

Der Ophthalmologe

Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft

**Elektronischer Sonderdruck für
M. Kernt**

Ein Service von Springer Medizin

Ophthalmologe 2011 · 108:445–451 · DOI 10.1007/s00347-010-2304-7

© Springer-Verlag 2010

zur nichtkommerziellen Nutzung auf der
privaten Homepage und Institutssite des Autors

**M. Kernt · S. Thiele · C. Hirneiss · A.S. Neubauer · C.A. Lackerbauer · A. Wolf · K.H. Eibl · C. Haritoglou ·
M.W. Ulbig · A. Kampik**

Zytoprotektive und antiangiogene Wirkung des Multikinaseinhibitors Sorafenib im retinalen Pigmentepithel

Zytoprotektive und antiangiogene Wirkung des Multikinaseinhibitors Sorafenib im retinalen Pigmentepithel

Die Prävalenz der altersbedingten Makuladegeneration (AMD) steigt mit der demographischen Entwicklung unserer Gesellschaft stetig an. Sie verursacht 8,7% aller Erblindungen im Sinne des Gesetzes und ist neben Katarakt und Glaukom die dritthäufigste Ursache für Sehbehinderung weltweit [13, 38].

Frühe Stadien der AMD sind durch die Formation von Drusen und Atrophie des retinalen Pigmentepithels (RPE) charakterisiert. Im weiteren Verlauf entwickeln ca. 10% der Patienten die neovaskuläre Form dieser Erkrankung. Diese führt in vielen Fällen zu einem schnellen Verlust der zentralen Sehschärfe [13].

Die AMD ist eine multifaktorielle Erkrankung und ihre Ursachen sind bisher nur teilweise erforscht. Es konnten jedoch eine Reihe von Risikofaktoren ausfindig gemacht werden, die eine mögliche Ursache für die typischen degenerativen Veränderungen im retinalen Pigmentepithel (RPE) bei AMD sein könnten. Neben genetischen und ernährungsbedingten Einflussfaktoren [10, 11, 13, 47] gelten auch die im Laufe des Lebens kumulierende Einwirkung des Sonnenlichts auf die Netzhaut und die Bildung oxidativer Stoffwechselprodukte als mögliche Ursachen für die Entstehung und das Fortschreiten der AMD [7, 8, 10, 11, 13, 29, 47, 52].

Pathophysiologisch spielt bei der neovaskulären AMD die Bildung von chorioidalen Neovaskularisationen (CNV) im Bereich der Makula eine zentrale Rolle [15, 22]. Durch die daraus resultierenden Flüssig-

sigkeitseinlagerungen und Blutungen im Bereich der Stelle des schärfsten Sehens kann es zu einem unwiederbringlichen Verlust der Lesefähigkeit, des Erkennens von Gesichtern und der Fähigkeit, Auto zu fahren, kommen [15, 22].

Die vermehrte Expression von Wachstumsfaktoren, insbesondere des „vascular endothelial growth factor“ (VEGF), wurde als einer der Schlüsselmechanismen bei der Entstehung von CNV erkannt [3]. Spezifische Antikörper gegen VEGF haben zu deutlichen Fortschritten in der Therapie dieser Erkrankung geführt [40, 41]. Mit dem Anti-VEGF-Antikörperfragment Ranibizumab (Lucentis®, Genentech, South San Francisco, USA), aber auch anderen verwandten Wirkstoffen, stehen uns seit einiger Zeit sichere und wirksame Therapeutika bei neovaskulärer AMD zur Verfügung [40]. Dennoch kommt es trotz dieser neuen therapeutischen Möglichkeiten bei einer Vielzahl der Patienten trotz Behandlung zu einer weiteren Verschlechterung der Sehschärfe. Zudem spricht die Erkrankung bei einem Teil der Patienten auf die Behand-

lung mit VEGF-Antikörpern nur unzureichend an [37, 40].

Mögliche Ursachen hierfür scheinen zu sein, dass die alleinige Blockade von VEGF im Glaskörper bei Patienten mit AMD zwar in vielen Fällen zu einer Stabilisierung oder leichten Verbesserung der Sehschärfe führt. Die neu gebildeten Blutgefäße und das sie umgebende, pathologisch veränderte Gewebe bleiben aber weiter bestehen, und langfristig ist ein weiteres Voranschreiten der Erkrankung festzustellen [37, 40]. Ein Grund für diesen Mangel an nachhaltiger Wirkung mag sein, dass redundante molekulare Signalwege trotz Therapie weiter aktiv bleiben und dass die alleinige Reduktion von VEGF im Extrazellulärraum nur begrenzte Wirkung auf das neovaskuläre Gewebe hat. Außerdem wird durch die Blockade von VEGF mit entsprechenden Antikörpern lediglich das von einer Vielzahl unterschiedlicher Zellen im Auge überschüssig produzierte Effektormolekül im Glaskörper abgefangen. Ob aber durch diese Therapie auch ein direkter Einfluss auf die Produktion von VEGF und seiner

Tab. 1 Für die Real-Time-PCR verwendete Primer

Target	Länge	Position	AT(C)	% GC	Sequenz
VEGF-A	18	1540–1557	60	56	Tgcccgctgtcttaaat
	18	1592–1609	60	61	tctccgctctgagcaagg
VEGFR-1	20	2693–2712	59	50	cttatgatccagcaagtgg
	20	2748–2767	60	50	caaaagccctctccaagt
VEGFR-2	22	3768–3789	59	41	gaacattgggaatctcttgc
	23	3811–3833	60	43	cggagaacaatgtagtcttgc

VEGF-A, „vascular endothelial growth factor A“, VEGFR-1 „vascular endothelial growth factor receptor 1“, VEGFR-2 „vascular endothelial growth factor receptor 2“.

