

**Wirkung schonender Laserverfahren auf den Komplex
aus retinalem Pigmentepithel, Bruch'scher Membran
und Choroidea - mögliche Therapieoption der frühen
altersabhängigen Makuladegeneration**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Elisabeth Dorothea Richert

Kiel, 2017

Referent/in: Prof. Dr. Manuela Dittmar

Korreferent/in: Prof. Dr. Alexa Klettner

Tag der mündlichen Prüfung: 2.5.2017

Zum Druck genehmigt: 2.5.2017

gez. Dekan: Prof. Dr. Natascha Oppelt

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS i

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS vi

ABBILDUNGSVERZEICHNIS..... x

TABELLENVERZEICHNISxiii

1. EINLEITUNG 1

 1.1. Das Wirbeltierauge 1

 1.1.1. Die Retina 1

 1.1.2. Der Komplex aus retinalem Pigmentepithel, Bruch’scher Membran und
Choroidea 3

 1.1.3. Das Immunprivileg des subretinalen Raums 8

 1.2. Die altersabhängige Makuladegeneration 9

 1.2.1. Pathologie und Konzepte der AMD-Entstehung 9

 1.2.2. AMD-relevante Zellmediatoren 15

 1.2.3. Therapiemöglichkeiten 20

 1.3. Lasertherapie 22

 1.3.1. Selektive Retinatherapie 24

 1.3.2. Thermische Stimulationstherapie der Retina 25

2. FRAGESTELLUNG 27

3. MATERIAL UND METHODEN 29

 3.1. Material 29

 3.1.1. Geräte und Instrumente 29

 3.1.2. Verbrauchsmaterialien 32

 3.1.3. Chemikalien 33

 3.1.4. Zusammensetzung von Puffern und Lösungen 35

3.1.5.	Zellkulturmedien und -reagenzien	36
3.1.6.	Kits und kommerziell erworbene Puffer	36
3.1.7.	Medikamente	37
3.1.8.	Antikörper.....	38
3.1.9.	Mausstämme	38
3.1.10.	Oligonukleotide.....	39
3.1.11.	Sonstige Substanzen	39
3.1.12.	Software.....	40
3.2.	Zellbiologische Methoden	41
3.2.1.	Präparation von Organkulturen aus retinalem Pigmentepithel, Bruch'scher Membran und Choroidea	41
3.2.2.	Kultivierung von Gewebeexplantaten in modifizierten Ussingkammern	42
3.2.3.	Durchlässigkeitsprüfung des Systems für den Farbstoff Brilliantblau G	43
3.2.4.	Vitalitätsfärbung mittels Calcein-Assay.....	43
3.2.5.	Bestimmung von Zellgröße und Zellzahl	44
3.3.	Proteinbiochemische Methoden	44
3.3.1.	Gewinnung von Organkulturüberständen	44
3.3.2.	Herstellung von Organkulturlysaten	45
3.3.3.	Isolierung von RPE-Zellen aus Organkulturen mit anschließender Zellyse ..	45
3.3.4.	Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford.....	46
3.3.5.	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	46
3.3.6.	Western Blot.....	47
3.3.7.	Stripping von Polyvinylidenfluorid-Membranen	48
3.3.8.	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	48
3.3.9.	Zymographie	49

3.3.10.	Immunhistochemie	50
3.4.	Molekularbiologische Methoden.....	50
3.4.1.	DNA-Isolierung aus murinen Proben.....	50
3.4.2.	Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	51
3.4.3.	Molekularbiologische Untersuchung muriner DNA mittels Polymerasekettenreaktion	51
3.4.3.1.	Genotypisierung der Nrf2 Knock-out Mäuse.....	53
3.4.3.2.	Nachweis der Crb1 ^{rd8} -Mutation.....	54
3.4.4.	Nachweis von Nukleinsäuren mittels Agarosegelelektrophorese	56
3.4.5.	RNA-Isolierung aus porcinen Organkulturen	57
3.4.6.	Erststrangsynthese der cDNA aus porcinen RNA-Proben	58
3.4.7.	Quantitative <i>Real-time</i> PCR.....	59
3.5.	Untersuchungen im Mausmodell	61
3.5.1.	Beschreibung der AMD-Mausmodelle	62
3.5.2.	Projektplan der <i>in vivo</i> Untersuchungen im AMD-Mausmodell	63
3.5.3.	Das Narkoseverfahren	65
3.5.4.	Untersuchungen an der Maus.....	66
3.5.4.1.	Fundusfotografie.....	67
3.5.4.2.	Optische Kohärenztomographie	67
3.5.4.3.	Fluoreszenzangiographie	67
3.5.4.4.	E nukleation	68
3.5.5.	Histologische Aufarbeitung des Mauseuges	68
3.5.6.	Aufarbeitung des Auges für die Elektronenmikroskopie und Toluidinblaufärbung	69
3.5.7.	Transmissionselektronenmikroskopie.....	70

3.6.	Laserbehandlungen.....	72
3.6.1.	Beschreibung des Lasersystems	72
3.6.2.	Laserbehandlung im Organkulturmodell.....	74
3.6.3.	Titration des RPE-Zellschadens.....	76
3.6.4.	Laserbehandlung in den AMD-Mausmodellen.....	77
3.7.	Statistik	79
4.	ERGEBNISSE	80
4.1.	Charakterisierung des Organkultursystems	80
4.2.	Vermessung von SRT-Laserpulsen	80
4.3.	Titration des RPE-Zellschadens nach Laserbehandlung	82
4.3.1.	Titration des RPE-Zellschadens nach TSR-Behandlung.....	82
4.3.2.	Titration des RPE-Zellschadens nach SRT-Behandlung.....	84
4.4.	RPE-Regeneration nach SRT-Laserbehandlung	86
4.5.	Sekretion und Expression AMD-relevanter Zellmediatoren.....	89
4.5.1.	Die Induktion von MMPs durch Laserbehandlungen.....	90
4.5.1.1.	MMP-Induktion nach SRT-Behandlung.....	90
4.5.1.2.	Die Induktion von MMPs nach TSR-Behandlung.....	93
4.5.2.	Einfluss der Laserbehandlung auf pro- und anti-angiogene Faktoren.....	96
4.5.2.1.	Einfluss der SRT auf pro- und anti-angiogene Faktoren	96
4.5.2.2.	Einfluss von TSR auf pro- und anti-angiogene Faktoren.....	98
4.5.3.	Ausschüttung inflammatorischer Zytokine nach Laserbehandlung.....	100
4.5.4.	Einfluss der TSR auf das Hitzeschockprotein 70.....	102
4.6.	AMD-artige Veränderungen in Nrf2- und ApoE-defizienten Mäusen	104
4.6.1.	Genotypisierung der Nrf2 Knock-out Mäuse	104
4.6.2.	AMD-artige Veränderungen in bildgebenden Untersuchungsverfahren....	105

4.6.3. Charakterisierung histologischer Veränderungen in beiden AMD-Mausmodellen.....	107
4.6.4. Untersuchung ultrastruktureller Veränderungen des RPE/BrM/Choroidea-Komplexes mittels TEM	109
4.6.5. Zusammenhang von funduskopischen Veränderungen und der Crb1 ^{rd8} -Mutation.....	112
4.7. Effekte der Laserbehandlungen in Nrf2- und ApoE-defizienten Mäusen	115
4.7.1 Veränderung der Dicke der BrM nach TSR und SRT.....	115
5. DISKUSSION.....	119
5.1 Die altersabhängige Makuladegeneration und aktuelle Therapieansätze.....	119
5.2 Einfluss der Laserbehandlung auf Zellmediatoren im Organkultursystem	120
5.3 Wirkung der Laserbehandlungen im murinen AMD-Modell.....	128
5.4 Fazit und Ausblick	133
6. ZUSAMMENFASSUNG	135
7. SUMMARY	137
8. LITERATURVERZEICHNIS	139
9. PUBLIKATIONEN.....	155
10. AUSZEICHNUNGEN.....	158
11. CURRICULUM VITAE.....	159
12. DANKSAGUNG.....	161
13. ERKLÄRUNG.....	162

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A. dest.	Aqua destillata
Abb.	Abbildung
ÄGr	Äußere Grenzmembran
ÄK	Äußere Körnerschicht
AMD	Altersabhängige Makuladegeneration
ÄP	Äußere plexiforme Schicht
Apo	Apolipoprotein
AREDS	<i>Age-Related Eye Disease Study</i>
bp	Basenpaare
BrM	Bruch'sche Membran
bzw.	Beziehungsweise
cDNA	<i>complementary Desoxyribonucleic Acid</i> , komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFH	<i>Complement Factor H</i> , Komplementfaktor H
CNV	Choroidale Neovaskularisation
CW	<i>Continuous Wave</i> , Dauerstrich
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Gesamtheit aller Desoxyribonukleinphosphate
DTT	Dithiothreitol
ECL	Elektrochemilumineszenz
ECM	<i>Extra Cellular Matrix</i> , Extrazellulärmatrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> , enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
EMT	Epitheliale-Mesenchymale-Transistion
FAG	Fluoreszenzangiographie
FasL	Fas Ligand
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> , Fetales Kälberserum
GZ	Ganglienzellschicht
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
HSP	<i>Heat Shock Protein</i> , Hitzeschockprotein
IFN- γ	Interferon-gamma
IgG	Immunglobulin G
IGr	Innere Grenzmembran
IK	Innere Körnerschicht
IL	Interleukin
IP	Innere plexiforme Schicht
kDa	Kilodalton
LASER	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i>
M	Mol
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter

MMP	Matrix-Metalloprotease
mRNA	<i>messenger RNA</i>
ms	Millisekunden
NaCl	Natriumchlorid
NF	Nervenfaserschicht
nm	Nanometer
Nrf2	<i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
Oligo	Oligonukleotide
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PEDF	<i>Pigment Epithelium Derived Factor</i>
PFA	Paraformaldehyd
PRS	Photorezeptorschicht
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	Quantitative <i>Real-time</i> PCR
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> , Ribonukleinsäure
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> , Reaktive Sauerstoffspezies
RPE	Retinales Pigmentepithel
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur ODER Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
sec	Sekunde
s.o.	Siehe oben
SDS	Sodium-dodecylsulfat

SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	<i>Standard error of the mean</i> , Standardfehler des Mittels
SRT	Selektive Retina-Therapie
STABW	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor beta</i>
TIMP	<i>Tissue Inhibitors of Matrix-Metalloprotease</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>
TSR	Thermische Stimulationstherapie der Retina
TTBS	Tris-Tween gepufferter Saline
u.a.	Unter anderem
U/Min	Umdrehungen pro Minute
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
vs.	Versus
WB	Western Blot
x g	Multipliziert mit der Gravitationsbeschleunigung
z. B.	Zum Beispiel
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar
μ s	Mikrosekunden

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Aufbau der Retina..... 2

Abbildung 2: Komplex aus retinalem Pigmentepithel, Bruch’scher Membran und der Choriocapillaris der Choroidea.. 3

Abbildung 3: Aufgaben und Funktionen des Retinalen Pigmentepithels..... 5

Abbildung 4: Darstellung der Augenhintergrunds mit einer gesunden Netzhaut und einer Netzhaut mit Drusen im Rahmen der AMD. 9

Abbildung 5: Konzepte der AMD-Pathogenese. 11

Abbildung 6: Präparation von Organkulturen aus frischen porcinen Augen..... 42

Abbildung 7: Projektplan der Etablierungs- und Pilotstudie zur Laserbehandlung zweier AMD-Mausmodelle..... 64

Abbildung 8: Untersuchung des murinen Auges im AMD-Mausmodell..... 66

Abbildung 9: Standardisierte Aufarbeitung der Mauseugen und Messung der BrM-Dicke am Elektronenmikroskop. 71

Abbildung 10: Aufbau des Lasersystems für die Anwendung an porcinen Explantaten und an der Maus..... 73

Abbildung 11: Laserbehandlung am Organkulturmodell..... 75

Abbildung 12: Titration des Zellschadens nach Laserbehandlung. 77

Abbildung 13: Laserbehandlung am Mausauge. 78

Abbildung 14: Dauer und Signalformen von Laserpulsen im zeitlichen Verlauf unter Verwendung unterschiedlicher Spotgrößen und Energien..... 81

Abbildung 15: Regenerationsprozess von RPE-Zellen nach Selektiver Retina-Therapie in der Calceinfärbung. 87

Abbildung 16: Variation der Zellzahl und –größe nach Selektiver Retina-Therapie..... 88

Abbildung 17: Immunfluoreszenzfärbung des Proliferationsmarkers Ki-67 in Organkultur-*flat mounts* 3 Tage nach Selektiver Retina-Therapie 89

Abbildung 18: Basolaterale Sekretion von Matrixmetalloproteasen an Tag 4 nach Selektiver Retina-Therapie in der Zymographie..... 91

Abbildung 19: Sekretion der Matrixmetalloproteasen-2 und -9 nach Selektiver Retina-Therapie mit unterschiedlichen Spotgrößen und –dichten 92

Abbildung 20: Immunfluoreszenzfärbung der Matrixmetalloprotease-2 Expression in Organkultur-Explantaten nach Selektiver Retina-Therapie mit 200 µm Spots..... 93

Abbildung 21: Sekretion der Matrixmetalloproteasen-2 und -9 nach Thermischer Stimulationstherapie der Retina mit unterschiedlichen Spotgrößen und –dichten.....	95
Abbildung 22: Expression der Matrixmetalloprotease-2 nach Thermischer Stimulationstherapie der Retina mit unterschiedlichen Spotgrößen und –dichten.....	96
Abbildung 23: Reduktion der Sekretion des <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> in Organkultur-Explantaten nach Selektiver Retina-Therapie mit unterschiedlichen Spotgrößen und –dichten.....	97
Abbildung 24: Sekretion des <i>Pigment Epithelium Derived Factor</i> von Organkultur-Explantaten nach Selektiver Retina Therapie mit unterschiedlichen Spotgrößen und –dichten.....	98
Abbildung 25: Sekretion des <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> in Organkultur-Explantaten nach Thermischer Stimulationstherapie der Retina mit unterschiedlichen Spotgrößen und –dichten.....	99
Abbildung 26: Sekretion des <i>Pigment Epithelium Derived Factor</i> von Organkultur-Explantaten nach Thermischer Stimulationstherapie der Retina mit unterschiedlichen Spotgrößen und –dichten.....	100
Abbildung 27: Sekretion inflammatorischer Zytokine von Organkultur-Explantaten nach Selektiver Retina-Therapie	101
Abbildung 28: TGF- β -Sekretion von Organkultur-Explantaten nach Selektiver Retina-Therapie.....	102
Abbildung 29: Hitzeschockprotein (HSP)70-Expression von porcinen Organkulturexplantaten nach Thermischer Stimulationstherapie der Retina.....	103
Abbildung 30: Genotypisierung von <i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i> Knock-out Mäusen.	104
Abbildung 31: Fundusveränderungen der Maus in bildgebenden Untersuchungsverfahren, die typische Alterationen der altersabhängigen Makuladegeneration zeigen.....	106
Abbildung 32: Histologie der retinalen Schichten und der Choroidea im Mausauge.	108
Abbildung 33: Messung der Dicke der Photorezeptorschicht in Kontroll- und AMD-Mäusen.	109
Abbildung 34: Elektronenmikroskopische Untersuchung der Bruch'schen Membran von AMD-Knock-out Mäusen.	110

Abbildung 35: Höhe des Retinalen Pigmentepithels (RPE) in verschiedenen murinen Zuchtlinien. 111

Abbildung 36: Zunahme der Dicke der Bruch'schen Membran bei Mäusen unterschiedlichen Alters und genetischem Hintergrunds..... 112

Abbildung 37: Genotypisierung von *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2* und Apolipoprotein E-defizienten Mäusen. 113

Abbildung 38: Zusammenhang zwischen funduskopischen Veränderungen und der *Crb1^{rd8}*-Mutation. 114

Abbildung 39: Beeinflussung der Dicke der Bruch'schen Membran durch Thermische Stimulationstherapie der Retina in zwei AMD-Mausmodellen..... 116

Abbildung 40: Beeinflussung der Dicke der Bruch'schen Membran durch Selektive Retina-Therapie in zwei Mausmodellen. 117

Abbildung 41: Elektronenmikroskopischer Nachweis der Dicke der Bruch'schen Membran im AMD-Mausmodell. 118

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Geräte und Instrumente dargestellt.....	29
Tabelle 2: In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Verbrauchsmaterialien aufgeführt.....	32
Tabelle 3: In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Chemikalien aufgeführt.	33
Tabelle 4: In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Puffer/Lösungen aufgeführt. .	35
Tabelle 5: In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Zellkulturmedien aufgeführt..	36
Tabelle 6: In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Kits und kommerziell erworbenen Puffer aufgeführt.	36
Tabelle 7: In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Medikamente aufgeführt.....	37
Tabelle 8: In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Antikörper aufgeführt.....	38
Tabelle 9: In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Mausstämme aufgeführt.	38
Tabelle 10: In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Oligonukleotide aufgeführt..	39
Tabelle 11: In der folgenden Tabelle sind sonstige verwendete Substanzen aufgeführt. .	39
Tabelle 12: In der folgenden Tabelle ist die verwendete Software aufgeführt.....	40
Tabelle 13: Zusammensetzung der SDS-PAGE-Gele	47
Tabelle 14: Reaktionsansatz für den Mastermix einer Standard-PCR zur Genotypisierung der Nrf2 Knock-out Mäuse	53
Tabelle 15: Temperaturprofil für eine einstufige PCR-Reaktion (Nrf2-Genotypisierung)..	54
Tabelle 16: Reaktionsansatz für den Mastermix einer Standard-PCR zum Nachweis der Crb1 ^{rd8} -Mutation.	55
Tabelle 17: Temperaturprofil für eine einstufige PCR-Reaktion (Crbrd8-Mutation).....	55
Tabelle 18: Durchführung der cDNA-Erststrangsynthese	59
Tabelle 19: Ansatz für die qRT-PCR mit cDNA aus porcinen Organkulturproben.....	61
Tabelle 20: Temperaturprofil für eine qRT-PCR mit Schmelzkurvenanalyse.....	61
Tabelle 21: Messung der Pulsdauern bei variierenden Pulsenergien und Spotgrößen	82
Tabelle 22: Titration des Zellschadens nach TSR-Laserbehandlung mit 300 µm Spots.....	83
Tabelle 23: Titration des Zellschadens nach TSR-Laserbehandlung mit 100 µm Spots.....	84
Tabelle 24: Titration des Zellschadens nach SRT-Laserbehandlung mit 100 µm Spots.....	85
Tabelle 25: Titration des Zellschadens nach SRT-Laserbehandlung mit 200 µm Spots.....	86

1. EINLEITUNG

1.1. Das Wirbeltierauge

Das Auge ist eines der dominierenden Sinnesorgane des Menschen und bestimmt maßgeblich die humanen Lebens- und Verhaltensweisen. Es dient der perzeptiven Vermittlung von Lichtsignalen und ist in der Lage Lichtimpulse in neuronale Reaktionen zu übersetzen, welche an das Gehirn weitergeleitet werden. Beeinträchtigungen des Sehvermögens (Visus) führen bei den Menschen, mit ihrer vorwiegend visuellen Orientierung, zu einer der stärksten Beeinflussungen der Lebensqualität (Krey *et al.* 1986). Der Augapfel ist aus drei Schichten aufgebaut. Die äußere Augenhaut besteht aus der undurchsichtigen Sklera (Lederhaut) und der transparenten Cornea (Hornhaut). Die mittlere Augenhaut (Uvea) besteht aus der gefäßtragenden Choroidea (Aderhaut), der blendenartigen Iris (Regenbogenhaut) sowie dem Ziliarkörper. Die innere Augenhaut wird durch die Retina (Netzhaut) gebildet (Krey *et al.* 1986).

1.1.1. Die Retina

Die Retina kleidet das posteriore Segment des Auges aus und besteht aus zehn Schichten. Sie befindet sich mit den basolateralen Mikrovilli des Retinalen Pigmentepithels (RPE) im direkten Kontakt mit der Bruch'schen Membran (BrM) und der Choroidea (siehe 1.1.2.). Zur apikalen Seite der Retina grenzt der Glaskörper an. Es liegen zwei Gefäßsysteme zur Versorgung der Retina vor. Während das retinale Kapillarnetz die innere Retina mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt, werden die Photorezeptoren über Nährstoffe aus dem Kapillarnetz der Choroidea (Choriocapillaris) ernährt (Lüllmann-Rauch 2015). In Abbildung (Abb.) 1 ist der Aufbau der Retina an dem Beispiel einer humanen (a) und murinen (b) Retina dargestellt sowie in (c) die Lagebeziehung der vertikalen Sehbahn-Neurone (Photorezeptoren, Bipolare Zellen, Ganglienzellen) zu den Retinaschichten.

Die äußerste Schicht der Retina stellt die polarisierte Schicht des RPE dar, welche eine Vielzahl an Aufgaben übernimmt, die dem Funktionserhalt der Photorezeptoren dienen (Strauss 2005) und auf dessen zentrale Bedeutung in Abschnitt 1.1.2. näher eingegangen wird. Es folgt die Photorezeptorschicht (PRS), die äußere Grenzmembran (ÄGr), die äußere Körnerschicht (ÄK), die äußere plexiforme Schicht (ÄP), die innere Körnerschicht

(IK), die innere plexiforme Schicht (IP), die Ganglienzellschicht (GZ), die Nervenfaserschicht (NF) und die innere Grenzmembran (IGr). Die PRS, deren Zellen das Licht wahrnehmen und als Reiz an die ableitenden Nerven weitergeben, wird von den Fortsätzen der Zapfen- und Stäbchenzellen gebildet. Der sensorische Fortsatz einer Rezeptorzelle besteht aus dem lichtempfindlichen Außensegment und dem Innensegment, welches das metabolische Zentrum darstellt. Die Außensegmente enthalten die Sehpigmente, welche in Biomembranen eingebaut sind und in denen die Phototransduktion stattfindet. Für die Funktionsfähigkeit der Photorezeptoren benötigen diese Zellen ein hohes Maß an Sauerstoff, Glukose sowie Schutzmechanismen vor destruktiven Einflüssen (Bhutto und Luttj 2012; Klettner 2015b). Die ÄGr beschreibt die Zellkontakte zwischen äußeren Müller-Zellfortsätzen und den Photorezeptoren. Die Perikaryen der Photorezeptoren bilden die ÄK und die Synapsen der axonalen Fortsätze bilden zusammen mit denen der Bipolarzellen und Horizontalzellen die ÄP. Die IK besteht aus Perikaryen der Bipolar-, Horizontal-, amakrinen-, und Müller-Zellen. Die Synapsen zwischen Axonen der Bipolarzellen, Ganglienzellen und amakrinen Zellen beschreiben die IP. Die Perikaryen der Ganglienzellen und nach innenverlagerten amakrinen Zellen befinden sich in der GZ. Die Axone der Ganglienzellen bilden die NF. Die Neuroretina wird durch die nach innen gerichteten Müllerzellfortsätze mit der Basallamina als IGr abgeschlossen (Abb.1) (Kolb *et al.* 1995; Lüllmann-Rauch 2015).

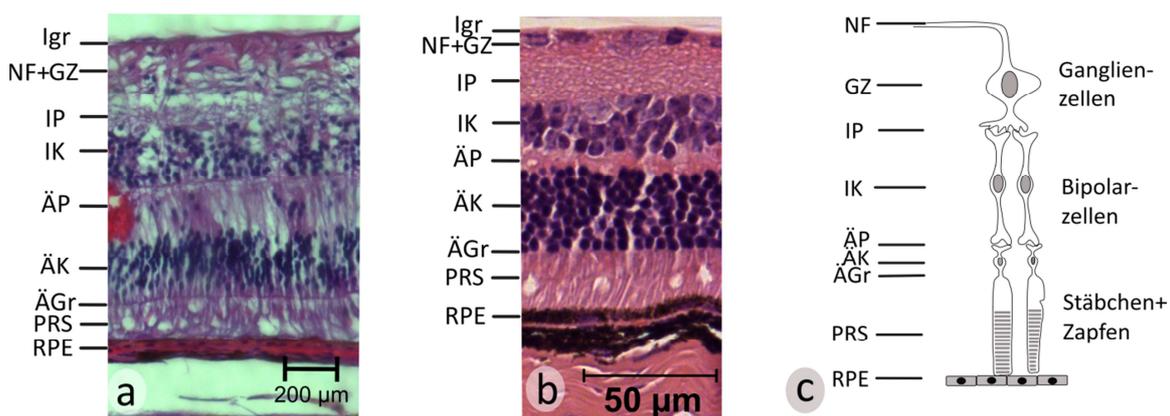


Abbildung 1: Aufbau der Retina. Es ist der Aufbau der humanen (a) und murinen (b) Retina dargestellt sowie in (c) die Lagebeziehung der vertikalen Sehbahn-Neurone (Photorezeptoren, Bipolare Zellen, Ganglienzellen) zu den Retinaschichten. Die Retina besteht aus dem retinalem Pigmentepithel (RPE), der Photorezeptorschicht (PRS), der äußeren Grenzmembran (ÄGr), der äußeren Körnerschicht (ÄK), der äußeren plexiformen Schicht (ÄP), der inneren Körnerschicht (IK), der inneren plexiformen Schicht (IP), der Ganglienzellschicht (GZ), der Nervenfaserschicht (NF) und der inneren Grenzmembran (IGr).

Bei der ophthalmologischen Untersuchung des Augenhintergrundes (Fundus) zeigen sich zwei anatomisch auffällige Strukturen. Es handelt sich dabei zum einen um die Papille, der Ort an dem der Sehnerv aus dem Auge austritt und zum anderen um die temporal gelegene Macula lutea. Die Macula lutea ist für das präzise Sehvermögen verantwortlich und beinhaltet die Fovea centralis, den Ort des schärfsten Sehens. In der Fovea befinden sich fast ausschließlich Zapfen in einer extrem hohen Dichte. Diese sind in einem 1:1 Verhältnis mit den nachgeschalteten Neuronen verbunden, welches zu der hohen Auflösung in diesem Bereich führt. Es finden sich keine retinalen Blutgefäße in der Fovea, weshalb die Nährstoff- und Sauerstoffversorgung in diesem Bereich allein über das choroidale Gefäßsystem stattfindet. Dies ist von Relevanz für die Versorgung der Photorezeptoren, da diese einen extrem hohen Sauerstoffbedarf aufweisen (Klettner, 2015b; Kolb *et al.* 1995; Lüllmann-Rauch 2015). Aufgrund der beschriebenen Besonderheiten der Macula lutea haben Schädigungen in diesem Bereich einen starken Einfluss auf das Sehvermögen und werden unter 1.2. näher behandelt.

1.1.2. Der Komplex aus retinalem Pigmentepithel, Bruch'scher Membran und Choroidea

Der funktionelle Komplex aus RPE, BrM und Choroidea (Abb. 2) ist von zentraler Bedeutung für diese Arbeit und wird daher im Weiteren näher beschrieben.

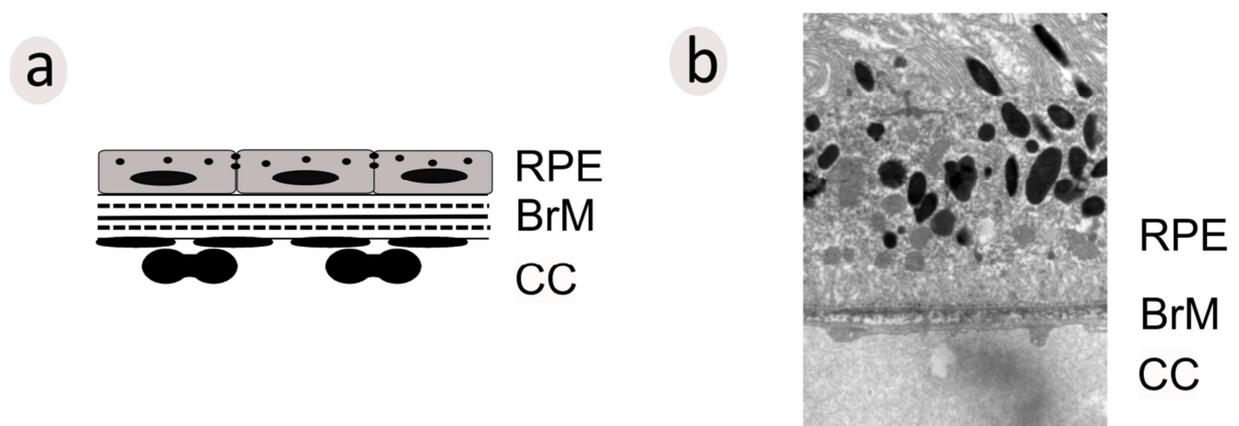


Abbildung 2: Komplex aus retinalem Pigmentepithel (RPE), Bruch'scher Membran (BrM) und der Choriocapillaris (CC) der Choroidea. Dargestellt ist der schematische Aufbau des Komplexes mit dem RPE als oberste Zellschicht, gefolgt von der penta-laminären BrM und der CC mit dem fenestrierten Endothel (a). Der genannte Komplex ist in einer elektronenmikroskopischen Aufnahme mit einer 3000-fachen Vergrößerung in einem murinen Auge dargestellt (b).

Das RPE stellt den äußersten Bestandteil der zehnschichtigen Retina dar und befindet sich in direkter Interaktion mit den Photorezeptoraußensegmenten. Durch den aktiven Transport von Wasser aus dem subretinalen Raum wird die Neuroretina an dem RPE gehalten. Das RPE besteht aus einer Einzelschicht polarisierter, postmitotischer Epithelzellen, die eine hexagonale Form aufweisen und eine Vielzahl an Melanomen im Zytoplasma besitzen. Die einzelne RPE-Zelle besteht aus einem basalen nicht pigmentierten Anteil, welcher den Zellkern trägt sowie einem anterioren stark pigmentierten Anteil, welcher über die apikalen Mikrovilli mit den Photorezeptoraußensegmenten in Verbindung steht (Strauss 2005). Die basolaterale Seite des RPE interagiert mit der BrM und der stark durchbluteten Choroidea, welche die Verbindung zum Blutkreislauf darstellt.

