fluorescein (Alcon) diluted in 0.9% sodium chloride were injected intraperitoneally. Late-phase images were taken 10 min after fluorescein administration. The size of laser spots and vascular leakage was determined using the measuring tool of the Heidelberg software. The pixel intensity was quantified in two regions of interest (ROI) within and one ROI outside each laser spot using the program ImageJ. The background pixel intensity was then subtracted from the laser spot values. The data of three laser spots were averaged to obtain the mean laser-induced leakage per eye.

Preparation of flat mounts, immunohistochemistry, and image analysis

The eyes were enucleated and fixed in 10% neutral buffered formalin (NBF) for 2 h at room temperature. The dissected retinal and RPE/choroidal flat mounts were permeabilized overnight (5% Triton X-100, 5% Tween-20 in PBS). Unspecific antigens were blocked with BLOTTO (1% milk powder, 0.01% Triton X-100 in PBS) for 1 h at room temperature. The flat mounts were subsequently incubated in the primary antibody overnight at 4°C (1:1000 dilution of Iba1, rabbit polyclonal, 234 003, Synaptic Systems). Flat mounts were then incubated with a 1:1000 dilution of goat anti-rabbit AlexaFluor 488 nm-conjugated secondary antibody (A11008; Life Technologies) for 1 h. In addition, RPE/choroidal flat mounts were incubated with a 1:10 dilution of primary TRITC-conjugated lectin (L5264; Sigma). After washing, retinal and RPE/choroidal flat mounts were mounted on a microscope slide and embedded with fluorescence mounting medium (S3023; DakoCytomation) [25].

Images were taken with a Zeiss Imager M.2 equipped with an ApoTome.2. The total number of Iba1-positive cells was counted for each laser spot. Cellular morphology was analyzed using a grid system to determine the mean number of grid crossing points per cell [25]. The colored pixel intensity in individual image areas of the laser spots was quantified using the Colored Pixel Counter tool for Fiji.

Areas of choroidal neovascularization in RPE/choroidal flat mounts were measured with the spline function of the graphic tool included in the ZEN software (Zeiss). Data were excluded when it came to damages to the CNV lesion during tissue processing or inability to locate a CNV lesion during imaging of an eyecup.

In situ hybridization (ISH) and image analysis

ISH of RPE/choroidal flat mounts was performed using the Multiplex Fluorescent Reagent Kit v2 (ACD) according to the protocol of Gross-Thebing et al. [26]. The following probes were used: Iba1 (channel C1 or C3), VEGF (channel C3), and PGF (channel C1). Images were taken with a Zeiss Imager M.2 including an ApoTome.2.

The colored pixel intensity in individual image areas of the laser spots was quantified using the Colored Pixel Counter tool for Fiji.

Quantification of cytokines

The concentration of cytokines in total retinal or RPE lysates were measured by ELISA according to the manufacturer's instructions (R&D Systems). Absorbance was quantified using a TriStar² multimode plate reader LB 942 (Berthold Technologies).

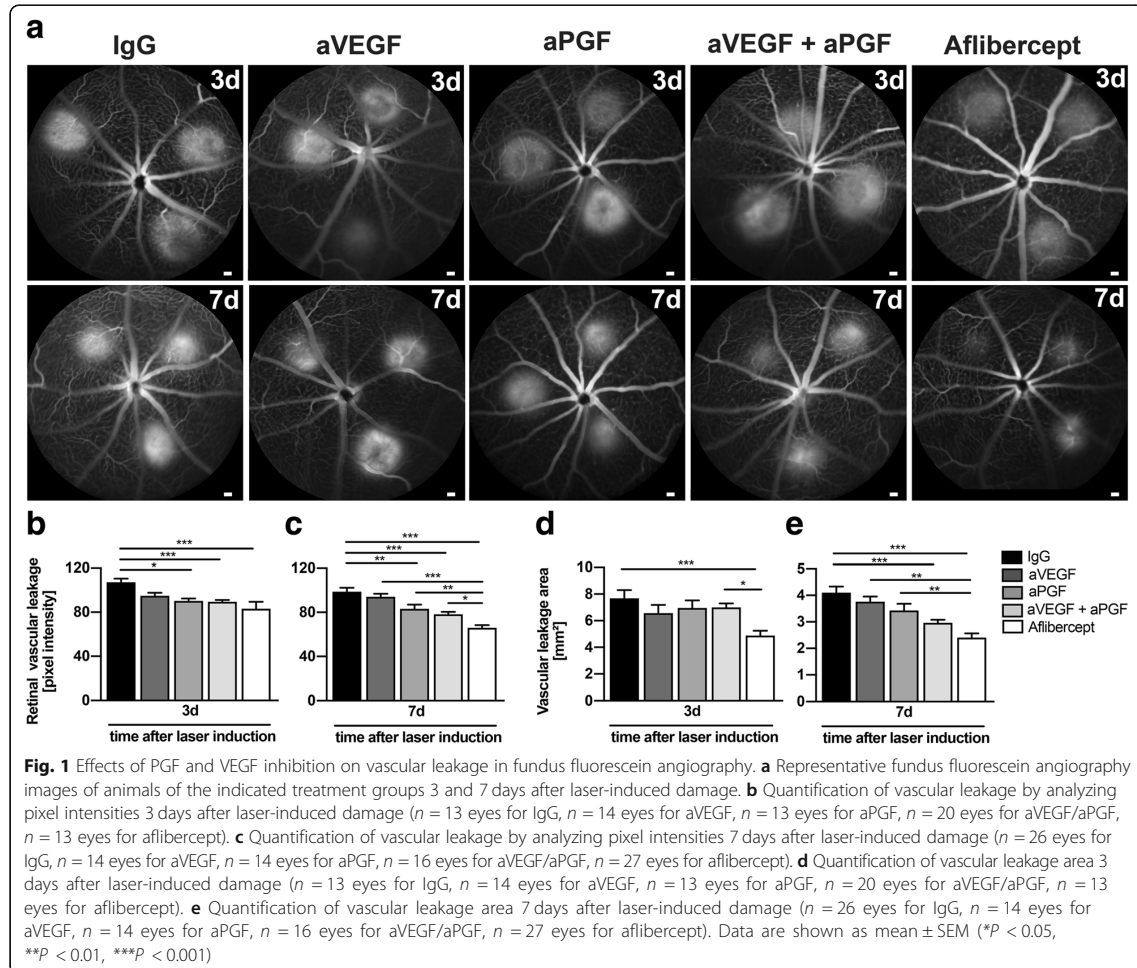
Statistical analysis

All data were analyzed using GraphPad PRISM (version 7) using analysis of variance (ANOVA) and Tukey's post-test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P \leq 0.001$. The data are shown as mean $\pm$ SEM. All analyses were performed after random consecutive numbering of animals, which was only revealed after finishing all analyses.

Results

Aflibercept strongly inhibits vascular leakage and choroidal neovascularization

We first compared the effects of inhibiting VEGF-A alone (aVEGF), PGF alone (aPGF), or in combinations (aVEGF plus aPGF, aflibercept) with IgG sham injections in the laser-induced mouse model of CNV. The inflammation-induced vascular leakage was assessed with fundus fluorescein angiography (FFA) at days 3 and 7 (Fig. 1a). The pixel intensities of leakage lesions (Fig. 1b, c) and their total area (Fig. 1d, e) were quantified, respectively. At 3 days after laser induction, anti-PGF alone (aPGF), the combination of aVEGF with aPGF, and aflibercept significantly reduced the pixel intensity of vascular leakage compared to IgG



(Fig. 1b). At 7 days after laser, the reduction in leakage intensity was greater with all injected biologics and aflibercept showed the strongest effect with significant differences to all other conditions (Fig. 1c). When analyzing leakage area after laser damage, aflibercept was the only molecule that showed a significant effect after 3 days (Fig. 1d). Aflibercept was also most effective treatment regarding the leakage area at day 7 (Fig. 1e). Only the combined therapy of aVEGF with aPGF and aflibercept showed significant differences compared to IgG treatment, whereas single administration of either aVEGF or aPGF did not affect leakage at this time point (Fig. 1e).

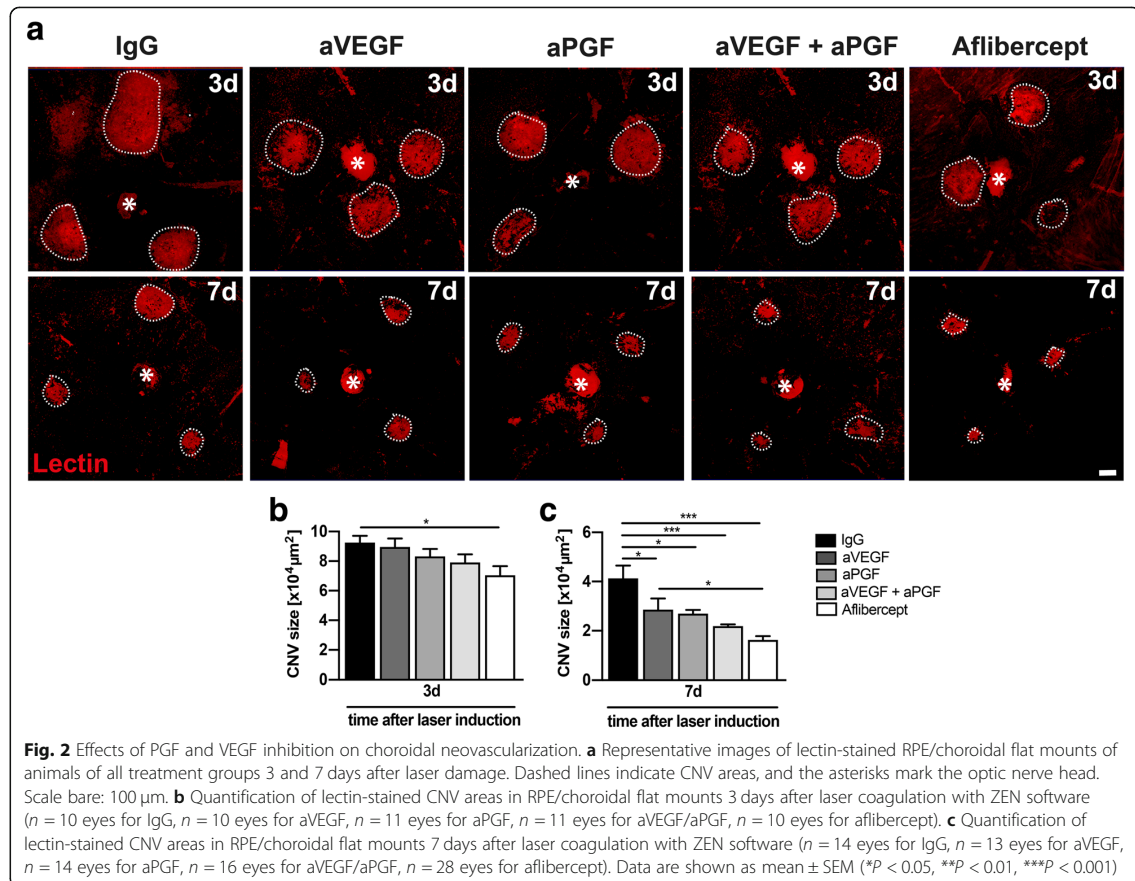
We next analyzed neovessel formation by lectin staining of RPE/choroidal flat mounts at days 3 and 7 (Fig. 2). Three days after laser damage only aflibercept reduced CNV compared to the IgG control (Fig. 2b). At day 7, all treatments significantly reduced CNV formation compared to IgG, whereby the combination of aVEGF and

aPGF as well as aflibercept led to the strongest decrease in CNV formation (Fig. 2c).

As the laser-CNV model also reflects an inflammation-related wound healing process [27, 28], we analyzed the overall size of the lesions at three different time points after laser (Additional file 1: Figure S1). Over time, the lesion size and the formation of a fibrotic scar decreased in all conditions and no significant effect of any treatment was observed (Additional file 1: Figure S1). This indicates that the applied compounds did not affect wound healing or fibrosis.