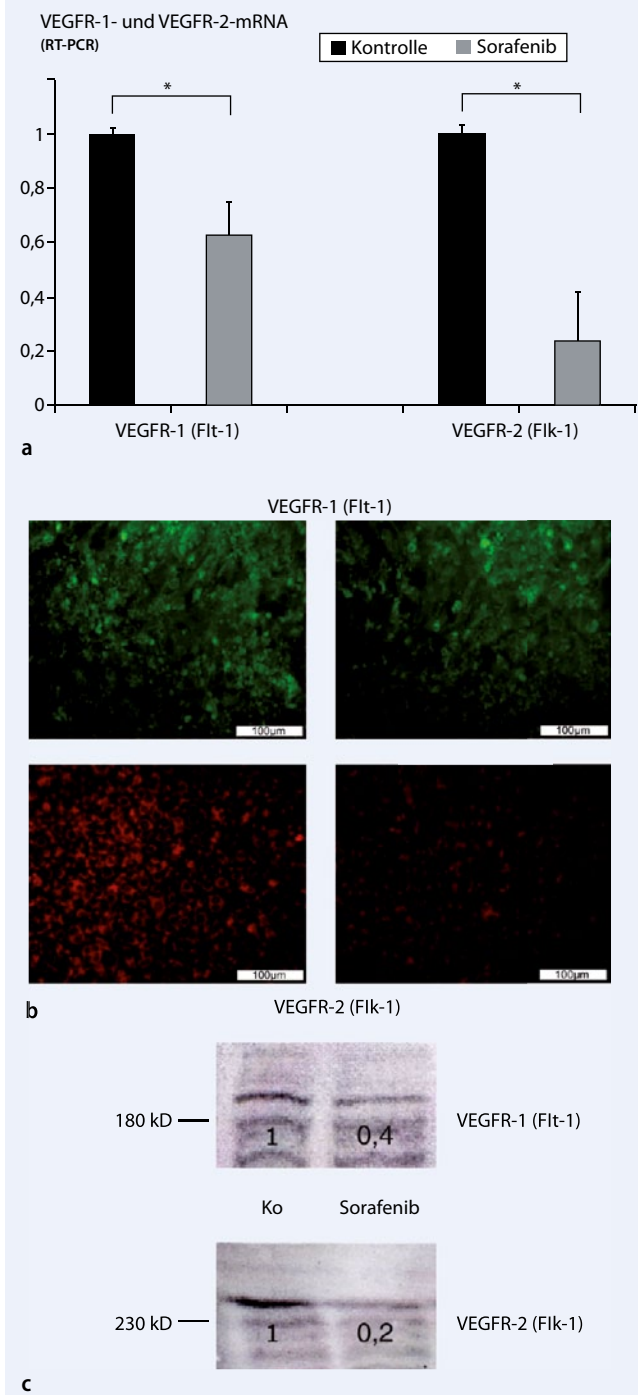


Abb. 1 **a** Expression von VEGFR-1/2-mRNA (RT-PCR) in primären humanen RPE-Zellen. Bei den Zellen, die für 24 h mit 1 µg/ml Sorafenib behandelt wurden, kam es zu einer signifikanten Abnahme der mRNA-Expression von VEGFR-1 und VEGFR-2. **b** Immunhistochemische Fluoreszenzfärbung zum Nachweis von VEGFR-1/2-Protein-Expression in primären RPE-Zellen: unbehandelte Zellen (Kontrolle) und nach 24 h Inkubation mit 1 µg/ml Sorafenib. **c** Repräsentative Westernblots zum Nachweis von VEGFR-1/2-Protein-Expression: unbehandelte primäre RPE-Zellen (Ko) und nach 24 h Inkubation mit 1 µg/ml Sorafenib (Sorafenib). RT-PCR Real-Time-PCR, VEGFR-1/2 Vascular-endothelial-growth-factor-Rezeptoren 1/2

Rezeptoren im retinalen Gewebe resultiert, wird kontrovers diskutiert [30, 48].

Eine der Hauptfunktionen des RPE ist die Aufrechterhaltung der äußeren Blut-Retina-Schranke, durch die ein selektiver Transport zwischen den choroidalen Gefäßen und der äußeren Retina gewährleistet wird. Als phagozytisches System ist das RPE für die Erneuerung der Photorezeptoren von eminenter Bedeutung. Außerdem ist es für die Integrität der Stäbchen und Zapfen unerlässlich

[13] und spielt auch bei der Entstehung eines Makulaödems eine herausragende Rolle [32]. Für den gesteuerten Abtransport von Flüssigkeit aus dem Subretinalraum und die Barrierefunktion des RPE ist die Funktionsfähigkeit seiner „tight junctions“ von entscheidender Bedeutung [1, 32]. Dem Wachstumsfaktor VEGF wird eine besondere Rolle bei der Entstehung eines Makulaödems zugeschrieben, da er eine Unterbrechung der Blut-Retina-Schranke induzieren [43] und einen

effizienten Abtransport von subretinaler Flüssigkeit verhindern kann [4, 5].

Für eine nachhaltige Therapie von CNV und feuchter AMD sind deshalb Wirkstoffe, die bereits bei der Produktion der ursächlichen Wachstumsfaktoren, aber auch an deren Rezeptoren, die bei der Regulation der Neovaskularisationskaskade in der Netzhaut eine zentrale Rolle einnehmen, wünschenswert.

Multikinaseinhibitoren stellen eine neue Wirkstoffklasse dar, die potenziell an verschiedenen Stellen der Neovaskularisationskaskade eingreifen [50]. Diese Studie untersucht die Wirkung des Multikinaseinhibitors Sorafenib (Nexavar, BAY 43-9006) auf die Expression von VEGFR-1/2 sowie dessen Wirkung auf die lichtinduzierte Expressionszunahme von VEGF. Hierfür wurden primäre, humane retinale Pigmentepithelzellen mit rein weißem Licht (spectral range 400–700 nm) bestrahlt. Zusätzlich wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen Sorafenib behandelt. Dann wurde die Vitalität der Zellen untersucht und die Expression von VEGF sowie seiner Rezeptoren VEGFR-1/2 bestimmt.