Das RPE erfüllt diverse Funktionen, welche in Abb. 3 dargestellt sind. Eine der wichtigsten Aufgaben des RPE ist die Bildung der äußeren Blut-Retina-Schranke über Zell-Zell-Verbindungen (*tight junctions*) im apikalen Bereich der Zellen, welche eine permeable Barriere zur Choroidea darstellen. Die äußere Blut-Retina-Schranke schützt die Neuroretina vor dem Eindringen von Krankheitserregern und Zellen aus dem Blut und trägt so zur Aufrechterhaltung des immunprivilegierten Raumes der Retina bei, auf den unter 1.1.3 näher eingegangen wird. Die Bildung der äußeren Blut-Retina-Schranke hat zur Folge, dass alle Nährstoffe und der Sauerstoff aus der Choroidea zunächst das RPE passieren müssen und die Photorezeptoren somit vollständig von der Funktion der RPE-Zellen abhängig sind. Ein Verlust des RPE führt unweigerlich zu einem Funktionsverlust der Photorezeptoren (Bhutto und Luty 2012; Klettner 2015b; Strauss 2005).

Des Weiteren ist das RPE für die Phagozytose von Photorezeptoraußensegmenten verantwortlich, welche regelmäßig von den Rezeptoren am distalen Ende abgestoßen werden (Young 1967). Durch das Recycling des durch Photonenabsorption entstandene all-trans-Retinol in 11-cis-Retinal ist das RPE ein direkter Bestandteil des visuellen Zyklus (Bok 1993). Neben dem Recycling werden andere Bestandteile vollständig abgebaut oder über Degradierung und anschließende Exozytose an die Choroidea abgegeben. Unterbleibt der Abtransport von Abfallstoffen durch das RPE, kommt es zur irreversiblen Schädigung von Photorezeptoren bis hin zur Erblindung (Bhutto und Luty 2012; Klettner 2015b; Strauss 2005).

Die Zellen des RPE sind durch die starke UV-Strahlung, durch die hohe metabolische Aktivität und den hohen Sauerstoffgehalt aus der Choroidea einem erheblichen Maß an oxidativem Stress ausgesetzt. Um sich gegen die Schädigungen durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zu schützen, verfügen die RPE-Zellen über einige Protektionsmechanismen, wie die Einlagerung des Melanins sowie detoxifizierende Systeme oder die Sekretion protektiver Wachstumsfaktoren (Klettner 2012). Das eingelagerte Melanin in den RPE-Zellen ermöglicht die Absorption des Großteils des einfallenden Lichts und wirkt als Filter für reaktives blaues Licht (Boulton und Dayhaw-Barker 2001).

Um die Integrität des funktionellen Komplexes aus RPE, BrM und Aderhaut aufrecht zu erhalten produziert das RPE zahlreiche Wachstumsfaktoren, wie z.B. den *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) (Adamis *et al.* 1993), den *Pigment Epithelium Derived Factor* (PEDF) (Tombran-Tink *et al.* 1995) und den *Transforming Growth Factor beta* (TGF- β) (Bost *et al.* 1992). Diese Faktoren stehen im Zusammenhang mit altersabhängigen Veränderungen und werden unter 1.2.2. näher beschrieben.

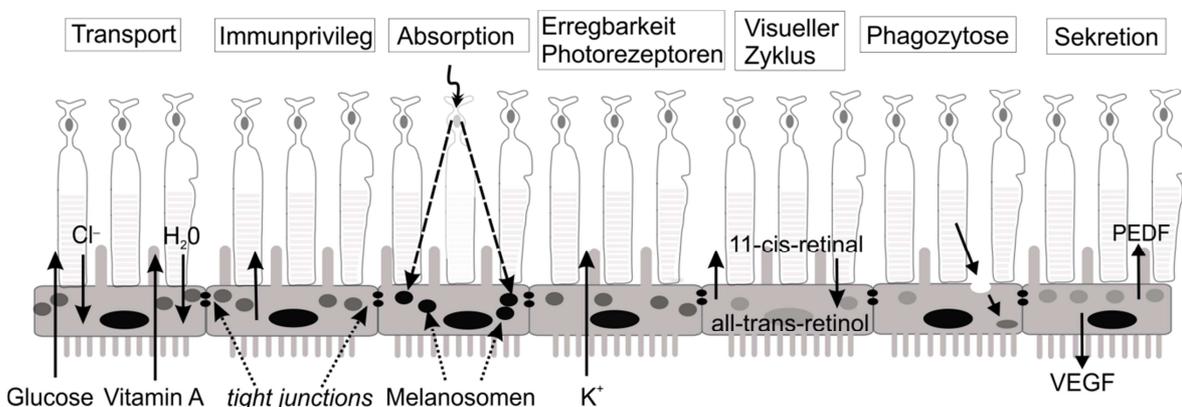


Abbildung 3: Aufgaben und Funktionen des retinalen Pigmentepithels (RPE). Die RPE-Schicht besteht aus einer Einzelschicht polarisierter Zellen mit einem apikalen und basolateralen Teil, welche beide charakteristischerweise Mikrovilli tragen. Die RPE-Zellen erfüllen eine Vielzahl von Funktionen. Sie sind an dem transzellulären Transport von Nährstoffen, Sauerstoff und Wasser über die Bruch'sche Membran verantwortlich und bildet durch die *tight junctions* im apikalen Teil der Zellen die äußere Blut-Retina-Schranke. Diese Barriere sowie die Sekretion immunsuppressiver Substanzen tragen zur Erhaltung des Immunprivilegs bei. Des Weiteren werden verschiedene Wachstumsfaktoren, wie der *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) und der *Pigment Epithelium Derived Factor* (PEDF) durch das RPE sezerniert. Durch den Transport von Kalium-Ionen nimmt das RPE Einfluss auf die Erregbarkeit der Photorezeptoren. Außerdem ist das RPE für die Phagozytose von Photorezeptoraußensegmenten verantwortlich und die Umwandlung des all-trans-Retinol in 11-cis-Retinal. Das Melanin absorbiert das einfallende Licht und schützt die Zelle so vor oxidativem Stress (nach Strauss, 2005.)

Die basolateralen Mikrovilli der RPE-Zellen liegen direkt an der Basallamina des RPE, welche die Verbindung zur BrM herstellt (Strauss 2005). Die BrM befindet sich als Extrazellulärmatrix (ECM) zwischen der Choriocapillaris der Choroidea und dem RPE. Dieses Molekularsieb stellt eine Diffusionsbarriere dar, um die Retina vor Immunzellen und Substanzen aus dem Blut zu schützen. Die BrM weist eine penta-laminäre Struktur auf und besteht aus der Basallamina des RPE, der inneren kollagenen Schicht, einer inneren Schicht aus elastischen Fasern, einer äußeren kollagenen Schicht und der Basallamina der Choriocapillaris (Bhutto und Luty 2012). Sie besteht hauptsächlich aus Kollagen vom Typ I, III, IV und VI (Chen *et al.* 2003), Fibronectin (Pauleikhoff *et al.* 1992), Laminin (Aisenbrey *et al.* 2006), Proteoglykane und Glycosaminglycane (Hewitt *et al.* 1989). An der basalen Seite der BrM grenzt direkt das fenestrierte Endothel der Choriocapillaris an. Sauerstoff und Nährstoffe aus der Choroidea gelangen über Diffusion durch die BrM zu den RPE-Zellen und von dort aus durch aktiven Transport zu den Photorezeptoren. Die Diffusionskapazität durch die BrM hängt von dem Alter, der retinalen Lokalisation, dem hydrostatischen Druck auf beiden Seiten und der Konzentration von biologisch aktiven Molekülen ab. Zusammenfassend stellt die BrM eine Interaktionsmatrix zwischen dem RPE-Neuroretina-Komplex und dem Blutstrom der Choroidea dar. Veränderungen in dem Komplex der BrM zeigen einen direkten Einfluss auf die Funktion des RPE und der Retina (Bhutto und Luty 2012).

Die Choriocapillaris stellt das gut durchblutete Kapillarbett der Choroidea dar und liegt direkt unter der BrM, wobei die Basalmembran der Choriocapillaris eine der Schichten der BrM darstellt. Das Endothel ist fenestriert, um einen optimalen Austausch zu gewährleisten. Die Choroidea ist für die Versorgung der Photorezeptoren und der RPE-Zellen mit Nährstoffe und Sauerstoff verantwortlich (Wangsa-Wirawan und Linsenmeier 2003). Eine Störung dieses Versorgungssystems kann zur Schädigung der Photorezeptoren führen.

Das okuläre Versorgungssystem besteht aus zwei Kreisläufen, dem retinalen Blutkreislauf und dem choroidalen Blutkreislauf. Die Versorgung der Photorezeptoren wird zu 90 % von der Choroidea und lediglich zu 10 % von dem retinalen Gefäßsystem übernommen (Klettner 2015b). In der Fovea centralis, dem Ort des schärfsten Sehens, wird die Versorgung ausnahmslos von der Choroidea übernommen, da sich in diesem Bereich

keine retinalen Gefäße befinden (Bhutto und Luty 2012). Des Weiteren hat die Choroidea eine wenig untersuchte Funktion, welche aus der Kühlung der Photorezeptoren und des RPE besteht. Da die thermische Energie des Sonnenlichts, welches im Auge gebündelt wird, durch den Blutstrom durch die Choroidea abtransportiert wird, wird die Retina vor schädigenden Temperaturen geschützt (Nickla und Wallman 2010).

Die Endothelzellen exprimieren VEGF-Rezeptoren vom Typ 1 und 2 (Blaauwgeers *et al.* 1999) sowie die Expression von intrazellulären Adhäsionsmolekülen vom Typ 1 (McLeod *et al.* 1995), die bei der Bindung von Makrophagen und Neutrophilen eine Rolle spielen.

Die Veränderungen des funktionellen Komplexes aus RPE, BrM und Choroidea sind ein Bestandteil des Alterungsprozesses. Im Laufe des Lebens nimmt die funktionelle Kapazität des RPE-BrM-Choroidea-Komplexes ab. Es kommt zur Anhäufung von Abbauprodukten in den RPE-Zellen, welches zu oxidativem Stress führt und so eine zytotoxische Wirkung auf die Zellen aufweist (Sparrow *et al.* 1999). Ab der fünften Lebensdekade kommt es außerdem zur Abnahme des Melaningehalts in den RPE-Zellen, welches zu einer Verminderung der Absorption führt und damit ebenfalls oxidativen Stress fördert. Ein Verlust von RPE-Zellen im Laufe des Lebens wurde beschrieben (Del Priore *et al.* 2002; Panda-Jonas *et al.* 1996), jedoch kontrovers diskutiert und in den letzten Jahren wiederlegt (Ach *et al.* 2014; Gao und Hollyfield 1992). Neben den Veränderungen in den RPE-Zellen kommt es auch zu Umgestaltungen in der BrM. Es kommt zur Akkumulation von lipidreichen Ablagerungen, Proteinen, Bestandteilen der ECM und glykosylierten Stoffwechselendprodukten. Durch eine fortschreitende Akkumulation kommt es zur Zunahme der Dicke der BrM (Curcio *et al.* 2001; Handa *et al.* 1999; Okubo *et al.* 1999). Dieses resultiert in der Verminderung des Stoffaustausches zwischen Choroidea und RPE und damit einer Unterversorgung der Photorezeptoren (Hillenkamp *et al.* 2004; Hussain *et al.* 2010; Moore und Clover 2001).

Auf die Bedeutung der Veränderungen des funktionellen Komplexes bei der Entwicklung von altersbedingten Erkrankungen wird unter 1.2.1. näher eingegangen.

1.1.3. Das Immunprivileg des subretinalen Raums

Im Allgemeinen ist das Auge ein immunprivilegiertes Raum, d.h. es herrscht eine verminderte Aktivierbarkeit des angeborenen und erworbenen Immunsystems. Das Immunprivileg wurde 1948 von Medawar beschrieben, welcher beobachtete, dass Fremdgewebe, die in das okuläre System eingebracht wurden, eine längere Überlebenszeit aufwiesen, als bei der Transplantation an anderen Stellen des Körpers (Medawar 1948). Das Immunprivileg des okulären Systems ist damit begründet, dass die Neurone der Retina sehr empfindlich gegenüber immunologischen Prozessen sind (Klettner 2015b). Eine Aktivierung des Immunsystems und mögliche Entzündungsreaktionen sollen unterbunden werden, da eine irreversible Schädigung der Photorezeptoren sowie eine Trübung und Narbenbildungen die Sehstärke stark beeinflussen würden (Streilein *et al.* 2002). Das Auge verfügt über verschiedene Mechanismen, wie der äußeren Blut-Retina-Schranke und Funktionen des RPE, um den inaktiven Status des Immunsystems im Auge aktiv zu erhalten, wobei die Unterbindung einer T-Zellen-Aktivierung von höchster Priorität ist (Klettner 2015b). Neben den RPE-Zellen stellen auch die Mikrogliazellen der Neuroretina immunologisch aktive Zellen im Auge dar (Klettner 2015b), wobei die Funktionen der RPE-Zellen im immunprivilegierten Raum im Weiteren genauer beschrieben werden soll.

Das RPE nimmt bei der Aufrechterhaltung des Immunprivilegs eine zentrale Rolle ein, da es verschiedene immunregulatorische Funktionen übernimmt (Klettner 2015a; Zamiri *et al.* 2007). Dazu gehört die Bildung der äußeren Blut-Retina-Schranke, welche durch die *tight junctions* der RPE-Zellen aufrechterhalten wird. Diese Barriere führt zur Abgrenzung gegen immunreaktive Zellen, wie z.B. den T-Zellen und Makrophagen (Klettner 2015a). Zusätzlich exprimiert das RPE auch pro-apoptotische Liganden wie den Fas Ligand (FasL), welcher T-Zellen in die Apoptose führen kann (Jørgensen *et al.* 1998). Auch die Inhibierung von Mitgliedern der angeborenen Immunabwehr, wie z.B. Makrophagen, wird von dem RPE übernommen (Niederhorn 2006).

Trotz zahlreicher Maßnahmen ist das Immunprivileg in dem subretinalen Raum nicht absolut und eine RPE-Stimulation kann zu dem gegenteiligen Effekt, nämlich der

Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen wie z.B. *Tumor Necrosis Factor-alpha* (TNF- α) oder Interferon-gamma führen (Detrick und Hooks 2010).

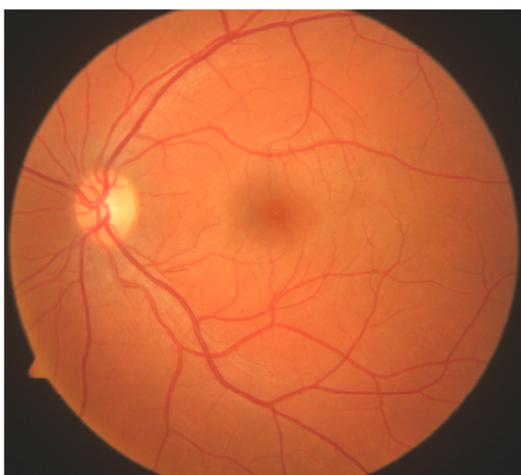
1.2. Die altersabhängige Makuladegeneration

Die altersabhängige Makuladegeneration (AMD) ist die häufigste Erblindungsursache älterer Menschen in der westlichen Welt (Schrader 2006). In Deutschland leben etwa 4,5 Mio. Menschen betroffene Menschen (Knauer und Pfeiffer 2006). Die erhebliche sozioökonomische Bedeutung der AMD wird im Zuge der demographischen Entwicklung in Deutschland und der gesamten entwickelten Welt weiter zunehmen (Schrader 2006). Die Untersuchung neuer Therapieformen für die frühe AMD ist der Gegenstand dieser Arbeit und wird im Weiteren näher beschrieben.

1.2.1. Pathologie und Konzepte der AMD-Entstehung

Die AMD ist gekennzeichnet durch fortschreitende degenerative Veränderungen im Bereich der Choroidea, BrM, RPE und neurosensorischer Netzhaut. Charakteristisch bei der AMD ist das Auftreten von subretinalen Ablagerungen, welche aus extrazellulärem Material und Stoffwechselendprodukten bestehen und als Drusen bezeichnet werden (Coleman *et al.* 2008). Diese können durch die Spiegelung des Augenhintergrunds (Funduskopie) diagnostiziert werden (Abb.4).

a) Gesunde Netzhaut



b) Netzhaut mit Drusen



Abbildung 4: Darstellung der Augenhintergrunds (Fundus) mit einer gesunden Netzhaut und einer Netzhaut mit Drusen im Rahmen der AMD (Fotos: Dr. Jan Tode, Kiel).

Die AMD ist wie schon angesprochen die häufigste Erblindungsursache älterer Menschen in der westlichen Welt (Schrader 2006). Die Verschlechterung der Sehstärke ist darin begründet als dass die AMD die Macula-Region betrifft. Die Macula lutea ist für das präzise Sehvermögen verantwortlich und beinhaltet die Fovea centralis, den Ort des schärfsten Sehens (siehe 1.1.1.).

Klinisch wird zwischen einer Frühform der AMD und zwei Spätformen unterschieden. Die frühe nicht-exsudative (trockene) Form der AMD ist gekennzeichnet durch das Auftreten von Drusen und möglichen Veränderungen des Pigmentepithels. Bei kleinen ($< 63 \mu\text{m}$), sogenannten „harten“ Drusen handelt es sich um gewöhnliche altersbedingte Veränderungen. Größere ($> 63 \mu\text{m}$), auch als „weiche“ Drusen bezeichnete Veränderungen, sowie Verschiebungen des Pigmentepithels gehen mit der frühen meist symptomlosen AMD einher (Coleman *et al.* 2008; Ferris *et al.* 2013; Klettner 2015 b).

Im langfristigen Verlauf kann es zur Progression der frühen AMD in die Spätformen kommen. Dazu zählt die geographische Atrophie, bei der es zum Verlust von RPE-Zellen und Photorezeptoren kommt. Weiterhin kann es zum Übergang in die exsudative (feuchte) Form der AMD kommen, bei der sich Ödeme und unkontrollierte Gefäßausprossungen der Aderhaut ausbilden und die unbehandelt meist zur Erblindung führt (Green 1999; Parmeggiani *et al.* 2013; Sarks *et al.* 2007). Die schnell progrediente feuchte Form der AMD macht etwa 10-15 % der erkrankten Personen aus. Bei dem größeren Teil, etwa 85-90 % der Patienten, tritt die langsam fortschreitende trockene Form der AMD auf, die mit einem langsamen Sehverlust einhergeht (Coleman *et al.* 2008).

Die Pathologie der AMD ist multifaktoriell und bis heute noch nicht vollständig verstanden. Es gibt eine Vielzahl von Faktoren, denen ein Einfluss auf die AMD zugesprochen wird. Dazu zählen das Alter, genetische Variationen, externe Faktoren wie hyperkalorische Diäten, oxidativer Stress und das Rauchen (Fritsche *et al.* 2016; Hyman und Neborsky 2002).

Nach aktueller Expertenmeinung basieren die molekularen Konzepte der AMD-Entstehung auf vier Säulen, die miteinander interagieren. Dazu gehören Veränderungen im Lipidstoffwechsel, oxidativer Stress, die Induktion inflammatorischer Prozesse und Beeinflussung der Angiogenese (Abb. 5). Auf die Details dieser Veränderungen im Hinblick

auf den Komplex aus RPE, BrM und Choroidea wird in den folgenden Abschnitten eingegangen.

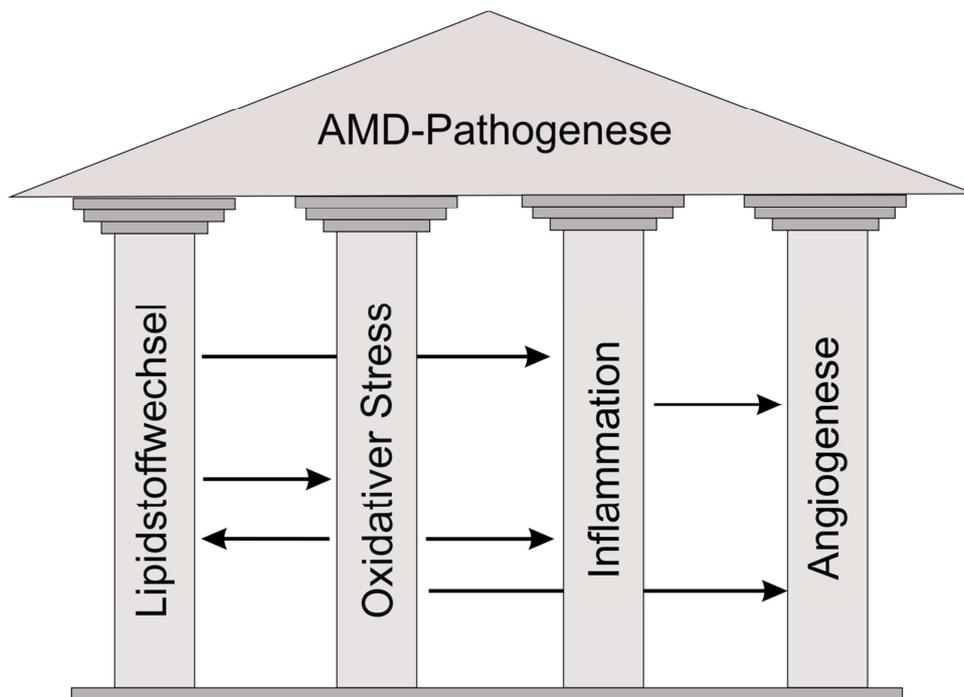


Abbildung 5: Konzepte der AMD-Pathogenese. Nach aktuellem Stand basieren die molekularen Konzepte der AMD-Entstehung auf vier Säulen, die miteinander interagieren. Dazu gehören Veränderungen im Lipidstoffwechsel, oxidativer Stress, die Induktion inflammatorischer Prozesse und Beeinflussung der Angiogenese bei der exsudativen Form der AMD. Es kommt zur gegenseitigen Beeinflussung der einzelnen Säulen. Der Lipidstoffwechsel wirkt auf den oxidativen Stress und die Inflammation. Der oxidative Stress wirkt seinerseits auf den Lipidstoffwechsel, die Inflammation und bei der exsudativen AMD auch auf die Angiogenese. Inflammatorische Prozesse haben wiederum einen Einfluss auf die Modulierung angiogener Prozessen bei der exsudativen AMD.

Die erste Säule der AMD-Pathogenese betrifft intra- und extrazelluläre Lipidablagerungen in den RPE-Zellen und der BrM. Die Ablagerungen führen zu einer Zunahme der Dicke der BrM und damit einer Abnahme der hydraulischen Leitfähigkeit zwischen Choroidea und RPE, welches zu einer Unterversorgung der Photorezeptoren führt (Curcio *et al.* 2001; Hillenkamp *et al.* 2004; Hussain *et al.* 2010; Moore *et al.* 1995; Moore und Clover 2001). Einige der Veränderungen des Lipidstoffwechsels, die bei der AMD beobachtet werden, wurden von Curcio *et al.* 2011 unter dem Begriff der *Oil-spill*-Theorie zusammengefasst (Curcio *et al.* 2011). Es wird dabei u.a. beschrieben, dass es im Laufe des Lebens zur Akkumulation von Cholesterinestern und anderen lipidhaltigen Stoffwechselendprodukten in den RPE-Zellen kommt. Diese werden physiologischerweise mit Hilfe des Apolipoprotein (Apo) B in den Chylomikronen transportiert. ApoB, welches

für diese Arbeit von großem Interesse ist, wird basolateral über Exozytose an die BrM weitergegeben und unter physiologischen Umständen von dem Plasma der Choriocapillaris absorbiert. Bei der AMD kommt es zu einer Akkumulation von ApoB und Stoffwechselendprodukten in der BrM, welches zur Verdickung der Membran führt (Curcio *et al.* 2011).

Zusätzlich lagert sich das autofluoreszente Lipofuszin im RPE an, welches als „Alterspigment“ beschrieben wird und das aus phagosomalen Inhaltsstoffen besteht. Dieses verhindert den Abbau von Stoffwechselendprodukten und führt unter der Einwirkung von kurzwelligem Licht zur Bildung von ROS, welche eine zytotoxischen Wirkung auf die Zellen aufweisen (Klettner 2015b, Sparrow *et al.* 1999). In Folge dessen können inflammatorische und angiogene Prozesse angeschoben werden, welche die dritte und vierte Säule der AMD-Pathogenese beschreiben.

Neben den lipidhaltigen Ablagerungen führt noch ein weiterer Prozess zu der Verdickung der BrM im Laufe des Lebens und bei der AMD im gesteigerten Maße. Es handelt sich dabei um Veränderungen in der penta-laminären Struktur der BrM, welche wie beschrieben aus extrazellulärem Material wie Kollagen und elastischen Fasern aufgebaut ist. Der Auf- und Abbau der ECM ist fein reguliert und wird über Matrix-Metalloproteasen (MMP, siehe 1.2.2) und deren Antagonisten, den *Tissue Inhibitors of Matrix-Metalloprotease* (TIMP) vermittelt, welche hauptsächlich von RPE-Zellen und in geringem Ausmaße auch von Endothelzellen exprimiert werden (Alexander *et al.* 1990; Guo *et al.* 1999; Padgett *et al.* 1997; Vranka *et al.* 1997). Ist diese fein regulierte Re-Modellierung der BrM und der Abtransport von Abbauprodukten in Richtung Choroidea gestört, führt dieses zur Akkumulation von Stoffwechselendprodukten innerhalb der Membran und wie beschreiben zur Verdickung der BrM (Okubo *et al.* 1999; Handa *et al.* 1999). Die Ablagerungen sind in der funduskopischen Untersuchung als Drusen sichtbar (Abb. 4). Ultrastrukturell stellen sich diese Ablagerungen in der Basallamina zwischen RPE und BrM dar (Basal laminar deposits) oder als Verdickungen innerhalb der BrM (Basal linear deposits) (Curcio und Millican 1999).

Die Veränderungen der BrM bei der AMD bestehen zusammengefasst aus der Akkumulation von Stoffwechselendprodukten und Zelltrümmern, Lipidablagerungen und einer gestörten Re-Modellierung der ECM. Die Veränderungen der BrM haben dabei

einen direkten Einfluss auf die RPE-Funktionen, wie Adhäsion, Proliferation und Differenzierung (Bhutto und Luttj 2012), welches die AMD-Progression fördern kann.

Die zweite Säule der Theorie zur AMD-Pathologie beschreibt den oxidativen Stress, welcher als wichtiger Auslöser der AMD vermutet wird (Zarbin 2004). Grundsätzlich ist die Retina einem erhöhten oxidativen Stress ausgesetzt, welches durch die starke Lichteinstrahlung, die hohe metabolische Aktivität und den hohen Sauerstoffpartialdruck verursacht wird. Wie bereits unter 1.1.2. beschrieben verfügt das RPE über einige Schutzmechanismen gegen oxidativen Stress (Klettner 2012). Dennoch führen die beschriebenen Faktoren kumulativ zu einem Schaden durch die Anhäufung von ROS, Lipidperoxidation, DNA-Schädigung und Proteinschädigungen. In Folge dessen kommt es zu Einschränkungen zellulärer Funktionen, wie z.B. lysosomaler Abbauprozesse und Autophagie. Dies führt zu Funktionseinbußen der Zellen und zum Zelltod bzw. zu der Degeneration von Geweben (Klettner *et al.* 2013a).

Der *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2) ist ein wichtiger Regulator des oxidativen Stress, welcher im weiteren Verlauf dieser Arbeit von Relevanz ist. Es handelt sich um einen Transkriptionsfaktor, welcher das Gleichgewicht zellulärer Redoxsysteme aufrechterhält und die Expression von Genen reguliert, welche für anti-oxidative Proteine kodieren. Eine Vielzahl von Genen, die dem oxidativen Schutz der Zellen dienen, werden über Nrf2 reguliert (Klettner 2012). Kommt es zu einer Störung der Nrf2 Funktion, so beeinflusst dies die zweite und dritte Säule der AMD-Pathogenese, den oxidativen Stress und die Inflammation.

Die Abnahme von Schutzmechanismen gegen den oxidativen Stress steht in direkter Verbindung mit der dritten Säule der AMD-Pathogenese, der Inflammation. Die Gründe einer inflammatorischen Reaktion in der AMD-Pathologie sind vielfältig. Zu den Stressoren zählen die Ablagerungen in dem Komplex aus RPE und BrM, der Einfluss von oxidativem Stress und auch genetische Dispositionen (Hollyfield *et al.* 2008; Spaide *et al.* 1999; van Lookeren Campagne *et al.* 2016).

Die Verbindung zwischen ROS und dem Auftreten degenerativen Erkrankungen wurde erstmals 1956 von Harman beschrieben (Harman 1956) und auch die Induktion von inflammatorischen Prozessen ist damit vergesellschaftet. Wie bereits beschrieben kommt

es durch Alterungsprozesse, Zigarettenrauch, intensive Lichtexposition und hohem Sauerstoffpartialdruck in den RPE-Zellen zur Anhäufung von z.B. ROS, welche zu Zellzerstörung und Gewebsdegeneration führen (Parmeggiani *et al.* 2013).

Des Weiteren haben auch genetische Dispositionen einen Einfluss auf inflammatorische Prozesse. Durch genetische Studien zeigte sich ein erhöhtes Risiko für die Entstehung der AMD bei Patienten, die Mutationen in den Genen für Faktoren des Komplementsystems (*Complement Factor H* [CFH] und *Complement factor 2*) aufwiesen (Hageman *et al.* 2005; Scholl *et al.* 2009). Das Komplementsystem besteht aus einer Kaskade von Plasmaproteinen, welche in der Lage sind den sogenannten Membranangriffskomplex zu bilden und so Wirtzellen und Mikroorganismen zu lysieren. Auch die genetische Veränderungen in verschiedenen CFH-regulierten Proteinen (Gold *et al.* 2006; Yates *et al.* 2007) und Genen, die für inflammatorische Zytokine kodieren (u.a. Interleukin (IL)-6, IL-8) (Casella *et al.* 2014) spielen eine Rolle bei der AMD-Entstehung. Die Mutation des CFH-Gens scheint dabei die höchste Relevanz zur AMD-Erkrankung aufzuweisen. In der Rotterdam-Studie konnte an 5681 Probanden gezeigt werden, dass Mutationen im CFH-Gen sowohl in dem Früh- als auch in dem Spätstadium der Erkrankung von großer Bedeutung ist (Despriet *et al.* 2006). Ein wichtiger Hinweis auf die Beteiligung des Komplementsystems an der AMD-Entstehung zeigte sich in der proteinbiochemischen Analyse von Drusen und RPE-BrM-Explantaten von AMD-Patienten, in denen zahlreiche Komplementfaktoren identifiziert werden konnten (Crabb *et al.* 2002; Yuan *et al.* 2010). Neben den Komplementfaktoren werden auch andere Bestandteile des Immunsystems als beteiligte Faktoren in der AMD-Entstehung angesehen (Klettner 2015b). So zeigten Untersuchungen des RPE, der BrM und Choriocapillaris bei AMD-Patienten, dass sich speziell in den Bereichen von Drusen gehäuft inflammatorische Zytokine wie z.B. IL-6, TNF- α , aber auch Makrophagen, Neutrophile und andere Immunzellen befanden (Cherepanoff *et al.* 2010).