PGF inhibition limits microglia and macrophage responses in retinal and RPE/choroidal flat mounts

We next addressed which compound was effective in modulating the activity of Iba1⁺ microglia and macrophages in the retina (Fig. 3) and the RPE/choroid complex (Fig. 4). Quantification of Iba1⁺ cells per laser spot showed



no differences between the treatments 3 days after laser damage (Fig. 3a, b). In contrast, 7 days after laser induction, inhibition of PGF either alone or in combination reduced the number of retinal microglia (Fig. 3c), with the strongest effect after aflibercept injection. These findings were confirmed by quantifying the number of Iba1 signal pixels in each area (Fig. 3d, e).

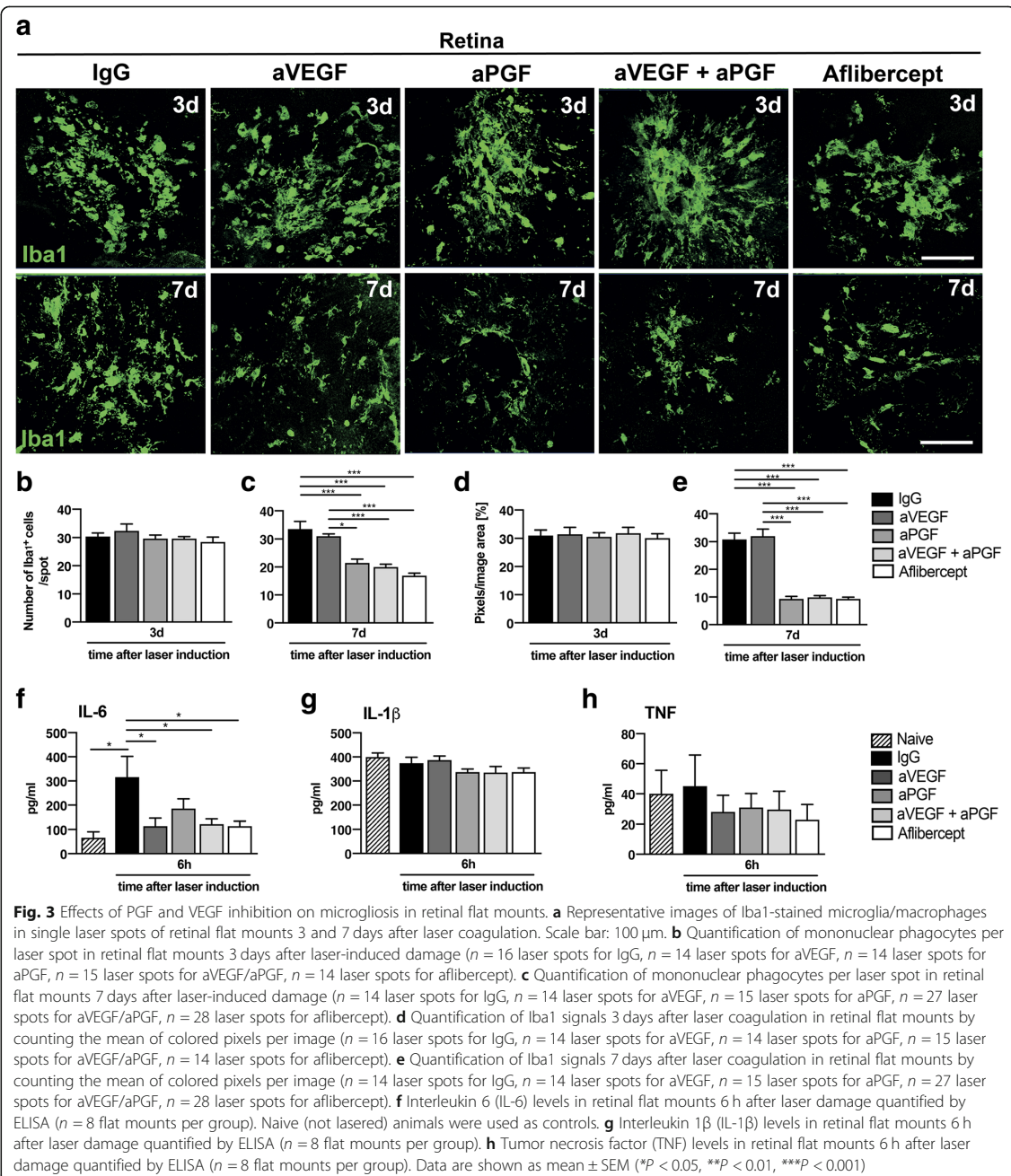
Since the morphology of microglia often correlates with their function and pro-inflammatory state, we next analyzed their ramification by counting the number of grid cross points per cell. None of the treatments affected the ramification state, indicating that the compounds mainly affected the recruitment of microglia to the laser lesion and not their overall morphology (Additional file 2: Figure S2a, b).

We next focused on the protein levels of three pro-inflammatory cytokines often rapidly produced by reactive microglia [29]. Six hours after laser damage, IL-6 was rapidly secreted in the retinal tissue, whereas IL-1 β and TNF did not show laser-induced expression differences (Fig. 3f-h). Treatments with aVEGF, aVEGF

combined with aPGF, and aflibercept reduced the secretion of IL-6, while aPGF showed no significant effect (Fig. 3f). Of note, 3 days after laser coagulation, the secretion of IL-6 declined to the level of naive mice (data not shown).

Staining of mononuclear phagocytes in RPE/choroidal flat mounts showed similar results than those in the retina (Fig. 4). Thus, there was no difference between all groups at day 3 (Fig. 4a, b, d), but strong effects at day 7 (Fig. 4c, e). All groups involving PGF inhibition reduced the number of Iba1+ cells in the laser spots at day 7 (Fig. 4c). Again, the analysis of grid crossing points per cell did not reveal any differences for any time point (Additional file 2: Figure S2c,d).

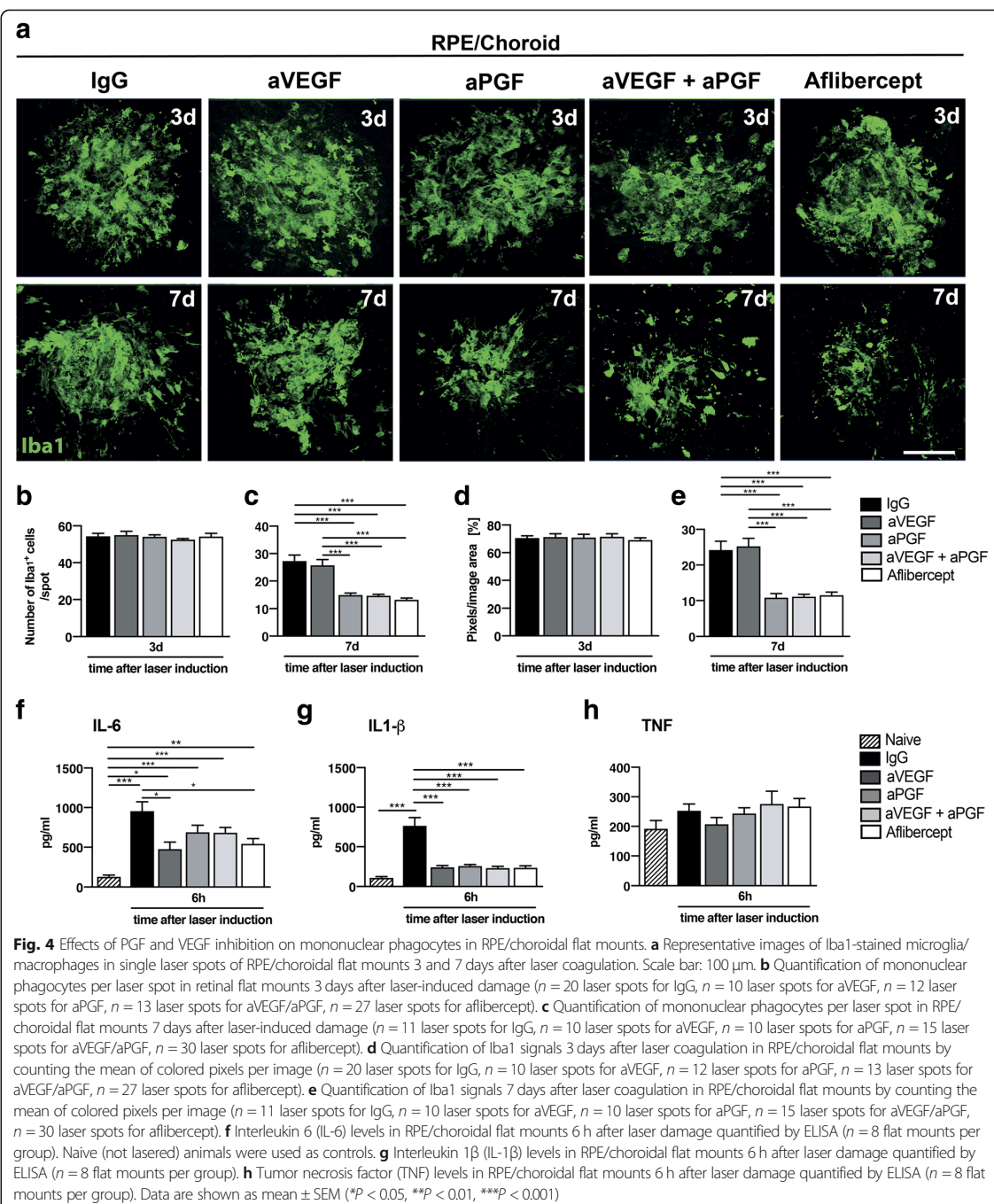
ELISAs of RPE/choroidal flat mounts showed increased IL-6 and IL-1 β secretion 6 h after laser damage, while no TNF secretion was detected (Fig. 4f-h). Interestingly, treatment with aflibercept and aVEGF resulted in significantly reduced levels of IL-6 compared to IgG (Fig. 4f), whereas all treatments strongly inhibited IL-1 β secretion (Fig. 4g).



VEGF and PGF inhibition limits their co-expression and secretion in mononuclear phagocytes

Since trapping of PGF significantly attenuated microgliosis and macrophage numbers in the laser lesions, we next asked the question whether these cells themselves actively transcribe VEGF and PGF mRNAs using in situ

hybridization (ISH) with specific amplifier probes. We first compared VEGF and PGF mRNA expression together with the marker Iba1. Therefore, ISH with RPE/choroidal flat mounts of lasered mice treated with IgG for 3 and 7 days was performed (Fig. 5a–c). The simultaneous detection of Iba1 (green) and VEGF (blue)



showed that most Iba1⁺ mononuclear phagocytes expressed VEGF in the lesion area (Fig. 5a). Similar results were obtained with PGF (Fig. 5b). Simultaneous hybridization with probes targeting PGF and VEGF

showed that the majority of cells, which were positive for VEGF, also expressed PGF at both time points (Fig. 5c). These results indicate that Iba1⁺ cells are capable to co-express significant amounts of VEGF and PGF mRNA.