Methoden

Kultivierung und Bestrahlung primärer RPE-Zellen

Um die Wirkung erhöhter Lichteinstrahlung auf das menschliche RPE hinsichtlich Vitalität und Expression des Wachstumsfaktors VEGF-A zu untersuchen, wurden primäre, humane RPE-Zellen, wie bereits in früheren Arbeiten beschrieben, für 60 min mit rein weißem Licht bestrahlt [26]. Hierzu wurde eine Hochleistungs-Xenon-Lichtquelle mit homogenem Lichtspektrum (400–700 nm) verwendet. An die Lichtquelle wurde ein Lichtleiter angeschlossen, über den die Bestrahlung der Zellen erfolgte. Unmittelbar vor der Bestrahlung wurde das Zellkulturmedium gegen phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) getauscht. Unter Kontrolle des Lichtspektrums und der Strahlungsintensität mittels Spektralphotometer wurden die Zellen von oben für 60 min mit einer Intensität von 350 mW/cm² bestrahlt. Unmittelbar nach der Bestrahlung wurde die PBS-

Lösung gegen serumfreies Zellkulturmedium, das die untersuchte Testsubstanz (Sorafenib) enthielt, ausgetauscht, und die Zellen wurden für 24 h in Dunkelheit gehalten. Dann wurde der Tetrazolium-Farb-Reduktions-Assay [MTT; 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] durchgeführt. Außerdem wurde mittels Real-Time-PCR (RT-PCR) eine quantitative Analyse der mRNA Expression des Wachstumsfaktors VEGF sowie die Umsetzung der entsprechenden mRNA-Transkripte in die entsprechenden Proteine durch einen „VEGF enzyme linked immunosorbent assay“ (ELISA) untersucht.

RPE-Zellen wurden von 5 Spenderaugen an der Hornhautbank der Augenklinik der LMU gewonnen und, wie andernorts beschrieben, kultiviert [26]. Dabei wurden nur die 2. und 3. Passage für die Versuche verwendet. Frühe Passagen von primären RPE-Zellen weisen noch zelleigenes Lipofuscin auf, das als Photosensitizer wirkt und bei der Entstehung der exsudativen AMD eine wichtige Rolle spielt [21, 45]. Dieser natürliche Lipofuscingehalt geht mit zunehmender Kultivierungsdauer der Zellen verloren [6, 16, 36].

Die Untersuchungen wurden an stationären Zellkulturen durchgeführt. Stationäre Zellkulturen erleichtern besonders im MTT-Assay die Abgrenzung von zytotoxischen gegenüber antiproliferativen Effekten. Hierzu wurden ca. 3×10^5 Zellen pro Well auf 35-mm-Petrischalen ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Dann wurden die Zellen, wie oben beschrieben, unter serumfreien Kulturbedingungen mit rein weißem Licht bestrahlt und mit der Testsubstanz (Sorafenib) behandelt.

MTT-Assay

Der MTT-Assay misst die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase und ist eine Standarduntersuchungstechnik der zellbiologischen Forschung [26, 34]. Prinzipiell werden die Zellen mit dem initial gelben MTT-Farbstoff inkubiert. Der Farbstoff wird, dem Vitalitätsgrad der Zellen entsprechend, verstoffwechselt und schlägt ins Violette über. Diese Farbänderung wird dann photometrisch erfasst und erlaubt so Rückschlüsse auf die

Ophthalmologie 2011 · 108:445–451 DOI 10.1007/s00347-010-2304-7
© Springer-Verlag 2011

M. Kernt · S. Thiele · C. Hirneiss · A.S. Neubauer · C.A. Lackerbauer · A. Wolf · K.H. Eibl · C. Haritoglou · M.W. Ulbig · A. Kampik

Zytoprotektive und antiangiogene Wirkung des Multikinaseinhibitors Sorafenib im retinalen Pigmentepithel

Zusammenfassung

Hintergrund. Kumulative Lichtexposition wird für die Entstehung der altersabhängigen Makuladegeneration (AMD) mitverantwortlich gemacht. Die Hemmung des „vascular endothelial growth factor A“ (VEGF) ist das wichtigste Ziel der aktuellen antiangiogenen Behandlungsstrategien bei AMD. In Fallberichten konnte die Wirksamkeit des Multikinaseinhibitors Sorafenib bei Patienten mit exsudativer AMD gezeigt werden. Diese Studie untersucht die Wirkung von Sorafenib auf die Expression der VEGF-Rezeptoren 1 und 2 (VEGFR-1/2) und die lichtinduzierte Expressionzunahme von VEGF in humanen retinalen Pigmentepithelzellen (RPE-Zellen).

Methoden. Der Effekt von Sorafenib auf die Expression von VEGFR-1 und -2 in primären humanen RPE-Zellen wurde auf zellulärer Ebene mittels RT-PCR, Immunhistochemie und Westernblot untersucht. Zusätzlich wurden die RPE-Zellen mit rein weißem Licht bestrahlt und mit Sorafenib behandelt. Dann

wurden die Vitalität der RPE-Zellen und die Expression von VEGF auf zellulärer Ebene bestimmt (Real-Time-PCR, Westernblot, Immunhistochemie, ELISA).

Ergebnis. Sorafenib reduziert die VEGFR-1/2-Expression von humanen RPE-Zellen. Die Bestrahlung der RPE-Zellen mit weißem Licht führt zu einer Abnahme der Vitalität und zur Induktion von VEGF. Diese lichtinduzierten Effekte werden signifikant reduziert, wenn Zellen mit Sorafenib (1 µg/ml) behandelt werden.

Schlussfolgerung. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass der Multikinaseinhibitor Sorafenib vielversprechende Eigenschaften für eine mögliche Anwendung bei exsudativer AMD aufweist.

Schlüsselwörter

Altersabhängige Makuladegeneration · Ranibizumab · Sorafenib · Pazopanib · Multikinaseinhibitoren

Cytoprotective and antiangiogenic effects of the multikinase inhibitor sorafenib on human retinal pigment epithelium

Abstract

Background. Cumulative light exposure is significantly associated with progression of age-related macular degeneration (AMD). Inhibition of vascular endothelial growth factor A (VEGF) is the main target of current antiangiogenic treatment strategies for AMD. Previous reports indicated that sorafenib, an oral multikinase inhibitor, might have beneficial effects on exudative AMD. This study investigates the effects of sorafenib on light-induced overexpression of VEGF and its receptors VEGFR1 and 2 in human retinal pigment epithelial (RPE) cells.