Wie in Abb. 5 darstellt ist, beeinflusst die Induktion inflammatorischer Prozesse auch die vierte Säule der AMD-Pathogenese, die Angiogenese, welche die exsudative Form der AMD betrifft und die mit Veränderungen im Bereich der Choriocapillaris einhergeht. Die Choroidale Neovaskularisation (CNV) ist das Hauptmerkmal bei der feuchten Form der AMD und ist durch unkontrollierte Gefäßsprossungen aus der Choroidea, durch die BrM

und das RPE in den subretinalen Raum gekennzeichnet. Ein primärer Faktor bei der CNV-Entstehung ist die Überexpression des pro-angiogenen VEGF (Spilisbury *et al.* 2000).

Das VEGF ist ein Signalmolekül, welches physiologischer Weise vom RPE sezerniert wird und eine protektive Wirkung auf Neurone und Aderhaut aufweist (siehe 1.2.2). Bei der Induktion des VEGF zeigt sich erneut die Interaktion zwischen den Säulen der multifaktoriellen AMD-Pathogenese, da die pathologische VEGF-Induktion durch oxidativen Stress, Sauerstoffmangel und inflammatorische Proteine hervorgerufen werden kann (Klettner 2015b). Das Gleichgewicht zwischen pro- und anti-angiogenen Faktoren ist kritisch ausbalanciert. Physiologischerweise dominieren die inhibitorischen Faktoren der Angiogenese, wie z.B. das anti-angiogene PEDF, auf das unter 1.2.2. weiter eingegangen wird. Kommt es in dem angiogenen System zu Störungen und zur Abnahme der inhibitorischen Faktoren, fördert dies die Neovaskularisation (Bhutto *et al.* 2006).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die funktionelle Beziehung von RPE, BrM und Choroidea sowohl in der nicht-exsudativen als auch in der exsudativen AMD gestört ist. Es kommt zum Untergang von RPE-Zellen, durch z.B. oxidative Prozesse, zur Verdickung der BrM durch Lipidablagerungen und CNV im Bereich der Choroidea. Der Verlust der funktionellen Integrität einer der Strukturen führt unweigerlich zur Beeinflussungen der anderen Strukturen und als letzte Konsequenz zum Untergang der Photorezeptoren und zur Erblindung.

1.2.2. AMD-relevante Zellmediatoren

Das VEGF ist einer der Hauptakteure bei der Entstehung der exsudativen Form der AMD und der Bildung neuer Blutgefäße, sowohl pathologischer als auch physiologischer Art (Ferrara *et al.* 1991). Der VEGF-Familie zugehörig sind die Wachstumsfaktoren VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F und der *Placenta Growth Factor* (Holmes und Zachary 2005; Yamazaki und Morita 2006). In dieser Arbeit steht der Faktor VEGF-A im Fokus und wird, wie in der Literatur üblich, gleichbedeutend mit dem Begriff VEGF verwendet. Im menschlichen Körper erfüllt VEGF eine Vielzahl von Funktionen, wie das Mitwirken bei der Embryonalentwicklung (Carmeliet *et al.* 1996), die Beeinflussung der Permeabilität von Endothelien (Senger *et al.* 1983), der Wundheilung (Tonnesen *et al.* 2000) und der Stickstoffmonoxidbildung in Endothelzellen (Kroll und Waltenberger 1998).

Im Auge wird VEGF von mehreren Zelltypen gebildet, wobei die Sekretion durch das RPE in dieser Arbeit im Fokus steht. Das VEGF wird sowohl zur apikalen Seite der Neuroretina, als auch zur basolateralen Seite der BrM und Choroidea abgegeben, wobei es basal zu einer stärkeren Ausschüttung kommt (Blaauwgeers *et al.* 1999; Klettner 2015b). Das VEGF weist unter anderem eine neuroprotektive Wirkung auf die Retina (Jin *et al.* 2000; Nishijima *et al.* 2007) und das retinale Pigmentepithel auf (Byeon *et al.* 2010) und ist an dem physiologischen Erhalt der Choroidea und der Fenestrierung beteiligt (Marneros *et al.* 2005). In Bezug auf die Erkrankung der feuchten AMD spielt VEGF eine entscheidende Rolle bei der Entstehung unkontrollierte Gefäßsprossungen aus der Choroidea, der bereits beschriebenen CNV (Spilsbury *et al.* 2000). Es handelt sich bei dem Faktor VEGF um ein Glykoprotein mit einer Größe von 45 Kilodalton (kDa) (Ferrara und Henzel 1989). Durch den Prozess des alternativen Spleißens von prä-messenger-RNA (mRNA) entstehen verschiedene Isoformen des Moleküls (Tischer *et al.* 1991). Es liegen vier Hauptisoformen von VEGF vor, welche sich durch die Anzahl der Aminosäuren (121, 165, 189 und 206 Aminosäuren) unterscheiden und die eine unterschiedliche biologische Aktivität aufweisen (Ferrara *et al.* 1991). Vom retinalen Gewebe wird hauptsächlich die Isoform VEGF₁₆₅ und in geringerem Maße die Isoformen VEGF₁₂₁ und VEGF₁₈₉ exprimiert (Klettner 2014; Wang *et al.* 2011), wobei die Expression durch verschiedene Faktoren wie Hypoxie (Shweiki *et al.* 1992), oxidativen Stress (Klettner und Roider 2009a) und Zytokine (Nagineeni *et al.* 2012) reguliert wird. Es wird diskutiert, dass autoregulatorische Wirkmechanismen bestehen, wonach VEGF seine eigene Expression beeinflussen kann. So konnte gezeigt werden, dass VEGF auf seinen eigenen Transkriptionsfaktor Einfluss nehmen und dadurch die eigene Expression verstärken kann (Deudero *et al.* 2008). Ebenso wurde beobachtet, dass exogen hinzugegebenes VEGF die Expression von VEGF verstärkt (Knizetova *et al.* 2008), genauso wie der Nachweis, dass durch eine VEGF-Neutralisierung über die VEGF-Inhibitoren Bevacizumab und Ranibizumab auch die VEGF-Expression vermindert wird (Klettner und Roider 2008). Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Inhibition des VEGF-Rezeptors auch die VEGF-Sekretion vermindert wird (Klettner *et al.* 2013b).

Ein natürlicher Gegenspieler des VEGF ist das anti-angiogene PEDF. Das PEDF gehört zu der Familie der Serin-Protease-Inhibitoren und weist ein Molekulargewicht von 50 kDa

auf (Tombran-Tink *et al.* 1995; Tombran-Tink *et al.* 1991). Es ist ein multifunktionelles Zytokin, welches als physiologischer Inhibitor der Angiogenese stark mit der VEGF-Regulation assoziiert ist. Der Weiteren ist es an der Entwicklung und dem Überleben von Photorezeptoren sowie der Neuroprotektion der Retina beteiligt (Bouck 2002; Cao *et al.* 2001; Dawson *et al.* 1999; Jablonski *et al.* 2000). Das PEDF wird von den RPE-Zellen exprimiert und es zeigte sich, dass durch die selektive Wirkung des PEDF die Endothelzellen von sich neu ausbildenden Gefäßen in die Apoptose geführt werden können (Bouck 2002; Volpert *et al.* 2002). Frühere Studien haben gezeigt, dass PEDF die Bildung neuer Blutgefäße in laserinduzierten CNV bei Mäusen hemmte (Mori *et al.* 2002a). Es zeigte sich, dass sowohl eine Überexpression von PEDF als auch eine Inhibierung von VEGF die Bildung einer CNV unterbinden kann (Mori *et al.* 2002b). Durch seine zentrale Rolle in der Inhibition von neuen Blutgefäßen und der CNV ist das PEDF auch für die AMD von Bedeutung (Tombran-Tink *et al.* 1995). Das PEDF zeigt sich als potentieller therapeutischer Angriffspunkt für retinale und choroidale Erkrankungen, die durch das Auftreten von Neovaskularisationen und degenerativen Veränderungen der Retina gekennzeichnet sind (Gehlbach *et al.* 2003; K. Mori *et al.* 2001).

Der Austausch von Nährstoffen und Stoffwechsel-Abbauprodukten über die BrM spielt eine wichtige Rolle bei dem Funktionserhalt der Neuroretina. In der AMD kommt es wie bereits beschrieben zur Verdickung der BrM und zur Einschränkung dieses Stoffaustausches. Die Re-Modellierung der BrM wird durch die Familie der MMPs, aber auch deren Antagonisten den TIMPs gesteuert. Die beiden Gruppen umfassen eine Vielzahl von Mitgliedern, von denen die MMPs 1, 2, 3 und 9 sowie die TIMPs 1, 2 und 3 Bestandteile der BrM sind und von dem RPE und zu einem geringen Teil auch von den choroidalen Endothelzellen sezerniert werden (Alexander *et al.* 1990; Guo *et al.* 1999; Padgett *et al.* 1997; Vranka *et al.* 1997).

Die MMPs sind Gelatinasen, welche alle bekannten Bestandteile der ECM und damit der BrM spalten können. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von zwei Laserbehandlungen (siehe 1.3.) auf die Gelatinasen MMP-2 und -9 untersucht, welche in der Lage sind, denaturiertes Kollagen abzubauen (Woessner 1991). MMPs werden als latente pro-Formen sezerniert und werden intrazellulär oder membranassoziiert zu funktionsfähigen Enzymen aktiviert (Birkedal-Hansen *et al.* 1993; Guo *et al.* 1999; Strongin *et al.* 1995;

Woessner 1991). Die aktiven Enzyme sind dann in der Lage die Komponenten der ECM zu degradieren und damit die BrM zu modellieren (Sternlicht und Werb 2001). Es zeigte sich, dass der Gehalt von inaktiven Pro-Formen der Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 mit zunehmendem Alter ansteigt, wohingegen der Gehalt an aktiven MMPs im Alter reduziert ist. Es wird angenommen, dass dies einer der Gründe für die herabgesetzte Re-Modellierungsaktivität in der BrM mit zunehmendem Alter ist und die Dicke der BrM damit im Alterungsprozess zunimmt (Guo *et al.* 1999; Ali A. Hussain *et al.* 2011). *In vitro* Studien zeigten, dass die Behandlung humaner BrM-Explantate mit exogen hinzugegebenen aktivierten MMPs zu einer Steigerung der Transportfähigkeit durch die Membran führte (Ahir *et al.* 2002). Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass die Stimulation von MMPs ein therapeutischer Ansatz bei der AMD-Behandlung darstellen könnte, mit dem Ziel die pathologisch verdickte BrM zu re-modellieren und dadurch die Durchlässigkeit der BrM zu erhöhen.

Der Einfluss inflammatorischer Prozesse auf die Pathogenese der AMD stellt ebenfalls einen der vier Hauptsäulen der AMD-Pathogenese da (siehe 1.2.1.). In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Lasertherapie (siehe 1.3.) die Expression inflammatorischer Zytokine (TNF- α , TGF- β und IL-6) induziert. Es sollte dadurch die Sicherheit der Laserbehandlungen überprüft werden, da eine Induktion inflammatorischer Prozesse die AMD-Entstehung fördern könnte.

TNF- α ist ein pro-inflammatorisches Zytokin, welches das Zellüberleben und die Zelldifferenzierung beeinflusst. Auf der anderen Seite wird aber auch die Apoptose durch TNF- α induziert (Hehlhans und Pfeffer 2005). TNF- α wird hauptsächlich von Makrophagen, aktivierten T-Zellen und Endothelzellen exprimiert, wobei die Expression von TNF- α -Rezeptoren auch in stimulierte RPE-Zellen induziert werden kann (Mosser und Edwards 2008; Shi *et al.* 2006). Dieses chemotaktisch agierende Zytokin kann die Permeabilität von Endothelien beeinflussen und so zu einem Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke führen, welches zur Unterversorgung der Photorezeptoren, zum Zusammenbruch des Immunprivilegs und zur ungehinderten Gefäßausprossung aus der Choroidea führen könnte (Derevjanik *et al.* 2002; Claudio *et al.* 1994; Lentsch und Ward 2000).

Die Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen wie dem TNF- α führt zur Induktion der VEGF-Sekretion von RPE-Zellen und kann darüber ebenfalls zu unkontrollierten Gefäßausprossungen seitens der Choroidea führen (Naginei *et al.* 2012). Eine Beeinflussung von TNF- α durch die Lasertherapie würde damit eine zentrale Rolle bei der Entstehung der exsudativen Form der AMD einnehmen.

Ein weiteres multifunktionales und AMD-relevantes Zytokin ist das TGF- β , welches einen Einfluss auf die Zellmigration und Proliferation im Rahmen der Wundheilung aufweist. Des Weiteren ist TGF- β an der Regulation von inflammatorischen Prozessen sowie der Zelldifferenzierung beteiligt (Moustakas *et al.* 2002; Saika 2005; Schiller *et al.* 2004). TGF- β ist für die AMD von Relevanz, da es die Produktion von ECM-Bestandteilen anregt, welches zu einer Verdickung der BrM führen könnte. Des Weiteren beeinflusst es die Sekretion von VEGF (Naginei *et al.* 2003; Schiller *et al.* 2004) und kommt in hohem Maß in den Endothelien von CNVs vor, was für einen Einfluss an der Entwicklung der feuchten AMD spricht (Ogata *et al.* 1997). Zudem beeinflusst das TGF- β einen Prozess, der als Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT) bezeichnet wird. Bei diesem Prozess verlieren Epithelzellen ihre differenzierten Phänotypen und wandeln sich in Mesenchym-ähnliche Zellen um (Kalluri und Weinberg 2009). Bei der Re-differenzierung kommt es zur Beeinträchtigung einiger Zellfunktionen, wie der Migrationsfähigkeit, der Zelladhäsion und der Bildung des Zytoskeletts (Kalluri und Weinberg 2009). Außerdem stehen die Mesenchym-ähnlichen Zellen mit fibrotischen Veränderungen bei z.B. kardiogener Fibrose sowie Leber- und Lungenfibrose in Verbindung (Kim *et al.* 2006; Zeisberg *et al.* 2007a; Zeisberg *et al.* 2007b). Fibrotische Veränderungen könnten im Auge fatale Auswirkungen auf die Integrität und Funktionalität des Auges aufweisen. Eine Induktion des TGF- β durch Laserbehandlungen wurde in früheren Studien beschrieben (Ishida *et al.* 1998; Yamamoto *et al.* 1998) und aufgrund dessen auch in dieser Arbeit untersucht, da eine Induktion durch die Laserbehandlung zu unerwünschten Nebeneffekten, wie der Konvertierung der trockenen in die feuchte Form der AMD, führen könnte.

Des Weiteren wurde IL-6 untersucht, ein pro-inflammatorisches Zytokin, welches hauptsächlich von Makrophagen und Mastzellen exprimiert wird. Es nimmt Einfluss auf inflammatorische Prozesse durch die Beteiligung an der Kontrolle von Zelldifferenzierung, Proliferation, Migration und Apoptose (Scheller *et al.* 2014). Das IL-6 ist weiterhin in der Lage Endothelzellen und Leukozyten zu aktivieren. Allerdings erfüllt IL-6 auch wichtige

homöostatische Aufgaben bei der Wundheilung und reguliert Stoffwechselfunktionen (Medzhitov 2008; Scheller *et al.* 2014). Eine Dysfunktion in diesem gut regulierten System führt zu akuten und chronischen Entzündungen (Scheller *et al.* 2014). Im Auge würde dies zu diversen Effekten wie dem irreversiblen Untergang von Photorezeptoren und Narbenbildung führen, welche die Sehkraft negativ beeinflussen würden. Es wurde gezeigt, dass unter oxidativem Stress und inflammatorischen Prozessen und der damit verbundenen Sekretion von IL-6 die Produktion von CFH reduziert werden kann. Dies könnte zu einem erhöhten Risiko für die Ausbildung des Membranangriffskomplexes im subretinalen Raum führen und einer damit einhergehend zu einer Schädigung des RPE führen, welches wiederum die AMD-Entstehung fördern würde (Klettner 2015a; Chen *et al.* 2007). Eine Induktion des pro-inflammatorischen Systems durch die Laserbehandlung könnte zu den oben genannten Effekten führen und dadurch ebenfalls die Progression der AMD fördern.

1.2.3. Therapiemöglichkeiten

Die AMD-Pathologie ist multifaktoriell und bis heute nur unvollständig verstanden. Eine möglichst frühe Erkennung und präventive Behandlung der AMD ist von großem medizinischem und sozioökonomischem Interesse. Die folgende Beschreibung bezieht sich auf die bekanntesten Therapieansätze für die Behandlung der exsudativen AMD und den aktuellen Stand in der Entwicklung einer Therapie für die trockene Form der AMD.

Als Therapiemaßnahme der exsudativen AMD haben sich Behandlungen gegen den pro-angiogenen Botenstoff VEGF etabliert. VEGF-Antagonisten wie Ranibizumab und Bevacizumab sind Antikörperfragmente bzw. vollständige Antikörper gegen alle Isoformen des VEGF-A und inhibieren dessen biologische Funktionen, wodurch u.a. die Angiogenese gehemmt wird (Gaudreault *et al.* 2005; Klettner und Roider 2009b). Neben den klassischen Antikörpern kommt seit 2012 auch ein Fusionsprotein namens Aflibercept für die Behandlung der exsudativen Form der AMD zum Einsatz (Klettner und Roider 2009b; Schmidt-Erfurth *et al.* 2014).

Die anti-VEGF Behandlung richtet sich jedoch nur gegen das Spätstadium der Erkrankung und kann nicht als Präventionsmaßnahme angewandt werden. Zudem erfordert diese Art der Therapie häufige Injektionen, wie z.B. im Fall des Ranibizumab, bei dem eine

monatliche Gabe empfohlen wird, bis das Maximum der Sehschärfe erreicht ist (Schmidt-Erfurth *et al.* 2014). Dies ist mit einem hohen Behandlungs- und Kostenaufwand verbunden und stellt damit eine immense Belastung der Patienten und des Gesundheitssystems dar. Das Voranschreiten des Sehverlusts bis zur hochgradigen Sehbehinderung bzw. Blindheit kann durch die anti-VEGF Behandlung verzögert, aber in der Regel nicht dauerhaft verhindert werden (CATT Research Group *et al.* 2011; Rofagha *et al.* 2013). Zudem ist der Einsatz der Substrat-spezifischen VEGF-Antagonisten nicht unumstritten. Systemische Nebenwirkungen der VEGF-Antagonisten, wie Herz-Kreislauf-Schädigungen werden beschrieben, aber noch wichtiger das Fortschreiten der Atrophie in der Macula lutea, dem Ort des schärfsten Sehens, unter der langjährigen Behandlung mit VEGF-Antagonisten. Dieses führt zu einer weiteren Verschlechterung der Sehstärke, was eine Limitation der Langzeittherapie darstellen kann (CATT Research Group *et al.* 2011; Sandler 2007; Yanagida und Ueta 2014; Rofagha *et al.* 2013).

Für die häufigere trockene Form der AMD gibt es bisher keine adäquate pathomechanismus-basierte Therapieform (Hampton *et al.* 2015). Der präventive Ansatz zur Behandlung der AMD besteht aktuell aus der Aufnahme von Nahrungsergänzungsmitteln. Die wissenschaftliche Rationale bei diesem Behandlungsansatz ist der Einfluss des oxidativen Stresses auf den Komplex aus RPE, BrM und Choroidea, welcher durch die Aufnahme anti-oxidativer Substanzen reduziert werden soll. Diese Empfehlung umfasst gemäß der AREDS- (*Age-Related Eye Disease Study*) Formel die kombinierte Aufnahme anti-oxidativer Substanzen wie Vitamin C, Vitamin E, Karotinoide und Lutein, aber auch Omega-3-ungesättigte Fettsäuren und Mineralien wie Zink und Selen (Age-Related Eye Disease Study Research Group 2001). Die Wirksamkeit dieser Behandlung ist jedoch umstritten. Mögliche Kontraindikationen können die Gabe von β -Karotinoiden bei aktiven oder ehemaligen Rauchern sein, da sich bei diesen ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Lungenkrebs zeigte. Des Weiteren wurde das gehäufte Auftreten von Prostatakarzinomen bei längerfristiger Einnahme von Vitamine E beobachtet (Klein *et al.* 2011; Lonn *et al.* 2005; Miller *et al.* 2005). Die Erblindung durch die trockene AMD kann durch die Supplementation nicht erkennbar gemindert werden (Evans und Lawrenson 2014).

1.3. Lasertherapie

Für die trockene Form der AMD gibt es bisher keine adäquate pathomechanismusbasierte Therapieform. In dieser Arbeit wird der Einsatz von schonenden Laserverfahren als mögliche Behandlungsoption untersucht.

Der Einsatz von Laserverfahren in der Ophthalmologie hat eine lange Tradition und wird als Goldstandard für die Therapie verschiedener retinaler Erkrankungen verwendet (Lavinsky *et al.* 2016). Der Funktionsmechanismus der Lasertherapie basiert auf der engen Bündelung und Verstärkung von Strahlung, wie die Abkürzung LASER (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) impliziert. Das Licht wird dabei meist in einen monochromatischen Laserstrahl gebündelt, welcher sich auf Distanz nur geringfügig ausweitet. Man unterscheidet zwischen unterschiedlichsten Lasertypen, die sich u.a. in der Wellenlänge der emittierten Strahlung und in der Stärke unterscheiden (Kneubühl und Sigrist 2008). Der Laser arbeitet als optischer Verstärker, welcher die benötigte Energie über ein Lasermedium empfängt. Dieses Medium kann aus einem Gas, einer Flüssigkeit oder festen Substanz bestehen. In dem Medium findet der Übergang von Atomen zwischen zwei Energieniveaus statt, welches durch das Einbringen von Energie über eine Pumpe induziert wird. Bei dem Übergang wird Energie frei, welche sich in Form von Photonen in dem Medium bewegt. Die Photonen bewegen sich von der einen zur anderen Seite des Mediums, wobei sie weitere Atome zum Übergang zwischen den Energieniveaus anregen. Diesen Vorgang bezeichnet man als stimulierte Emission. An den Enden des Mediums befinden sich zwei Spiegel. Einer der Spiegel ist teildurchlässig, sodass hier einerseits eine Reflektion stattfindet, andererseits aber auch die gebündelte Laserstrahlung ausgestrahlt werden kann (Kneubühl und Sigrist 2008).

In Abhängigkeit von der Laserstärke können in der Ophthalmologie unterschiedliche Arbeiten mit einem Laser durchgeführt werden, die von der Veränderung der Hornhautkrümmung bis zur Verödung feiner retinaler Gefäße führen. In der Durchführung der retinalen Laserbehandlung wird meistens mit einem Laser im sichtbaren grünen Wellenbereich von 514 Nanometern (nm) und 532 nm behandelt, aber auch im Infrarotbereich von 810 nm (Koinzer 2014). Die Expositionszeiten liegen dabei zwischen 50 und 500 Millisekunden (ms) und die Leistungen werden so gewählt, dass

deutlich sichtbare Läsionen am Augenhintergrund induziert werden (Roider 2006). Bei einer klinisch sichtbaren Läsion, wie sie beispielsweise bei der Verödung von Gefäßen auftritt, ist es verständlich, dass auch histologisch ein deutlicher Defekt nachgewiesen werden kann. Es kommt zu einer thermischen Nekrose des Pigmentepithels, der Choriocapillaris und Choroidea, der Photorezeptoren und sogar Teilen der inneren Netzhautschichten. In Folge dessen bilden sich Lasernarben, die z.B. bei einer Ablösung der Retina auch gewollt und von Nutzen sind, da die Retina wieder an ihrem Untergrund fixiert wird. Allerdings sind diese Verfahren destruktiv und nicht für die Behandlung einer degenerativen Erkrankung geeignet (Roider 2006, Writing Committee for the Diabetic Retinopathy Clinical Research Network *et al.* 2007).

Es wurde in den letzten Jahren intensiv an der molekularbiologischen Wirkung von Laserbehandlungen geforscht und es zeigte sich, dass die Zellen des RPE eine entscheidende Rolle einnehmen, da sie durch ihre Pigmentierung das Licht im grünen Wellenbereich besonders gut absorbieren (Roider 2006). Da der Komplex aus RPE, BrM und Choroidea durch die Laserbehandlung angesprochen wird und sich in diesem Bereich ein großer Teil der AMD Pathologie befindet, wurde der Einsatz konventioneller Laserbehandlungen auch bei AMD-Patienten untersucht. Dabei zeigte sich, dass eine Laserbehandlung zum Abbau von Ablagerungen in dem Komplex aus BrM und RPE führt, welche als Drusen sichtbar sind. Allerdings schien der Abbau von Drusen für den klinischen Verlauf und die Sehfunktion keine Verbesserung darzustellen (Parodi *et al.* 2009). Ein entscheidender Grund dafür ist, dass bisherige Netzhautlaserverfahren auch bei umsichtiger Verwendung eine thermische Nekrose der Netzhaut erzeugen und damit eine Behandlung im Zentrum der Macula lutea, dem Ort des schärfsten Sehens, ausgeschlossen sind (Friberg *et al.* 2009). Eine thermische Netzhautnekrose in diesem Bereich würde zur Erblindung oder zu einer erheblichen Sehverschlechterung führen (Roider *et al.* 2010). Da die Behandlung der Macula lutea nicht erfolgen kann, diese jedoch die relevanteste Region der AMD-Pathogenese darstellt, sind die unzureichenden Wirkungen der bisherigen Laserstudien nachzuvollziehen (Friberg *et al.* 2009; Owens *et al.* 2006).

In dieser Arbeit wurden zwei neue Laserverfahren untersucht, welche keine thermische Netzhautnekrose hervorrufen sollen und mit denen eine Behandlung an oder im Bereich

der Macula lutea denkbar wäre. Bei diesen stimulierenden Lasertherapien handelt es sich um die Selektive Retina-Therapie (SRT) und die Thermische Stimulationstherapie der Retina (TSR).

Das Ziel der SRT und der TSR ist die Prävention früher altersabhängiger Veränderungen durch eine stimulierende Lasertherapie des Aderhaut-BrM-RPE-Komplexes, welche die Zerstörung von Sinneszellen sicher vermeiden und dennoch effektiv sein sollen. Durch die Re-Modellierung des RPE-BrM-Komplexes soll die Durchlässigkeit der BrM für Nährstoffe und Sauerstoff wieder erhöht werden und die Neuroretina im Folgenden besser versorgt werden. Dieser biophotonische Therapieansatz hat im Gegensatz zur Pharmakotherapie den sozioökonomischen Vorteil, dass keine langfristig wiederkehrenden Behandlungskosten für die anti-VEGF-Therapie benötigt und die blindheitsbedingten Folgekosten der späten AMD vermieden werden könnte.

1.3.1. Selektive Retina-Therapie

Die SRT ist eine Lasermethode, die selektiv die RPE-Zellen zerstört, ohne dabei die Neuroretina oder die BrM zu schädigen (Brinkmann *et al.* 2006; Roider *et al.* 1992; Roider *et al.* 1998; Roider *et al.* 1999). Diese selektive Schädigung wird durch einen 532 nm Laser im grünen Spektralbereich und durch die Verwendung kurzer, repetitiver Pulse im Mikrosekunden- (μ s) Bereich erreicht, welche die Besonderheit dieser Lasertherapie darstellen. Die Laserpulse führen zu einer rapiden Bildung von Mikroblasen an den Melanosomen von RPE-Zellen, welches zu einer selektiven Ruptur der Zellmembranen führt, im Folgenden aber nur die RPE-Zellen zerstört (Brinkmann *et al.* 2000). Dies ist ein entscheidender Unterschied zu konventionellen Laserverfahren und macht die SRT für die Behandlung der frühen AMD so interessant.

In Folge der RPE-Zerstörung findet eine anschließende RPE-Regeneration statt. Es kommt zur Migration und Proliferation der RPE-Zellen in dem Bereich der Laserläsion, welches eine Besonderheit darstellt, da die RPE-Zellen normalerweise post-mitotisch vorliegen (Treumer *et al.* 2012). Im Laufe des Regenerationsprozesses wurde beobachtet, dass die RPE-Zellen vermehrt bestimmte Zellmediatoren, wie z.B. MMPs sezernieren (Treumer *et al.* 2012; Zhang *et al.* 2012). Es wird angenommen, dass es sich bei der Regeneration der

RPE-Zellen um eine Art der Re-Juvenilisationstherapie handelt, welche hypothetisch auch einen Nutzen z.B. auf die verdickte BrM aufweisen kann.

Es wurden bereits im Rahmen von klinischen Studien u.a. an Diabetespatienten *in vivo* Untersuchungen durchgeführt, die zeigen, dass die SRT-Läsionen durch klinisch bildgebende Verfahren, wie die Fluoreszenzangiographie (siehe 3.5.4.3) detektiert werden konnten, wobei jedoch keine Schädigung der Neuroretina in funktionellen Analysen nachgewiesen wurde (Roider *et al.* 1999). In bereits durchgeführten klinischen Studien zeigten sich positive Effekte wie eine Visusstabilisierung der SRT bei den Krankheitsbildern der diabetischen Makulopathie und zentral serösen Chorioretinopathie (Elsner *et al.* 2006a; Elsner *et al.* 2006b; Framme *et al.* 2002; Roider *et al.* 2000).

Die bisherigen Ergebnisse unterstützen die Hypothese einer Re-Juvenilisation des RPE-BrM-Komplexes, welche im Rahmen dieser Arbeit weiter untersucht werden soll, um weitere Evidenz für eine mögliche präventive Behandlung der AMD zu generieren.