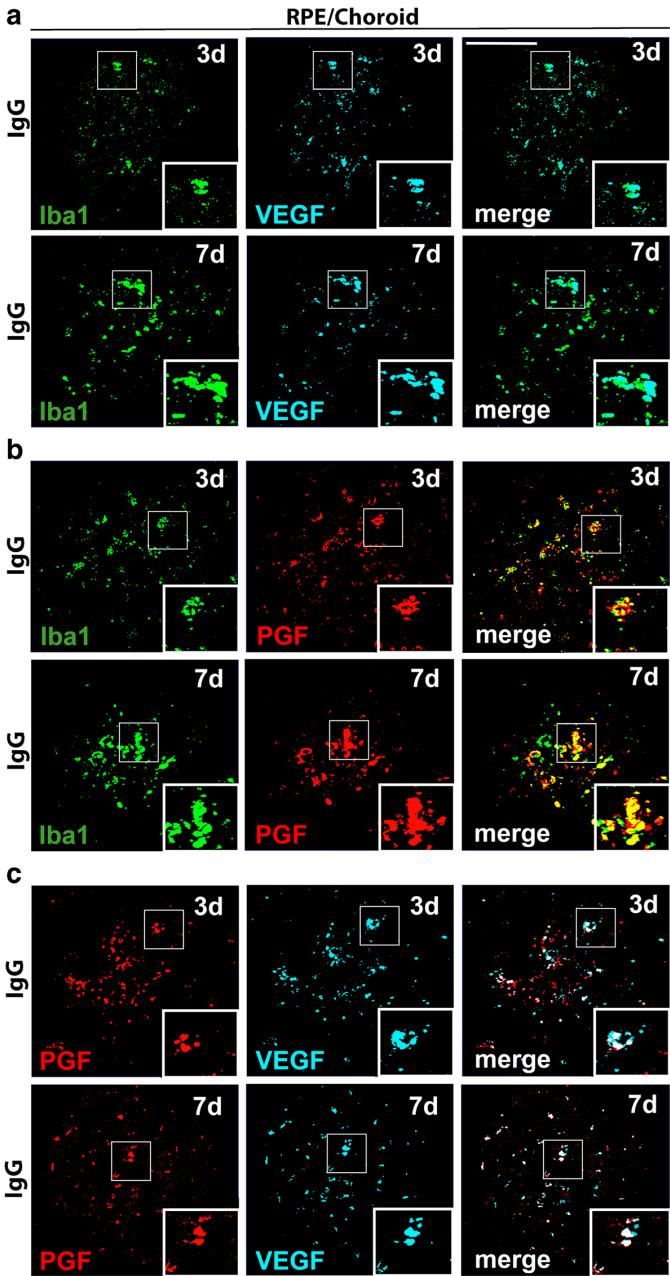
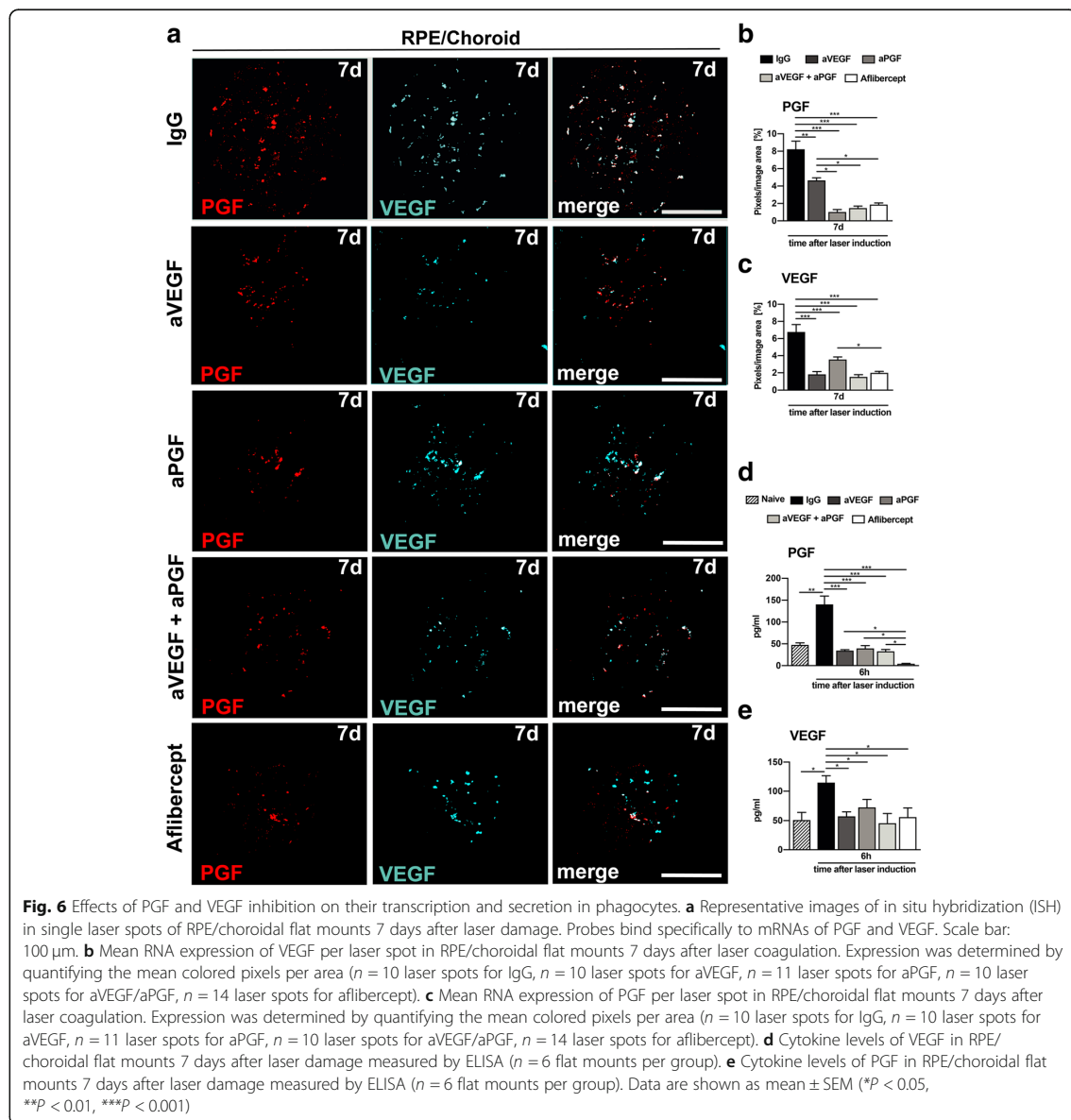


Fig. 5 Mononuclear phagocytes co-express PGF and VEGF mRNAs in laser lesions. Scale bar: 100 μ m. **a** Representative images of in situ hybridization of single laser spots in RPE/choroidal flat mounts of IgG-treated animals at days 3 and 7. Probes targeted both Iba1 and VEGF. **b** Representative images of in situ hybridization of laser spots in RPE/choroidal flat mounts of IgG-treated animals at days 3 and 7. Probes targeted both Iba1 and PGF. **c** Representative images of in situ hybridization of laser spots in RPE/choroidal flat mounts of IgG-treated animals at days 3 and 7. Probes targeted both PGF and VEGF. The frames show higher magnification areas

We then analyzed the effect of the different treatments on VEGF and PGF mRNA expression in phagocytes at day 7 using ISH (Fig. 6a). Intravitreal administration of aVEGF, the combination of aVEGF and aPGF as well as aflibercept strongly reduced the color pixel intensity in the laser lesions of RPE/choroidal flat mounts hybridized with VEGF probes. Treatment with aPGF also reduced pixel intensity but significantly less than the other biologics (Fig. 6b). Hybridization with PGF probes showed that all treatments attenuated PGF mRNA levels in the

laser lesion with aVEGF showing the smallest effect (Fig. 6c).

Since mRNA expression levels do not unequivocally represent translation and secretion of cytokines, we measured VEGF and PGF protein levels in RPE/choroidal flat mounts using ELISAs. Both VEGF and PGF were expressed at basal levels in RPE/choroidal flat mounts of naive mice, which strongly increased 6 h after laser damage (Fig. 6d, e). Significantly reduced VEGF and PGF levels were observed in all treatment groups (Fig. 6d, e).



However, PGF protein levels were fully suppressed by aflibercept only, indicating the highest efficacy of the VEGF/PGF protein trap aflibercept compared to inhibition with single or combined antibodies (Fig. 6e).

Discussion

This study aimed to investigate the role of PGF and VEGF inhibition on neovessel formation and mononuclear phagocyte reactivity in the murine laser CNV model. Our data show that the PGF inhibition, especially with aflibercept, dampens vascular leakage and CNV 7 days after laser application. These results are in accordance with a recent report comparing antibody-mediated PGF inhibition with aflibercept at a later time point (14 days) after laser treatment [17]. In that paper, Crespo-Garcia et al. identified higher PGF and VEGF levels in the laser-damaged retina using immunostainings [17]. Here, we significantly expand these findings by showing in situ co-expression of PGF and VEGF by Iba1-positive mononuclear phagocytes in the RPE/choroid complex. These in situ hybridization data were then verified by quantitative ELISAs, again demonstrating a strong induction of VEGF and PGF protein levels in the laser CNV model and effective inhibition of both factors especially with aflibercept.

Previous reports have indicated a higher efficacy of co-inhibition of VEGF and PGF in decreasing both retinal leakage and neovascularization compared to VEGF inhibition alone [16, 17]. Our analysis of mononuclear phagocytes in both retinal and RPE/choroidal flat mounts revealed reduced microgliosis in the retina, less mononuclear phagocytes in the RPE/choroid, and significantly lower expression of PGF and VEGF after trapping PGF and VEGF. Thus, resident retinal immune cells as well as recruited macrophages seem to be both affected by intravitreal PGF/VEGF inhibition, which is in line with the proposed role for both cell populations in AMD [6]. Of note, the strongest reduction of phagocytes in laser lesions was achieved by the treatments involving PGF inactivation. This indicates that PGF seems to be important for cell recruitment and retaining them at the lesion site, which corroborates previous findings from isolated retinal immune cells [16].

The combined blockage of VEGF and PGF resulted in a more effective reduction of vascular leakage and neovascularization than both treatments alone suggesting a synergistic effect of these two compounds. Indeed, Huo et al. showed that the inhibition of PGF significantly increased the inhibitory effects of aVEGF on vessel density after laser impact [16]. In comparison to the combined therapy with aPGF and aVEGF, the administration of aflibercept showed stronger effects regarding the vascular leakage and CNV. A plausible explanation could be the fact that aflibercept binds VEGF-A not only via

the amino acids necessary for VEGFR1/R2 interactions but also blocks the heparin-binding site on VEGF-A [30]. Heparin and heparan sulfate significantly contribute to the process of angiogenesis [31]. However, what remains unsolved is the question which cell types have the biggest impact on VEGF and PGF-related neovessel formation.

Pro-inflammatory cytokines are rapidly produced by mononuclear phagocytes upon activation. Here, we determined the quantitative levels of IL-6, IL-1 β , and TNF in RPE/choroid samples. In contrast to previous findings derived from qPCR analyses [17], our data showed a high secretion of IL-1 β in RPE/choroid samples. Since IL-1 β can potentially induce VEGF production by RPE cells [32], the reduced IL-1 β levels in the different treatment groups may also dampen RPE-derived VEGF levels. The anti-PGF/VEGF-A treatments could possibly also limit inflammasome activation in the RPE [33, 34]. The fact that laser damage did not induce IL-1 β in the retina suggests an important role of RPE cells and invading macrophages for inflammasome-dependent IL-1 β secretion. As the RPE inflammasome can also trigger chemotaxis of microglia [34], anti-angiogenic therapies may indirectly modulate migration of mononuclear phagocytes. IL-6 secretion was reduced in both retinal and RPE/choroidal flat mounts after VEGF-A and PGF co-inhibition, implicating that microglia and macrophages may contribute to its secretion in both tissues. These findings are in line with a report by Levy et al., demonstrating that macrophages produce high amounts of IL-6 in apolipoprotein E-dependent conditions mimicking AMD [35].

Beside its anti-angiogenic effects, PGF blockade has recently been shown to protect other cell types in the eye. Thus, PGF inhibition by antibodies or aflibercept protected photoreceptors from light-induced degeneration [36, 37]. The modulation of microglia was not analyzed in these studies but could be a possible explanation for these positive effects of PGF inhibition on the stressed retina. Finally, aflibercept seems to have less side effects on RPE physiology than the antibody-derived molecules bevacizumab and ranibizumab [38].

Despite the findings of significantly better preclinical efficacy in reducing lesion size and immune cell activation in the laser CNV model presented here, human clinical studies showed comparable effects of aflibercept and ranibizumab in treatment-naïve patients with wet AMD [39]. However, aflibercept was more effective in patients with lower baseline visual acuity, indicating a potential benefit in trapping both PGF and VEGF compared to VEGF inhibition alone [39]. Future research is needed to decipher the biological pathways affected by blockade of these two important growth factors in the retina.