Methods. The effects of sorafenib on VEGFR1 and 2 expression of primary human RPE cells was investigated by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), immunohistochemistry and western blotting. In addition, RPE cells were exposed to white light and incubated with sorafenib. Viability,

expression of VEGF and its mRNA were determined by RT-PCR, immunohistochemistry, western blotting, and enzyme-linked immunosorbent assays.

Results. Sorafenib reduced VEGFR1 and 2 expression of RPE cells. Light exposure decreased cell viability and increased expression and secretion of VEGF. These light-induced effects were significantly reduced when cells were treated with sorafenib at a dose of 1 µg/ml.

Conclusion. The results show that sorafenib has promising properties as a potential antiangiogenic treatment for AMD.

Keywords

Age-related macular degeneration · Ranibizumab · Sorafenib · Pazopanib · Multikinase inhibitors

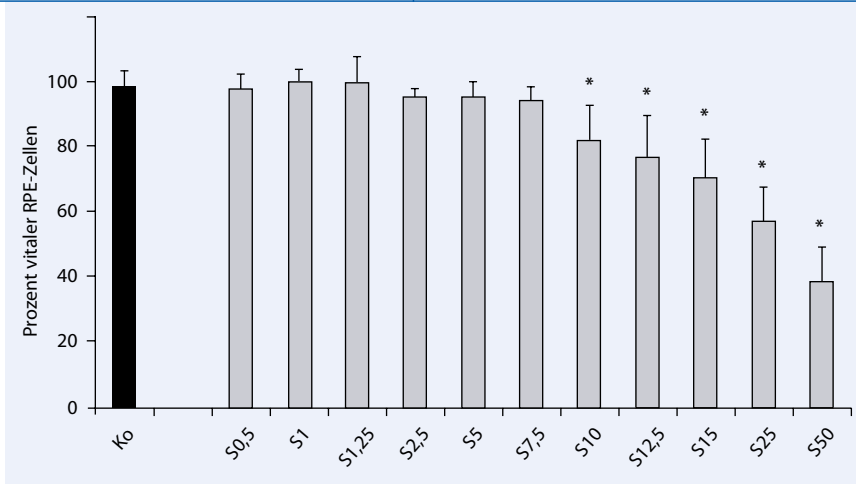


Abb. 2 ▲ Im Zellvitalitätsassay (MTT-Assay) kam es bei den primären RPE-Zellen nach 24 h Behandlungszeit bis zu einer Sorafenib-Konzentration von 7,5 µg/ml zu keiner signifikanten Abnahme der mitochondrialen Dehydrogenaseaktivität, verglichen zur unbehandelten Kontrolle (Ko). Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet

Vitalität und Proliferationsfähigkeit der untersuchten Zellen.

RNA-Isolation und quantitative RT-PCR

Für diese Studie wurde die Gesamt-RNA zur Untersuchung der VEGF-Expression sowie der Flt-1- und Flk-1-Expression (Flt-1, Flk-1: VEGF-Rezeptoren) aus 35-mm-Petrischalen nach der Guanidinium-Thiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode (Stratagene, Heidelberg, Deutschland) entsprechend vorangegangener Protokolle isoliert [24]. Die quantitative RT-PCR ermöglicht die Erfassung von sehr kleinen Mengen mRNA. Nach der üblichen Isolierung der mRNA wird diese in cDNA durch reverse Transkriptase umgeschrieben. Diese cDNA wird dann für die spezifische PCR verwendet.

Um Unterschiede der Höhe der VEGF-, Flt-1- und Flk-1-RNA-Expression in jeder untersuchten Probe zu bestimmen, wurde die Expression von 18S-rRNA gleichzeitig in ein und derselben Probe als interne Kontrolle mitgeführt und die entsprechende VEGF-, Flt-1- und Flk-1-RNA in das Verhältnis dazu gesetzt. Die verwendeten Primer für die RT-PCR sind in **Tab. 1** aufgeführt.

Proteinextraktion, Fluoreszenzimmunhistochemie und Westernblot-Analyse

Um zu überprüfen, ob die sorafenibinduzierte Abnahme der Flt-1- und Flk-1-mRNA-Transkription in verminderte Proteinsynthese umgesetzt wurde, wurde ein Gesamtproteinextrakt aus den Zellen gewonnen und mit einem Mausanti-Flt-1-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) und einem Anti-Flk-1-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) entsprechend vorangehender Beschreibungen durch Westernblotting analysiert [26]. Hierbei wurde im Anschluss an den eigentlichen Blottingvorgang der gleichmäßige Auftrag der Gesamtproteinmenge durch Färben der entsprechenden Polyvinylidendifluoridmembran eines jeden Westernblots mit Coomassie Brilliantblau überprüft.

Nachweis des Wachstumsfaktors VEGF in den Zellkulturüberständen

In einem weiteren Versuchsaufbau wurde die Sekretion von VEGF durch RPE-Zellen nach Bestrahlung mit rein weißem Licht und nach Behandlung mit Sorafenib untersucht. Für den ELISA-Test zum Nachweis von VEGF in den Zellkulturüberständen wurde das Medium der entsprechenden Zellkulturen gesammelt und zentrifugiert. Aus diesen Proben

wurde dann die Konzentration von VEGF mit einem spezifischen ELISA-Assay-Kit (R&D Systems) analysiert. Die Extinktion wurde bei 450 nm mit einem Mikrotiterplatten-Reader (Bio-Rad) gemessen. Zur Analyse der Ergebnisse werden die Mittelwerte \pm SD aus 6 unterschiedlichen Proben ausgewertet und zu einem Konzentrationsstandard korreliert.

Statistische Auswertung

Die Analyse der Versuchsergebnisse erfolgte mit SPSS 13.0 für Windows (SPSS, Chicago, IL, USA). Für die Ergebnisse aus dem MTT-Assay und der RT-PCR wurde der Mann-Whitney-Test angewendet. Bei allen statistischen Tests wurde $p < 0,05$ als signifikant angesehen. Alle Versuche wurden mindestens 3-mal und mit RPE-Zellen von je 3 verschiedenen Spendern durchgeführt.