1.3.2. Thermische Stimulationstherapie der Retina

Die TSR stellt ein Hyperthermieverfahren dar, welches zu einer Erwärmung der RPE-Zellen führt, diese jedoch, anders als bei der SRT, nicht zerstört und im subletalen Bereich behandelt. Die Laserbehandlung wird mit einem Dauerstrichlaser („*continuous wave*“ [CW]) durchgeführt, der im Vergleich zur SRT nicht mit kurzen repetitiven Pulsen behandelt, sondern mit längeren Pulsen im ms-Bereich. Die Wellenlänge des emittierten Lichts liegt jedoch wie bei der SRT im grünen Bereich (532 nm). Die grüne Strahlung wird hauptsächlich von den RPE-Zellen absorbiert, wie auch bei der SRT, jedoch wird die Leistung des Laserstrahls so niedrig eingestellt, dass es zu keiner thermischen Zerstörung der Zellen führt, sondern lediglich zu einer thermischen Stimulation des RPE (Lavinsky *et al.* 2016).

Die genauen Wirkmechanismen dieser Therapie sind noch weitestgehend unklar, allerdings wurde in früheren Studien gezeigt, dass die thermische Stimulation mit einem CW-Laser einen positiven Effekt bei retinalen Erkrankungen wie der zentral serösen Retinopathie und dem Makulaödem zeigte (Lavinsky und Palanker 2015; Lavinsky *et al.* 2016; Sramek *et al.* 2011). Die molekulare Rationale für diesen Effekt wird in der

gesteigerten Sekretion zellulärer Mediatoren zum Schutz der Zelle vermutet. Es wurde gezeigt, dass RPE-Zellen auf einen moderaten Anstieg der Temperatur mit der Expression von Hitzeschockproteine (HSP) reagieren (Lavinsky *et al.* 2016). Die HSPs gehören zu einer ubiquitär vorkommenden Gruppe hochkonservierter Proteine, die als Chaperone agieren und die Aufgabe der korrekten Proteinfaltung übernehmen. Eine sanfte Stimulation der RPE-Zellen und die damit verbundene Expression dieser Proteine könnte zu einer Reduktion apoptotischer und inflammatorischer Zytokine führen, welche zur Schädigung der Zellen im Rahmen der AMD beitragen (Beckham *et al.* 2008; Lanneau *et al.* 2007; Söti *et al.* 2005; Sramek *et al.* 2011). Aufgrund der beschriebenen Effekte wird die biologische Wirkung der TSR in dieser Arbeit *in vitro* und *in vivo* weiter untersucht, um weitere Evidenz für die Anwendung am AMD-Patienten zu generieren.

2. FRAGESTELLUNG

Die altersabhängige Makuladegeneration (AMD) ist die häufigste Erblindungsursache älterer Menschen in der westlichen Welt. Die erhebliche sozioökonomische Bedeutung der AMD wird im Zuge der demographischen Entwicklung weiter zunehmen. Die Erkrankung ist gekennzeichnet durch fortschreitende degenerative Veränderungen im Bereich der Choroidea, Bruch'scher Membran (BrM), retinalem Pigmentepithel (RPE) und neurosensorischer Netzhaut.

Es lässt sich klinisch zwischen einer langsam progredienten nicht-exsudativen („trockenen“) und eine schnell progredienten exsudativen („feuchten“) Form der AMD unterscheiden. Für die Behandlung der häufiger auftretenden trockenen Form der AMD steht bis heute keine adäquate Pathomechanismus-basierte Form der Therapie zur Verfügung.

Diese Arbeit befasst sich mit der Untersuchung schonender Laserverfahren für die Behandlung früher degenerativer Veränderungen der AMD. Durch einen präventiven Einsatz stimulierender Laserbehandlungen soll die Konvertierung der frühen AMD in das Spätstadium vermindert bzw. unterbunden werden. Die Selektive Retina-Therapie (SRT) und die Thermische Stimulationstherapie der Retina (TSR) stellen zwei Möglichkeiten der schonenden Laserbehandlungen dar. Diese führen zu einer Stimulation des Komplexes aus RPE, BrM und Choroidea, ohne dabei eine Schädigung der Neuroretina hervorzurufen.

Die vorliegende Arbeit dient der grundlagenorientierten Untersuchung der beiden Therapieverfahren *in vitro* und *in vivo* und ist in zwei Teile gegliedert.

Der erste Teil beinhaltet die Untersuchung der Laserverfahren auf die Expression und Sekretion von AMD-relevanten Zellmediatoren in einem porcinen Organkulturmodell bestehend aus RPE, BrM und Choroidea. Dazu gehörten u.a. die MMPs, welche am ständigen Umbau der Extrazellulärmatrix in der BrM beteiligt sind, das pro-angiogene VEGF, welches als wichtigster Faktor bei der Entstehung von choroidalen Neovaskularisationen gilt, sowie dessen Gegenspieler, das anti-angiogen wirkende PEDF. Bei Laserbehandlung gibt es die Möglichkeit unterschiedlich große „Spots“ zu applizieren, womit der Bereich des Gewebes beschrieben ist, der beim einmaligen Auslösen des Lasers behandelt wird. Diese Spotgröße wurde bei dem verwendeten Laser zwischen 100 und 300 μm variiert. Es wurde damit untersucht, ob die Größe der gesetzten Spots eine

Bedeutung auf die Proteinexpression aufweist. Dazu wurde die Zellantwort nach der Behandlung mit unterschiedlichen Spotgrößen und -dichten verglichen.

In dem zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Behandlung zweier AMD-Mausmodelle mit der SRT und TSR an unserer Klinik etabliert. Es handelte sich bei den Mäusen um ApoE -/- und Nrf -/- Knock-out Mäuse, welche aufgrund von Gendefekten verschiedene Veränderungen des Augenhintergrunds aufweisen sollten. Es wurde zunächst der Frage nachgegangen, ob die Knock-out Mäuse AMD-ähnliche Veränderungen im Fundusbild und in ultrastrukturellen Untersuchungen zeigten und damit als Modell geeignet waren. Die weitere Fragestellung bestand jedoch aus der Untersuchung der Hypothese, dass die Laserbehandlungen die Dicke der pathologisch veränderten BrM in den Mäusen modulieren könnten. Dazu wurden die Knock-out Mäuse unterschiedlichen Alters mit den beschriebenen Laserverfahren behandelt und die Dicke der BrM anschließend elektronenmikroskopisch vermessen. Des Weiteren wurde geprüft, ob das Alter der Tiere, der genetische Hintergrund und die Variation der Behandlungsparameter einen Einfluss auf den Erfolg der Behandlung haben.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Material

3.1.1. Geräte und Instrumente

Tabelle 1: In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Geräte und Instrumente dargestellt.

Geräte/Instrumente	Zusatzbezeichnung	Firma	Firmensitz
Abzug	7560F	Köttermann	Hänigsen, D
Autoklav	Varioklav®	Thermo Fisher Scientific	Dreieich, D
Biopsiestanze	6 mm	L. Klein	Biel/Bienne, CH
Brutschränke	CO ₂ Inkubator	Thermo Fisher Scientific	Dreieich, D
	BB15Water Jacketed Incubator	Labotec	Göttingen, D
Chalazionzange	Hermle 784	Hermle	Tutlingen, D
Einbettförmchen	G3531	Plano	Wetzlar, D
Eismaschine	AF80	Scotsman	Milan, I
Entwicklungskammern	Bio Imaging Systems MF-ChemiBis 1.6	Biostep	Jahnsdorf, D
	Gene Flash Syngene Bio Imaging	Sygene	Cambridge, UK
	Gel-Dokumentation, total modular	PHASE Gesellschaft	Lübeck, D
Filtersets	Filterset 38HE; ex 470/40, em 25/50	Carl Zeiss	Jena, D
	Filterset 43HE; ex 550/25, em 605/70	Carl Zeiss	Jena, D
	Filterset 49; ex 365/50, em 445/50	Carl Zeiss	Jena, D
	Filterset 50; ex 640/30, em 90/50	Carl Zeiss	Jena, D
Gefrierschränke	-20 °C Schrank	Liebherr	Kirchdorf, D
	-80 °C Schrank	Sanyo	Moriguchi, J
Gelelektrophorese-kammer	Kammer horizontal MGV-402T	C.B.S. Scientific Company	San Diego, CA, USA
	Kammer vertikal, Mini Protean® Tetra-Cell	Bio-Rad	München, D

Glasplatten	Mini Protean®System	Bio-Rad	München, D
Gridboxen		Plano	Wetzlar, D
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf	Hamburg, D
Haftplatten für Grids	80 mm	Plano	Wetzlar, D
Heizplatte	Leica EM MP Heizplatte	Leica	Wetzlar, D
Kameras	AxioCam Mrc5	Carl Zeiss	Jena, D
	AxioCam MrM	Carl Zeiss	Jena, D
	AxioCam ICc5	Carl Zeiss	Jena, D
	Micron III Kamera	Phoenix Research Laboratories	Pleasanton, CA, USA
Kugelmühle	Omni Bead Ruptor 24	Omni International	Kennesaw, GA, USA
Laser	Prototyp	Carl Zeiss	Jena, D
Laseraufsatz	Laser injector	Phoenix Laboratories	Pleasanton, CA, USA
Magnetrührer	Combimag RCT	IKA®-Werke	Staufen, D
Mikroskope	Apotome 2, Mikroskop	Carl Zeiss	Jena, D
	Binokular, Stemi SV6	Carl Zeiss	Jena, D
	Elektronenmikroskop, EM 900	Carl Zeiss	Jena, D
	Fluoreszenzmikroskop Imager. M2	Carl Zeiss	Jena, D
	Inverses Lichtmikroskop, Axiovert 100	Carl Zeiss	Jena, D
Mischgeräte	Inkubationsschüttler	Infors HAT	Bottmingen, D
	Rollenmischgerät	VWR	Darmstadt, D
	Wippschüttler	VWR	Darmstadt, D
Modifizierte Ussingkammern		Technische Fakultät, CAU zu Kiel	Kiel, D
OCT-Adapter	Prototyp	Thorlabs	Lübeck, D
Photometer	Mikrotiterplatten- Photometer, ELx800	Biostep	Jahnsdorf, D
	ND-1000 Spectrophotometer	Peqlab	Erlangen, D

(Nanodrop)			
	Spektralphotometer Spectronic Genesys 10 Bio	Thermo Fisher Scientific	Dreieich, D
pH-Messgerät	pH 211 Microprocessor	Hanna Instruments	Vöhringen, D
Pinzetten	Anatomische Pinzette, gerade und gebogen	Bausch & Lomb	Berlin, D
	Umkehrpinzette, gebogen Typ N7, Dumont	Plano	Wetzlar, D
Pipetten	2,5 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf	Hamburg, D
	Mehrkanalpipette 100 µl	Eppendorf	Hamburg, D
	Ripette®	Ritter	Schwabmünchen, D
Real-time PCR System	Step One RealTime PCR System	Applied Biosystems, Thermo Fisher	Dreieich, D
Saugpumpe	Vacusaft comfort	Integra Bioscience	Zizers, CHE
Scheren	Enukleationsschere	Bausch & Lomb	Berlin, D
	Federschere	Karl Storz	Tuttlingen, D
	Hornhautschere nach Castroviejo	Bausch & Lomb	Berlin, D
Sterilbänke	Antair Sterilbank BSK	Über Sternkopf	Lübeck, D
	Sterilbank Safe 2020	Thermo Fisher Scientific	Dreieich, D
Stößel		Air Liquid Medical	Lübeck, D
Thermischer Messkopf	Thermal Power Sensor	Thorlabs	Lübeck, D
Thermocycler	My Cycler thermal Cycler	Bio-Rad	München, D
	Px2 Thermo Cycler	Thermo Fisher Scientific	Dreieich, D
Ultraschallgerät	Vibracell CV 188	Sonics & Materials	Newtown, CT, USA

Waagen	Analysewaage	Kern & Sohn	Balingen, D
	Feinwaage	Sartorius analytic	Göttingen, D
Wärmematten	Mehrfach-Komprese	Gello Geltechnik	Ahaus, D
Wärmeschrank	UN30	Eydam	Kiel, D
Waschautomat	ELx50	Biotek	Winooski, VT, USA
Wasserbad	1086	Gesellschaft f. Labortechnik	Burgwedel, D
Wasserwännchen		Leica	Wetzlar, D
Westernblotkammern	Wet Blot Mini Trans Blot Cell Module	Bio-Rad	München, D
Zentrifugen	Biozym Minifuge	Biozym	Hessisch Oldendorf, D
	Centrifuge 5414	Eppendorf	Hamburg, D
	Centrifuge 5415D	Eppendorf	Hamburg, D
	Centrifuge 5417R	Eppendorf	Hamburg, D
	Heraeus Fresco 17	Thermo Fisher Scientific	Dreieich, D
	Rotanta 460R	Hettich	Tuttlingen, D
Vortexer	VortexGenie2	Scientific Industries	Bohemia, NY, USA

3.1.2. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Verbrauchsmaterialien aufgeführt.

Verbrauchsmaterialien	Zusatzbezeichnung	Firma	Firmensitz
Blottingpapiere	RotiLabo®	Roth	Karlsruhe, D
Cellophanfolie		Roth	Karlsruhe, D
Deckgläschen	24x24 mm	Gerhard Menzel	Braunschweig, D
Einmalküvetten	1,5 ml	Brand	Wertheim, D
Einmalpasteurpipetten	1 ml, 5 ml	Roth	Karlsruhe, D
Einmalspritzen	1 ml	B. Braun	Melsungen, D
Einmalspritzen	1-20 ml Discardit™ II	Becton, Dickinson and Company	Franklin Lakes, NJ, USA
Glasstreifen	25 mm, G335	Plano	Wetzlar, D
Grids	Parallelsteg mit Quersteg 150	Plano	Wetzlar, D
Keramikkügelchen	2,8 mm	Omni International	Kennesaw, GA, USA

Kanülen	30 G, 0,3x13 mm	Becton, Dickinson and Company	Franklin Lakes, NJ, USA
MicroAmp® qRT-Zubehör	48-Well Optical Adhesive Film	Ambion, Life Technologies	Darmstadt, D
	Fast Optical 48 well Reaction Plate	Ambion, Life Technologies	Darmstadt, D
	Fast Reaction Tubes	Ambion, Life Technologies	Darmstadt, D
	Optical 8-Cap-Strip	Ambion, Life Technologies	Darmstadt, D
Objektträger	76x26 mm	Karl Hecht	Sondheim, D
Parafilm	Parafilm® M	Bemis Company	Oshkosh, USA, WI
Pipettenspitzen	10-1000 µl	Sarstedt	Nümbrecht, D
Rasierklinge	T585	Plano	Wetzlar, D
Reaktionsgefäße	0,2-2 ml	Sarstedt	Nümbrecht, D
	Ritips®	2,5 ml, 5 ml	Ritter Schwabmünchen, D
Schraubgefäße	2 ml	Sarstedt	Nümbrecht, D
Serologische Pipetten	5 ml, 10 ml, 25 ml	Th. Geyer	Berlin, D
Skalpelle	No. 11, No. 12	Feather	Osaka, J
Western Blot Membran	Roti®-PVDF	Roth	Karlsruhe, D
Zellkultur Testplatten	12-well, 96-well	Th. Geyer	Berlin, D
Zellschaber	16 cm, 25 cm	Sarstedt	Nümbrecht, D
Zentrifugationsröhrchen	15 ml, 50 ml	Sarstedt	Nümbrecht, D
Zymographie Gele	10 % Ready Gel	Bio-Rad	München, D

3.1.3. Chemikalien

Tabelle 3: In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Chemikalien aufgeführt.

Chemikalien	Firma	Firmensitz
1,2 Propylenoxid	Merck	Darmstadt, D
2-Mercaptoethanol	Sigma	Steinheim, D
30% Acrylamide/Bis Solution	Bio-Rad	München, D
6-Aminohexansäure	Merck	Darmstadt, D
Aceton	Merck	Darmstadt, D
Agarose Broad Range	Roth	Karlsruhe, D
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Merck	Darmstadt, D
Araldite M, Fluka	Sigma	Steinheim, D
Bisbenzimidin H	Sigma	Steinheim, D
Bleicitrat	Merck	Darmstadt, D
Borsäure	Merck	Darmstadt, D
Bovines Serum Albumin	Sigma	Steinheim, D

Brilliantblau G	Fluoron	Ulm, D
Bromphenolblau	Roth	Karlsruhe, D
Buffer Substance Dulbecco's	Serva	Heidelberg, D
Calcein Acetoxymethyl	AnaSpec Inc.	Fremont, CA, USA
Calciumchlorid	Sigma	Steinheim, D
Chloroform	Merck	Darmstadt, D
Coomassie Brilliant Blue Destaining Solution	Bio-Rad	München, D
Coomassie Brilliant Blue Staining Solution	Bio-Rad	München, D
DDSA, Epoxy Embedding Medium Hardener	Sigma	Steinheim, D
di-Sodium-Tetraborat	Merck	Darmstadt, D
DL-Dithioereitol (DTT)	Sigma	Steinheim, D
Eosin	Merck	Darmstadt, D
Ethanol, vergällt	Büfa	Hude, D
Ethanol, unvergällt	Merck	Darmstadt, D
Ethidiumbromid	Roth	Karlsruhe, D
Ethylendinitriltetraessigsäure (EDTA)	Merck	Darmstadt, D
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-tetraessigsäure (EGTA)	Merck	Darmstadt, D
Formaldehyd	J.T. Baker	München, D
Formvar	Sigma	Steinheim, D
Formvar	Merck	Darmstadt, D
Glutaraldehyd 25%	Merck	Darmstadt, D
Glycerin, 87%	Merck	Darmstadt, D
Glycin	Merck	Darmstadt, D
Glycerol	Merck	Darmstadt, D
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Roth	Karlsruhe, D
Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate	Merck	Darmstadt, D
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck	Darmstadt, D
Methanol	Merck	Darmstadt, D
Milchpulver	Roth	Karlsruhe, D
Natriumborhydrid	Merck	Darmstadt, D
Natriumchlorid (NaCl)	Roth	Karlsruhe, D
Natriumchlorid 0,9% (flüssig)	Fresenius	Bad Homburg, D
Natronlauge 10 mol/l	Bernd Kraft	Duisburg, D
Nonidet® P40 Substitute (NP-40)	Sigma	Steinheim, D
Osmiumtetroxide	Merck	Darmstadt, D
Paraformaldehyd	Roth	Karlsruhe, D
Paraffin	Leica	Wetzlar, D
PBS - Phosphatpuffer	Serva	Heidelberg, D
Peperazin-1,4-ethansulfonsäure (PIPES)	Roth	Karlsruhe, D
Salzsäure 25%	Roth	Karlsruhe, D
Stickstoff flüssig	Air Liquid Medical	Lübeck, D
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Merck	Darmstadt, D
Taurine	Sigma	Steinheim, D
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth	Karlsruhe, D
Titriplex II (EGTA)	Merck	Darmstadt, D

Toluidinblau O	Merck	Darmstadt, D
Triton X 100	Roth	Karlsruhe, D
Trizma® base (Tris)	Sigma	Steinheim, D
Trizma® Hydrochlorid (Tris-Hydrochlorid)	Sigma	Steinheim, D
Tween®20	Merck	Darmstadt, D
Uranylacetat-Dihydrat	Merck	Darmstadt, D
Xylencyanol	Roth	Karlsruhe, D
Xylol-Phenol-Gemisch	Dr. Hollborn und Söhne	Leipzig, D

3.1.4. Zusammensetzung von Puffern und Lösungen

Tabelle 4: In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Puffer und Lösungen aufgeführt.

Puffer	Konzentration	Material
Fixierungspuffer für die Immunhistochemie		
Borat, 2x, pH 11	200 mM 2 mM	Di-Sodium-Tetraborat Magnesiumchlorid
PEM, 2x, pH 6,5	200 mM 2 mM 2 mM	PIPES EGTA Magnesiumchlorid
Ladepuffer	36 mM	Bromphenolblau
Gelelektrophorese mit RNA-Proben (100 ml)	46 mM 33 ml (150 mM; pH 7,6) 60 ml 7 ml	Xylencyanol Tris Glycerol H ₂ O
NP-40 Lysispuffer, pH 7,4	50 mM 150 mM 2 mM 1% 1%	Tris NaCl EDTA NP- 40 Triton X-100
Sammelgelpuffer, 2x, pH 6,8	250 mM 0,1 %	Tris SDS
<i>Stripping</i> Puffer	100 mM 2 % 0,5 %	NaOH SDS DTT
Transferblotpuffer	24, 8 mM 192 mM 20 %	Tris Glycin Methanol
Trenngelpuffer, 4x, pH 8,8	1,5 M 0,1 %	Tris SDS

Tris-Borat-EDTA (TBE)- Puffer, 10x, pH 8,3	890 mM 20 mM 890 mM	Borsäure EDTA Tris-Hydrochlorid
Tris-EDTA (TE-Puffer), pH 8,0	10 mM 1 mM	Tris-Hydrochlorid EDTA
Tris-Tween gepufferte Saline (TTBS), pH 7,5	0,1 M 0, 1 % 0,15 M	Tris Tween®20 NaCl

3.1.5. Zellkulturmedien und -reagenzien

Tabelle 5: In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Zellkulturmedien und -reagenzien aufgeführt.

Zellkulturmedien und- reagenzien	Zusatz	Firma	Firmensitz
Calciumchlorid	2 mmol	Sigma	Steinheim, D
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose	Mit NaHCO ₃ , D- Glucose, (4,5g/ml) ohne Phenolrot	Biochrom	Berlin, D
Fetales Kälberserum (FCS)		Linaris	Wertheim- Bettingen, D
Ham's F-12	Mit L-Glutamin	PAA Laboratories	Pasching, A
PBS Dulbecco	10 x	Biochrom	Berlin, D
Penicillin/Streptomycin	10.000 U/ml	Biochrom	Berlin, D
Taurin	100 µmol	Sigma	Steinheim, D

3.1.6. Kits und kommerziell erworbene Puffer

Tabelle 6: In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Kits und kommerziell erworbenen Puffer aufgeführt.

Kits und kommerziell erworbene Puffer	Zusatzbezeichnung	Firma	Firmensitz
ELISA-Kits	Human VEGF Quantikine® ELISA	R&D Systems	Minneapolis, MN, USA
	IL-6 Porcine Quantikine ELISA Kit	R&D Systems	Minneapolis, MN, USA
	Pigment Epithelium- Derived Factor Human Rekombinant	Novatein Biosciences	Woburn, MA, USA

	TGF-beta Mouse/Rat/Porcine/ Canine Quantikine ELISA Kit	R&D Systems	Minneapolis, MN, USA
	Tissue Inhibitors of Metalloproteinase 3 (<i>Sus Scrofa</i>)	USCN Life Science	Wuhan, Hubei, CHN
	TNF-alpha Quantikine ELISA porcine	R&D Systems	Minneapolis, MN, USA
	Pig Hsp70	LS Bio Life Span	Seattle, WA, USA
Entwicklungspuffer	Zymographie	Bio-Rad	München, D
DNA Extraktion	Phire Animal Tissue Direct PCR Kit	Thermo Fisher Scientific	Dreieich, D
qPCR-Kit	qPCR-BIO Probe Mix Hi-ROX	PCR Biosystems Ltd Über Nippon Genetics Europe	Düren, D
Renaturierungspuffer	Zymographie	Bio-Rad	München, D
RNA Säulenisolierung	NucleoSpin RNA II	Macherey-Nagel	Düren, D
Tris/Glycerin/SDS (TGS) Laufpuffer, 10x, pH 8,3	25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0,1 % (w/v) SDS	Bio-Rad	München, D
Zymographie Ladepuffer	Zylogram sample buffer	Bio-Rad	München, D

3.1.7. Medikamente

Tabelle 7: In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Medikamente aufgeführt.

Medikamente	Zusatz	Firma	Firmensitz
Antipamezolhydrochlorid	Antidot	OrionPharma	Hamburg, D
Augengel	Methocel® 2%	OmniVision	Puchheim, D
Fentanyl	Narkosemittel	B. Braun	Melsungen, D
Flumazenil Inresa	Antidot 0,1 mg/ml	Inresa Arzneimittel	Freiburg, D
Fluorescein	Alcon® 10% Injektionslösung	Alcon	Freiburg, D
Medetomidinhydrochlorid	Narkosemittel 1 mg/ml	CP-Pharma	Burgdorf, D

Midazolamhydrochlorid	Narkosemittel 1 mg/ml	Hamel Pharmaceuticals	Hamel, D
Mydriasis-Augentropfen	0,025 mg/ml Phenylephrine und 0,05 g/ml Tropicamide	UKSH Apotheke	Kiel, D
Naloxonhydrochlorid	Antidot 0,4 mg/ml	B. Braun	Melsungen, D

3.1.8. Antikörper

Tabelle 8: In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Antikörper aufgeführt.

Antikörper	Spezies/ Kopplung	Ausgangs- konzentration	Verdünnung / Methode	Firma	Firmensitz
Anti-MMP-2	Ziege	200 µg/ml	1:200 WB	Santa Cruz Biotechnology	Heidelberg, D
Anti-beta-Aktin	Kaninchen	8 µg/ml	1:2000 Western Blot (WB)	Cell Signaling	Danvers, USA
Anti-Hsp70	Maus,	100 µg/ml	1:1000 WB	Santa Cruz Biotechnology	Heidelberg, D
Anti-Kaninchen IgG	Ziege, HRP-linked	66 µg/ml	WB 1:1000- 1:3000	Cell Signaling	Danvers, MA, USA
Anti-Ki 67	Kaninchen	0,1 mg/ml	1:50 ICC	abcam	Cambridge, UK
Anti-mouse IgG	Pferd HRP-linked	170 µg/ml	WB 1:1000- 1:3000	Cell Signaling	Danvers, MA, USA
Anti-PEDF	Kaninchen	200 µg/ml	1:200 WB	Santa Cruz Biotechnology	Heidelberg, D
Anti-Ziege IgG	Esel, Alexa Fluor 647	2 mg/ml	1:1000 IF	Life technologies	Carlsbad, CA, USA

3.1.9. Mausstämme

Tabelle 9: In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Mausstämme aufgeführt.

Bezeichnung	Genetischer Hintergrund	Bezug/Hersteller	Firmensitz
Nrf2-KO	B6.129X1- Nfe2l2tm1Ywk/J	Jackson Laboratory	Bar Harbor, ME USA

ApoE-KO	B6.129P2- Apoetm1Unc/J	Jackson Laboratory	Bar Harbor, ME USA
BL6/J	C57BL/6/J	Jackson Laboratory	Bar Harbor, ME USA

3.1.10. Oligonukleotide

Tabelle 10: In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Oligonukleotide (Oligo) aufgeführt.

Oligo-Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')	Firma	Firmensitz
OdT T7	GAGAGAGGATCCAAGTC TAATACGACTCACTATAGGG AGATTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTT G/A/C	Firma Invitrogen, Life Technologies	Carlsbad, CA, USA
Nrf c_forward	GCCTGAGAGCTGTAGGCC	Eurofins Genomics	Ebersberg, D
Nrf Wt_reverse	GGAATGGAAAATAGCTCCTGCC	Eurofins Genomics	Ebersberg, D
Nrf Mut_reverse	GACAGTATCGGCCTCAGGAA	Eurofins Genomics	Ebersberg, D
mCrb1 mF2	GCCCCTGTTTGCATGGAGGAAAC TTGGAAGACAGCTACAGTTCTTCT G	Eurofins Genomics	Ebersberg, D
mCrb1 mF1	GTGAAGACAGCTACAGTTCTGAT C	Eurofins Genomics	Ebersberg, D
mCrb1 mR	GCCCCATTTGCACACTGATGAC	Eurofins Genomics	Ebersberg, D

3.1.11. Sonstige Substanzen

Tabelle 11: In der folgenden Tabelle sind sonstige verwendete Substanzen aufgeführt.

Substanz	Zusatzbezeichnung	Firma	Firmensitz
Aqua destillata (A. dest)	Ampuwa Spüllösung	Fresenius Kabi	Bad Homburg, D
Bio-Rad-Färbelösung	BioRad Proteinassay	Bio-Rad	München, D
Doppelt destilliertes Wasser	HPLC	Roth	Karlsruhe, D
Eindeckmedium	Faramount	Dako	Carpinteria, CA,USA

	Slow Fade® Gold antifade reagent	Invitrogen, Life Technologies	Darmstadt, D
Größenstandard	Ladder 1kb-GeneRuler™	Fermentas, Thermo Fisher Scientific	Dreieich, D
	Gene ruler 50 bp	Thermo Fisher Scientific	Dreieich, D
	Kaleidoscope™ Prestained Standards	Bio-Rad	München, D
HeLa-Positivkontrolle	HeLa Whole Cell Lysate, 2,5 µg/µl	Santa Cruz	
Polymerase	Phire Hot Start	Thermo Fisher Scientific	Dreieich, D
Phosphataseinhibitor	Phosphatase-Inhibitor Cocktail 2	Sigma-Aldrich	Steinheim, D
Proteinaseinhibitor	Proteaseinhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich	Steinheim, D
Reverse Transkriptase	Superscript III	Invitrogen, Life Technologies	Darmstadt, D
Ribonuklease-Inhibitor	RiboLock™	Fermentas	St. Leon-Roth, D
Rinder Serumalbumin	Albumin from Bovine Serum	Fluka Chemie AG	Buchs, CHE

3.1.12. Software

Tabelle 12: In der folgenden Tabelle ist die verwendete Software aufgeführt.

Software	Zusatzbezeichnung	Hersteller	Firmensitz
Axiovision	Rel. 4.8	Carl Zeiss	Jena, D
Corel Draw	CorelDRAW® Graphics Suite X7	Corel Corporation	Ottawa, CAN
GelCapture	V 5.1	Biostep	Jahnsdorf, D
Gen 5	1.04.5	Biostep	Jahnsdorf, D
Microsoft Office	V 2010	Microsoft	Redmond, WA, USA
SPSS	Version 23	IBM	Ehningen, D
Total Lab	TL100	Biosystematica	Mountain Hall, GB
Zen	2012	Carl Zeiss	Jena, D

3.2. Zellbiologische Methoden

Die zellbiologischen Arbeiten wurden an einer Sterilarbeitsbank mit autoklavierten oder äußerlich desinfizierten Arbeitsmaterialien durchgeführt. Die porcinen Organkulturen wurden bei 37° C, einem CO₂-Gehalt von 5 % und in wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert.

3.2.1. Präparation von Organkulturen aus retinalem Pigmentepithel, Bruch'scher Membran und Choroidea

Um den Einfluss der Laserbehandlung auf die Sekretion AMD-relevanter Proteine zu untersuchen, wurden Organkulturen aus porcinen Augen angefertigt, welche in modifizierten Ussingkammern kultiviert wurden (Abb. 6). Die Gewebeexplantate beinhalteten den dreidimensionalen Komplex aus RPE, BrM und Choroidea und wurden mit leichten Modifikationen nach dem Protokoll von Treumer *et al.* (2012) präpariert. Es wurden dazu frische Schweinaugen von einem nahegelegenen Schlachthof bezogen, welche innerhalb von 4 Stunden (h) *post mortem* präpariert wurden.