Conclusions

In summary, this study for the first time showed that PGF inhibition, most effective as trap using aflibercept, reduced phagocyte-related mRNA expression and secretion of VEGF-A and PGF as well as pro-inflammatory cytokines in the laser CNV model mimicking wet AMD. Aflibercept showed the highest efficacy in preventing vascular leakage and CNV. Pharmacological targeting of pro-angiogenic and pro-inflammatory pathways simultaneously may therefore provide a novel approach for the treatment of neovascular AMD.

Additional files

Additional file 1: Figure S1. Aflibercept does not attenuate wound healing. a Top, representative mouse fundus images analyzed with the Heidelberg Spectralis IR-mode at days 0, 3, and 7 after laser coagulation. Bottom, representative cross-section images of laser lesion sites. b Quantification of laser spot size at day 0 ($n = 24$ eyes for IgG, $n = 22$ eyes for aVEGF, $n = 24$ eyes for aPGF, $n = 20$ eyes for aVEGF/aPGF, $n = 22$ eyes for aflibercept). c Quantification of laser spot size at day 3 ($n = 22$ eyes for IgG, $n = 15$ eyes for aVEGF, $n = 16$ eyes for aPGF, $n = 15$ eyes for aVEGF/aPGF, $n = 18$ eyes for aflibercept). d Quantification of laser spot size at day 7 ($n = 15$ eyes for IgG, $n = 17$ eyes for aVEGF, $n = 19$ eyes for aPGF, $n = 15$ eyes for aVEGF/aPGF, $n = 20$ eyes for aflibercept). Data are shown as mean $\pm$ SEM. (JPG 2535 kb)

Additional file 2: Figure S2. Aflibercept does not affect mononuclear phagocyte morphology. a Quantification of immune cell morphology in laser spots 3 days after laser coagulation in retinal flat mounts ($n = 11$ laser spots per group). b Quantification of immune cell morphology in laser spots 7 days after laser coagulation in retinal flat mounts ($n = 11$ laser spots per group). c Quantification of immune cell morphology in laser spots 3 days after laser coagulation in RPE/choroidal flat mounts ($n = 11$ laser spots per group). d Quantification of immune cell morphology in laser spots 7 days after laser coagulation in RPE/choroidal flat mounts ($n = 11$ laser spots per group). All images were analyzed using a grid image analysis system (ImageJ). (JPG 1098 kb)

Abbreviations

Aflib: Aflibercept; AMD: Age-related macular degeneration; aPGF: Anti-placental growth factor; aVEGF: Anti-vascular endothelial growth factor; CNV: Choroidal neovascularization; IgG: Immunoglobulin G; IHC: Immunohistochemistry; IL-1 β : Interleukin-1 β ; IL-6: Interleukin-6; ISH: In situ hybridization; NBF: Neutral buffered formalin; OCT: Optical coherence tomography; PBS: Phosphate-buffered saline; PGF: Placental growth factor; ROI: Region of interest; RPE: Retinal pigment epithelium; TNF: Tumor necrosis factor; VEGF: Vascular endothelial growth factor; VEGFR1: Vascular endothelial growth factor Receptor 1

Acknowledgements

We thank Prof. Olaf Strauss (Charité Berlin) for helpful discussions and Eva Scheiffert for excellent technical assistance.

Funding

This study was supported by funds from Bayer AG

Availability of data and materials

Data supporting the conclusions of this article are presented in this manuscript.

Authors' contributions

CB and AW conducted and analyzed most of the experiments. MH conducted and analyzed the ELISA assays. TL obtained the funding and designed the study. CB, AW, MH, and TL wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

Thomas Langmann has participated in advisory boards from Bayer AG. All other authors declare no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Laboratory for Experimental Immunology of the Eye, Department of Ophthalmology, University of Cologne, Faculty of Medicine and University Hospital Cologne, 50931 Cologne, Germany. ²Institute for Medical Microbiology, Immunology and Hygiene, 50931 Cologne, Germany. ³Center for Molecular Medicine Cologne (CMMC), University of Cologne, 50931 Cologne, Germany.

Received: 24 October 2018 Accepted: 28 January 2019

Published online: 07 February 2019

References

- Wong WL, Su X, Li X, Cheung CM, Klein R, Cheng CY, Wong TY. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health*. 2014;2:e106–16.
- Nguyen CL, Oh LJ, Wong E, Wei J, Chilov M. Anti-vascular endothelial growth factor for neovascular age-related macular degeneration: a meta-analysis of randomized controlled trials. *BMC Ophthalmol*. 2018;18:130.
- Yang S, Zhao J, Sun X. Resistance to anti-VEGF therapy in neovascular age-related macular degeneration: a comprehensive review. *Drug Des Devel Ther*. 2016;10:1857–67.
- Chen M, Xu H. Parainflammation, chronic inflammation, and age-related macular degeneration. *J Leukoc Biol*. 2015;98:713–25.
- Wang X, Zhao L, Zhang J, Fariss RN, Ma W, Kretschmer F, Wang M, Qian HH, Badea TC, Diamond JS, et al. Requirement for microglia for the maintenance of synaptic function and integrity in the mature retina. *J Neurosci*. 2016;36:2827–42.
- Guillonneau X, Eandi CM, Paques M, Sahel JA, Sapienza P, Sennlaub F. On phagocytes and macular degeneration. *Prog Retin Eye Res*. 2017;61:98–128.
- Karlstetter M, Scholz R, Rutar M, Wong WT, Provis JM, Langmann T. Retinal microglia: just bystander or target for therapy? *Prog Retin Eye Res*. 2015;45:30–57.
- Deissler HL, Lang GK, Lang GE. Capacity of aflibercept to counteract VEGF-stimulated abnormal behavior of retinal microvascular endothelial cells. *Exp Eye Res*. 2014;122:20–31.
- Van de Veire S, Stalmans I, Heindryckx F, Oura H, Tijeras-Raballand A, Schmidt T, Loges S, Albrecht I, Jonckx B, Vincier S, et al. Further pharmacological and genetic evidence for the efficacy of PLGF inhibition in cancer and eye disease. *Cell*. 2010;141:178–90.
- Van Bergen T, Etienne I, Cunningham F, Moons L, Schlingemann RO, Feyen JHM, Stitt AW. The role of placental growth factor (PLGF) and its receptor system in retinal vascular diseases. *Prog Retin Eye Res*. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2018.10.006>. [Epub ahead of print].
- Ando R, Noda K, Namba S, Saito W, Kanda A, Ishida S. Aqueous humour levels of placental growth factor in diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmol*. 2014;92:e245–6.
- Kovacs K, Marra KV, Yu G, Wagley S, Ma J, Teague GC, Nandakumar N, Lashkari K, Arroyo JG. Angiogenic and inflammatory vitreous biomarkers associated with increasing levels of retinal ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015;56:6523–30.
- Van Bergen T, Jonckx B, Hollanders K, Sijnave D, Van de Velde S, Vandewalle E, Moons L, Stassen JM, Stalmans I. Inhibition of placental growth factor improves surgical outcome of glaucoma surgery. *J Cell Mol Med*. 2013;17:1632–43.
- Rakic JM, Lambert V, Devy L, Luttun A, Carmeliet P, Claes C, Nguyen L, Foidart JM, Noel A, Munaut C. Placental growth factor, a member of the VEGF family, contributes to the development of choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44:3186–93.

15. Pongsachareonnon P, Mak MYK, Hurst CP, Lam WC. Neovascular age-related macular degeneration: intraocular inflammatory cytokines in the poor responder to ranibizumab treatment. *Clin Ophthalmol*. 2018;12:1877–85.
16. Huo X, Li Y, Jiang Y, Sun X, Gu L, Guo W, Sun D. Inhibition of ocular neovascularization by co-inhibition of VEGF-A and PLGF. *Cell Physiol Biochem*. 2015;35:1787–96.
17. Crespo-Garcia S, Corkhill C, Roubeix C, Davids AM, Kociok N, Strauss O, Jousen AM, Reichhart N. Inhibition of placenta growth factor reduces subretinal mononuclear phagocyte accumulation in choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2017;58:4997–5006.
18. Tarallo V, Bogdanovich S, Hirano Y, Tudisco L, Zentilin L, Giacca M, Ambati J, De Falco S. Inhibition of choroidal and corneal pathologic neovascularization by Plgf1-de gene transfer. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53:7989–96.
19. Saishin Y, Saishin Y, Takahashi K, Lima e Silva R, Hylton D, Rudge JS, Wiegand SJ, Campochiaro PA. VEGF-TRAP(R1R2) suppresses choroidal neovascularization and VEGF-induced breakdown of the blood-retinal barrier. *J Cell Physiol*. 2003;195:241–8.
20. Miyamoto N, de Kozak Y, Jeanny JC, Glotin A, Mascarelli F, Massin P, BenEzra D, Behar-Cohen F. Placental growth factor-1 and epithelial haemato-retinal barrier breakdown: potential implication in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetologia*. 2007;50:461–70.
21. Miyamoto N, de Kozak Y, Normand N, Courtois Y, Jeanny JC, Benezra D, Behar-Cohen F. PIGF-1 and VEGFR-1 pathway regulation of the external epithelial hemato-ocular barrier. A model for retinal edema. *Ophthalmic Res*. 2008;40:203–7.
22. Van Bergen T, Hu TT, Etienne I, Reyns GE, Moons L, Feyen JHM. Neutralization of placental growth factor as a novel treatment option in diabetic retinopathy. *Exp Eye Res*. 2017;165:136–50.
23. Perelman N, Selvaraj SK, Batra S, Luck LR, Erdreich-Epstein A, Coates TD, Kalra VK, Malik P. Placenta growth factor activates monocytes and correlates with sickle cell disease severity. *Blood*. 2003;102:1506–14.
24. Adini A, Kornaga T, Firoozbakht F, Benjamin LE. Placental growth factor is a survival factor for tumor endothelial cells and macrophages. *Cancer Res*. 2002;62:2749–52.
25. Luckoff A, Scholz R, Sennlaub F, Xu H, Langmann T. Comprehensive analysis of mouse retinal mononuclear phagocytes. *Nat Protoc*. 2017;12:1136–50.
26. Gross-Thebing T, Paksa A, Raz E. Simultaneous high-resolution detection of multiple transcripts combined with localization of proteins in whole-mount embryos. *BMC Biol*. 2014;12:55.
27. Espinosa-Heidmann DG, Suner IJ, Hernandez EP, Monroy D, Csaky KG, Cousins SW. Macrophage depletion diminishes lesion size and severity in experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44:3586–92.
28. Sakurai E, Anand A, Ambati BK, van Rooijen N, Ambati J. Macrophage depletion inhibits experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44:3578–85.
29. Fonken LK, Frank MG, Kitt MM, Barrientos RM, Watkins LR, Maier SF. Microglia inflammatory responses are controlled by an intrinsic circadian clock. *Brain Behav Immun*. 2015;45:171–9.
30. MacDonald DA, Martin J, Muthusamy KK, Luo JK, Pyles E, Rafique A, Huang T, Potocky T, Liu Y, Cao J, et al. Aflibercept exhibits VEGF binding stoichiometry distinct from bevacizumab and does not support formation of immune-like complexes. *Angiogenesis*. 2016;19:389–406.
31. Zhao W, McCallum SA, Xiao Z, Zhang F, Linhardt RJ. Binding affinities of vascular endothelial growth factor (VEGF) for heparin-derived oligosaccharides. *Biosci Rep*. 2012;32:71–81.
32. Nagineni CN, Kommineni VK, William A, Detrick B, Hooks JJ. Regulation of VEGF expression in human retinal cells by cytokines: implications for the role of inflammation in age-related macular degeneration. *J Cell Physiol*. 2012;227:116–26.
33. Tseng WA, Thein T, Kinnunen K, Lashkari K, Gregory MS, D'Amore PA, Ksander BR. NLRP3 inflammasome activation in retinal pigment epithelial cells by lysosomal destabilization: implications for age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54:110–20.
34. Mohr LK, Hoffmann AV, Brandstetter C, Holz FG, Krohne TU. Effects of inflammasome activation on secretion of inflammatory cytokines and vascular endothelial growth factor by retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015;56:6404–13.
35. Levy O, Lavalette S, Hu SJ, Housset M, Raoul W, Eandi C, Sahel JA, Sullivan PM, Guillonnet X, Sennlaub F. APOE isoforms control pathogenic subretinal inflammation in age-related macular degeneration. *J Neurosci*. 2015;35:13568–76.
36. Izawa H, Inoue Y, Ohno Y, Ojino K, Tsuruma K, Shimazawa M, Hara H. Protective effects of antiplacental growth factor antibody against light-induced retinal damage in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015;56:6914–24.
37. Kuse Y, Takahashi K, Inoue Y, Izawa H, Nakamura S, Shimazawa M, Hara H. Intravitreal aflibercept protects photoreceptors of mice against excessive light exposure. *J Pharmacol Sci*. 2018;137:407–11.
38. Parisi L, Fuhrer R, Zinkernagel M, Enzmann V. Ranibizumab and bevacizumab but not aflibercept inhibit proliferation of primary human retinal pigment epithelium in vitro. *Ophthalmologica*. 2018. p. 1–6. <https://doi.org/10.1159/000490430>. [Epub ahead of print].
39. Zhang Y, Chioreso C, Schweizer ML, Abramoff MD. Effects of aflibercept for neovascular age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis of observational comparative studies. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2017;58:5616–27.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