Ergebnisse

Signifikant reduzierte Expression von VEGFR-1/VEGFR-2 nach Sorafenib-Behandlung

Nach 24 h Inkubationszeit mit 1 µg/ml Sorafenib zeigte sich eine signifikante Abnahme der VEGFR-1- und VEGFR-2-mRNA Expression, wobei die VEGFR-2-mRNA um den Faktor 5, die VEGFR-1-mRNA um den Faktor 1,7 reduziert war und damit deutlich geringer ausfiel (**Abb. 1a**).

Auch in Bezug auf die Umsetzung der entsprechenden mRNA-Transkripte in Proteine ließ sich sowohl in der Fluoreszenzfärbung als auch im Westernblot zeigen, dass bei den Zellen, die mit Sorafenib behandelt worden waren, sowohl die Expression von VEGFR-1 als auch von VEGFR-2 herabgesetzt war (**Abb. 1b,c**).

Sorafenib schützt das RPE vor phototoxischen Einflüssen auf die Vitalität der Zellen

Sorafenib ist an RPE-Zellen in therapeutischen Konzentrationen gut biokompatibel und schützt das RPE vor phototoxischen Einflüssen auf die Vitalität der Zellen. Nach 24 h Behandlungszeit zeigte sich im

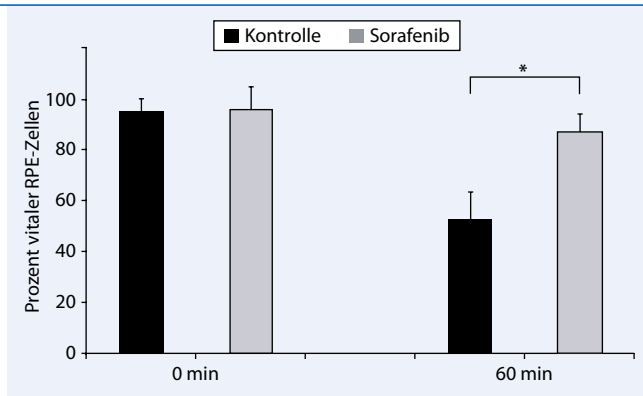


Abb. 3 ▲ Im Zellvitalitätsassay (MTT-Assay) kam es bei den primären RPE-Zellen nach 60 min Bestrahlung mit rein weißem Licht zu einer signifikanten Abnahme der mitochondrialen Dehydrogenaseaktivität (MDA). Bei den Zellen, die direkt im Anschluss an die Bestrahlung mit 1 µg/ml Sorafenib behandelt wurden, war diese Abnahme der MDA signifikant geringer ausgeprägt als bei den Zellen, die nur bestrahlt worden waren

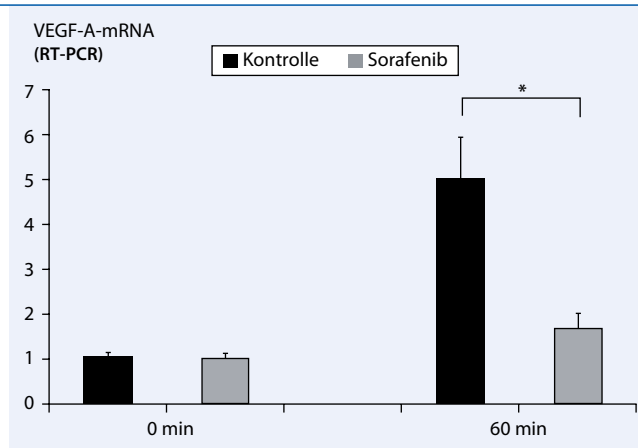


Abb. 4 ▲ Expression von VEGF-A-mRNA (RT-PCR) nach 60 min Bestrahlung der RPE-Zellen mit rein weißem Licht und nach Sorafenib-Behandlung (1 µg/ml). Statistisch signifikante Unterschiede in der VEGF-A-Expression sind durch einen * gekennzeichnet. VEGF-A, „vascular endothelial growth factor A“, RT-PCR Real-Time-PCR, RPE retinalen Pigmentepithel

MTT-Assay bis zu einer Sorafenib-Konzentration von 10 µg/ml keinerlei Auswirkung auf die mitochondriale Dehydrogenaseaktivität humaner RPE-Zellen, die Rückschlüsse auf Vitalität und Proliferationsfähigkeit der untersuchten Zellen erlaubt (■ Abb. 2).

Die Bestrahlung der RPE-Zellen mit rein weißem Licht (400–700 nm, 350 mW/cm²) führte zu einer bestrahlungszeitabhängigen Abnahme der mitochondrialen Dehydrogenaseaktivität. Nach 60 min Bestrahlungszeit war die Vitalität der untersuchten RPE-Zellen im MTT-Assay signifikant reduziert (■ Abb. 3).

Wurden die RPE-Zellen direkt nach der Bestrahlung mit 1 µg/ml Sorafenib behandelt, kam es zu einer signifikanten Abnahme dieser phototoxischen Effekte (■ Abb. 3).

Signifikant verminderte Expressionszunahme von VEGF durch erhöhte Lichtexposition des RPE durch Sorafenib

Die Ergebnisse dieser Studie konnten zudem zeigen, dass es mit zunehmender Dauer der Bestrahlung zu einer ausgeprägten Induktion des Wachstumsfaktors VEGF kam. Hierbei war die VEGF-Konzentration in den Zellkulturüberständen nach 60 min Bestrahlungszeit um das 2,5-fache höher als bei den unbestrahlten Kontrollzellkulturen. Auch hier konnte die Behandlung mit 1 µg/ml

Sorafenib direkt im Anschluss an die Bestrahlung sowohl die mRNA Expression als auch die Sekretion des Wachstumsfaktors VEGF signifikant reduzieren (■ Abb. 4, 5).