Die überschüssigen Gewebeanhänge an den Schweinebulbi wurden mit einer gebogenen Enukleationsschere von den Augen entfernt. Die Bulbi wurden für etwa 5 Minuten (min) in einem 1:3 Gemisch aus Betaisodonalösung und Natriumchlorid (NaCl) äußerlich desinfiziert. Die Augen wurden im Bereich der Limbusregion mithilfe einer Rasierklinge zirkulär eröffnet. Das anteriore Segment des Auges, der Glaskörper sowie die Linse wurden entnommen und verworfen. Anschließend wurde das Auge durch seitliche Einschnitte von der Sklera bis zum *Nervus opticus* eröffnet. Der Komplex aus RPE, BrM und Choroidea wurde vorsichtig mittels Pinzette und Federschere von der Sklera abpräpariert (Abb. 6 a). Der untere Teil des Ringsystems (weißer Ring) der modifizierten Ussingkammer wurde unter dem Explantat zwischen Choroidea und Sklera platziert. Anschließend wurde die Neuroretina von der Organkultur abpräpariert und verworfen, sodass das RPE nun als oberste Schicht frei lag. Der obere Teil des Ringsystems (schwarzer Ring) wurde verwendet, um den Gewebekomplex zwischen den beiden Ringen zu fixieren (Abb. 6 b). Der Innendurchmesser des Ringsystems betrug 7 mm und die Höhe 1 mm. Die exponierte Gewebeoberfläche des Explantats betrug 38,5 mm². Zwischen den beiden Ringen befand sich ein Fixationsstreifen von 1 mm Breite, in dem das Gewebe in

eingeklemmten Zustand vorlag. Im Anschluss an die Präparation wurden die Organkulturen in 12-*well*-Kulturplatten mit 1,5 ml warmen Organkulturmediums pro Kavität überführt und auf einer 37 °C warmen Heizplatte gelagert. Das Organkulturmedium bestand aus einem Gemisch aus Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) und Ham's F12 (1:1), welchem 2 mM Calcium, 100 µM Taurin, 5-10 % Fetales Kälberserum (FCS) und 1 % Penicillin/Streptomycin zugesetzt wurde. Die Integrität der Präparate wurde an der Spaltlampenapparatur des Lasersystems beurteilt.

3.2.2. Kultivierung von Gewebeexplantaten in modifizierten Ussingkammern

Bei der modifizierten Ussingkammer handelt es sich um ein zweiteiliges Kammersystem, welches mit einer Schraubverbindung zusammengesetzt wird. In einer mittigen Aussparung wurden die zuvor präparierten und entsprechend behandelten Gewebeexplantate eingespannt (Abb. 6 c). Das charakteristische an der modifizierten Ussingkammer ist die Unterteilung des Systems in zwei Kompartimente. Die RPE-Seite der Organkultur steht mit dem apikalen Kompartiment in Verbindung und die choroidale Seite des Explantats mit dem basalen Kompartiment. Diese Kompartimentierung ermöglichte die Differenzierung zwischen apikaler und basolateraler Proteinsekretion, welche aufgrund der Polarität von RPE-Zellen von Bedeutung ist (Abb. 6 d). Nach der Bestückung und Verschließung der Kammer wurden beide Kompartimente gleichzeitig durch einen simultanen Pipettiervorgang mithilfe zweier Eppendorfpipetten mit 1,1 ml warmen Organkulturmediums befüllt. Der simultane Pipettiervorgang wurde durchgeführt, damit sich beide Kompartimente gleichzeitig mit Medium füllen und kein einseitiger Druck auf den Gewebekomplex einwirkt.

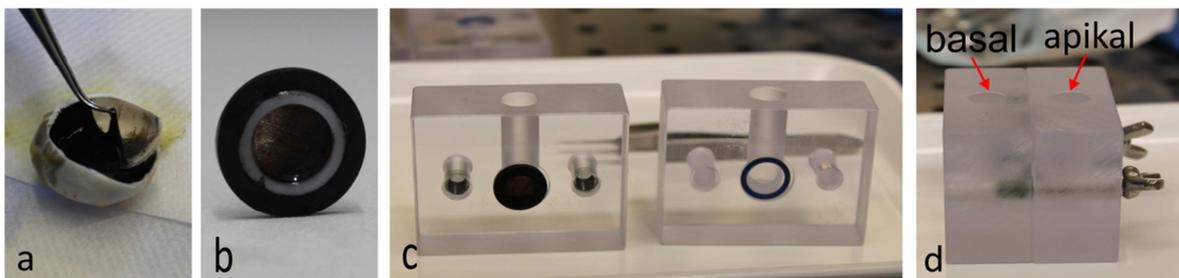


Abbildung 6: Präparation von Organkulturen aus frischen porcinen Augen. Es wurden Organkulturen aus frischen Schweineaugen (a) bestehend aus retinalem Pigmentepithel, Bruch'scher Membran und Choroidea präpariert und in einem Ring fixiert (b). Die Kulturen wurden in modifizierten Ussing-Kammern kultiviert (c), welche die Differenzierung zwischen apikaler und basolateraler Proteinsekretion erlaubten (d).

Um die Verdunstung des Mediums im Laufe der Kultivierung zu verhindern, wurden die Kammeröffnungen mit Parafilm abgedichtet. Die Belüftung des Systems während der Kultivierung erfolgte über je zehn Einstiche des Parafilms mit einer sterilen Kanüle. Die Explantate wurden bis zu 4 Tage in den modifizierten Ussingkammern kultiviert.

3.2.3. Durchlässigkeitsprüfung des Systems für den Farbstoff Brilliantblau G

Die Integrität des Systems wurde durch den Einsatz des Farbstoffs Brilliantblau G getestet. Dieser wurde nach der Bestückung der Kammer zusammen mit dem Nährmedium in das basolaterale Kompartiment der modifizierten Ussingkammer appliziert. Es sollte dabei analysiert werden, ob es zu einer passiven Passage des Farbstoffs von der basolateralen zur apikalen Seite kommt. Die modifizierte Ussingkammer wurde über drei Tage mit dem Nährmedium und Farbstoff im Brutschrank platziert. Anschließend wurde das Medium von basolateraler sowie apikaler Seite entnommen und der Anteil des blauen Farbstoffes gegen das Organkulturmedium als Leerwert photometrisch bei $\lambda = 584$ nm gemessen.

3.2.4. Vitalitätsfärbung mittels Calcein-Assay

Die Untersuchung der Vitalität der RPE-Zellen sowie die Integrität der Explantate wurden mittels Calcein-Assay durchgeführt. Bei dem Farbstoff Calcein-Acetoxy-methylester handelt es sich um einen nicht fluoreszierenden Ester, welcher über die Zellmembranen ins Zellinnere transportiert wird. Befindet sich das Farbstoffmolekül innerhalb von vitalen Zellen, werden die Acetoxy-methyl- und die Acetatgruppen durch Esterasen abgespalten. Es verbleibt das Calcein, welches nach der Abspaltung in der Lage ist, Calciumionen zu komplexieren, was zu einer grünen Fluoreszenz führt. Tote Zellen können nicht fluoreszieren, da keine aktiven Esterasen mehr vorliegen und der beschriebene Abspaltungsvorgang nicht ablaufen kann (Neri *et al.* 2001).

Für die Calceinfärbung wurden die Explantate für 45 min in je 2 ml warmem Organkulturmedium mit 4 $\mu\text{g/ml}$ Calcein-AM bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Präparate zweimalig mit Phosphatgepufferter Saline (PBS) gewaschen. Die Zellvitalität wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie (Axiovert 100) bei $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 497/517$ nm analysiert und fotografisch dokumentiert. Für die weitere Analyse der Organkulturen und

der Überstände wurden ausschließlich Explantate zugelassen, die mindestens 90 % Zellvitalität aufwiesen.

Im Anschluss an die Calceinfärbung wurden die Explantate mit einer Biopsiestanze mit einem Durchmesser von 6 mm aus dem Ringsystem entfernt. Durch die Verwendung der Stanze wurde gewährleistet, dass der Fixierungsbereich der Kultur, welcher sich zwischen den Ringen befindet, nicht in die weitere Untersuchung eingeht. Es ist davon auszugehen, dass die Zellen in diesem Bereich stark beschädigt sind und so das Protein-Expressionsmuster beeinflussen würden. Nach der Entnahme wurden die Explantate in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zur weiteren Verwendung bei – 80 °C gelagert.

3.2.5. Bestimmung von Zellgröße und Zellzahl

Um den Regenerationsprozess von selektiv zerstörten RPE-Zellen im Rahmen der SRT-Laserbehandlung zu beschreiben, wurden die Explantate mittels Calceinfärbung untersucht. Die Analyse der Zellgröße fand 4 Tage nach der SRT-Behandlung mit 200 µm Spots in dem Bereich der induzierten Läsion statt (siehe 1.3.1. und 3.6.2.). Die Bestimmung der Zellzahl wurde an Tag 2, 3 und 4 nach Laserbehandlung an fotografischen Aufnahmen durchgeführt. Die maximal behandelte Fläche bei einer quadratischen Laserfaser und einer SRT-Spotgröße von 200 µm Kantenlänge beträgt 0,04 mm². Dieser Bereich wurde über ein semi-automatisches Programm in AxioVision als 100 % definiert. Die Zellgröße und -zahl wurden in diesem Bereich bestimmt und mit unbehandelten Kontrollbereichen verglichen.

3.3. Proteinbiochemische Methoden

3.3.1. Gewinnung von Organkulturüberständen

Zur Gewinnung von Organkulturüberständen wurde das Medium simultan aus den beiden Kompartimenten der modifizierten Ussingkammern entnommen und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Entnahme erfolgte über die Dauer der Kultivierung alle 24 h. Unmittelbar nach der Entnahme wurde das Medium bei 13.000 Umdrehungen pro

Minute (U/min) zentrifugiert, der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verarbeitung bei - 20 °C gelagert.

3.3.2. Herstellung von Organkulturlysaten

Zur Herstellung von Proteinlysaten wurden die ausgestanzten Gewebeproben in 1,5 ml Reaktionsgefäßen in flüssigen Stickstoff überführt. Anschließend wurden die Explantate mit einem vorgekühlten Stößel zermahlen und in 80 µl eines NP-40 Lysispuffers resuspendiert, welcher zuvor mit Proteinase- und Phosphataseinhibitoren (1:100) versetzt wurde. Die Suspension wurde gevortext, kurz anzentrifugiert, für 30 min auf Eis gelagert und anschließend mit je 20 Ultraschallstößen á 3 Sekunden (sec) homogenisiert. Es folgte eine Zentrifugation für 20 min bei 13.000 U/min und 4 °C. Der Überstand wurde dekantiert und in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, welche bis zu weiterem Gebrauch bei -20 °C gelagert wurden.

3.3.3. Isolierung von RPE-Zellen aus Organkulturen mit anschließender Zelllyse

Um zu untersuchen, ob sich die Proteinexpression des vollständigen Explantats von der Expression der beinhalteten RPE-Zellen unterschied bzw. die Expression der RPE-Zellen durch den Hintergrund maskiert wurde, wurden die RPE-Zellen der Kulturen isoliert. Die eingespannten Explantate wurden in sterile Glasschalen gelegt und mit einer Pinzette fixiert. Anschließend wurden 30 µl des Organkulturmediums auf das Explantat gegeben. Durch wiederholte Pipettierbewegungen an der Oberfläche des Explantats wurden die RPE-Zellen von der Choroidea abgespült und in 1 ml des Organkulturmediums in 1,5 ml Reaktionsgefäßen überführt. Anschließend wurden die 1,5 ml Reaktionsgefäße für 5 min bei 4 °C und 13.000 U/min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde anschließend mit 1 ml PBS resuspendiert, erneut für 5 min zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Für die Zelllyse wurde das Pellet mit 50 µl NP-40 Lysispuffer resuspendiert, welcher zuvor mit Proteinase- und Phosphataseinhibitoren (1:100) versetzt wurde. Anschließend erfolgte die Inkubation für 30 min auf Eis, die Lyse mit 20 Ultraschallstößen á 3 sec und 15 min Zentrifugation bei 13.000 U/min und 4 °C. Der

Überstand wurde dekantiert und in neue Reaktionsgefäße überführt, welche bis zu weiterem Gebrauch bei -20 °C gelagert wurden.

3.3.4. Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford

Es handelt sich bei dieser Methode um ein quantitatives Bestimmungsverfahren nach Bradford (1976). Das Prinzip dieses Testes ist es, die Bindung zwischen dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue und Proteinen nachzuweisen. Diese Bindung findet bevorzugt an den basischen und aromatischen Aminosäuren der Proteine statt. Dadurch wird im sauren Milieu eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 465 nm nach 595 nm hervorgerufen. Diese Verschiebung kann bei 595 nm photometrisch ermittelt werden.

Die Proteinbestimmung wurde in 1 ml einer 1:5 verdünnten Bio-Rad-Färbelösung durchgeführt, welcher 20 μl der 1:50 verdünnten Probe zugesetzt wurden. Die Verdünnungen wurden mit Aqua destillata (A. dest.) angesetzt. Nach kurzem Durchmischen wurde die Lösung für mindestens 10 min bei Raumtemperatur (RT) in Plastikkuvetten inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion der Probe bei einer Wellenlänge von $\lambda = 595\text{ nm}$ gegen A. dest. als Leerwert photometrisch gemessen. Die Proteinkonzentration wurde über eine Kalibriergerade mit Rinderserumalbumin (BSA) als Standardprotein bestimmt.

3.3.5. Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Es handelte sich bei der Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) um ein Verfahren, bei dem Proteine ihrer Größe nach durch Wanderung in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden (Eckert und Kartenbeck 1997). Es wurde hierbei ein 5 %-iges Sammelgel und ein 12 %-iges Trenngel mit einer Stärke von 0,75 bis 1 mm verwendet (Tabelle [Tab.] 13). Vor der Bestückung des SDS-Polyacrylamidgels wurden die Proteinextrakte mit einem SDS-Ladepuffer und A. dest. versehen und für 5 min im Heizblock bei 95 °C denaturiert. Es wurden 20 μg Protein pro Probe eingesetzt. Die Hitzebehandlung, die Zusammensetzung des Ladepuffers und das SDS führen dazu, dass die Proteine denaturiert und negativ geladen vorliegen und sich aufgrund dessen der

Größe nach im elektrischen Feld auftrennen. Die Elektrophorese wurde mit 12 mA, 150 Volt, 150 Watt pro Gel für 30 min gestartet, bis die Proteine das Sammelgel durchlaufen hatten. Danach wurde zur Trennung der Proteine im Trenngel auf 24 mA, 150 V, 150 Watt und 50 min erhöht. Zusätzlich zu den Proben wurde ein Molekulargewichtsmarker mitgeführt, welcher Proteine in definierten Größen enthielt und blau gefärbt war.

Tabelle 13: Zusammensetzung der SDS-PAGE-Gele. Aufgeführt sind die Materialien für das Trenn- und Sammelgel.

Material	12 % Trenngel	5 % Sammelgel
A. dest.	1,75 ml	1,15 ml
4 x Trenngelpuffer	1,25 ml	-
2 x Sammelgelpuffer	-	0,5 ml
Acrylamid, 30 % w/v	2 ml	0,335 ml
APS	40 µl	15 µl
TEMED	5 µl	5 µl

3.3.6. Western Blot

Bei dem Western Blot handelt es sich um eine Antigen-Antikörper basierte Methode, um Proteine semi-quantitativ nachzuweisen (Eckert und Kartenbeck 1997). Nach der Auftrennung der Proteine erfolgte der Transfer über die *Tank-Blot*-Methode auf eine Polyvinylidenfluorid- (PVDF) Membran. Dazu wurde das Elektrophoresegel auf eine mit Methanol äquilibrierte Membran gelegt und zwischen zwei 1,5 mm dicken Whatman-Filtern platziert. Dieses Konstrukt wurde anschließend zwischen zwei Fasermatten in das *Tank-Blot*-Gitter gespannt und in eine Kammer mit kaltem Transferpuffer und Kühlakku eingesetzt. Der Proteintransfer auf die PVDF-Membran erfolgte bei 100 V für 80 min.

Anschließend wurde die Membran 3 mal für 10 min mit Tris-Tween gepufferter Saline (TTBS) gewaschen. Unspezifische Bindestellen der Membran wurden durch die Inkubation in 4 %-iger Milchlösung blockiert. Die Membran wurde bei 4 °C über Nacht mit einem spezifischen Primärantikörper inkubiert. Es folgten Waschschrte von 3 mal 10 min mit TTBS sowie die Inkubation der Membran mit einem Meerrettich-Peroxidasegekoppelten

(HRP) Sekundärantikörper in 4 %-iger Milchlösung bei RT über 30 min. Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind unter 3.1.8. aufgeführt. Anschließend wurde ein Chemilumineszenz-Reagenz (Immobilon™ *Western Chemiluminescent HRP Substrate*) auf die Membran aufgetragen und für 5 min bei RT inkubiert. Die Detektion und densitometrische Auswertung der Proteinbanden erfolgte im MF-ChemiBis-Gerät mit unterschiedlichen Belichtungszeiten und der Software Total Lab. Im Anschluss wurde die Membran mit einem *stripping*-Puffer behandelt und das Kontrollprotein β -Aktin auf derselben Membran nachgewiesen. Nach der densitometrischen Auswertung der Western Blots wurde die Ratio zwischen dem Zielprotein und β -Aktin errechnet, um eventuelle Schwankungen in der aufgetragenen Proteinmenge auszugleichen.

3.3.7. Stripping von Polyvinylidenfluorid-Membranen

Um dieselbe Membran mit einem zweiten Antikörper zu behandeln, wurde das sogenannte *stripping*-Verfahren angewandt (Rehm und Lentzel 2010). Dabei wurden bestehende Antigen-Antikörperbindungen durch das in dem *stripping* Puffer enthaltene Dithiothreitol (DTT) aufgebrochen. Die Inkubation der Membran in dem *stripping*-Puffer erfolgte bei 55 °C für 1 h. Um die Reste des DTT zu entfernen, wurde die Membran 3 mal für 10 min mit TTBS gewaschen. Vor einer erneuten Inkubation mit einem Primärantikörper erfolgte eine Wiederholung der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen durch 4 % Milchpulver für 1 h.

3.3.8. Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Bei dem Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) handelt es sich um eine Antigen-Antikörper basierte Methode um Proteine zu quantifizieren (Rehm und Lentzel 2010). Für den Nachweis eines Zielproteins werden an der Wand einzelner Kavitäten einer 96-*well* Platte spezifische Antikörper fixiert. Durch Zugabe des Zielproteins wird dieses mit hoher Affinität an den ersten Antikörper gebunden. Durch Zugabe eines zweiten Antikörpers wird das Zielprotein an einem weiteren Epitop fixiert und befindet sich nun zwischen Erst- und Zweitantikörper. Der Zweitantikörper wird an eine Peroxidase gekoppelt, welche in der Lage ist ein Substrat umzusetzen. Die Substratumsetzung spiegelt sich in einem Farbumschlag wieder. Die Intensität des entstandenen Farbumschlags kann

photometrisch bei $\lambda = 450$ nm gemessen werden. Die in dieser Arbeit verwendeten ELISA-Kits sind unter 3.1.6 aufgeführt. Die aus der Organkultur gewonnenen Überstände und Standards wurden nach Herstellerangaben in den ELISA eingesetzt und bei Bedarf vorher entsprechend verdünnt. Die Waschschrirte erfolgten automatenbasiert am ELx50 (Biotek). Die photometrische Auswertung der Platten erfolgte bei allen Herstellern bei $\lambda = 450$ nm. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte automatisch über die mitgeführte Standardkurve.

3.3.9. Zymographie

Bei der Zymographie handelt es sich um ein Verfahren, bei dem Enzyme ihrer Größe und Aktivität nach charakterisiert werden (Westermeier 2016). Die Zymographie in dieser Arbeit wurde verwendet, um die Gelatinasen MMP-2 und 9 nachzuweisen, welche in der Lage sind, das Gelatinesubstrat in dem Zymographiegel umzusetzen. In Vorarbeiten von Treumer *et al.* 2012 wurde die angegebene Laufhöhe der MMPs validiert. Für die Detektion der Proteasen wurden 20 μ l des Zymographie-Probenpuffers mit 10 μ l der Proben gemischt und auf ein 10 % Zymographiegel aufgetragen. Es wurden stets Proben der unbehandelten Kontrolle zusammen mit der dazugehörigen behandelten Probe und einer Mediumkontrolle aufgetragen. Die MMPs wurden in einer konventionellen Elektrophoresekammer bei folgenden Einstellungen aufgetrennt: 20 mA, 150 V für 30 min und 50 mA, 200 V für 40 min. Im Anschluss wurden die Gele kurz in A. dest. gespült, 2 mal für 30 min mit einem Renaturierungspuffer behandelt und bei 37 °C für 18 h in einem Entwicklungspuffer inkubiert. Die Gele wurden am Folgetag mit Coomassieblau für 3 h gefärbt und für 1 h mit einer Entfärbelösung geklärt, wobei sich die Bereiche der aktiven MMPs als helle Banden auf dunkelblauem Grund darstellten. Die densitometrische Auswertung der Banden erfolgte im MF-ChemiBis-Gerät mit unterschiedlichen Belichtungszeiten und der Software Total Lab. Der MMP-Gehalt der Probe wurde in Relation zu der unbehandelten Kontrolle berechnet, nachdem die Mediumkontrolle subtrahiert wurde.

3.3.10. Immunhistochemie

Die Expression von MMP-2 und dem Mitosemarker Ki-67 wurde in Organkultur-*Flat mounts* mittels Immunhistochemie nachgewiesen (modifiziert nach Mulisch und Welsch 2010). Die Explantate wurden dazu in 12-*well* Schalen für 30 min mit 4 % Formalin auf Eis vorfixiert. Anschließend erfolgte die weitere Fixierung mit einem Gemisch aus einem Teil 6 % Paraformaldehyd (PFA) und einem Teil zweifachen PIPES/EGTA/MgCl₂ (PEM) für 5 min sowie einem Gemisch aus einem Teil 6 % PFA und einem Teil zweifachen Borats für 10 min. Das Gewebe wurde mit PBS gewaschen. Die Permeabilisierung des Gewebes erfolgte für 5 min mit 0,1 % Triton-X-100 in PBS und Natriumborhydrat für 10 min. Anschließend folgen 2 Waschschrte mit PBS und das Abblocken unspezifischer Bindestellen durch das Reagenz Roti® Immunoblock in PBS für mindestens 1 h. Die Inkubation des Primärantikörpers für MMP-2 und Ki-67 erfolgte bei 4 °C über Nacht verdünnt in Roti® Immunoblocklösung. Am Folgetag wurden die Explantate 3 mal mit PBS gewaschen und mit dem Zweitantikörper (1:500) und 0,4 µM Bisbenzimidin H (Hoechst) in Roti® Immunoblocklösung bei RT inkubiert. Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind unter 3.1.8. aufgeführt. Im Anschluss folgten drei Waschschrte mit PBS und ein Waschschrte mit A. dest. Die Präparate wurden mit dem Eindeckmedium *Slow Fade*® *Gold antifade reagent* auf Objektträgern mit Deckgläschen eingedeckt und anschließend bei 4°C im Dunkeln gelagert. Die fotografische Dokumentation erfolgte fluoreszenzmikroskopisch am Imager M2 Apotom-Mikroskop. Die Auswertung erfolgte mit der Software Zen. Um valide Ergebnisse zu generieren wurden die Behandlungen an mindestens 3 biologischen Replikaten durchgeführt. Pro Explantat wurden mindestens 3 Aufnahmen getätigt.

3.4. Molekularbiologische Methoden

3.4.1. DNA-Isolierung aus murinen Proben

Für die DNA-Isolierung aus murinen Proben wurden entweder Ohrstanzen oder 0,5 mm große Gewebestücke der Schwanzspitzen verwendet. Die Gewebe wurden in sterile 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und mit 20,5 µl eines Mastermix aus *Dilution Buffer* und

DNARelease Additive™ des *Phire Animal Tissue Direct-Kits* versetzt. Der Ansatz wurde vorsichtig gevortext und abzentrifugiert, für 7 min bei RT inkubiert und für 3 min bei 98 °C im Wärmeblock erhitzt. Die Gewebereste der Lyse wurden für 2 min bei 13.000 U/min abzentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.4.2. Quantifizierung von Nukleinsäuren

Es wurden in dieser Arbeit sowohl Proben genomischer DNA murinen Ursprungs als auch RNA-Proben aus porcinen Organkulturen photometrisch quantifiziert.

Die Quantifizierung genomischer DNA aus murinen Geweben erfolgte in UV-Küvetten an einem Photometer bei $\lambda = 260$ nm gegen A. dest. als Leerwert. Die DNA wurde vorher 1:200 mit A. dest. verdünnt. Die Konzentration wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Konzentration} = \frac{\text{Extinktion } 260 \cdot \text{Verdünnung} \cdot \text{Umrechnungsfaktor } \mu\text{g}}{\text{Volumen } (\mu\text{l})} = \frac{E_{260} \cdot 200 \cdot 50}{1000} \text{ } [\mu\text{g}/\mu\text{l}]$$

Der Umrechnungsfaktor für DNA-Proben wurde nach Literaturangaben mit 50 angegeben (Mülhardt 2013). Anschließend wurde die Lösung bei 280 nm für den Nachweis von Protein- und RNA-Verunreinigung gemessen und der 260/280 nm Absorptionsquotient gebildet. Dieser sollte bei etwa 1,8 liegen. Höhere Werte lassen auf Verunreinigungen der Probe schließen (Mülhardt 2013).

Die Quantität und der Reinheitsgrad der porcinen RNA-Proben aus Organkulturen wurden unmittelbar nach Isolation photometrisch am Nanodrop bei $\lambda = 260$ nm gegen A. dest. ermittelt. Die Proben wurden zuvor 1:5 mit A. dest. verdünnt. Der 260/280 nm Absorptionsquotient wurde automatisch am Gerät berechnet.

3.4.3. Molekularbiologische Untersuchung muriner DNA mittels Polymerasekettenreaktion

Die Untersuchung muriner DNA-Proben erfolgte mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR). Die PCR-Methode wurde 1985 von Kary Mullis entwickelt. Sie stellt ein *in vitro*-Verfahren dar, mithilfe dessen eine selektive Amplifikation von spezifischen

Genabschnitten möglich ist. Eine DNA-Polymerase synthetisiert an einer einzelsträngigen DNA-Matrize, ausgehend von DNA-Oligonukleotiden, ein neues doppelsträngiges DNA-Molekül. Für die Amplifikation werden folgende Reaktionskomponenten benötigt: Ausgangs-DNA (DNA-Matrize, *Template*), spezifische Oligonukleotide (Primer), eine thermostabile DNA-Polymerase, vier verschiedene Desoxynukleotide (dNTPs), zweiwertige Magnesiumionen (Mg^{2+}) als Kofaktor der Polymerase und ein geeigneter Puffer (Mullis und Faloona, 1987).

Die PCR-Reaktion ist ein zyklischer Prozess, welcher aus drei Reaktionsschritten besteht, die mehrfach wiederholt werden. Die ausgewählten DNA-Sequenzen werden dabei exponentiell vervielfältigt. Der erste Schritt umfasst den thermischen Denaturierungsvorgang, bei dem die doppelsträngige Ausgangs-DNA auf 94-98 °C erhitzt wird. Durch die hohe Temperatur trennt sich die DNA in Einzelstränge auf. Im Anschluss folgt der zweite Schritt, welcher als Anlagerung (*Annealing*) bezeichnet wird. Bei diesem Schritt hybridisieren die spezifischen Oligonukleotidprimer an den DNA-Einzelstrang. Als Primer werden kurze, einzelsträngige DNA-Sequenzen bezeichnet, die an die beiden komplementären Enden des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes binden. Es wird in diesem Fall von einem Vorwärts (*forward*)- und einem Rückwärts (*reverse*)-Primer gesprochen. Die optimale Temperatur für diesen Vorgang hängt von den eingesetzten Oligonukleotiden ab und liegt in der Regel zwischen 49 °C und 67 °C. Im Anschluss an die Primerbindung erfolgt der dritte Schritt: die enzymabhängige DNA-Synthese (Elongation) bei 72 °C. Hier lagern sich mithilfe einer hitzestabilen DNA-Polymerase, ausgehend von dem jeweiligen Primer, die Desoxynukleotide komplementär zu der DNA-Matrize in 5' - 3'-Richtung an den gewünschten DNA-Abschnitt an, welcher zu einem Doppelstrang vervollständigt wird. Ist der Elongationsschritt abgeschlossen, beginnt der nächste Zyklus, bestehend aus den drei genannten Reaktionsschritten, wobei das entstandene Produkt ebenfalls als neues Ausgangsmaterial dient (Mullis 1990).

Aufgrund des breiten naturwissenschaftlichen Anwendungsspektrums hat sich eine Vielzahl von Modifikationen für die ursprüngliche PCR-Methode entwickelt. Eine dieser Modifikationen wurde in dieser Arbeit genutzt und wird als *hot-start*-PCR bezeichnet. Bei der ursprünglich entwickelten PCR wird meist eine Taq-Polymerase aus dem hyperthermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* verwendet. Diese Polymerase hat den

Nachteil, dass sie bereits bei RT oder während der initialen Phase der PCR aktiv ist und es zur Amplifikation von unspezifisch hybridisierten Primern oder der Bildung von Primer-Dimeren kommen kann. Bei der hier verwendeten *hot-start*-PCR wurde ein chemisch modifiziertes Enzym eingesetzt, das zunächst inaktiv vorlag und erst nach einer initialen Inkubation (94-98 °C) aktiviert wurde, wodurch die Spezifität der Reaktion erhöht wird (Chou *et al.* 1992; D'Aquila *et al.* 1991).