3. Diskussion

3.1 Übersicht

Diese Arbeit zielt darauf ab, die Rolle der Hemmung von VEGF und PGF bei der Neovaskularisation und Reaktivität der MPs zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass VEGF und PGF neben anti-angiogenen vor allem auch anti-inflammatorische Effekte zuzuschreiben sind. Mit den Ergebnissen der ISH rückten die MPs als wichtiges Steuerelement der Regulation dieser Wachstumsfaktoren weiter in den Mittelpunkt. Die neuen Erkenntnisse werfen aber auch neue Fragen zur genauen Rolle von VEGF, PGF und den Mikroglia auf. Neben dem Aufgreifen dieser Fragen wird im Diskussionsteil vor allem die Überlegenheit der Koinhibition von VEGF und PGF im Vergleich zu deren Einzelhemmung diskutiert.

3.2 Rolle von VEGF und PGF

Die Inhibition von PGF erwies sich in dieser Studie als anti-angiogen. Bereits sieben Tage nach Laserschaden konnte in der aPGF-Versuchsgruppe ein signifikant stärkerer Rückgang der CNV im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden (Fig. 2 der Publikation). Diese Ergebnisse ergänzen die Ergebnisse einer Studie, in der vor Kurzem 14 Tage nach dem Laser mit der PGF-Hemmung ein Rückgang der CNV gezeigt werden konnte (46). Ebenfalls bestätigten unsere Ergebnisse die in letzterer Studie aufgezeigte Tatsache, dass mit aPGF eine Reduktion der Mikrogliose erzielt werden kann, und das schon an Tag 7 nach Laserkoagulation (Fig. 3 und 4 der Publikation). Neben dem Einfluss auf die Chemotaxis konnte mit dieser Arbeit der Effekt von PGF auf das phagozytäre Expressionsverhalten aufgeschlüsselt werden. So vermochte die Neutralisierung von PGF die Transkription und Expression von PGF und VEGF im gleichen Maße zu hemmen (Fig. 6 der Publikation). Die anti-inflammatorische Wirkung von aPGF auf die Chemotaxis der MPs könnte man sich bei anderen inflammatorischen retinalen Erkrankungen zunutze machen. Im Lichtschaden-Modell der trockenen AMD konnte in einer anderen Studie schon experimentell das therapeutische Potential der PGF-Hemmung bei einer nicht-exsudativen inflammatorischen Erkrankung demonstriert werden (74).

Durch unsere Versuche konnte auch VEGF ein proinflammatorisches Potential zugeschrieben werden. Wie auch aPGF unterdrückte aVEGF die Transkription und Expression von VEGF und PGF gleichermaßen (Fig. 6 der Publikation). Im Gegensatz zu aPGF schien die Inhibition von VEGF jedoch keinen Einfluss auf die Migration der Mikroglia und Makrophagen zu haben (Fig. 3 und 4 der Publikation). Dies steht im Widerspruch zu einer Arbeit, die auch der Neutralisierung von VEGF Effekte auf die Mikrogliose zusprach (75). Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz wäre, dass sich das in letzterer Studie verwendete inflammatorische Modell der systemischen Lipopolysaccharid-Injektion stark von dem dieser Arbeit zugrunde liegenden Modell des lokalen Laserschadens unterscheidet. Womöglich führt die durch die Lipopolysaccharid-Injektion nachgeahmte bakterielle Infektion zu einer Aktivierung anderer Subtypen von MPs oder verändert deren Reaktion auf anti-inflammatorische Therapieversuche.

Ein weitere proinflammatorische Fähigkeit von VEGF und PGF scheint die Ankurbelung der Zytokin-Produktion in MPs zu sein. In dieser Studie konnte mittels ELISA nämlich gezeigt werden, dass sowohl aVEGF als auch aPGF die IL-6-Expression in retinalen und RPE/choroidalen Flatmounts herunterkurbelt (Fig. 3 und 4 der Publikation). Interessanterweise beobachtete ein Forscherteam aus Peking jedoch, dass sich die intraokuläre Konzentration von IL-6 durch die intravitreale operative Medikamentengabe (IVOM) eines Medikaments aus der aVEGF-Gruppe nicht veränderte. Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten darin begründet sein, dass wir das Zytokin nicht im Glaskörper maßen, sondern in den Flatmounts selber und dass wir die Zytokin-Konzentration nicht innerhalb von drei Monaten nach intravitrealer Injektion bestimmten, sondern genau sechs Stunden danach.

Auch IL-1 β scheint an VEGF und PGF gekoppelt zu sein. Die Neutralisierung der beiden Wachstumsfaktoren führte nämlich in den Versuchen dieser Arbeit zu geringeren IL-1 β -Leveln in den RPE/choroidalen Flatmounts (Fig. 3 und 4 der Publikation). Die Tatsache, dass durch den Laser die IL-1 β -Expression nicht in retinalen Flatmounts induziert werden konnte, verdeutlicht die Rolle des Inflammasoms des RPE für die IL-1 β -Produktion. Die IL-1 β reduzierenden Effekte der VEGF- und PGF-Hemmung lassen vermuten, dass hier die Inflammasom-Aktivierung des RPE beeinflusst wurde (76, 77). Da neben den Mikroglia auch die RPE-Zellen VEGF produzieren können, ist anzunehmen,

dass durch aVEGF und aPGF auch das von RPE-Zellen exprimierte VEGF herunterreguliert wird (38).

Was darüber hinaus unklar bleibt, ist die Relevanz der verschiedenen Quellen von VEGF und PGF im Auge für die Entstehung der Neovaskularisation. Auf diesen Punkt wird noch näher im nächsten Abschnitt (3.3) eingegangen.

3.3 Rolle der mononukleären Phagozyten

In vielen Studien wurde bereits der positive Effekt der Eindämmung der Mikroglia-Reaktivität durch die Hemmung verschiedener Rezeptoren auf den Krankheitsverlauf von inflammatorischen Augenerkrankungen nachgewiesen. So geht zum Beispiel die Hemmung des phagozytären C5-Rezeptors durch verminderte Aktivierung von MPs mit einem gemilderten Krankheitsverlauf der autoimmunen Uveoretinitis einher (78). Die Senkung der proinflammatorischen Mikroglia-Antwort im Modell des Lichtschadens mittels Translokatorprotein-(TSP0)-Liganden XBD173 bewahrte die Netzhaut vor Degeneration (79). Außerdem zeigten Karlstetter et al., dass die Hemmung des Siglec-Rezeptors der Mikroglia durch Polysialinsäure zu einer Verminderung der CNV führt (80). Eine weitere Studie wies den Mikroglia-modulierenden und anti-angiogenen Effekt von Interferon-beta nach und unterstrich die große Rolle der Mikroglia für die Entstehung der CNV (81).

Dass auch die Neutralisierung von PGF die Chemotaxis der Mikroglia dämpft und so die Mikrogliose eindämmt, konnte in einem Modell der diabetischen Retinopathie veranschaulicht werden (49). Dieser Effekt der PGF-Hemmung wurde nun am Modell der feuchten AMD bestätigt (Fig. 3 und 4 der Publikation).

Beim Einfluss der VEGF-Hemmung auf die Mikrogliose unterscheiden sich die Meinungen. Während Couturier et al. in einem Mausmodell der okulären Inflammation durch die Behandlung mit aVEGF eine verminderte Anzahl aktivierter Mikroglia in der Netzhaut beobachten konnten (75), hatte in dieser Arbeit die Neutralisierung von VEGF keinen Effekt auf die Anzahl der Mikroglia in einem Laserspot. Der scheinbar unterschiedliche Effekt von VEGF und PGF auf die MPs deutet auf verschiedene Pathways hin, die beide Wachstumsfaktoren in der Zelle auslösen. Auch die ISH-Versuche dieser Arbeit geben hier

keine Erklärung, da diese lediglich aufzeigten, dass die Hemmung von VEGF und PGF dieselben Auswirkungen auf die Expression der beiden Faktoren haben. Hier ist zum besseren Verständnis weitere Forschung vonnöten.

Was angesichts weiterer VEGF- und PGF-Quellen im Auge (wie dem RPE) darüber hinaus unklar bleibt, ist der Anteil des von MPs exprimierten VEGF und PGF an der retinalen Gesamtausschüttung dieser Faktoren. Es kann zwar durch den in dieser Arbeit gezeigten großen Effekt der PGF-Hemmung auf die Migration der MPs und der gleichzeitigen Reduktion von CNV und Leckagen von einem großen Einfluss von Mikroglia auf die Neovaskularisation ausgegangen werden. Um hier mehr Klarheit zu schaffen, wären jedoch weitere Experimente nötig. Eine Möglichkeit wäre zum Beispiel, die MPs auszuschalten und anschließend zu schauen, dass es durch die Therapie wirklich zu keiner weiteren Reduktion der Expression von VEGF und PGF mehr kommt. Auch die Bestimmung von VEGF- und PGF-Leveln im RPE in Bereichen außerhalb der Laserspots würde hier helfen.

Die Ergebnisse der ISH in dieser Studie zeigten zum ersten Mal, dass viele MPs zur Koexpression von VEGF und PGF in der Lage sind (Fig. 5 der Publikation). Interessanterweise deckten sich die Bereiche der gefärbten mRNA von VEGF und PGF nicht vollständig, sodass davon auszugehen ist, dass bestimmte Subtypen von MPs nur jeweils VEGF oder PGF exprimieren. Das hieße, dass verschiedene Subtypen von MPs womöglich unterschiedliche Aufgaben im Entzündungsgeschehen und im Prozess der Neovaskularisation wahrnehmen. Die veraltete Einteilung in M1- und M2-Makrophagen liefert hier keine Antworten, da mit Abstand die meisten MPs im Laserspot ohnehin VEGF und PGF koproduzieren (59). Hier ist in Zukunft weitergehende Forschung über die verschiedenen Subtypen der MPs mit ihren Eigenschaften angezeigt.

3.4 Koinhibition vs. Einzelhemmung von VEGF und PGF

Die Tatsache, dass VEGF und PGF aus derselben Familie stammen, lässt durch die große Ähnlichkeit vergleichbare Effekte beider Faktoren vermuten. In der Tat besitzen beide Wachstumsfaktoren proangiogene Eigenschaften (7, 79). Die Frage, die sich nun ergibt, ist, ob dieselbe Wirkweise von VEGF und PGF zu synergistischen Effekten einer gleichzeitigen Hemmung der beiden Faktoren führt, oder überflüssig und ohne weiteren Nutzen ist. Auf Medikamentenebene hieße die Frage dann, ob eine Therapie mit Aflibercept als effektiver angesehen werden kann als eine alleinige VEGF-Hemmung mit Ranibizumab oder Bevacizumab.