Diskussion

Pathophysiologisch stellen die Expressionszunahme von Wachstumsfaktoren und die daraus resultierende Fehlregulation des retinalen Gefäßwachstums eine der wichtigsten Ursachen von CNV dar [17, 39, 42, 53]. Der Wachstumsfaktor VEGF nimmt hierbei eine zentrale Stellung ein [3]. In einer Vielzahl von Studien konnte nachgewiesen werden, dass neben dieser Schlüsselrolle von VEGF bei der Entstehung von CNV auch verschiedene andere angiogene Wachstumsfaktoren (z. B. „platelet-derived growth factor“, PDGF, und „placenta growth factor, PlGF) im Glaskörper und der Netzhaut bei proliferativen Netzhauterkrankungen vermehrt exprimiert werden und ebenfalls bei der Entwicklung und dem Fortschreiten der AMD von großer Bedeutung sind [17, 39, 42, 53]. Außerdem scheint hierbei das Gleichgewicht der Rezeptoren, durch welches die neoangiogenetischen Signalkaskaden in den Zellen vermittelt werden, eine wichtige Rolle zu spielen [18, 49]. VEGF beispielsweise reguliert die Angiogenese im Gefäßendothel durch die Rezeptortyrosinkinasen VEGF-Rezeptor 1 (VEGFR-1, Flt-1) und VEGF-Rezeptor 2 (VEGFR-2, Flk-

1, KDR; [49]). Ein Ungleichgewicht zwischen VEGF und seinen Rezeptoren kann zu CNV führen [14].

Der Multikinaseinhibitor Sorafenib (Nexavar, BAY 43–9006) ist für die orale Therapie bei fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom und anderen Tumorerkrankungen zugelassen. Die spezifische Wirkung von Sorafenib greift aber auch in Signalwege ein, die an der Entstehung von CNV und der feuchten AMD maßgeblich beteiligt sind [50, 51].

So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass neben der Hemmung der RAF-Kinase als primärer Wirkmechanismus Sorafenib auch eine signifikante Wirkung auf verschiedene andere Rezeptortyrosinkinasen, die bei der Entstehung von Gefäßneubildungen beteiligt sind, besitzt. Hierbei sind unter anderem die Blockierung der RAF/Mitogen-activated protein (MAP)/“extracellular signal-regulated kinase“ (ERK) Kinase (MEK)/ERK (RAF/MEK/ERK) Kaskade und Effekte auf verschiedene Rezeptortyrosinkinasen, wie den VEGF-Rezeptoren 2 und 3 (VEGFR-2/3), den PDGF-Rezeptors, von Flt-3, Ret und c-Kit von Bedeutung [2, 9, 31, 50, 51]. In Bezug auf eine mögliche Anwendung am Auge konnte unsere Arbeitsgruppe in einer jüngst veröffentlichten Arbeit nachweisen, dass Sorafenib neben der Blockierung von Rezeptortyrosinkinasen auch eine direkte Wirkung auf die Expression der Wachstumsfaktoren VEGF, PDGF und PlGF okulärer Gliazellen hat [25]. In Ergänzung zu diesen Daten

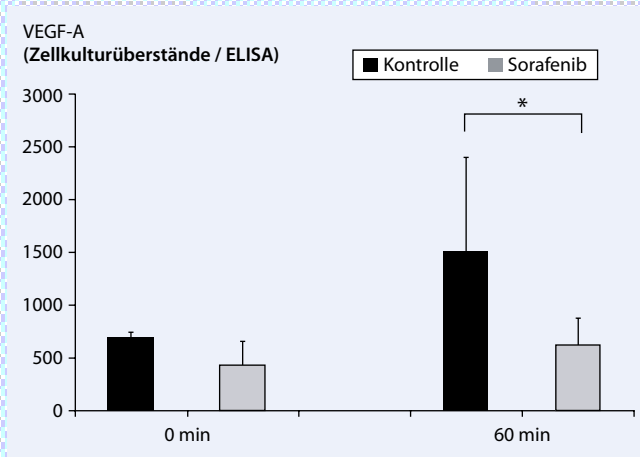


Abb. 5 ▲ Quantitativer Nachweis der VEGF-A-Sekretion der RPE-Zellen nach Bestrahlung und Sorafenib-Behandlung (ELISA): unbestrahlte RPE-Zellen (0 min) und nach 60 min Bestrahlungszeit mit rein weißem Licht (60 min). Statistisch signifikante Unterschiede in der VEGF-A-Sekretion sind durch einen * gekennzeichnet. VEGF-A, „vascular endothelial growth factor A“; RT-PCR Real-Time-PCR, RPE retinales Pigmentepithel

zeigt diese Studie im Zellkultorexperiment, dass Sorafenib im RPE, dem bei der Entstehung der AMD eine grundlegende Rolle zugesprochen wird, zu einer signifikanten Reduktion der lichtinduzierten Expressionszunahme von VEGF führt. Diese Reduktion der Wachstumsfaktor-expression ließ sich sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene nachweisen und belegt, dass der Wirkmechanismus von Sorafenib deutlich früher in der Pathogenese der CNV ansetzt als die etablierten Therapien mit VEGF-Antikörpern.

Einschränkend muss an dieser Stelle angemerkt werden, dass pathologische Veränderungen im RPE zwar maßgeblich an der Entstehung der neovaskulären AMD beteiligt sind, dass aber auch andere Strukturen wie die choroidalen und retinalen Gefäßendothelien oder auch die Bruch-Membran und Zellen der neurosensorischen Netzhaut eine wichtige Rolle spielen. Ob die in dieser Studie aufgezeigten Effekte von Sorafenib auf das RPE auch an diesen Strukturen antiangiogene Wirkungen zeigen, muss in weiteren experimentellen und klinischen Studien genauer erörtert werden.

Auch klinisch bestehen Hinweise, dass die Anwendung von Multikinaseinhibitoren bei Patienten mit feuchter AMD vielversprechend ist. So zeigen jüngst veröffentlichte Fallberichte, dass Sorafenib, allein oder in Kombination mit VEGF-

Antikörpern – selbst bei therapieresistenten Fällen –, zu einer Verringerung des CNV-bedingten Makulaödems und einer konsekutiven Verbesserung der Sehschärfe führen kann [12, 27]. Klinische Studien zur Wirksamkeit der topischen Gabe von Pazopanib, einem weiteren Wirkstoff aus der Gruppe der Multikinaseinhibitoren, bei neovaskulärer AMD sind in Planung (z. B. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01072214).