3.4.3.1. Genotypisierung der Nrf2 Knock-out Mäuse

Die Verpaarung der Nrf2 Knock-out Mäuse sollte nach Angaben des Jackson Laboratory mit einem homozygoten und einem heterozygoten Tier erfolgen. Um zu bestimmen, in welcher Ausprägung die Mutation im Nrf2-Gen vorliegt, wurden die Tiere nach der Geburt über die PCR-Reaktion genotypisiert. Nach Angaben des Jackson Laboratory zur Genotypisierung der Nrf2 Knock-out Mäuse wurden folgende Primer verwendet: NRF2 *c_forward* (5'-GCCTGAGAGCTGTAGGCC-3'), NRF2 *Wt_reverse* (5'-GGAATGGAAAATAGCTCCTGCC-3') und NRF2 *Mut_reverse* (5'-GACAGTATCGGCCTCAGGAA-3'). Die Primer wurden in lyophilisierter Form geliefert und nach Herstellerangaben mit TE (Tris-EDTA)-Puffer auf 100 pmol/µl (100 µM) angesetzt. Anschließend wurden die Primer mit TE-Puffer in einer 1:10 Verdünnung auf 10 pmol/µl (10 µM) verdünnt und bei -20 °C eingefroren. Für die PCR-Reaktion wurde ein Primermix angesetzt, der die drei verdünnten Primer in gleicher Menge und Konzentration 1:1:1 enthielt. Die PCR wurde mit dem *Phire Animal Tissue Direct* PCR Kit (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt, welches alle Komponenten, mit Ausnahme der Primern, enthielt. Der PCR-Ansatz in 0,2 µl Reaktionsgefäßen ist in Tab. 14 aufgeführt.

Tabelle 14: Reaktionsansatz für den Mastermix einer Standard-PCR zur Genotypisierung der Nrf2 Knock-out Mäuse. Dargestellt sind die einzelnen Reaktionskomponenten und das benötigte Volumen der einzelnen Komponenten in µl pro Probe. Die PCR wurde mit dem *Phire Animal Tissue Direct* PCR Kit (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt, welches alle Komponenten, mit Ausnahme der Primer, enthielt. Die DNA-Proben wurden im Anschluss separat beigefügt.

Komponente	Volumen
2x PCR Buffer (inkl. dNTPs+MgCl ₂)	10 µl
Primermix	2 µl
Phire Hot Start Polymerase	0,4 µl
ddH ₂ O	5,6 µl
DNA-Lösung	2 µl

Im Anschluss wurden die Proben kurz an zentrifugiert und in einem PCR-Thermoblock platziert. Das einstufige Temperaturprofil für die Standard-PCR ist in Tab. 15 aufgeführt.

Tabelle 15: Temperaturprofil für eine einstufige PCR-Reaktion zur Genotypisierung der Nrf2 Knock-out Mäuse.

Vorgang	Temperatur (°C)	Zeit	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	98	5 min	1
Denaturierung	98	5 sec	40
Annealing	60	5 sec	
Elongation	72	20 sec	
Finale Elongation	72	1 min	1
Kühlung	4	∞	∞

Im Anschluss an die PCR-Reaktion wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Es wurden drei mögliche Genotypen erwartet: die Träger des Wildtyp mit 262 Basenpaaren (bp), Heterozygote mit zwei Genprodukten bei 400 und 262 bp und homozygote Nrf2 Knock-out Mäuse mit 400 bp.

Für die ApoE-defizienten Mäuse wurde keine Genotypisierung durchgeführt, da hier nur homozygote Individuen bestellt und anschließend verpaart wurden, die wie im nachfolgenden beschrieben AMD-typische Veränderungen am Augenhintergrund zeigten (siehe 4.6.).

3.4.3.2. Nachweis der Crb1^{rd8}-Mutation

Die Mutation des Crb1-Gens stellt eine häufige Mutation bei Zuchtmäusen dar. Infolge einer homozygoten Mutation des Gens wird die Ausbildung bestimmter AMD-relevanter Fundusveränderungen in der Maus beschrieben (Mehalow *et al.* 2003). Um nachzuweisen, ob der spezifische Knock-out unserer Mäuse für den ophthalmologischen Phänotyp verantwortlich ist, oder ob dieser lediglich durch die Crb1^{rd8}-Mutation bedingt ist, wurde eine Genotypisierung durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Tiere nach der Geburt über die PCR-Reaktion auf das homozygote Vorhandensein der Mutation untersucht. Es wurden dafür folgende Primer verwendet (Mehalow *et al.* 2003): mCrb1 mF2 (5'-GCCCTGTTTGCATGGAGGAACTTGAAGACAGCTA-CAGTTCTTCTG-3'), mCrb1 mF1 (5'-GTGAAGACAGCTACAGTTCTGATC-3') und mCrb1 mR

(5'-GCCCCATTTGCACACTGATGAC-3'). Die Primer wurden in lyophilisierter Form geliefert, nach Herstellerangaben mit TE-Puffer auf 100 pmol/ μ l (100 μ M) angesetzt. Anschließend wurden die Primer mit TE-Puffer in einer 1:10 Verdünnung auf 10 pmol/ μ l (10 μ M) verdünnt und bei -20 °C eingefroren. Die PCR wurde in zwei Ansätzen durchgeführt. Der erste Ansatz diente zum Nachweis des Wildtyp und der zweite Ansatz zum Nachweis der Mutante. Es wurden zwei Primermixturen angesetzt, wobei der Primermix für den Wildtyp die Primer mCrb1 mF1 und mCrb1 mR im Verhältnis 1:1 enthielt und der Primermix für die Mutation die Primer mCrb1 mF2 und mCrb1 mR im Verhältnis 1:2. Die Ansätze für beide PCR-Reaktionen sind in Tab. 16 aufgeführt. Sie unterscheiden sich lediglich in der Zusammensetzung des Primermixes und sind daher nicht getrennt aufgeführt. Die PCR wurde mit dem *Phire Animal Tissue Direct* PCR Kit (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt, welches alle Komponenten, mit Ausnahme der Primern, enthielt.

Tabelle 16: Reaktionsansatz für den Mastermix einer Standard-PCR zum Nachweis der Crb1rd8-Mutation. Dargestellt sind die einzelnen Reaktionskomponenten und das benötigte Volumen der einzelnen Komponenten in μ l pro Probe. Die PCR wurde mit dem *Phire Animal Tissue Direct* PCR Kit (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt, welches alle Komponenten, mit Ausnahme der Primern, enthielt. Die DNA-Proben wurden im Anschluss separat beigelegt.

Komponente	Volumen
2x PCR Buffer (inkl. dNTPs+MgCl ₂)	5 μ l
Primermix Mutante oder Wildtyp	1 μ l
Phire Hot Start Polymerase	0,2 μ l
A. bidest	3,3 μ l
DNA-Lösung	0,5 μ l

Im Anschluss wurden die Proben kurz zentrifugiert und in einem PCR-Thermoblock platziert. Das einstufige Temperaturprofil für die Standard-PCR ist in Tab. 17 aufgeführt.

Tabelle 17: Temperaturprofil für eine einstufige PCR-Reaktion zum Nachweis der Crb1rd8-Mutation.

Vorgang	Temperatur (°C)	Zeit	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	98	5 min	1
Denaturierung	98	5 sec	30
Annealing	60	5 sec	
Elongation	72	20 sec	
Finale Elongation	72	1 min	1
Kühlung	4	∞	∞

Im Anschluss an die PCR-Reaktion wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Es wurden zwei mögliche Genotypen erwartet, der Wildtyp mit 220 bp und die Mutante mit 244 bp.

3.4.4. Nachweis von Nukleinsäuren mittels Agarosegelelektrophorese

Zum Nachweis der DNA aus murinen Gewebestücken und der RNA aus porcinen Organkulturen wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Agarose ist ein langkettiges Polysaccharid, welches aus Seealgen gewonnen wird. Wird Agarosepulver in einem geeigneten Puffer aufgekocht, bildet sich beim Erkalten des Gemisches ein maschenartiges Gel aus. Dieses Gel fungiert als engporiges Molekularsieb, welches der Auftrennung von Nukleinsäuren ihrer Größe nach dient. Die Nukleinsäuren wurden zusammen mit einem gefärbten Ladepuffer auf das Gel aufgetragen. Dazu wird das Gemisch in die Geltaschen pipettiert, welche beim Gießvorgang durch das Einsetzen von Plastik-Kämmen entstehen. Legt man an dieses Gel eine elektrische Spannung an, so durchläuft die durch das Phosphatrückrat negativ geladene Nukleinsäure das Molekularsieb in Richtung der positiv geladenen Anode. Die Geschwindigkeit, mit der die DNA bzw. RNA das Gel im elektrischen Feld durchläuft, ist von der Höhe der angelegten Spannung, der Größe der Fragmente und der Teilchenladung abhängig (Mülhardt 2013). Zur Herstellung des Gels wurde zunächst eine horizontale Gelkammer mit einem Gelschlitten aus Plexiglas nach Herstellerangaben zusammengesetzt. Die beiden Enden des Gelschlittens wurden mit Gelgusssperren und Klebeband abgedichtet und die Plastikkämmen in dem Gelschlitten platziert.

Für den Nachweis der DNA wurden ein nicht-toxischer Farbstoff (*DNA Dye Non-Tox*) verwendet, der gleichzeitig als Ladepuffer diente und direkt mit der DNA-Probe gemischt wurde. Der Nachweis der RNA erfolgte mit Ethidiumbromid, welches mit einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml zu dem flüssigen Agarosegemisch hinzugegeben wurde. Ethidiumbromid interkaliert in die Doppelhelix von Nukleinsäuresträngen (Waring 1965; Serwer 1983). Beide Farbstoffe können unter UV-Licht mit einer Emission von $\lambda=560$ nm nachgewiesen werden.

Zum Nachweis der RNA und der DNA wurden 1,5 %-ige Agarosegele verwendet. Dazu wurden 2,25 g Agarose in einem 300 ml-Erlenmeyerkolben mit 150 ml 1 x TBE (Tris-Borat-EDTA)-Puffer gemischt. Die Agarose wurde unter Aufkochen in einer Mikrowelle bei 800 Watt gelöst. Für den Nachweis der RNA wurde nach dem Aufkochen das Ethidiumbromid zu der flüssigen Agarose hinzugegeben. Nach 30 min wurden die Kämme und Gelgussperren von dem auspolymerisierten Gel entfernt und die Laufkammer mit 1x TBE gefüllt. Es wurden 5 µl der jeweiligen DNA-Probe mit 2 µl des *DNA Dye Non-Tox* Farbstoffes versetzt und in die Taschen des Gels pipettiert. Für den Nachweis der RNA erfolgte die Zugabe von 2 µl eines farbigen Ladepuffers zu 2 µl RNA-Probe. Ein entsprechender Größenstandard wurde in beiden Fällen mitgeführt. Die Laufzeit in 1 x TBE-Puffer betrug 45 min bei 120 V und 135 mA. Die Auswertung und Fotodokumentation erfolgte in beiden Fällen in der UV-Kammer.

3.4.5. RNA-Isolierung aus porcinen Organkulturen

Um die relative Expression von MMP-2 zu bestimmen, wurden die Explantate nach der Kultivierung mit einer 6 mm Biopsiestanze aus den Fixationsringen entfernt. Die RNA wurde über das Säulensystem NucleoSpin® RNA II (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben isoliert. Das Kit enthielt alle benötigten Komponenten, welche in der folgenden Beschreibung aufgeführt sind. Um ausreichend RNA zu generieren, wurden immer zwei Explantaten gemeinsam über eine Säule isoliert.

Die Homogenisation der Explantate erfolgte mittels Kugelmühle in 1,5 ml Schraubgefäßen, welchen jeweils 3 Keramikkügelchen, 350 µl RA1 Puffer und 35 µl DTT hinzugefügt wurden. Die Gewebe wurden mittels einer Kugelmühle 2 mal für 2 min mit 3 Kügelchen bei $S=3,25$ m/s homogenisiert. Zur Reinigung wurde das Homogenisat auf den violetten NucleoSpin® Filter gegeben und für 1 min bei 11.000 x g zentrifugiert. Zur Herstellung optimaler Bindungskonditionen wurde der Filter verworfen, 350 µl 70 % Ethanol zu dem Homogenisat gegeben und 2 mal für 5 sec gevortext. Anschließend wurden die blauen NucleoSpin® Filter in 1,5 ml Reaktionsgefäße eingesetzt und mit dem Homogenisat beladen. Die Säule wurde für 30 sec bei 11.000 x g zentrifugiert. Der Filter wurde in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß eingesetzt und mit 350 µl MBM-Puffer zur Entfernung von Salzrückständen versetzt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 1 min bei

11.000 x g sowie zwei Waschschr tte mit 200 µl RAW2 Puffer und 600 µl RA3 Puffer mit jeweils 30 sec Zentrifugation bei 11.000 x g. Ein dritter Waschschr tt wurde mit 250 µl RA3 Puffer und 2 min Zentrifugation angeschlossen. Die RNA wurde mit 40 µl RNase-freiem Wasser und einem Zentrifugationsschr tt von 1 min bei 11.000 x g eluiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -20 °C bzw. 4 °C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung wurde wie beschrieben am Nanodrop durchgeführt. Zum Nachweis der erfolgreichen RNA-Isolierung wurden die Proben zusammen mit einem Gr o enstandard auf ein Agarosegel aufgetragen. Die RNA-Isolierung wurde am Zoologischen Institut, AG Molekulare Physiologie, CAU Kiel durchgeführt.

3.4.6. Erststrangsynthese der cDNA aus porcinen RNA-Proben

Bei der isolierten RNA handelt es sich um ein Gemisch aus drei RNA-Arten: rRNA, tRNA und mRNA. Durch die Verwendung des viralen Enzyms Reverse Transkriptase (RT) erfolgt die Umschreibung der kodierenden mRNA in eine komplementäre, einzelsträngige DNA-Sequenz, die cDNA (*complementary DNA*) (Mülhardt 2013).

In dieser Arbeit wurde die SuperScript® III-RT verwendet, welche nach Herstellerangaben (Invitrogen, Life Technologies) aus der RT des M-MLV (*Moloney Murine Leukaemia Virus*) konstruiert wurde und eine erhöhte Thermostabilität aufweist. Diese RT schreibt die mRNA ausgehend von einem Oligo d(T)-Primer in cDNA um. Der Oligo d(T)-Primer besteht aus 25 Thyminbasen, welche an den Poly-A-Schwanz der mRNA binden und so eine spezifische Synthese erlauben. Die Erststrangsynthese wurde am Zoologischen Institut, AG Molekulare Physiologie, CAU Kiel durchgeführt.

Der Ansatz für die Erststrangsynthese ist in Tab. 18 aufgeführt.

Tabelle 18: Durchführung der cDNA-Erststrangsynthese. Aufgeführt sind die einzelnen Komponenten und die benötigte Menge pro Probe sowie die Inkubationsschritte.

Komponente	Menge
Oligo d(T) (10 pmol)	0,5 µl
dNTPs (10 mM, 2,5 mM each)	0,5 µl
RNA	150 ng
A. bidest	ad 6,75 µl
Es folgte ein Inkubationsschritt für 5 min bei 65 °C und für 1 min auf Eis.	
5x First Strand Buffer	2 µl
DTT (0,1 M)	0,5 µl
RNase Inhibitor (10 U)	0,25 µl
RT Superscript III (100 U)	0,5 µl
	Σ 10 µl
Es folgte ein Inkubationsschritt für 5 min bei RT, die cDNA-Synthese für 60 min bei 50 °C und die Stopreaktion für 15 min bei 70 °C.	

3.4.7. Quantitative *Real-time* PCR

Die quantitative *Real-time* PCR (qRT-PCR) beschreibt ein Verfahren zur Quantifizierung von DNA-Proben mittels genspezifischer Primer in einer PCR-Reaktion. Die Quantifizierung erfolgt über die Verwendung interkalierender Fluoreszenzfarbstoffe, welche während der Elongationsphase der PCR in die Doppelstrang-PCR eingebaut werden. Der Anstieg des Fluoreszenzsignals in der exponentiellen Phase der PCR ist proportional zu der amplifizierten DNA-Menge und kann in Echtzeit gemessen werden (Mühlhardt 2013). Zum Nachweis der Expression von MMP-2 wurde der Fluoreszenzfarbstoff *SYBR Green* und folgende Primer genutzt: MMP-2 *forward* (5'-GAGCCTCTGGGTCAAGTTC-3') und MMP-2 *reverse* (5'-CTTGCCTCTGGATGCCATT-3'). Beta-Aktin wurde als internes Referenzgen verwendet, um Abweichungen in der Ausgangsmenge auszugleichen. Dieses Gen wurde gewählt, da in mehreren qRT-Testläufen und weiterhin durch die Western Blot-Analysen gezeigt wurde, dass die β -Aktin-Expression durch die Laserbehandlung nicht beeinflusst wird.

Es wurden folgende Primer für den Nachweis von β -Aktin verwendet: β -Aktin *forward*

(5'-CTGCGGCATCCACGAAACTA-3') und β -Aktin *reverse* (5'-CTGGGCA-CTCACCTTGATCTT-3'). Alle Messungen wurden in Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Analyse der Daten erfolgte über die $\Delta\Delta$ CT-Methode nach Pfaffl (2004) bei der die Expression des MMP-2 Gens in den gelaserten Proben als x-fache Expression bezogen auf die unbehandelten Kontrollproben berechnet wurde. Die CT-Werte (*cycle threshold*) sind dabei ein Maß für den Fluoreszenzanstieg in der exponentiellen Phase der PCR. Es gilt dabei:

$$\Delta\text{CT} = \text{CT Zielgen} - \text{CT Referenzgen}$$

$$\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT Behandlung} - \Delta\text{CT Kontrolle}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$$

In diesem Modell wird von einer konstanten Verdopplungsrate der Proben-DNA in jedem PCR-Zyklus ausgegangen, weshalb die Basis 2 angegeben wird. In der Realität ist jedoch von unterschiedlich starken Bindungsaffinitäten der verwendeten Primer auszugehen, weshalb vor der Quantifizierung die Bestimmung der Primereffizienzen für MMP-2 und β -Aktin über eine serielle Verdünnungsreihe erfolgte. Dies diente dem Nachweis, dass die Primer auch bei abnehmender DNA-Menge gleichmäßig binden.

Die Effizienz wird als Korrekturfaktoren in die Formel eingesetzt (Pfaffl und Riedmaier 2011):

$$\frac{(E \text{ Zielgen})^{\Delta\text{CT}} \text{Zielgen}^{(\text{Kontrolle}-\text{Behandlung})}}{(E \text{ Referenzgen})^{\Delta\text{CT}} \text{Referenzgen}^{(\text{Kontrolle}-\text{Behandlung})}}$$

Die Effizienz wird über $E = 10^{(-1/\text{Steigung})}$ berechnet.

Die Quantifizierung der MMP-2 Expression wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff *SYBR Green* durchgeführt. Bei der Verwendung dieses Farbstoffes wurde im Rahmen der Quantifizierung eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um die Spezifität des Farbstoffes zu bestimmen. Es wurden dabei die doppelsträngigen PCR-Produkte bei einer stetig ansteigenden Temperatur von 50 – 95 °C in 0,3 °C-Schritten aufgeschmolzen, wobei das *SYBR Green* freigesetzt und die Fluoreszenzabnahme aufgezeichnet wird. Spezifisch produzierte Genprodukte weisen dabei höhere Schmelztemperaturen auf als unspezifische Genprodukte wie z.B. Primerdimere. Des Weiteren diente der Farbstoff ROX als passiver Referenzfarbstoff und war bereits in dem verwendeten SYBR-Mix (Tab. 19)

enthalten. Die *Real-time* PCR wurde am Zoologischen Institut, AG Molekulare Physiologie, CAU Kiel durchgeführt.

Der Ansatz für die qRT-PCR in 0,2 ml Reaktionsgefäßen ist in Tab. 19 aufgeführt. Vor der Zugabe der cDNA-Probe wurde der Ansatz mit A. bidest auf 30 ng in 3,75 µl (8 ng/µl) verdünnt. Die Primer wurden auf 5 pmol/µl mit A. bidest verdünnt.

Tabelle 19: Ansatz für die qRT-PCR mit cDNA aus porcinen Organkulturproben. Aufgeführt sind die einzelnen Komponenten und die benötigte Menge pro Probe.

Komponente	Menge
SYBR-Mix	5,25 µl
Sense Primer	0,5 µl
Antisense Primer	0,5 µl
cDNA	3,75 µl (8 ng/µl)

Die PCR-Ansätze wurden in den Reaktionsgefäßen 2 mal für 1 min bei 3000 U/min und 4 °C zentrifugiert und in dem qRT-PCR-Gerät platziert. Das Programm der verwendeten qRT-PCR ist in Tab. 20 aufgeführt.

Tabelle 20: Temperaturprofil für eine qRT-PCR mit Schmelzkurvenanalyse.

Vorgang	Temperatur (°C)	Zeit	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	95	10 min	1
Denaturierung	95	10 sec	
Annealing	60	20 sec	40
Elongation	72	35 sec	
Schmelzkurvenanalyse	95	15 sec	1
	60	1 min	1
	60-95°C	in 0,3 °C Schritten	1
	95	15 sec	1
Kühlung	4	∞	∞

3.5. Untersuchungen im Mausmodell

In Ergänzung zu den vorangegangenen zellbiologischen Untersuchungen in einem *ex vivo* Organkulturmodell wurden die beiden Laserverfahren SRT und TSR *in vivo* untersucht. Dafür wurden die Untersuchungen zweier beschriebener AMD-Mausmodelle (Dithmar *et al.* 2000; Zhao *et al.* 2011) in unseren Laboren etabliert, an denen der therapeutische

Effekt der Laserbehandlungen im genetisch-veränderten Organismus getestet wurde. Die Tiere wurden von dem Jackson Laboratorium (Bar Harbor, Maine, USA) bezogen und am Tierstall des UKSH Kiel in einem 12 h Tag/Nacht-Rhythmus unter Standarddiät gehalten.

3.5.1. Beschreibung der AMD-Mausmodelle

Zwei AMD-Mausmodelle mit unterschiedlichem pathophysiologischem Fokus wurden für diese Arbeit verwendet, da sie zwei Konzepte der AMD-Entstehung ansprechen. Dazu gehören die Störungen des Lipidstoffwechsels durch ein Knock-out im ApoE-Lipoprotein und die Induktion von oxidativem Stress durch eine Nrf2-Defizienz (siehe 1.2.1.).

Das erste AMD-Modell stellt das Nrf2 Knock-out Modell der Zuchtlinie B6.129X1-Nfe2l2tm1Ywk/J dar. Diese Tiere haben einen genetischen C57BL/6J Hintergrund. In diesem Modell ist der Transkriptionsfaktor Nrf2, als wichtiger Regulator des antioxidativen Schutzes, ausgeschaltet. Es kommt zu einem Ungleichgewicht zellulärer Redoxsysteme und der Expression von anti-oxidative Proteinen. In Folge dessen wird eine Anhäufung von Sauerstoffradikalen, pro-inflammatorischer Zytokine und Komplementfaktoren beobachtet. Klinisch zeigt sich durch die Einwirkungen des oxidativen Stresses drusenartige Ablagerungen, Pigmentverschiebungen des RPE, eine Verdickung der BrM und CNVs in älteren Mäusen (Zhao *et al.* 2011; Wakabayashi *et al.* 2010). Für das NRF2 knock out Modell wurden frühe Veränderungen bei 6, 9 und 12 Monate alten Tieren und späte Veränderungen bei 15 Monate alten Mäusen erwartet. Um sicher Veränderungen zu beobachten und zu untersuchen, ob es einen Unterschied bei der Laserbehandlung zwischen unterschiedlich alten Mäusen gibt, wurden in dieser Studie 9, 12 und 15 Monate alte Tiere verwendet (Zhao *et al.* 2011).

Bei dem zweiten Modell handelt es sich um ApoE-defiziente Mäuse der Zuchtlinie B6.129P2-Apoetm1Unc/J, welche ebenfalls einen genetischen C57BL/6J Hintergrund aufweisen. Diesem Modell fehlt das ApoE, ein Ligand um Lipoproteine niedriger und mittlerer Dichte zu verstoffwechseln (siehe 1.2.1). Es kommt zum Anstieg des Plasmacholesterinspiegels und zu lipidhaltigen Ablagerungen im gesamten Organismus. Der pathologische Fokus im Auge liegt auf der Verdickung der BrM und lipidhaltigen Ablagerungen in Form von Vakuolen im Bereich des RPE (Dithmar *et al.* 2000). Für das ApoE Knock-out Modell erwarteten wir nach 1 bis 4 Monaten frühe, nach 8 Monaten

späte AMD-typische Veränderungen (Dithmar *et al.* 2000). Um frühe und späte Veränderungen zu erfassen, wurden in dieser Arbeit 4 und 8 Monate alte Mäuse verwendet.

Als Kontrolle dienten Wildtyp C57BL/6J Mäuse mit gleichem Alter wie die Knock-out Mäuse ohne genetische Veränderungen. Sie zeigen einen normalen Phänotyp und Netzhautveränderungen im Sinne einer AMD waren nicht zu erwarten.

3.5.2. Projektplan der *in vivo* Untersuchungen im AMD-Mausmodell

Die Pilotstudie diente der methodischen Etablierung und Beschreibung der AMD-Mausmodelle sowie der Überprüfung des therapeutischen Nutzens der Laserbehandlung. Verglichen wurden zwei AMD-Mausmodelle mit einer gleichaltrigen, gesunden Kontrollgruppe. Es wurde in kleinen Gruppen unterschiedliche Mausmodelle, Behandlungsparameter und Behandlungszeitpunkte untersucht. Die Beschreibung der verwendeten Behandlungsparameter „*Low density*“ und „*High density*“ sind unter 3.6.4 näher aufgeführt.

Der Projektplan bestand aus 3 Studienarmen (Abb. 7) und wurde am 18.06.2014 vom Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein unter dem Förderzeichen V 242-7224.121-12 (61-5/14) genehmigt. Die statistische Fallzahlberechnung wurde von Frau Dr. Amke Caliebe vom Institut für Medizinische Informatik und Statistik in Kiel durchgeführt. Die Anzahl der verwendeten Tiere ist in Abb. 7 in Klammern hinter dem jeweiligen Behandlungsmodus aufgeführt.

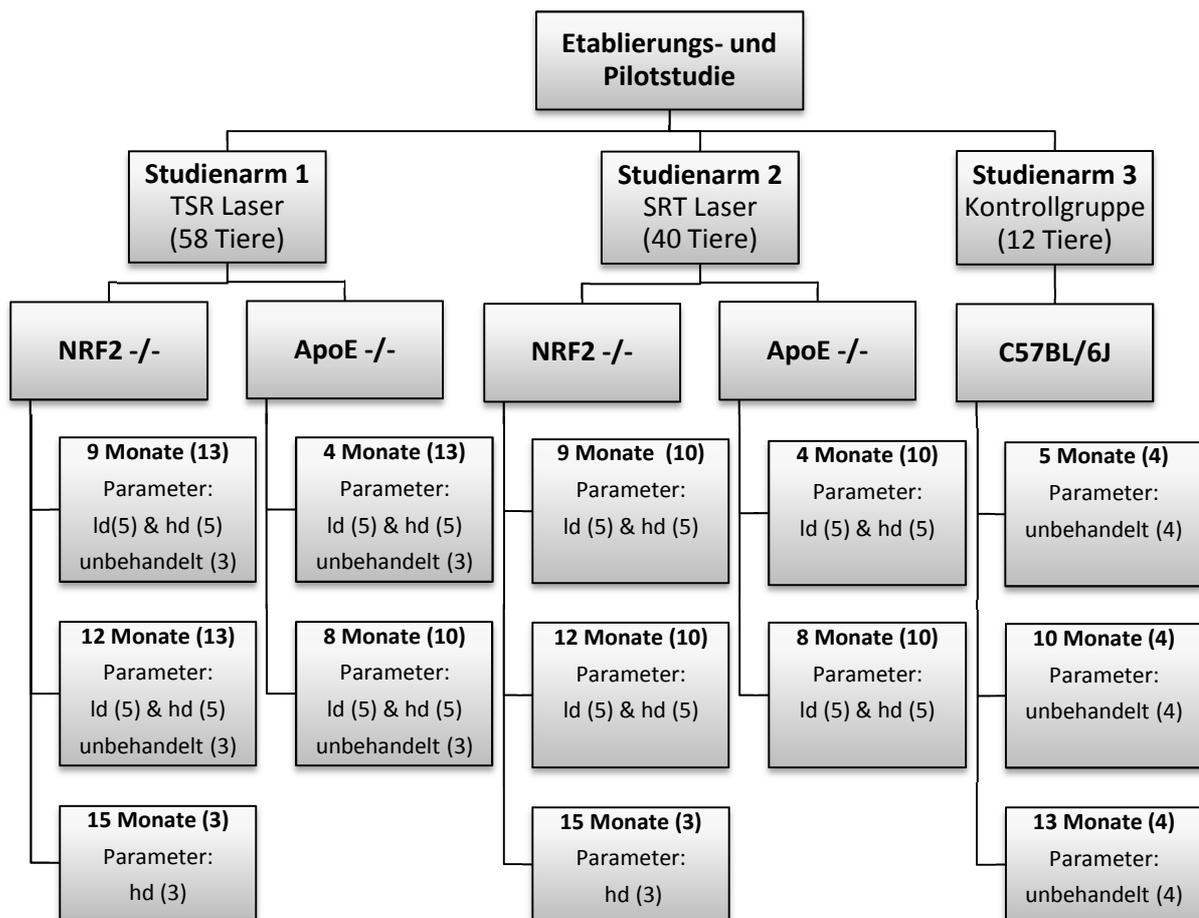


Abbildung 7: Projektplan der Etablierungs- und Pilotstudie zur Laserbehandlung zweier AMD-Mausmodelle. Der Projektplan beschreibt die drei Studienarme der Pilotstudie mit Angaben zum Lasermodus, Art des Mausmodells, Anzahl der behandelten Tiere und Parametersatz „Low density“ (ld) und „High density“ (hd).

Im Studienarm 1 wurden 4 bis 15 Monate alte Tiere beider Modelle mit den etablierten klinischen Methoden (Funduskopie, Fluoreszenzangiographie, Optische Kohärenztomographie) untersucht (siehe 3.5.4). Einige Tiere blieben dabei unbehandelt und dienten als Kontrollgruppe innerhalb des Modells, um die AMD-typischen Veränderungen und den Krankheitsverlauf zu charakterisieren. Die weiteren Tiere wurden mit zwei unterschiedlichen Parametersätzen („Low density“ und „High density“) mit dem TSR-Laser behandelt, nach einem Monat erneut untersucht und euthanasiert (siehe 3.6.4).