Hinweise auf synergistische Effekte von VEGF und PGF liefert zum Beispiel eine Studie über das Neovaskularisationsglaukom, in der durch die intravitreale Ranibizumab-Injektion neben verminderten VEGF-Leveln auch verminderte PGF-Level gemessen werden konnten (83). Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen die Vermutung eines synergistischen Effekts durch mehrere Versuche. Einerseits zeigte die Koinhibition in Bezug auf die CNV-Reduzierung einen größeren Effekt als die Einzelhemmung (Fig. 2 der Publikation). Auf der anderen Seite verdeutlicht die ISH der Flatmounts, dass die Hemmung einer der beiden Wachstumsfaktoren auch die Expression des jeweils anderen Faktors unterdrückt (Fib. 6 der Publikation). Bei der ISH war in Bezug auf die Unterdrückung der Expression die gleichzeitige Hemmung von VEGF und PGF jedoch nicht der Einzelhemmung überlegen (abgesehen von Aflibercept, das die PGF-Expression in der ISH komplett supprimierte). Die Diskrepanz zwischen deutlich höherer CNV-Reduktion durch die Koinhibition und scheinbar geringem Vorteil der Koinhibition auf die Expression der proangiogenen Faktoren in MPs lässt vermuten, dass neben den MPs auch weitere Quellen der beiden Wachstumsfaktoren eine entscheidende Rolle für die Neovaskularisation spielen.

Doch warum zeigen klinische Studien keinen Nachteil von Ranibizumab oder Bevacizumab gegenüber Aflibercept, wenn in dieser Arbeit dargelegt wird, dass die Koinhibition von VEGF und PGF ein scheinbar besseres klinisches Outcome mit sich bringt? Grundsätzlich wird für Aflibercept, Ranibizumab und Bevacizumab von gleichen Ansprechraten auf die feuchte AMD berichtet (84). Unter bestimmten Umständen scheint Aflibercept jedoch wirksamer als seine zwei Konkurrenten zu sein, was womöglich auf

den Vorteil zusätzlichen PGF-Hemmung zurückzuführen ist. So war das Outcome für Patienten mit einer großen RPE-Abhebung unter Aflibercept besser als für Ranibizumab oder Bevacizumab (84). Auch beim diabetischen Makulaödem scheint Aflibercept bei schlechtem Ausgangsvisus der Patienten seinen beiden Konkurrenten überlegen zu sein (85, 86).

Darüber hinaus wird immer wieder von Fällen berichtet, in denen Aflibercept den Visus der auf Bevacizumab oder Ranibizumab nicht mehr ansprechenden Patienten noch verbessern konnte (87). Solche Non-Responder scheinen also auch von der zusätzlichen PGF-Inhibierung zu profitieren. Allerdings kann nicht komplett ausgeschlossen werden, dass der Effekt von Aflibercept bei diesen Non-Respondern in seiner RPE-schützenden Wirkung liegt (88). Womöglich aber kann der schützende Effekt von Aflibercept direkt auf die Hemmung von PGF zurückzuführen sein. In der Tat zeigte eine Studie von Hollborn et al., dass PGF in hoher Konzentration zur Einschränkung der Proliferation von RPE-Zellen führt (89). Damit liegt die Vermutung nahe, dass Aflibercept im Gegensatz zur VEGF-Einzelhemmung durch die Neutralisierung des Proliferation-einschränkenden PGF die RPE-Zellen schützt.

Ein weiterer klärungsbedürftiger Aspekt ist die Tatsache, dass Aflibercept in den Versuchen dieser Arbeit in der Reduktion der Größe von Leckagen und CNV größere Wirkung zeigt als die gleichzeitige Verabreichung von aVEGF und aPGF. Auch bei der ISH zeigt Aflibercept als einzige Komponente eine nahezu komplette Unterdrückung der PGF-Exprimierung in MPs. Zum einen mag dies durch die Molekülstruktur zu erklären sein. Während Bevacizumab als monoklonaler Antikörper und Ranibizumab als Antikörper-Fragment fungieren, lässt sich das Fusionsprotein Aflibercept als VEGF-Trap bezeichnen (90). Diese regelrechte „Falle“ sorgt für eine höhere Bindungsaffinität von VEGF im Vergleich zu aVEGF, Ranibizumab oder Bevacizumab. Zum anderen bindet Aflibercept neben den Domänen, die für die Interaktion mit den VEGF-Rezeptoren wichtig sind, auch an die Heparin-Bindungsdomäne von VEGF-A (90). Auch Heparin und Heparansulfat tragen zur Entstehung von Neovaskularisation bei (91).

Eine weiterer Aspekt, der noch Klärung bedarf, ist die Tatsache, dass die intravitreale Applikation von aVEGF und aPGF in Kombination zu einer systemischen Hochregulation von PGF führen könnte, wie in einer Studie von Zehetner et al. gezeigt wird (92). Dieser Anstieg systemischer PGF-Level könnte der anti-angiogenen Wirkung einer PGF-

Hemmung entgegenstehen und die Neovaskularisation antreiben. Auf der anderen Seite zeigen wir mit unserer Studie, dass die Koinhibition bezüglich der CNV-Größe doch potenter ist als die Einzelhemmung. Selbst wenn es unter dieser Therapie zu einem Anstieg systemischer PGF-Expression kommt, scheint die Wirkung des lokal-injizierten aPGF am Ort der Inflammation zu überwiegen. Mehr Klarheit würde hier die Messung von PGF-Plasmaleveln nach der intravitrealen Injektion schaffen.

3.5 Methodik

Wie in Kapitel 1.8 ersichtlich besitzt die murine Netzhaut keine Makula wie wir sie bei Primaten antreffen. Das lässt zunächst die Frage aufkommen, ob das Modell der laserinduzierten CNV für eine makuläre Erkrankung überhaupt geeignet ist.

Auf den zweiten Blick scheint die murine Netzhaut der menschlichen dennoch ähnlicher zu sein als man zunächst denkt. So wird deren Ähnlichkeit dadurch verdeutlicht, dass in einem transgenen Mausmodell bei älteren Tieren AMD-ähnliche Veränderungen und Atrophien im RPE nachgewiesen werden konnten (93). Auch bei Versuchen mit Zigarettenrauch ausgesetzten Wildtyp-Mäusen konnten mit sub-RPE Ablagerungen und Verdickungen der Bruch-Membran AMD-ähnliche Veränderungen nachgewiesen werden (94). Mit CFH-defizienten Mäusen, die Veränderungen des RPE und der Bruch-Membran zeigten, konnte darüber hinaus noch ein weiterer Risikofaktor für die AMD im Mausmodell nachgewiesen werden (95).

Ein weiterer Schwachpunkt des Modells der laserinduzierten CNV ist die Tatsache, dass im Vergleich zum üblichen Verlauf der AMD, wo eine *chronische* Dysfunktion des RPE zu retinalen Schäden führt, durch den Laserschaden ein *akuter* Schaden entsteht. Dieser akut gesetzte Schaden würde auch ohne intravitreale Injektion von Medikamenten von selbst abheilen, weshalb wir auch bei unbehandelten Mäusen einen Rückgang der CNV Tage nach dem Laser beobachten konnten. So darf man die erzielten Ergebnisse nicht absolut betrachten, sondern muss die erzielten medikamentösen Erfolge in Relation zum natürlichen Verlauf sehen.

Mit der Etablierung der ISH für RPE/choroidale Flatmounts konnten wir wichtige Fragen zur Transkription der Wachstumsfaktoren VEGF und PGF in MPs beantworten. Trotz der beeindruckenden neuen Einsicht in intrazelluläre Vorgänge dürfen die Grenzen dieser Methodik nicht außer Acht gelassen werden. Die dutzenden Waschschriffe der Proben übten unumgänglich starken mechanischen Einfluss auf die oberflächlich angesammelten MPs in den Laserspots des RPE aus. Dies könnte einer der Gründe dafür sein, weshalb die ISH mit weitaus empfindlicheren retinalen Flatmounts nicht geglückt ist. Da der mechanische Einfluss ja alle Versuchsgruppen betraf, erlaubt im Endeffekt der Vergleich zwischen den einzelnen Gruppen gute Aussagen, die detaillierte und absolute Betrachtung der Ergebnisse ist allerdings mit Vorsicht zu genießen.

3.6 Ausblick

Die in dieser Arbeit gewonnenen Einblicke spornen dazu an, sich in Zukunft das große anti-inflammatorische Potential der PGF-Hemmung auch bei anderen Krankheitsmodellen zunutze zu machen und auf andere inflammatorische okuläre Erkrankungen zu übertragen. Angesichts des großen Bedarfs an einer Therapie für die nicht-exsudative Form der AMD wie etwa auch der trockenen AMD.

Darüber hinaus wäre es interessant, das Prinzip der Koinhibition weiter auszubauen und zu untersuchen, ob andere Kombinationstherapien noch stärkere synergistische Effekte auf die Modulation der MPs haben wie zum Beispiel die Kombination aus aPGF und XBD173.

4. Zusammenfassung

Mit dieser Arbeit wurde der immunologische Effekt der Hemmung der in die Pathogenese der AMD eingebundenen Wachstumsfaktoren VEGF und PGF auf mononukleäre Phagozyten am Tiermodell der laserinduzierten CNV untersucht. Da die Therapieoptionen für die AMD als führende Erblindungsursache in der westlichen Welt sehr begrenzt sind und bei der trockenen AMD sogar gänzlich fehlen, ist der Bedarf an neuen Behandlungsansätzen groß. Mononukleäre Phagozyten sind durch ihre zentrale Rolle im Entzündungsprozess ein vielversprechendes therapeutisches Target. In dieser Studie konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Hemmung von PGF die Expression von mRNA in Phagozyten und die Sekretion von VEGF-A und PGF sowie proinflammatorischer Zytokine im Modell der feuchten AMD senkte. Die gleichzeitige Hemmung proangiogener und proinflammatorischer Reaktionswege könnten ein neuer pharmakologischer Angriffspunkt sein und insbesondere für Non-Responder der Anti-VEGF-Therapie ein Hoffnungsschimmer sein.

5. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Klinische Erscheinung von Drusen in einem frühen AMD-Stadium

Abb. 2: Aktive CNV bei exsudativer AMD

Abb. 3: Akkumulation von mononukleären Phagozyten bei der AMD

Abb. 4: Infiltrierende mononukleäre Phagozyten schütten inflammatorische Zytokine aus

Abb. 5: Das Modell der laserinduzierten CNV

6. Literaturverzeichnis

1. Hoon M, Okawa H, Della Santina L, Wong ROL. Functional architecture of the retina: Development and disease. *Prog Retin Eye Res.* 2014 Sep;42:44–84.
2. Herzlich, AA, Patel M, Charles Sauer T, Chan C-C. Retinal anatomy and pathology. In: *Retinal Pharmacotherapy* [Internet]. Elsevier; 2010 [cited 2019 May 26]. p. 5–14. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781437706031000077>
3. Chapot CA, Euler T, Schubert T. How do horizontal cells ‘talk’ to cone photoreceptors? Different levels of complexity at the cone-horizontal cell synapse: How do horizontal cells ‘talk’ to cone photoreceptors? *J Physiol.* 2017 Aug 15;595(16):5495–506.
4. Reichenbach A, Bringmann A. New functions of Müller cells: New Functions of Müller Cells. *Glia.* 2013 May;61(5):651–78.
5. Sparrow JR, Hicks D, Hamel CP. The retinal pigment epithelium in health and disease. *Curr Mol Med.* 2010 Dec;10(9):802–23.
6. Ao J, Wood JP, Chidlow G, Gillies MC, Casson RJ. Retinal pigment epithelium in the pathogenesis of age-related macular degeneration and photobiomodulation as a potential therapy?: RPE in AMD and the role of photobiomodulation. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2018 Aug;46(6):670–86.
7. Witmer AN, Vrensen GFJM, Van Noorden CJF, Schlingemann RO. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Prog Retin Eye Res.* 2003 Jan;22(1):1–29.
8. Booij JC, Baas DC, Beisekeeva J, Gorgels TGMF, Bergen AAB. The dynamic nature of Bruch’s membrane. *Prog Retin Eye Res.* 2010 Jan;29(1):1–18.
9. Wong WL, Su X, Li X, Cheung CMG, Klein R, Cheng C-Y, et al. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health.* 2014 Feb;2(2):e106–16.
10. Colijn JM, Buitendijk GHS, Prokofyeva E, Alves D, Cachulo ML, Khawaja AP, et al. Prevalence of Age-Related Macular Degeneration in Europe. *Ophthalmology.* 2017 Dec;124(12):1753–63.
11. Whitmore SS, Sohn EH, Chirco KR, Drack AV, Stone EM, Tucker BA, et al. Complement activation and choriocapillaris loss in early AMD: Implications for pathophysiology and therapy. *Prog Retin Eye Res.* 2015 Mar;45:1–29.
12. Ferris FL, Wilkinson CP, Bird A, Chakravarthy U, Chew E, Csaky K, et al. Clinical Classification of Age-related Macular Degeneration. *Ophthalmology.* 2013 Apr;120(4):844–

51.