VEGF reguliert die Angiogenese im Gefäßendothel durch die Rezeptortyrosinkinasen VEGF-Rezeptor 1 (VEGFR-1, Flt-1) und VEGF-Rezeptor 2 (VEGFR-2, Flk-1, KDR) [49]. Aus experimentellen Studien wissen wir, dass die selektive Inhibition von VEGFR-1/2 zur Regression von CNV führen kann [23, 46]. VEGFR-2 scheint hierbei mehr Einfluss auf die Angiogenese und permeabilitätssteigenden Wirkungen von VEGF zu haben als VEGFR-1 [18, 19]. VEGFR-1 hingegen reguliert die Aktivität von VEGF im Endothel der Blutgefäße, indem er die Bindung von VEGF/VEGFR-2 verhindert [18].

Die Ergebnisse unserer Studie zeigen eindeutig, dass Sorafenib an primären humanen RPE-Zellen die Expression sowohl des VEGFR-1 als auch des VEGFR-2 signifikant reduzieren kann. Es ist aber anzumerken, dass der Effekt auf den VEGFR-2 deutlich stärker ausgeprägt war. Dies ist insofern von Bedeutung, als insbesondere

re VEGFR-2 eine wichtige Rolle bei der Entwicklung neuer Gefäße spielt [44] und eine enge Verbindung zwischen dem VEGF/VEGFR-2-Signalweg und neovaskulären Netzhauterkrankungen zu bestehen scheint [28, 46].

Auch in Bezug auf das RPE sind solche regulatorischen Mechanismen der VEGF-Rezeptoren von Bedeutung. So konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des VEGFR-2 auf der apikalen Seite von RPE-Zellen für den VEGF-induzierten Anstieg der Epithelpermeabilität verantwortlich ist [1]. Die Rolle des VEGFR-1 in Bezug auf das RPE wird hingegen in der Literatur kontrovers diskutiert [1, 33]. Die Ergebnisse einer Studie von Miyamoto et al. deuten beispielsweise darauf hin, dass VEGFR-1 die durch VEGF induzierten Veränderungen der Barrierefunktion von kultivierten RPE-Zellen vermittelt und den transepithelialen Gewebswiderstand von ARPE19-Zellen reduziert [33].

Fazit für die Praxis

Im Gegensatz zu reinen VEGF-Antikörpern wirkt Sorafenib also nicht nur deutlich früher in der Pathogenese der neovaskulären AMD, sondern außerdem auch noch an verschiedenen Stellen der Neovaskularisationskaskade. Dies könnte insofern von Nutzen sein, als die Hemmung eines einzelnen Moleküls über rezeptorvermittelte Feed-back-Mechanismen zu einer kompensatorischen Zunahme alternativer Signalwege führen kann und dieses aber möglicherweise durch den multiplen Ansatz von Sorafenib verhindert werden kann [17, 39, 42, 53]. Sowohl Sorafenib als auch andere Wirkstoffe aus der Gruppe der Multikinaseinhibitoren scheinen von ihrem Wirkmechanismus her eine vielversprechende Ergänzung zu den etablierten Therapiestrategien bei neovaskulärer AMD darzustellen. Ob sich daraus auch klinisch Vorteile für die Therapie der neovaskulären AMD ergeben, kann zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht abgeschätzt werden. Weitere Studien müssen den genauen Stellenwert dieser Substanzgruppe bei feuchter AMD klären. Die vorliegenden ersten Daten lassen aber hoffen, dass Multikinaseinhibitoren einen zusätzlichen Beitrag zur weiteren Verbesserung

der Therapie dieser die Lebensqualität sehr beeinträchtigenden Erkrankung [20, 35] darstellen.

Korrespondenzadresse

Dr. M. Kernt



Augenklinik, Ludwig-Maximilians-Universität
Mathildenstraße 8,
80336 München
Marcus.Kernt@
med.uni-muenchen.de

Interessenkonflikt. Der korrespondierende Autor gibt an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Literatur