In Studienarm 2 wurde die Behandlung mit dem SRT-Laser analog zu Studienarm 1 durchgeführt. Auf unbehandelte Kontrollen wurde hier verzichtet, da die Tiere aus Studienarm 1 für den Vergleich zwischen Laserbehandlung und Kontrolle verwendet werden konnten.

In Studienarm 3 wurde eine gesunde Kontrollgruppe der C57BL/6J Wildtyp Mäuse mit den bildgebenden Verfahren untersucht, jedoch nicht mit dem Laser behandelt. Die Augen dieser Mäuse dienten dem Vergleich mit AMD-Knock-out Mäusen und der Modellbeschreibung. Die Mäuse wurden nur am Tag der Euthanasierung untersucht und sind daher ein Monat älter im Projektplan angegeben, damit die Tiere aus den Studienarmen 1 und 2 altersgerecht untersucht wurden.

3.5.3. Das Narkoseverfahren

Alle Tierversuche wurden in Allgemeinnarkose durchgeführt. Es handelte sich dabei um eine vollständig antagonisierbare Kombinationsanästhesie. Nach der Ermittlung des Körpergewichts (KG) der Mäuse wurde eine Triple-Narkose mit Fentanyl (0,05 mg/kg KG), Midazolam (5,0 mg/kg KG) und Medetomidin (0,5 mg/kg KG) intraperitoneal appliziert. Während der Narkose wurde nach Bedarf nachinjiziert, wobei die Narkosetiefe anhand der Überprüfung des Zwischenzehenreflexes bestimmt wurde. Um ein Auskühlen des Tieres zu verhindern, wurden die Mäuse auf Heizmatte warmgehalten. Im Anschluss an die Versuche wurden die Tiere durch die intraperitoneale Gabe eines Antidots aus Naloxon (1,2 mg/kg KG), Flumazenil (0,5 mg/kg KG) und Atipamezol (2,5 mg/kg KG) aus der Narkose aufgeweckt und für mindestens 1 h nachbeobachtet.

3.5.4. Untersuchungen an der Maus

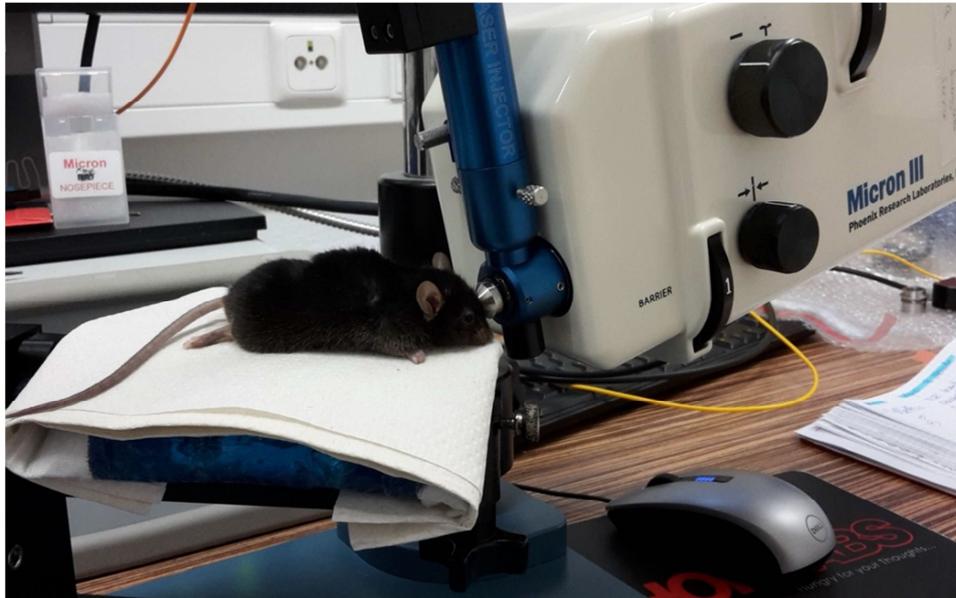


Abbildung 8: Untersuchung des murinen Auges im AMD-Mausmodell. Die Maus befindet sich während der Untersuchungen in Narkose und ist auf einer Wärmematte gelagert. Der Adapter an der Micron III-Kamera befindet sich über ein Methylcellulosegel im direkten Kontakt zum Mausauge.

Es wurden klinisch bildgebende Verfahren zu diagnostischen Zwecken an den Mäusen durchgeführt, die im Weiteren beschrieben werden (Abb. 8). Diese klinischen Untersuchungen wurden am Tag der Behandlung und 1 Monat nach der Behandlung durchgeführt. Neben den bildgebenden Verfahren wurden Routineuntersuchungen an den Mäusen durchgeführt, die auf einem Berichtsbogen zur Überprüfung der Versuchstierbelastung dokumentiert wurden. Dazu gehörte z.B. die Dokumentation des Gewichts, des Verhaltens, mögliche Verletzungen und des allgemeineren Habitus der Tiere. Die Pupillen der Versuchstiere wurden einmalig mit Mydriasis-Augentropfen weitgestellt und die Augenoberfläche mit Augenkontaktgel (Methylcellulose 2 %) durchgehend feucht gehalten.

3.5.4.1. Fundusfotografie

Bei der Fundusfotografie handelt es sich um ein nicht-invasives bildgebendes Verfahren, welches es ermöglicht den Augenhintergrund darzustellen (Sachsenweger 2003). Für die Funduskopie der Mäuse wurde die Micron III Kamera (Phoenix) verwendet. Die Augen wurden mit einem Kontaktgel bedeckt und das Kontaktobjektiv der Kamera aufgesetzt. Es wurden pro Auge standardmäßig drei Bilder angefertigt: zentral, nasal und temporal. Der Augenhintergrund sowie AMD-typische Veränderungen wie Drusen, RPE-Verschiebungen, Atrophie, CNV und alle weiteren Auffälligkeiten wurden fotografisch und schriftlich dokumentiert.

3.5.4.2. Optische Kohärenztomographie

Die optische Kohärenztomographie (OCT) ist ein nicht-invasives bildgebendes Verfahren, bei dem die Netzhaut mit einem Laser abgefahren wird und durch Interferometrie ein Bild der Netzhautschichten, ähnlich einer histologischen Aufnahme, generiert wird (Fercher *et al.* 1988; Fercher *et al.* 1993). Das OCT für Mäuse wurde von unseren Verbundpartnern der Firma Thorlabs (Lübeck) entwickelt und als Aufsatz für die bestehende Funduskamera (Micron III) gefertigt. Für die OCT wurden die Augen mit einem Kontaktgel bedeckt und das Kontaktobjektiv des OCT aufgesetzt. AMD-typische Veränderungen wurden fotografisch und schriftlich dokumentiert. Es wurden pro Auge standardmäßig drei Bilder angefertigt: inferior, zentral und superior.

3.5.4.3. Fluoreszenzangiographie

Die Fluoreszenzangiographie (FAG) ist ein Verfahren, um den Gefäßfluss und die Unversehrtheit der retinalen Gefäße darzustellen (Novotny und Alvis 1961). Hierzu wurde der Farbstoff Fluorescein (60 mg/kg KG) intraperitoneal appliziert. Fluorescein ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der durch die Anregung mit blauem Licht ($\lambda = 496 \text{ nm}$) Fluoreszenzsignale im grünen Bereich ($\lambda = 530 \text{ nm}$) abgibt. Einige Minuten nach der Applikation konnte der Farbstoff im Auge über die Funduskamera und einem integrierten Filter nachgewiesen werden. AMD-typische Veränderungen wurden fotografisch und schriftlich dokumentiert.

3.5.4.4. E nukleation

Die Tiere wurden in Narkose durch zervikale Dislokation euthanasiert. Die Augen wurden mit Hilfe von Scheren und Pinzetten enukleiert. Anhängende Muskelgewebe und die Bindehaut wurden unter einem Binokular entfernt, wobei der Sehnerv zur späteren Orientierung bei der histologischen Aufarbeitung ca. 2 mm stehengelassen wurde.

3.5.5. Histologische Aufarbeitung des Mausauges

Im Anschluss an die E nukleation wurden die Mäusebulbi für 1 h in 4 % Glutaraldehyd und für 12 h in Paraformaldehyd fixiert. Anschließend folgte eine Wässerung für 30 min in destilliertem Wasser. Die Entwässerung des Gewebes erfolgte durch eine aufsteigende Alkoholreihe bei RT mit 70 % (30 min), 80 % (40 min), 90 % (50 min) und 99 % (50 min) Ethanol. Es folgte die Inkubation in Chloroform und mit einem Chloroform-Paraffingemisch (1:1) bei 60 °C für 60 min im Wärmeschrank. Anschließend wurden die Bulbi in reinem Paraffin für 60 min bei 60 °C gelagert, in Paraffinblöckchen gegossen und bei RT abkühlen lassen. Die Blöcke wurden mit einer Schnittdicke von 3-5 µm geschnitten, auf Objektträger aufgezogen und auf dem Wärmetisch bei 40 °C für 2 h gelagert.

Es folgte die Hämatoxylin-Eosin-Färbung nach Mayer (Mulisch und Welsch 2010). Dazu wurden die Schnitte in Xylol entparaffiniert und mit der absteigenden Alkoholreihe aus 99 %, 90 %, 80 % und 70 % Ethanol für 5 min behandelt. Es folgte ein kurzer Wässerungsschritt mit A. dest. und die Kernfärbung mit dem Farbstoff Hämatoxylin nach Mayer für 5 min, welcher alle sauren Strukturen der Zelle blau anfärbte. Ein Wässerungsschritt unter fließendem Leitungswasser führt zu der vollen Farbentfaltung. Es folgte ein weiterer Wässerungsschritt mit A. dest. und die Färbung mit dem Farbstoff Eosin, welcher alle basischen Strukturen, wie z.B. das Zytoplasma der Zelle anfärbte. Es folgte eine aufsteigende Alkoholreihe mit 80 %, 90 %, 99 % Ethanol und einem Zwischenmedium aus Phenol und Xylol (1:1), bei der die Schnitte kurz hintereinander in die Küvetten getaucht wurden. Vor der Eindeckung erfolgte die Inkubation in Xylol, wobei die Inkubationszeiten variieren können. Die Abdeckung der gefärbten Schnitte erfolgte mittels Permount-Eindeckmedium und Deckgläschen auf den Objektträgern.

3.5.6. Aufarbeitung des Auges für die Elektronenmikroskopie und Toluidinblaufärbung

Die Hauptkenngröße zur Untersuchung des Laser-Therapieerfolgs ist die Dicke der BrM. Zur Messung der Dicke der BrM wurden die Augen mittels Elektronenmikroskopie ultrastrukturell untersucht.

Zur elektronenmikroskopischen Aufarbeitung wurden die Augen zunächst für mindestens 24 h in 4 % Glutaraldehyd fixiert und danach in einem Kunststoff (Araldit) eingebettet. Für die Aralditeinbettung wurden die Augen über Nacht mit PBS gespült und anschließend für 2 h mit einem 1:1 Gemisch aus PBS und 2 % Osmiumtetroxid behandelt. Es folgte eine aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 80 %, 90 % und 100 %) und die Inkubation in Propylenoxid für jeweils 2 x 10 min. Einem Gemisch aus 91 ml Araldit-M und 84 ml DDSA (*Epoxy embedding medium hardener*) wurden 3 % *Araldite M accelerator* hinzugegeben. Dieses Gemisch wurde 1:1 mit Propylenoxid schlierenfrei verrührt und über Nacht bei RT zu den Augen gegeben. Am Folgetag wurde Araldit mit 2 % *Araldite M accelerator* versetzt und für 4 h zu den Augen gegeben. Die Augen wurden in einer Kunststoffform mit dem Gemisch aus Araldit und Beschleuniger für 2 h bei RT inkubiert und der Kunststoff bei 45° C im Wärmeschrank über Nacht gehärtet. Am nächsten Tag wurde die Temperatur zur vollständigen Aushärtung für 48 h auf 60° C erhöht (modifiziert nach Mulisch und Welsch 2010).

Im Anschluss an die Einbettung wurden die Augen am Mikrotom mit Glas- und Kristallmessern in Dickschnitte (0,5 bis 1 µm) und Ultradünnschnitte (100 nm) geschnitten. Die Einbettung wurde am Anatomischen Institut, CAU Kiel durchgeführt. Es wurden je drei Stufen des Auges geschnitten: direkt über dem Sehnerv, mittig durch den Sehnerv und direkt unter dem Sehnerv. Die Dickschnitte wurden auf Objektträger und die Ultradünnschnitte auf Formvar-beschichtete Steggrids aufgezogen.

Die Dickschnitte wurden für die lichtmikroskopische Auswertung mit Toluidinblau gefärbt. Dazu wurde eine 3:1 Mischung von Toluidinblau und Pyronin angesetzt und die Schnitte damit für 8 min bei 70 °C inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte 3 mal mit warmem A. dest. und 2 mal mit 70 % Ethanol gespült und mit Permunt-Eindeckmedium unter Deckgläschen eingedeckt. Die Schnitte wurden zur Messung der Dicke der PRS mit der AxioVision Software genutzt.

Die Ultradünnschnitte wurden mit Bleicitrat und Uranylacetat kontrastiert und elektronenmikroskopisch ausgewertet.

3.5.7. Transmissionselektronenmikroskopie

Die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) ist ein Verfahren zur ultrastrukturellen Untersuchung von Zellen oder Geweben mittels Elektronenstrahlen und elektronenoptischer Linsen. Die Elektronenstrahlen werden dabei durch einen mit Bleicitrat und Uranylacetat kontrastierten Ultradünnschnitt geleitet, wobei die absorbierten Elektronen das Bild generieren (Nagl 1981). Die TEM wurde am Anatomischen Institut, CAU Kiel durchgeführt.

Die kontrastierten TEM-Schnitte der Augen wurden in einem standardisierten, verblindeten Verfahren am Elektronenmikroskop ausgewertet (Abb. 9). Dieses Verfahren ist erforderlich, damit keine Fehler durch eine mögliche Erwartungshaltung des Beobachters („*observer bias*“) in die Analyse einfließen. Es wurden am posterioren Pol des Auges drei Stufen pro Auge untersucht (Abb. 9 a-b). In jeder Stufe wurde an drei durch die Stege der Grids definierten Positionen links vom Sehnerv und an drei Positionen rechts vom Sehnerv eine Aufnahme gemacht, wodurch pro Stufe sechs Bilder generiert wurden (Abb. 9 c). Anschließend wurden pro Aufnahme drei Messungen durchgeführt, was zu einer Gesamtzahl von 54 Messungen pro Auge führte (Abb. 9 d).

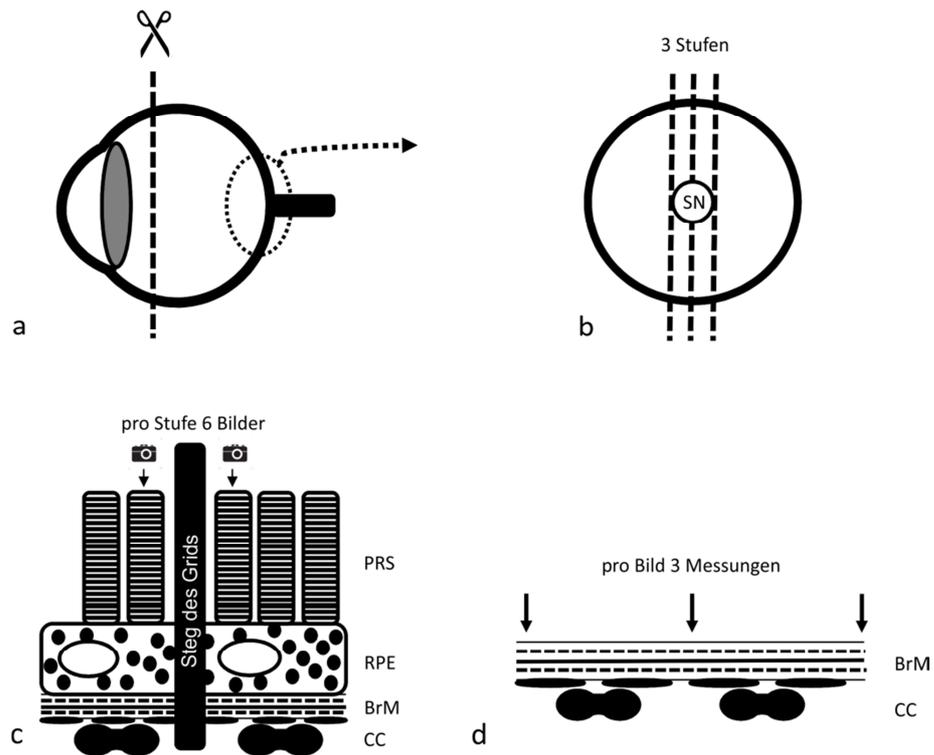


Abbildung 9: Standardisierte Aufarbeitung der Mauseugen und Messung der BrM-Dicke am Elektronenmikroskop. Der posteriore Pol des Auges (a) wurde in drei Stufen geschnitten: oberhalb des Sehnervs, mittig hindurch und unterhalb des Sehnervs (b). In jeder Stufe wurden an sechs definierten Positionen Aufnahmen der BrM generiert (c). An jeder Aufnahme wurden drei Messungen der Dicke der BrM durchgeführt (d). Dieses Verfahren führte zu einer Gesamtzahl von 54 Messungen pro Auge. Abkürzungen: SN=Sehnerv, PRS=Photorezeptorschicht, RPE=Retinales Pigmentepithel, BrM= Bruch'sche Membran, CC=Choriocapillaris.

Es wurde zusätzlich zu der Untersuchung der Dicke der BrM an allen untersuchten Schnitten die Höhe des RPE als interne Referenz ausgemessen. Dies wurde durchgeführt, um zu prüfen, ob die Augen immer in der korrekten horizontalen Orientierung geschnitten wurden. Wäre dies nicht der Fall und wäre ein Schnitt z.B. tangential angeschnitten, so würde es zu starken Abweichungen der RPE-Dicke kommen. Als Maß für die RPE-Dicke wurden eigene Untersuchungen durchgeführt und Literaturangaben einbezogen (Schmidt-Erfurth *et al.* 2008).

3.6. Laserbehandlungen

In dieser Arbeit sollte die Wirkung neuer Laserverfahren auf die Sekretion AMD-relevanter Zellmediatoren im porcinen Organkulturmodell und auf die Dicke der BrM im AMD-Mausmodell untersucht werden.

3.6.1. Beschreibung des Lasersystems

Für die Versuche wurde ein Nd:YAG (Neodymium-doped:Yttrium-Aluminium-Granat) Experimentallaser der Carl Zeiss Meditec AG verwendet (Abb. 10 a). Es handelt sich dabei um einen Laser aus der Visulas 532-Serie (Zeiss), der neben dem konventionellen Dauerstrich- (CW) Modus, bei dem der Laser einzelne Pulse im ms-Bereich ausgibt, auch über einen gepulsten Modus verfügt, der kurze repetitive Laserpulse im μs -Bereich ausgibt (siehe 1.3.). Der Laser verfügte über eine quadratische optische Faser mit einem Kernprofil von 70 μm . Die gewünschten Einstellungen wurden über einen Bildschirm (*Touch-Screen*) eingegeben (Abb. 10 b). Da die Laserpulse sehr kurz sind und für das Auge kaum zu erfassen, markiert ein für das Auge ungefährlicher roter Teststrahl ($\lambda = 635 \text{ nm}$) die potentielle Behandlungsstelle (siehe Abb. 13) solange bis der Laser über ein Fußpedal (Abb. 10 c) ausgelöst wird. Die behandelte Fläche, die vorher über den Teststrahl angezeigt wurde, wird im Folgenden als „Spot“ bezeichnet. Diese Bezeichnung beschreibt lediglich die behandelte Fläche und wird unabhängig davon verwendet, ob eine Läsion durch die Laserstrahlung entstanden ist oder nicht. Die Größe der Spots kann an der Spaltlampe eingestellt werden (Abb. 10 d). In dieser Arbeit wurden für die Behandlung der Organkulturen (siehe 3.6.2.) unterschiedliche Spotgrößen von 100-300 μm verwendet. Für die Laserbehandlung im Mausmodell (siehe 3.6.4.) wurde ein Laseradapter der Firma Phoenix auf die Micron III Kamera (Phoenix) aufgesetzt (Abb. 10 e). Die Spotgröße von 50 μm für die Behandlung im Mausmodell konnte nicht verändert werden, da es an dem Laseraufsatz keine Möglichkeit der Variation gab.

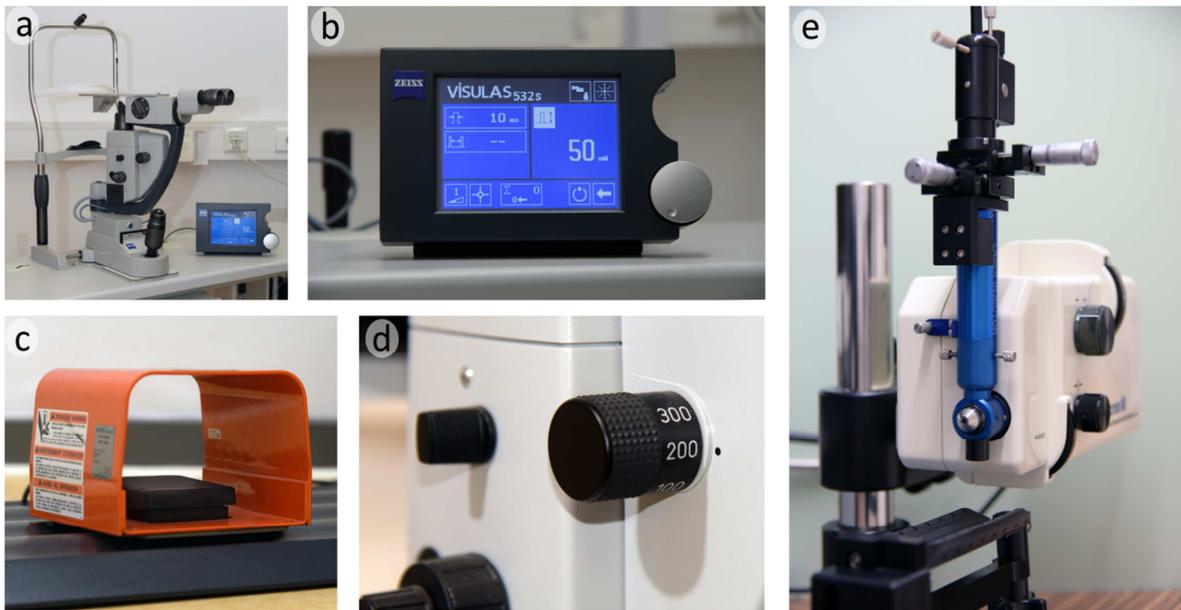


Abbildung 10: Aufbau des Lasersystems für die Anwendung an porcinen Explantaten und an der Maus. Es wurde ein Nd:YAG (Neodymium-doped:Yttrium-Aluminium-Granat) Experimentallaser (Carl Zeiss Meditec AG) verwendet (a). Die gewünschten Einstellungen wurden über einen Bildschirm (*Touch-Screen*) eingegeben (b) und der Laser über ein Fußpedal ausgelöst (c). Die Größe der Spots kann an der Spaltlampe eingestellt werden (d). Für die Laserbehandlung im Mausmodell wurde ein Laseradapter (Phoenix) auf die Micron III Kamera (Phoenix) aufgesetzt (e) (Fotos: Markus Berendes, Kiel).

Für den gepulsten Modus wird die Einheit mit dem Formelzeichen E (Energie) in Mikrojoule (μJ) angegeben. Für die Behandlung im CW-Modus wird die Einheit P (Leistung) in Milliwatt (mW) verwendet. Die Energie bzw. Leistung wurde routinemäßig vor jeder Behandlung mit einem thermischen Messkopf (*Thermal Power Sensor*) gemessen.

Für die TSR-Behandlung (siehe 1.3.2) wurde im CW-Modus bei $\lambda = 532 \text{ nm}$ mit Pulsdauern von 10 bis 100 ms behandelt. Für die Behandlung im Organkulturmodell wurden Spotgrößen zwischen 100 und 300 μm verwendet, wohingegen im Mausmodell mit einer konstanten Spotgröße von 50 μm gearbeitet wurde (s.o.). Die Wahl der Spotgröße im Organkulturmodell beruhte darauf, dass möglichst unterschiedliche Parameter gewählt werden sollten, um die Proteinsekretion nach der Verwendung unterschiedlicher Spotgrößen zu vergleichen. Die applizierte Leistung lag bei der Behandlung im Organkulturmodell zwischen 15 und 100 mW und im Mausmodell zwischen 1 und 15 mW.

Für die SRT-Behandlung (siehe 1.3.1) wurde mit kurz aufeinander folgenden Pulsen, dem sogenannten „gepulsten“ Modus behandelt. Die Dauer und Signalform der Pulse variiert in Abhängigkeit zu der gewählten Energie. Diese wurden von den Kooperationspartnern des Medizinischen Laserzentrums Lübeck (MLL) mit einem Energiemesskopf und einer aktiven Fotodiode an der Laserspaltlampe für ausgewählte Energien bestimmt. Ein Prüfbericht und die Rohdaten wurden vom MLL zur weiteren Bearbeitung zur Verfügung gestellt. Zur Bewertung der Pulsdauern wurden nur die Messpunkte eingeschlossen, die 10 % der Maximalamplitude (Anfangsmaximum) überschritten hatten.

Für die Behandlung im Organkulturmodell wurden Spotgrößen zwischen 100 und 200 μm verwendet und im Mausmodell konstante 50 μm . Die Verwendung von 200 μm großen Spots bei der Behandlung des Organkulturmodells beruhte auf früheren Studien unserer Arbeitsgruppe, die ebenfalls mit 200 μm durchgeführt wurden. Im Vergleich dazu sollte auch noch der Effekt einer kleineren Spotgröße untersucht werden, weshalb die 100 μm großen Spots als nächstkleinere verfügbare Größe gewählt wurden. Die applizierte Energie lag bei der Behandlung im Organkulturmodell zwischen 15 und 70 μJ und im Mausmodell zwischen 1 und 15 μJ .

3.6.2. Laserbehandlung im Organkulturmodell

Für die Laserbehandlung der Organkulturen wurden je 2 Explantate für Behandlung und Kontrolle aus einem Auge präpariert. Die Präparate wurden in einer 12-well Schale mit 1,5 ml frischem Organkulturmedium gelagert und auf einer Metallhalterung vor dem Laser platziert. Standardmäßig verläuft der Laserstrahl an der Spaltlampe horizontal, um in das Auge des Patienten zu gelangen. Im Falle der Organkulturexplantate wurde eine Spiegelapparatur an die Spaltlampe des Lasers angebracht, um den Laserstrahl vertikal abzulenken (Abb. 11). Die RPE-Integrität wurde mittels Spaltlampenuntersuchung geprüft. Der Laserstrahl wurde auf der Oberfläche des Präparates fokussiert und die Laserbehandlung gestartet.

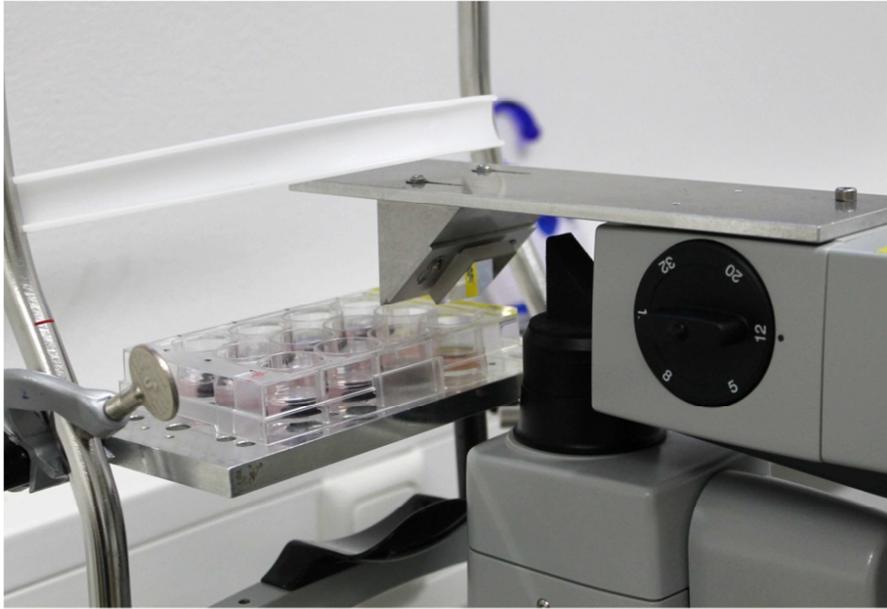


Abbildung 11: Laserbehandlung am Organkulturmodell. Das Organkulturexplantat wurde in einer 12-Well Schale über eine Spiegelapparatur an der Spaltlampe gelasert. Die RPE-Integrität wurde mittels Spaltlampenuntersuchung geprüft. Der Laserstrahl wurde auf der Oberfläche des Präparates fokussiert und die Laserbehandlung gestartet.

Für die Kultivierungsversuche zum Nachweis AMD-relevanter Zellmediatoren wurden drei unterschiedliche Laserbehandlungen durchgeführt. Die Begriffe „*Low density*“ und „*High density*“ wurden gewählt, um deutlich zu machen, dass die Anzahl der gesetzten Laserspots sich unterscheidet. Bei den drei unterschiedlichen Behandlungen handelte es sich um die Laserbehandlungen:

- a) mit großen 300 μm (TSR) bzw. 200 μm (SRT) Spots. Es wurden im Mittel 40 Spots für den TSR-Modus und 70 Spots für den SRT-Modus appliziert.
- b) mit kleinen 100 μm Spots in einer „*Low density*“-Behandlung, bei der kumulativ die gleiche Fläche wie in Behandlung a) gelasert wurde. Es wurden im Mittel 350 Spots für den TSR-Modus und 280 Spots für den SRT-Modus appliziert.
- c) mit kleinen 100 μm Spots in einer „*High density*“-Behandlung, bei der eine höhere Anzahl Spots appliziert wurden als in den beiden anderen Behandlungen. Es wurden im Mittel für beide Modi 550 Spots appliziert.

Im Anschluss an die Laserbehandlung wurden die Präparate wie beschrieben in die modifizierten Ussingkammern eingespannt und kultiviert.