13. Inana G, Murat C, An W, Yao X, Harris IR, Cao J. RPE phagocytic function declines in age-related macular degeneration and is rescued by human umbilical tissue derived cells. *J Transl Med* [Internet]. 2018 Dec [cited 2019 May 28];16(1). Available from: <https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12967-018-1434-6>
14. Parmeggiani F, Romano MR, Costagliola C, Semeraro F, Incorvaia C, D'Angelo S, et al. Mechanism of inflammation in age-related macular degeneration. *Mediators Inflamm*. 2012;2012:546786.
15. Fritsche LG, Igl W, Bailey JNC, Grassmann F, Sengupta S, Bragg-Gresham JL, et al. A large genome-wide association study of age-related macular degeneration highlights contributions of rare and common variants. *Nat Genet*. 2016 Feb;48(2):134–43.
16. Seddon JM, Yu Y, Miller EC, Reynolds R, Tan PL, Gowrisankar S, et al. Rare variants in CFI, C3 and C9 are associated with high risk of advanced age-related macular degeneration. *Nat Genet*. 2013 Nov;45(11):1366–70.
17. Schuchard RA. Preferred retinal loci and macular scotoma characteristics in patients with age-related macular degeneration. *Can J Ophthalmol*. 2005 Jun;40(3):303–12.
18. Fleckenstein M, Mitchell P, Freund KB, Sadda S, Holz FG, Brittain C, et al. The Progression of Geographic Atrophy Secondary to Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmology*. 2018 Mar;125(3):369–90.
19. Wang H, Hartnett ME. Regulation of signaling events involved in the pathophysiology of neovascular AMD. *Mol Vis*. 2016;22:189–202.
20. Mokwa NF, Ristau T, Keane PA, Kirchhof B, Sadda SR, Liakopoulos S. Grading of Age-Related Macular Degeneration: Comparison between Color Fundus Photography, Fluorescein Angiography, and Spectral Domain Optical Coherence Tomography. *J Ophthalmol*. 2013;2013:385915.
21. Mitchell P, Liew G, Gopinath B, Wong TY. Age-related macular degeneration. *The Lancet*. 2018 Sep;392(10153):1147–59.
22. Pennington KL, DeAngelis MM. Epidemiology of age-related macular degeneration (AMD): associations with cardiovascular disease phenotypes and lipid factors. *Eye Vis* [Internet]. 2016 Dec [cited 2019 May 30];3(1). Available from: <http://eandv.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40662-016-0063-5>
23. DeAngelis MM, Owen LA, Morrison MA, Morgan DJ, Li M, Shakoob A, et al. Genetics of age-related macular degeneration (AMD). *Hum Mol Genet*. 2017 01;26(R1):R45–50.
24. Rudnicka AR, Kapetanakis VV, Jarrar Z, Wathern AK, Wormald R, Fletcher AE, et al.

Incidence of Late-Stage Age-Related Macular Degeneration in American Whites: Systematic Review and Meta-analysis. *Am J Ophthalmol*. 2015 Jul;160(1):85-93.e3.

25. Al-Zamil WM, Yassin SA. Recent developments in age-related macular degeneration: a review. *Clin Interv Aging*. 2017;12:1313–30.

26. Zarbin M, Sugino I, Townes-Anderson E. Concise Review: Update on Retinal Pigment Epithelium Transplantation for Age-Related Macular Degeneration. *STEM CELLS Transl Med*. 2019 May;8(5):466–77.

27. Geerlings MJ, de Jong EK, den Hollander AI. The complement system in age-related macular degeneration: A review of rare genetic variants and implications for personalized treatment. *Mol Immunol*. 2017;84:65–76.

28. Guymer RH, Wu Z, Hodgson LAB, Caruso E, Brassington KH, Tindill N, et al. Subthreshold Nanosecond Laser Intervention in Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmology*. 2019 Jun;126(6):829–38.

29. Gragoudas ES, Adamis AP, Cunningham ET, Feinsod M, Guyer DR, VEGF Inhibition Study in Ocular Neovascularization Clinical Trial Group. Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med*. 2004 Dec 30;351(27):2805–16.

30. Brown DM, Michels M, Kaiser PK, Heier JS, Sy JP, Ianchulev T, et al. Ranibizumab versus verteporfin photodynamic therapy for neovascular age-related macular degeneration: Two-year results of the ANCHOR study. *Ophthalmology*. 2009 Jan;116(1):57-65.e5.

31. Comparison of Age-related Macular Degeneration Treatments Trials (CATT) Research Group, Martin DF, Maguire MG, Fine SL, Ying G, Jaffe GJ, et al. Ranibizumab and bevacizumab for treatment of neovascular age-related macular degeneration: two-year results. *Ophthalmology*. 2012 Jul;119(7):1388–98.

32. Stewart MW. Aflibercept (VEGF Trap-eye): the newest anti-VEGF drug. *Br J Ophthalmol*. 2012 Sep;96(9):1157–8.

33. Papadopoulos N, Martin J, Ruan Q, Rafique A, Rosconi MP, Shi E, et al. Binding and neutralization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and related ligands by VEGF Trap, ranibizumab and bevacizumab. *Angiogenesis*. 2012 Jun;15(2):171–85.

34. A Randomized, Placebo-Controlled, Clinical Trial of High-Dose Supplementation With Vitamins C and E, Beta Carotene, and Zinc for Age-Related Macular Degeneration and Vision Loss: AREDS Report No. 8. *Arch Ophthalmol*. 2001 Oct 1;119(10):1417.

35. Heesterbeek TJ, Lorés-Motta L, Hoyng CB, Lechanteur YTE, den Hollander AI. Risk factors for progression of age-related macular degeneration. *Ophthalmic Physiol Opt*. 2020 Mar;40(2):140–70.

36. Penn JS, Madan A, Caldwell RB, Bartoli M, Caldwell RW, Hartnett ME. Vascular endothelial growth factor in eye disease. *Prog Retin Eye Res.* 2008 Jul;27(4):331–71.
37. Krause TA, Alex AF, Engel DR, Kurts C, Eter N. VEGF-production by CCR2-dependent macrophages contributes to laser-induced choroidal neovascularization. *PloS One.* 2014;9(4):e94313.
38. Klettner A, Westhues D, Lassen J, Bartsch S, Roeder J. Regulation of constitutive vascular endothelial growth factor secretion in retinal pigment epithelium/choroid organ cultures: p38, nuclear factor κ B, and the vascular endothelial growth factor receptor-2/phosphatidylinositol 3 kinase pathway. *Mol Vis.* 2013;19:281–91.
39. Dor Y, Porat R, Keshet E. Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis. *Am J Physiol-Cell Physiol.* 2001 Jun;280(6):C1367–74.
40. Slomiany MG, Rosenzweig SA. IGF-1-induced VEGF and IGFBP-3 secretion correlates with increased HIF-1 α expression and activity in retinal pigment epithelial cell line D407. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004 Aug;45(8):2838–47.
41. Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Delli-Bovi P, Persico MG. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci.* 1991 Oct 15;88(20):9267–71.
42. Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Ferraro MG, Aprelikova O, Alitalo K, et al. Two alternative mRNAs coding for the angiogenic factor, placenta growth factor (PlGF), are transcribed from a single gene of chromosome 14. *Oncogene.* 1993 Apr;8(4):925–31.
43. Yang W, Ahn H, Hinrichs M, Torry RJ, Torry DS. Evidence of a novel isoform of placenta growth factor (PlGF-4) expressed in human trophoblast and endothelial cells. *J Reprod Immunol.* 2003 Oct;60(1):53–60.
44. Rakic J-M, Lambert V, Devy L, Luttun A, Carmeliet P, Claes C, et al. Placental growth factor, a member of the VEGF family, contributes to the development of choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003 Jul;44(7):3186–93.
45. Mesquita J, Castro-de-Sousa JP, Vaz-Pereira S, Neves A, Passarinha LA, Tomaz CT. Vascular endothelial growth factors and placenta growth factor in retinal vasculopathies: Current research and future perspectives. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2018 Feb;39:102–15.
46. Crespo-Garcia S, Corkhill C, Roubeyx C, Davids A-M, Kociok N, Strauss O, et al. Inhibition of Placenta Growth Factor Reduces Subretinal Mononuclear Phagocyte Accumulation in Choroidal Neovascularization. *Investig Ophthalmology Vis Sci.* 2017 Oct 4;58(12):4997.

47. Huo X, Li Y, Jiang Y, Sun X, Gu L, Guo W, et al. Inhibition of Ocular Neovascularization by Co-Inhibition of VEGF-A and PLGF. *Cell Physiol Biochem*. 2015;35(5):1787–96.
48. Miyamoto N, de Kozak Y, Jeanny JC, Glotin A, Mascarelli F, Massin P, et al. Placental growth factor-1 and epithelial haemato–retinal barrier breakdown: potential implication in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetologia*. 2007 Feb;50(2):461–70.
49. Van Bergen T, Hu T-T, Etienne I, Reyns GE, Moons L, Feyen JHM. Neutralization of placental growth factor as a novel treatment option in diabetic retinopathy. *Exp Eye Res*. 2017;165:136–50.
50. Perelman N. Placenta growth factor activates monocytes and correlates with sickle cell disease severity. *Blood*. 2003 Apr 24;102(4):1506–14.
51. Zhou X, Qi Y. Larynx carcinoma regulates tumor-associated macrophages through PLGF signaling. *Sci Rep*. 2015 May 11;5:10071.
52. Adini A, Kornaga T, Firoozbakht F, Benjamin LE. Placental growth factor is a survival factor for tumor endothelial cells and macrophages. *Cancer Res*. 2002 May 15;62(10):2749–52.
53. Chow A, Brown BD, Merad M. Studying the mononuclear phagocyte system in the molecular age. *Nat Rev Immunol*. 2011 Nov;11(11):788–98.
54. Wang X, Zhao L, Zhang J, Fariss RN, Ma W, Kretschmer F, et al. Requirement for Microglia for the Maintenance of Synaptic Function and Integrity in the Mature Retina. *J Neurosci*. 2016 Mar 2;36(9):2827–42.
55. Brown GC, Neher JJ. Microglial phagocytosis of live neurons. *Nat Rev Neurosci*. 2014 Apr;15(4):209–16.
56. Mulfaul K, Rhatigan M, Doyle S. Toll-Like Receptors and Age-Related Macular Degeneration. In: Ash JD, Anderson RE, LaVail MM, Bowes Rickman C, Hollyfield JG, Grimm C, editors. *Retinal Degenerative Diseases* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2018 [cited 2020 May 8]. p. 19–28. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-75402-4_3
57. Ma W, Coon S, Zhao L, Fariss RN, Wong WT. A2E accumulation influences retinal microglial activation and complement regulation. *Neurobiol Aging*. 2013 Mar;34(3):943–60.
58. Huang H, Parlier R, Shen J, Luty GA, Viores SA. VEGF Receptor Blockade Markedly Reduces Retinal Microglia/Macrophage Infiltration into Laser-Induced CNV. Boulton ME, editor. *PLoS ONE*. 2013 Aug 20;8(8):e71808.
59. Guillonneau X, Eandi CM, Paques M, Sahel J-A, Sapieha P, Sennlaub F. On phagocytes