1. Ablonczy Z, Crosson CE (2007) VEGF modulation of retinal pigment epithelium resistance. *Exp Eye Res* 85:762–771
2. Adnane L, Trail PA, Taylor I et al (2006) Sorafenib (BAY 43–9006, Nexavar), a dual-action inhibitor that targets RAF/MEK/ERK pathway in tumor cells and tyrosine kinases VEGFR/PDGFR in tumor vasculature. *Methods Enzymol* 407:597–612
3. Aiello LP, Pierce EA, Foley ED et al (1995) Suppression of retinal neovascularization in vivo by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:10457–10461
4. Antcliff RJ, Marshall J (1999) The pathogenesis of edema in diabetic maculopathy. *Semin Ophthalmol* 14:223–232
5. Barber AJ, Antonetti DA (2003) Mapping the blood vessels with paracellular permeability in the retinas of diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:5410–5416
6. Barishak YR (1960) In vitro behaviour of the pigmented cells of the retina and uvea of the adult human eye. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 38:339–346
7. Beatty S, Murray IJ, Henson DB et al (2001) Macular pigment and risk for age-related macular degeneration in subjects from a Northern European population. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:439–446
8. Cai J, Nelson KC, Wu M et al (2000) Oxidative damage and protection of the RPE. *Prog Retin Eye Res* 19:205–221
9. Carlomagno F, Anaganti S, Guida T et al (2006) BAY 43–9006 inhibition of oncogenic RET mutants. *J Natl Cancer Inst* 98:326–334
10. Cruickshanks KJ, Klein R, Klein BE (1993) Sunlight and age-related macular degeneration. The Beaver Dam Eye Study. *Arch Ophthalmol* 111:514–518
11. Cruickshanks KJ, Klein R, Klein BE et al (2001) Sunlight and the 5-year incidence of early age-related maculopathy: the beaver dam eye study. *Arch Ophthalmol* 119:246–250
12. Diago T, Pulido JS, Molina JR et al (2008) Ranibizumab combined with low-dose sorafenib for exudative age-related macular degeneration. *Mayo Clin Proc* 83:231–234
13. Ehrlich R, Harris A, Kheradiya NS et al (2008) Age-related macular degeneration and the aging eye. *Clin Interv Aging* 3:473–482
14. Ferrara N, Gerber HP, Lecouter J (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9:669–676
15. Fine SI, Berger JW, Maguire MG et al (2000) Age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 342:483–492
16. Flood MT, Gouras P, Kjeldbye H (1980) Growth characteristics and ultrastructure of human retinal pigment epithelium in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 19:1309–1320
17. Freyberger H, Brocker M, Yakut H et al (2000) Increased levels of platelet-derived growth factor in vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 108:106–109
18. Grisanti S, Tatar O (2008) The role of vascular endothelial growth factor and other endogenous interplayers in age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res* 27:372–390
19. Haines JI, Schnetz-Boutaud N, Schmidt S et al (2006) Functional candidate genes in age-related macular degeneration: significant association with VEGF, VLDLR, and LRP6. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:329–335
20. Hirneiss C, Neubauer AS, Welge-Lüssen U et al (2003) Measuring patient's quality of life in ophthalmology. *Ophthalmologie* 100:1091–1097
21. Holz FG, Pauleikhoff D, Klein R et al (2004) Pathogenesis of lesions in late age-related macular disease. *Am J Ophthalmol* 137:504–510
22. Jager RD, Mieler WF, Miller JW (2008) Age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 358:2606–2617
23. Kami J, Muranaka K, Yanagi Y et al (2008) Inhibition of choroidal neovascularization by blocking vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase. *Jpn J Ophthalmol* 52:91–98
24. Kernt M, Hirneiss C, Wolf A et al (o J) Indocyanine green increases light-induced oxidative stress, senescence, and matrix metalloproteinases 1 and 3 in human RPE cells. *Acta Ophthalmol*
25. Kernt M, Liegl RG, Rueping J et al (o J) Sorafenib protects human optic nerve head astrocytes from light-induced overexpression of vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor, and placenta growth factor. *Growth Factors*
26. Kernt M, Neubauer AS, Liegl R et al (2009) Cytoprotective effects of a blue light-filtering intraocular lens on human retinal pigment epithelium by reducing phototoxic effects on vascular endothelial growth factor- α , Bax, and Bcl-2 expression. *J Cataract Refract Surg* 35:354–362
27. Kernt M, Staehler M, Stief C et al (2008) Resolution of macular oedema in occult choroidal neovascularization under oral Sorafenib treatment. *Acta Ophthalmol* 86:456–458
28. Kinose F, Roscilli G, Lamartina S et al (2005) Inhibition of retinal and choroidal neovascularization by a novel KDR kinase inhibitor. *Mol Vis* 11:366–373
29. Klein R, Klein BE, Linton KI (1992) Prevalence of age-related maculopathy. The Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology* 99:933–943
30. Klettner A, Roeder J (2008) Comparison of bevacizumab, ranibizumab, and pegaptanib in vitro: efficiency and possible additional pathways. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:4523–4527
31. Liu L, Cao Y, Chen C et al (2006) Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer Res* 66:11851–11858
32. Marmor MF (1999) Mechanisms of fluid accumulation in retinal edema. *Doc Ophthalmol* 97:239–249
33. Miyamoto N, De Kozak Y, Jeanny JC et al (2007) Placental growth factor-1 and epithelial haemato-retinal barrier breakdown: potential implication in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetologia* 50:461–470
34. Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55–63
35. Neubauer AS, Holz FG, Sauer S et al (o J) Cost-effectiveness of ranibizumab for the treatment of neovascular age-related macular degeneration in germany: Model analysis from the perspective of germany's statutory health insurance system. *Clin Ther* 32:1343–1356
36. Nilsson SE, Sundelin SP, Wihlmark U et al (2003) Aging of cultured retinal pigment epithelial cells: oxidative reactions, lipofuscin formation and blue light damage. *Doc Ophthalmol* 106:13–16
37. Regillo CD, Brown DM, Abraham P et al (2008) Randomized, double-masked, sham-controlled trial of ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration: PIER study year 1. *Am J Ophthalmol* 145:239–248
38. Resnikoff S, Pascolini D, Ety'ale D et al (2004) Global data on visual impairment in the year 2002. *Bull World Health Organ* 82:844–851
39. Robbins SG, Mixon RN, Wilson DJ et al (1994) Platelet-derived growth factor ligands and receptors immunolocalized in proliferative retinal diseases. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35:3649–3663
40. Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS et al (2006) Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 355:1419–1431
41. Rosenfeld PJ, Fung AE, Puliafito CA (2005) Optical coherence tomography findings after an intravitreal injection of bevacizumab (avastin) for macular edema from central retinal vein occlusion. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 36:336–339
42. Schlingemann RO (2004) Role of growth factors and the wound healing response in age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 242:91–101
43. Schneeberger EE, Lynch RD (2004) The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol* 286:C1213–C1228
44. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP et al (1995) Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 376:62–66
45. Sparrow JR, Cai B (2001) Blue light-induced apoptosis of A2E-containing RPE: involvement of caspase-3 and protection by Bcl-2. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:1356–1362
46. Takahashi H, Tamaki Y, Ishii N et al (2008) Identification of a novel vascular endothelial growth factor receptor 2 inhibitor and its effect for choroidal neovascularization in vivo. *Curr Eye Res* 33:1002–1010
47. Tomany SC, Cruickshanks KJ, Klein R et al (2004) Sunlight and the 10-year incidence of age-related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study. *Arch Ophthalmol* 122:750–757
48. Van Wijngaarden P, Coster DJ, Williams KA (2005) Inhibitors of ocular neovascularization: promises and potential problems. *JAMA* 293:1509–1513
49. Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L et al (2000) Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res* 60:203–212
50. Wilhelm SM, Adnane L, Newell P et al (2008) Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. *Mol Cancer Ther* 7:3129–3140
51. Wilhelm SM, Carter C, Tang L et al (2004) BAY 43–9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res* 64:7099–7109
52. Winkler BS, Boulton ME, Gottsch JD et al (1999) Oxidative damage and age-related macular degeneration. *Mol Vis* 5:32
53. Witmer AN, Vrensen GF, Van Noorden CJ et al (2003) Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Prog Retin Eye Res* 22:1–29