- and macular degeneration. *Prog Retin Eye Res.* 2017 Nov;61:98–128.
60. Wright TM. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci.* 1997;2(4):d12-26.
 61. Kauppinen A, Paterno JJ, Blasiak J, Salminen A, Kaarniranta K. Inflammation and its role in age-related macular degeneration. *Cell Mol Life Sci.* 2016 May;73(9):1765–86.
 62. Izumi-Nagai K, Nagai N, Ozawa Y, Mihara M, Ohsugi Y, Kurihara T, et al. Interleukin-6 Receptor-Mediated Activation of Signal Transducer and Activator of Transcription-3 (STAT3) Promotes Choroidal Neovascularization. *Am J Pathol.* 2007 Jun;170(6):2149–58.
 63. Chalam KV, Grover S, Sambhav K, Balaiya S, Murthy RK. Aqueous Interleukin-6 Levels Are Superior to Vascular Endothelial Growth Factor in Predicting Therapeutic Response to Bevacizumab in Age-Related Macular Degeneration. *J Ophthalmol.* 2014;2014:1–6.
 64. Levy O, Calippe B, Lavalette S, Hu SJ, Raoul W, Dominguez E, et al. Apolipoprotein E promotes subretinal mononuclear phagocyte survival and chronic inflammation in age-related macular degeneration. *EMBO Mol Med.* 2015 Feb;7(2):211–26.
 65. Lavalette S, Raoul W, Houssier M, Camelo S, Levy O, Calippe B, et al. Interleukin-1 β inhibition prevents choroidal neovascularization and does not exacerbate photoreceptor degeneration. *Am J Pathol.* 2011 May;178(5):2416–23.
 66. Eandi CM, Charles Messance H, Augustin S, Dominguez E, Lavalette S, Forster V, et al. Subretinal mononuclear phagocytes induce cone segment loss via IL-1 β . *eLife* [Internet]. 2016 Jul 20 [cited 2020 May 8];5. Available from: <https://elifesciences.org/articles/16490>
 67. Hu SJ, Calippe B, Lavalette S, Roubex C, Montassar F, Housset M, et al. Upregulation of P2RX7 in Cx3cr1-Deficient Mononuclear Phagocytes Leads to Increased Interleukin-1 Secretion and Photoreceptor Neurodegeneration. *J Neurosci.* 2015 May 6;35(18):6987–96.
 68. Lichtlen P, Lam TT, Nork TM, Streit T, Urech DM. Relative Contribution of VEGF and TNF- α in the Cynomolgus Laser-Induced CNV Model: Comparing the Efficacy of Bevacizumab, Adalimumab, and ESBA105. *Investig Ophthalmology Vis Sci.* 2010 Sep 1;51(9):4738.
 69. Housset M, Samuel A, Ettaiche M, Bemelmans A, Beby F, Billon N, et al. Loss of Otx2 in the Adult Retina Disrupts Retinal Pigment Epithelium Function, Causing Photoreceptor Degeneration. *J Neurosci.* 2013 Jun 12;33(24):9890–904.
 70. Seabrook TA, Burbridge TJ, Crair MC, Huberman AD. Architecture, Function, and Assembly of the Mouse Visual System. *Annu Rev Neurosci.* 2017 Jul 25;40(1):499–538.
 71. Tobe T, Ortega S, Luna JD, Ozaki H, Okamoto N, Derevjani N, et al. Targeted Disruption of the FGF2 Gene Does Not Prevent Choroidal Neovascularization in a Murine

Model. *Am J Pathol*. 1998 Nov;153(5):1641–6.

72. Shah RS, Soetikno BT, Lajko M, Fawzi AA. A Mouse Model for Laser-induced Choroidal Neovascularization. *J Vis Exp [Internet]*. 2015 Dec 27 [cited 2019 Jul 5];(106). Available from: <http://www.jove.com/video/53502/a-mouse-model-for-laser-induced-choroidal-neovascularization>

73. Volland S, Esteve-Rudd J, Hoo J, Yee C, Williams DS. A Comparison of Some Organizational Characteristics of the Mouse Central Retina and the Human Macula. Li T, editor. *PLOS ONE*. 2015 Apr 29;10(4):e0125631.

74. Kuse Y, Takahashi K, Inoue Y, Izawa H, Nakamura S, Shimazawa M, et al. Intravitreal aflibercept protects photoreceptors of mice against excessive light exposure. *J Pharmacol Sci*. 2018 Aug;137(4):407–11.

75. Couturier A, Bousquet E, Zhao M, Naud M-C, Klein C, Jonet L, et al. Anti-vascular endothelial growth factor acts on retinal microglia/macrophage activation in a rat model of ocular inflammation. *Mol Vis*. 2014;20:908–20.

76. Mohr LKM, Hoffmann AV, Brandstetter C, Holz FG, Krohne TU. Effects of Inflammasome Activation on Secretion of Inflammatory Cytokines and Vascular Endothelial Growth Factor by Retinal Pigment Epithelial Cells. *Investig Ophthalmology Vis Sci*. 2015 Oct 7;56(11):6404.

77. Tseng WA, Thein T, Kinnunen K, Lashkari K, Gregory MS, D'Amore PA, et al. NLRP3 Inflammasome Activation in Retinal Pigment Epithelial Cells by Lysosomal Destabilization: Implications for Age-Related Macular Degeneration. *Investig Ophthalmology Vis Sci*. 2013 Jan 7;54(1):110.

78. Copland DA, Hussain K, Baalasubramanian S, Hughes TR, Morgan BP, Xu H, et al. Systemic and local anti-C5 therapy reduces the disease severity in experimental autoimmune uveoretinitis. *Clin Exp Immunol*. 2010 Mar;159(3):303–14.

79. Scholz R, Caramoy A, Bhuckory MB, Rashid K, Chen M, Xu H, et al. Targeting translocator protein (18 kDa) (TSPO) dampens pro-inflammatory microglia reactivity in the retina and protects from degeneration. *J Neuroinflammation [Internet]*. 2015 Dec [cited 2020 May 9];12(1). Available from: <http://www.jneuroinflammation.com/content/12/1/201>

80. Karlstetter M, Kopatz J, Aslanidis A, Shahraz A, Caramoy A, Linnartz-Gerlach B, et al. Polysialic acid blocks mononuclear phagocyte reactivity, inhibits complement activation, and protects from vascular damage in the retina. *EMBO Mol Med*. 2017 Feb;9(2):154–66.

81. Lückoff A, Caramoy A, Scholz R, Prinz M, Kalinke U, Langmann T. Interferon-beta signaling in retinal mononuclear phagocytes attenuates pathological neovascularization.

EMBO Mol Med. 2016 Jun;8(6):670–8.

82. Rakic J-M, Lambert V, Devy L, Luttun A, Carmeliet P, Claes C, et al. Placental growth factor, a member of the VEGF family, contributes to the development of choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003 Jul;44(7):3186–93.

83. Zhou M, Wang J, Wang W, Huang W, Ding X, Zhang X. Placenta Growth Factor in Eyes with Neovascular Glaucoma Is Decreased after Intravitreal Ranibizumab Injection. Duesbery NS, editor. *PLOS ONE*. 2016 Jan 19;11(1):e0146993.

84. Park DH, Sun HJ, Lee SJ. A comparison of responses to intravitreal bevacizumab, ranibizumab, or aflibercept injections for neovascular age-related macular degeneration. *Int Ophthalmol*. 2017 Oct;37(5):1205–14.

85. Heier JS, Bressler NM, Avery RL, Bakri SJ, Boyer DS, Brown DM, et al. Comparison of Aflibercept, Bevacizumab, and Ranibizumab for Treatment of Diabetic Macular Edema: Extrapolation of Data to Clinical Practice. *JAMA Ophthalmol*. 2016 Jan 1;134(1):95.

86. Cai S, Bressler NM. Aflibercept, bevacizumab or ranibizumab for diabetic macular oedema: recent clinically relevant findings from DRCR.net Protocol T. *Curr Opin Ophthalmol*. 2017 Nov;28(6):636–43.

87. Unsal E, Cubuk MO. The outcomes of aflibercept therapy in patients with age-related macular degeneration resistant to bevacizumab or ranibizumab. *J Curr Ophthalmol*. 2018 Dec;30(4):337–42.

88. Parisi L, Fuhrer R, Zinkernagel M, Enzmann V. Ranibizumab and Bevacizumab but Not Aflibercept Inhibit Proliferation of Primary Human Retinal Pigment Epithelium in vitro. *Ophthalmologica*. 2019;241(3):137–42.

89. Hollborn M, Tenckhoff S, Seifert M, Köhler S, Wiedemann P, Bringmann A, et al. Human retinal epithelium produces and responds to placenta growth factor. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2006 Jun;244(6):732–41.

90. MacDonald DA, Martin J, Muthusamy KK, Luo J-K, Pyles E, Rafique A, et al. Aflibercept exhibits VEGF binding stoichiometry distinct from bevacizumab and does not support formation of immune-like complexes. *Angiogenesis*. 2016;19(3):389–406.

91. Zhao W, McCallum SA, Xiao Z, Zhang F, Linhardt RJ. Binding affinities of vascular endothelial growth factor (VEGF) for heparin-derived oligosaccharides. *Biosci Rep*. 2012 Feb 1;32(1):71–81.

92. Zehetner C, Bechrakis NE, Stattin M, Kirchmair R, Ulmer H, Kralinger MT, et al. Systemic Counterregulatory Response of Placental Growth Factor Levels to Intravitreal Aflibercept Therapy. *Investig Ophthalmology Vis Sci*. 2015 May 21;56(5):3279.

93. Rakoczy PE, Zhang D, Robertson T, Barnett NL, Papadimitriou J, Constable IJ, et al. Progressive Age-Related Changes Similar to Age-Related Macular Degeneration in a Transgenic Mouse Model. *Am J Pathol.* 2002 Oct;161(4):1515–24.
94. Espinosa-Heidmann DG, Suner IJ, Catanuto P, Hernandez EP, Marin-Castano ME, Cousins SW. Cigarette Smoke–Related Oxidants and the Development of Sub-RPE Deposits in an Experimental Animal Model of Dry AMD. *Investig Ophthalmology Vis Sci.* 2006 Feb 1;47(2):729.
95. Coffey PJ, Gias C, McDermott CJ, Lundh P, Pickering MC, Sethi C, et al. Complement factor H deficiency in aged mice causes retinal abnormalities and visual dysfunction. *Proc Natl Acad Sci.* 2007 Oct 16;104(42):16651–6.

7. Lebenslauf

08.08.1994	geboren in Marl
08/2004 – 06/2013	Albert-Schweitzer-/Geschwister-Scholl-Gymnasium Marl
06/2013	Erlangung der allgemeinen Hochschulreife (Note 1,0)
10/2013	Aufnahme des Studiums der Humanmedizin, Universität zu Köln
09/2015	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Physikum)
09/2016 – 02/2017	Auslandssemester an der Università degli Studi di Palermo, Italien
08/2017	Absolvierung des FELASA B Kurses an der Humboldt-Universität zu Berlin
09/2017	Erhalt des Doktorandenstipendiums der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft (DOG)
10/2017 – 01/2019	Experimentelle Phase der Promotion
02/2019	Veröffentlichung im Journal of Neuroinflammation
04/2019	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
05/2019 – 04/2020	Praktisches Jahr an Lehrkrankenhäusern der Medizinischen Universität Wien, University of Cape Town, University of Melbourne und der Universität zu Köln
05/2020	3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung sowie Erhalt der Approbation