3.6.3. Titration des RPE-Zellschadens

Vor der Kultivierung der Organkulturen und der Analyse der ausgeschütteten Zellmediatoren musste die Schwelle des RPE-Zellschadens titriert werden. Der Begriff der Zelltodschwelle bezeichnet die Leistung bzw. Energie bei der etwa 50 % der behandelten Zellen nach 24 h tot waren. Als „überschwellige“ Behandlung wird im Folgenden der Bereich bezeichnet, bei dem es zu einem 100 %-igen Zelltod nach 24 h kam.

Die Titration des RPE-Zellschadens war notwendig, da die Kultivierungsversuche für die TSR-Behandlung im subletalen Bereich, d.h. unter der Zelltodschwelle stattfinden sollten und für die SRT-Behandlung auf bzw. über der Zelltodschwelle. Dazu wurden wie beschrieben Explantate aus frischen Schweineaugen präpariert und mit dem Laser in dem jeweiligen Modus behandelt. Es wurden zunächst vier Markerläsionen im stark überschwelligen Bereich in einem Quadrat gesetzt. Diese waren auch ohne weitere Färbung als zerstörter RPE-bereich in der Spaltlampenuntersuchung sichtbar. Innerhalb dieses Bereichs wurden eine definierte Anzahl Testläsionen der gewünschten Leistung bzw. Energie appliziert, die für den Behandler nicht mehr direkt sichtbar waren (Abb. 12 a). Der Zellschaden wurde im Anschluss mittels Calceinfärbung bestimmt. Die Färbung wurde nach 1 h für die Untersuchung der Frühphase und nach 24 h für die Untersuchung der Spätphase durchgeführt. Die Dokumentation erfolgte fotografisch. Die Messung der Läsionsgrößen erfolgte semi-automatisch mittels AxioVision-Programm. Die Fläche toter Zellen wurde in Relation zu der maximal bestrahlten Fläche für die jeweilige Spotgröße gesetzt und in Prozent angegeben (Abb. 12 b).

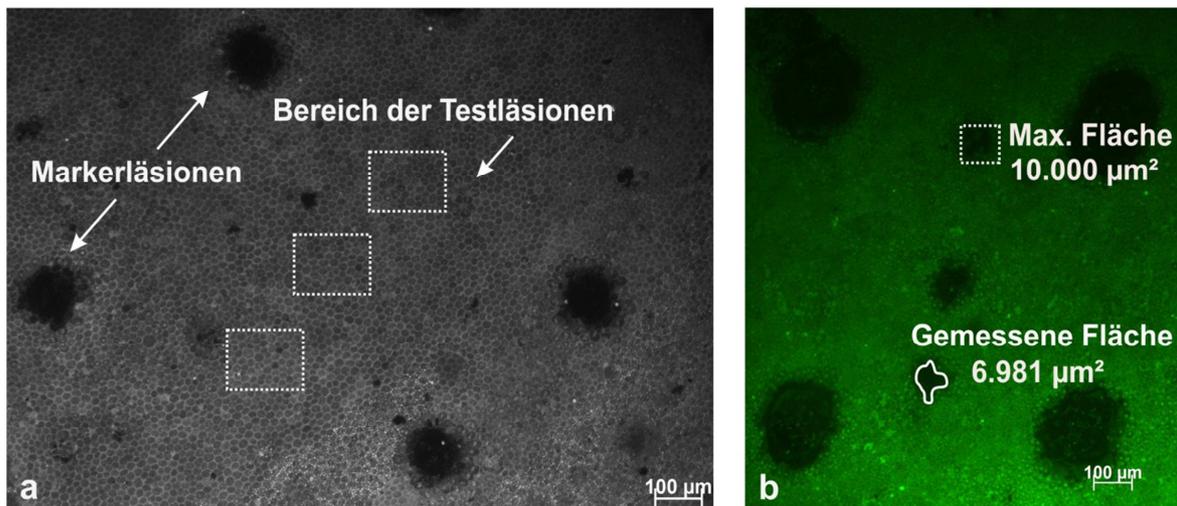


Abbildung 12: Titration des Zellschadens nach Laserbehandlung. Es wurden überschwellige Testläsionen appliziert, die sofort nach der Behandlung sichtbar wurden. Innerhalb dieses Bereichs wurden Testläsionen mit der gewünschten Leistung bzw. Energie appliziert (a). Eine Calceinfärbung wurde nach 1 und 24 h angeschlossen. Die Messung der Läsionsgröße erfolgte semi-automatisch. Die Fläche toter Zellen wurde in Relation zu der maximal bestrahlten Fläche, in diesem Falle $10.000 \mu\text{m}^2$, gesetzt.

Der Effekt der Laserbehandlung ist von Parametern wie z.B. der RPE-Pigmentierung abhängig. Um die Variabilität des Zelltods bei RPE-Zellen darzustellen, wurden alle applizierten Spots in die Charakterisierung einbezogen, auch wenn einige Spots zu keinem Zellschaden (0 %) führten. Der Bereich zwischen 0 und 100 % toter Zellen wird im Folgenden als Zelltodspanne angegeben. Des Weiteren wurde der Mittelwert der zerstörten Gewebereiche pro Leistung/Energie angegeben.

Für die Berechnung der effektiven ED_{50} -Dosis, definiert als die Laserenergie, bei dem 50 % der RPE Zellen zerstört wurden, wurde für den SRT-Modus eine Probitanalyse durch die Kooperationspartner des Medizinischen Laserzentrums Lübeck (MLL) durchgeführt.

3.6.4. Laserbehandlung in den AMD-Mausmodellen

Für die Laserbehandlung der AMD-Mäuse wurde ein kommerziell erhältlicher Laseraufsatz in die Micron III Kamera eingekoppelt. Die Mäuse wurden wie beschrieben in Narkose versetzt, die Pupillen dilatiert und ein Kontaktgel aufgetragen. Der Laser wurde über eine Kontaktoptik an das Auge angesetzt. Über die Kamera wurde ein Fundusbild generiert, auf dem der rote Teststrahl des Lasers zu erkennen war. In der Peripherie wurden zunächst Testläsionen erzeugt, die als weiße Verfärbungen der Retina im

Fundusbild zu erkennen waren (Abb. 13). Die Energie bzw. Leistung wurde stetig reduziert, bis zu dem Punkt, an dem nach einer Wartezeit von 3 sec gerade noch eine Weißfärbung zu erkennen war.

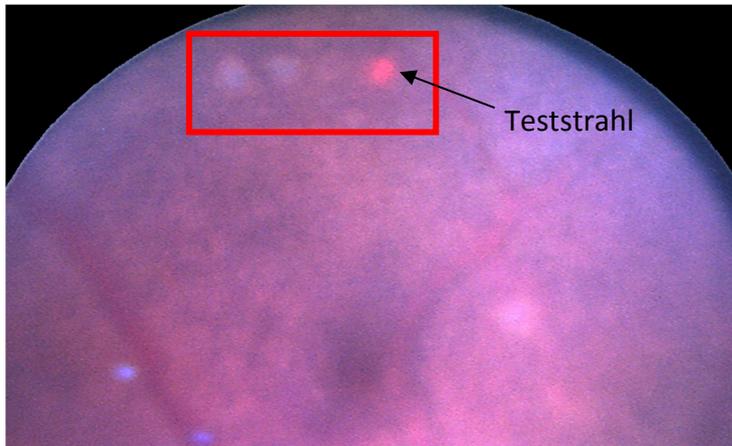


Abbildung 13: Laserbehandlung am Mauseuge. Dargestellt sind die Testläsionen in der Peripherie des Auges, bei denen mit abnehmender Energie/Leistung (von links nach rechts) behandelt wurde. Der rote Teststrahl zeigt die Position des Lasers an.

In Anlehnung an die Arbeiten von Lavinsky *et al.* 2016 wurde die Leistung bzw. Energie von der letzten funduskopisch sichtbaren Läsion um 70 % reduziert. Im Folgenden wurde mit 30 % der letzten funduskopisch sichtbaren Läsionsstärke der gesamte zentrale Bereich um den Sehnerv behandelt. Die subletalen Behandlungsspot waren weder im Fundusbild noch in der OCT oder FAG zu erkennen.

Die Bezeichnung des sogenannten Interspotabstandes beschreibt im Folgenden wie groß der Abstand zwischen den einzelnen Behandlungsspot ist. Ein Interspotabstand von 1 bedeutet demnach, dass ein Behandlungsspot appliziert wird, dann der Zielstrahl versetzt wird und zwischen dem ersten applizierten Spot und dem weiteren applizierten Spot eine Spotbreite dazwischen liegt. Es wurden zwei Behandlungsmodi („*High density*“ und „*Low density*“) verwendet, die zur Etablierung des optimalen Behandlungsregimes dienten:

1. Behandlungsmodus „*High density*“:
 - a. TSR-Laser: 1 Spot Interspotabstand, 30 ms Pulsdauer
 - b. SRT-Laser: 1 Spot Interspotabstand, 300 ms Behandlungsdauer, 500 Hz Frequenz, 150 Pulse
2. Behandlungsmodus „*Low density*“:
 - a. TSR-Laser: 2 Spots Interspotabstand, 10 ms Pulsdauer
 - b. SRT-Laser: 2 Spots Interspotabstand, 300 ms Behandlungsdauer, 100 Hz Frequenz, 30 Pulse

Durch die Verwendung unterschiedlicher Pulsdauern sollte die optimale Behandlung mit dem stärksten Effekt gefunden werden. Für die subletale Behandlung im TSR-Modus wurden von anderen Arbeitsgruppen mit 20 ms behandelt (Lavinsky *et al.* 2016). Um sich in diesem Bereich zu bewegen wurden 10 und 30 ms von unserer Arbeitsgruppe gewählt.

Für die Behandlung mit der gepulsten Methode wurde sich für den *High density*-Modus auf Angaben zur Anzahl der Pulse aus früheren Arbeiten (J. Roider *et al.* 1993) bezogen. Im Gegensatz dazu sollte die heute etablierte SRT mit den Einstellungen der *Low density*-Behandlung angewandt werden (Treumer *et al.* 2012).

3.7. Statistik

Alle aufgeführten Experimente wurden an mindestens drei biologischen Replikaten durchgeführt. In den aufgeführten Balkendiagrammen ist der Mittelwert mit der Standardabweichung (STABW) oder dem Standardfehler des Mittels (SEM) aufgeführt.

Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit dem t-Test nach Student und dem ANOVA-Test über das Programm SPSS Version 23. Es wurde jeweils gegen die gepaarten unbehandelten Kontrollen gerechnet. Ein Wert von $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet.

Für die Berechnung der effektiven ED₅₀-Dosis, definiert als die Laserenergie, bei dem 50 % der RPE Zellen zerstört wurden, wurde für eine Probitanalyse durch die Kooperationspartner des MLL durchgeführt.

Die statistische Fallzahlberechnung für die Verwendung von Versuchstieren wurde von Frau Dr. Amke Caliebe vom Institut für Medizinische Informatik und Statistik in Kiel durchgeführt.

4. ERGEBNISSE

4.1. Charakterisierung des Organkultursystems

Die Kultivierung von Organkulturen wurde über einen Zeitraum von 4 Tagen durchgeführt, da sich die Qualität der Organkulturen in diesem Zeitrahmen als stabil erwies. Ausschließlich Gewebeexplantate, die nach der Calceinfärbung am Tag 4 eine RPE-Vitalitätsrate von mindestens 90 % pro Explantat aufwiesen, wurden in die weitere Studie eingeschlossen. Das Ringsystem der modifizierten Ussingkammern, welches in dieser Arbeit verwendet wurde, verfügte über eine größere Expositions- und eine geringere Fixationsfläche des Gewebes, als die bisher an unserer Klinik verwendeten Systeme. Bei der Verwendung eines älteren Organkultursystems in unserer Arbeitsgruppe wurde ermittelt, dass 35,4 % der kultivierten Ringe von ausreichender Qualität waren. Die Modifikationen des aktuellen Systems führten zu einer Steigerung des Vitalitätsanteils. Mit dem modifizierten System wiesen 64,2 % der Explantate am Ende des Kultivierungszeitraumes einen Vitalitätsanteil von ≥ 90 % auf und wurden in die Studie eingeschlossen.

Die Integrität des Organkultursystems wurde durch den Einsatz des Farbstoffs Brilliantblau G getestet, welcher mit dem Nährmedium in das basolaterale Kompartiment der modifizierten Ussingkammern appliziert wurde. Eine mögliche Passage des Farbstoffs von der basolateralen zur apikalen Seite wurde durch die photometrische Messung des Farbstoffes bei $\lambda=584$ nm gegen das Organkulturmedium als Leerwert analysiert. An drei biologischen Replikaten zeigte sich ein durchschnittlicher Übergang des Farbstoffes von der basalen zur apikalen Seite des Organkultursystems von 1,1 %. Dieser Anteil wurde als marginal erachtet und die modifizierten Ussingkammern als zuverlässig beurteilt.

4.2. Vermessung von SRT-Laserpulsen

Die Dauer und Signalform der Pulse variiert in Abhängigkeit von der gewählten Energie. In Abb. 14 ist der zeitliche Pulsverlauf bei unterschiedlichen Energien an der Laserspaltlampe bei 100 μm und 200 μm Spotgröße aufgetragen. Es zeigte sich dabei zu

Beginn des Pulses ein Anfangsmaximum der Kurve, welches $0,25 \mu\text{s}$ andauerte und ab $20 \mu\text{J}$ eine gleichbleibende Spitzenintensität aufwies. Bei einer Erhöhung der Energie auf über $20 \mu\text{J}$, zeigte sich die Bildung einer sogenannten „Schulter“ des Pulses, welche zu einer entsprechenden Verlängerung der Pulsdauern führte. Die Länge der Schulter nahm mit steigender Energie zu und führte zu einer Verlängerung der Pulse bis zu $3 \mu\text{s}$.

Die Pulse für die SRT-Kultivierungsversuche mit $200 \mu\text{m}$ Spotgröße waren demnach länger, als die Pulse bei der Behandlung mit $100 \mu\text{m}$ Spotgröße, welches bei der Beurteilung der Ergebnisse relevant sein könnte.

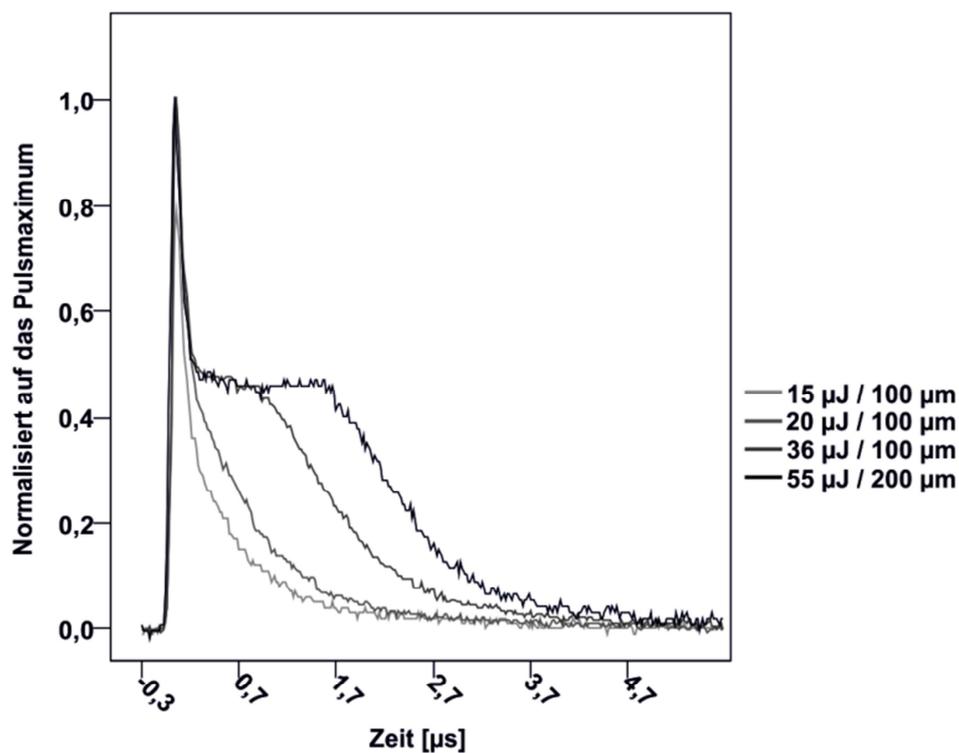


Abbildung 14: Dauer und Signalformen von Laserpulsen im zeitlichen Verlauf unter Verwendung unterschiedlicher Spotgrößen und Energien. Die Pulsdauer ist in Mikrosekunden (μs) und die Energie in Mikrojoule (μJ) angegeben. Es zeigte sich ein Anfangsmaximum der Pulse mit einer Dauer von $0,25 \mu\text{s}$, welches ab $20 \mu\text{J}$ eine gleichbleibende Spitzenqualität aufweist. Ab einer Energie von $20 \mu\text{J}$ beginnt die Ausbildung einer Pulsschulter, welche zur Verlängerung der Pulsdauern auf mehrere Mikrosekunden führt.

In Tabelle 21 sind die gemessenen Pulsdauern für die variierenden Energien und Spotgrößen dargestellt.

Tabelle 21: Messung der Pulsdauern bei variierenden Pulsenergien und Spotgrößen.

Eingestellte Pulsenergie	Gemessene Pulsenergie	Eingestellte Spotgröße	Gemessene Pulsdauer
15 μJ	15,9 μJ	100 μm	1,04 μs
20 μJ	21,1 μJ	100 μm	1,36 μs
30 μJ	32,6 μJ	100 μm	2,00 μs
36 μJ	37,6 μJ	100 μm	2,40 μs
40 μJ	42,9 μJ	200 μm	2,66 μs
55 μJ	57,7 μJ	200 μm	3,04 μs

4.3. Titration des RPE-Zellschadens nach Laserbehandlung

Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit ist der Effekt stimulierender Laserbehandlungen auf den Komplex aus Aderhaut, RPE und Choroidea. Es ist daher von zentraler Bedeutung mit welcher Intensität die Gewebe bestrahlt werden und welcher Zellschaden dabei verursacht wird. Mit Hilfe der Titrationsergebnisse konnte für die TSR-Behandlung der subletale Bereich bestimmt werden, d.h. die geeignete Leistung für eine Behandlung unter der Zelltodschwelle und für die SRT-Behandlung der Bereich auf bzw. über der Zelltodschwelle (siehe 3.6.3). Im Folgenden sind die Titrationsergebnisse für beide Lasermodi aufgeführt. Der Bereich zwischen 0 und 100 % toter Zellen wird im Folgenden als Zelltodspanne angegeben. Des Weiteren wurde der Mittelwert der zerstörten Gewebebereiche pro Leistung/Energie angegeben.

4.3.1. Titration des RPE-Zellschadens nach TSR-Behandlung

Die Titration des RPE-Zellschadens wurde für eine Spotgröße von 100 und 300 μm nach 1 h und 24 h mittels Calceinfärbung durchgeführt. Die Wahl der Spotgröße im Organkulturmodell beruhte darauf, dass möglichst unterschiedliche Parameter gewählt werden sollten, um die Proteinsekretion nach der Verwendung unterschiedlicher

Spotgrößen zu vergleichen. Es wurde kein RPE-Schaden induziert, der zu einer unmittelbar sichtbaren Schädigung der RPE-Zellen während der Laserbehandlung führte. Bei einer Spotgröße von 300 µm (Tab. 22) und einer Leistung von 45 mW lagen die Zelltodspannen nach 1 h und 24 h zwischen 0-8 % und der mittlere Zelltod bei 1 bzw. 2 %. Nach Behandlung mit 65 mW lag die Zelltodspanne in der Frühphase bei 4-34 % und im Mittel bei 23 %. In der Spätphase lag die Zelltodspanne leicht erhöht zwischen 8-39 % mit einem Mittel von 22 %. Eine TSR-Behandlung mit 80 mW führte zu einer Zelltodspanne von 38-70 % und einem mittleren Zelltod von 51 % nach 1 h sowie einer ähnlichen Zelltodspanne von 31-69 % und einem Mittel von 48 % nach 24 h. Eine Leistung von 100 mW resultierte in einer Zelltodspanne von 31-80 % und einem mittleren Zelltod von 46 % nach 1 h. In der Spätphase zeigte sich eine Zelltodspanne von 65-100 % und einem mittleren Zelltod von 85 %. Insgesamt führte die Erhöhung der Leistung zu einer steigen Zunahme des Zelltods. Die Zelltodschwelle für die Kultivierungsversuche mit 300 µm Spots wurde auf 80 mW, 100 ms festgelegt, da bei dieser Leistung im Mittel 51 bzw. 48 % der Zellen zerstört wurde. Für die unterschwellige TSR-Laserbehandlung der Organkulturen wurde für die Behandlung mit 300 µm Spots eine Leistung von 45 mW, 100 ms gewählt.

Tabelle 22: Titration des Zellschadens nach TSR-Laserbehandlung mit 300 µm Spots. Aufgeführt sind der Zeitpunkt der Calceinfärbung nach Laserbehandlung, die Leistung der Laserpulse, die Anzahl der gesetzten Spots, die Zelltodspanne und der Mittelwert der zerstörten Gewebebereiche. Die Spotgröße betrug 300 µm und die Pulsdauer 100 ms.

TSR-Modus	300 µm Spotgröße			
	Leistung (mW), 100 ms			
	45	65	80	100
Frühphase 1 Stunde nach TSR				
Anzahl der Spots	6	6	7	12
Zelltodspanne	0-8 %	4-34 %	38-70 %	31-80 %
Mittelwert	1 %	23 %	51 %	46 %
Spätphase 24 Stunden nach TSR				
Anzahl der Spots	8	10	11	12
Zelltodspanne	0-8 %	8-39 %	31-69 %	65-100 %
Mittelwert	2 %	22 %	48 %	85 %

Bei einer Spotgröße von 100 µm (Tab. 23) und einer Leistung von 15 mW lag die Zelltodspanne nach 1 h zwischen 0-32 % und der mittlere Zelltod bei 16 %. In der Spätphase resultierte diese Behandlung in eine Zelltodspanne von 0-28 % und einem mittleren Zelltod von 11 %. Nach der TSR-Behandlung mit 25 mW lag die Zelltodspanne in der Frühphase bei 0-61 % und im Mittel bei 28 %. In der Spätphase lag die Zelltodspanne bei 24-98 % mit einem Mittel von 60 %. Die Behandlung mit 35 mW führte in der Früh- und Spätphase zu einem 100 %-igen Tod der RPE-Zellen. Insgesamt führte die Erhöhung der Leistung zu einer steigen Zunahme des Zelltods. Die Titration der Zelltodschwelle für die Behandlung mit 100 µm Spots ergab eine Leistung von 25 mW, 100 ms als Schwellenwert, woraufhin die unterschwelligeren Kultivierungsversuche mit 15 mW, 100 ms durchgeführt wurden.

Tabelle 23: Titration des Zellschadens nach TSR-Laserbehandlung mit 100 µm Spots. Aufgeführt sind der Zeitpunkt der Calceinfärbung nach Laserbehandlung, die Leistung, die Anzahl der gesetzten Spots, die Zelltodspanne und der Mittelwert der zerstörten Gewebereiche. Die Spotgröße betrug 100 µm und die Pulsdauer 100 ms.

TSR-Modus	100 µm Spotgröße		
	Leistung (mW), 100 ms		
	15	25	35
Frühphase 1 Stunde nach TSR			
Anzahl der Spots	7	7	20
Zelltodspanne	0-32 %	0-61 %	100 %
Mittelwert	16 %	28 %	100 %
Spätphase 24 Stunden nach TSR			
Anzahl der Spots	11	23	12
Zelltodspanne	0-28 %	24-98 %	100 %
Mittelwert	11 %	60 %	100 %

4.3.2. Titration des RPE-Zellschadens nach SRT-Behandlung

Die Titration des RPE-Zellschadens wurde für die Spotgrößen von 100 µm und 200 µm in der Spätphase nach 24 h durchgeführt. Die Verwendung von 200 µm großen Spots bei der Behandlung des Organkulturmodells beruhte auf früheren Studien unserer Arbeitsgruppe,

die ebenfalls mit 200 µm durchgeführt wurden. Im Vergleich dazu sollte auch noch der Effekt einer kleineren Spotgröße untersucht werden, weshalb die 100 µm großen Spots als nächstkleinere verfügbare Größe gewählt wurden. Die Energiedichten sind im Folgenden in mJ/cm² pro Puls angegeben. Es wurde kein RPE-Schaden induziert, der zu einer unmittelbar sichtbaren Schädigung der RPE-Zellen während der Laserbehandlung führte. Neben der Zelltodspanne und dem mittleren Zelltod wurde die effektive ED₅₀-Dosis über eine Probit-Analyse bestimmt.

Die Steigerung der Pulsenergien führte zu einer Erhöhung der Zelltodschwelle, wie in den folgenden Tabellen aufgeführt ist.

Bei einer Spotgröße von 100 µm (Tab. 24) und einer Energiedichte von 150 mJ/cm² lag die Zelltodspanne nach 24 h zwischen 0-37 % und der mittlere Zelltod bei 2 %. Nach der SRT-Behandlung mit 180 mJ/cm² lag die Zelltodspanne zwischen 0 und 100 % mit einem Mittel von 59 %. SRT-Pulse mit Energiedichten von 200-220 mJ/cm² führten in allen applizierten Spots zu einem 100 %-igen Zelltod. Die Probitanalyse ergab einen ED₅₀-Wert von 180 mJ/cm² für die Behandlung mit einer Spotgröße von 100 µm.

Tabelle 24: Titration des Zellschadens nach SRT-Laserbehandlung mit 100 µm Spots. Aufgeführt sind der Zeitpunkt nach Laserbehandlung, die Energiedichte, die Anzahl der gesetzten Spots, die Zelltodspanne und der Mittelwert der zerstörten Gewebereiche. Die Spotgröße betrug 100 µm, die Behandlungsdauer 300 ms, die Frequenz 100 Hz und die Anzahl der Pulse 30.

SRT-Modus	100 µm Spotgröße			
	Energiedichte (mJ/cm ²)			
	150	180	200	220
Spätphase 24 Stunden nach SRT				
Anzahl der Spots	25	37	39	25
Zelltodspanne	0-37 %	0-100 %	100 %	100 %
Mittelwert	2 %	59 %	100 %	100 %

Bei einer Spotgröße von 200 µm (Tab. 25) wurde durch die Behandlung mit einer Energiedichte von 120 mJ/cm² kein Zellschaden induziert. Nach der SRT-Behandlung mit 140 mJ/cm² lag die Zelltodspanne zwischen 0 und 87 % mit einem Mittel von 50 %. SRT-Behandlungen mit Energiedichten von 180 mJ/cm² führten zu einer Zelltodspanne von

60-100 % und einem mittleren Zelltod von 92 %. Die Probitanalyse ergab einen ED₅₀-Wert von 136 mJ/cm² für die Behandlung mit einer Spotgröße von 200 µm.

Tabelle 25: Titration des Zellschadens nach SRT-Laserbehandlung mit 200 µm Spots. Aufgeführt sind der Zeitpunkt der Calceinfärbung nach Laserbehandlung, die Energiedichte, die Anzahl der gesetzten Spots, die Zelltodspanne und der Mittelwert der zerstörten Gewebebereiche. Die Spotgröße betrug 200 µm, die Behandlungsdauer 300 ms, die Frequenz 100 Hz und die Anzahl der Pulse 30.

SRT-Modus	200 µm Spotgröße		
	Energiedichte (mJ/cm ²)		
	120	140	180
Spätphase 24 Stunden nach SRT			
Anzahl der Spots	26	29	26
Zelltodspanne	0 %	0-87 %	60-100 %
Mittelwert	0 %	50 %	92 %

Für die Kultivierungsversuche und Zytokinanalyse der Organkulturen nach SRT-Laserbehandlung wurde für die Spots mit 100 µm Kantenlänge mit 200 mJ/cm² und für die 200 µm Spots mit 140 mJ/cm² behandelt.

4.4. RPE-Regeneration nach SRT-Laserbehandlung

Das Ziel der SRT-Behandlung ist die selektive Zerstörung von RPE-Zellen. Um den Regenerationsprozess nach der SRT-Laserbehandlung zu beschreiben, wurden die Explantate mittels Calceinfärbung nach 1 und 4 Tagen untersucht.

Wie in Abb. 15 dargestellt, zeigte sich nach 24 h der SRT-Effekt auf die RPE-Zellen, welche in dem behandelten Areal zerstört wurden (Abb. 15 a). Im Laufe des Regenerationsprozesses verschlossen die RPE-Zellen vom Rande aus die induzierte Läsion. Diese Zellen zeigten eine vergrößerte und irreguläre Zellform mit prominenten Zellkernen. Fünf bis 14 % dieser regenerativen Zellen zeigten 2 Zellkerne (Abb. 15 b, Pfeil). Nach 4 Tagen wurde die Läsion durch die RPE-Regeneration wieder vollständig verschlossen (Abb. 15 b).

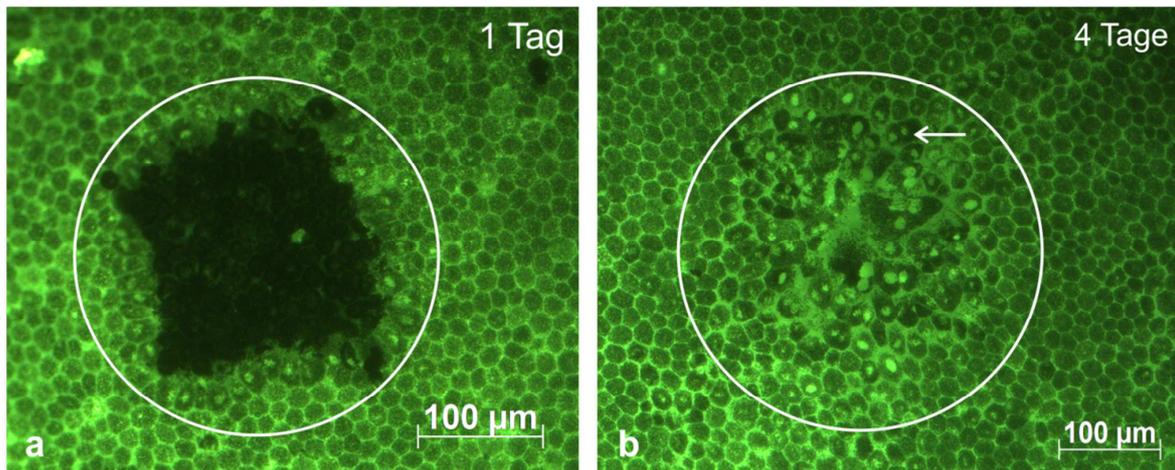


Abbildung 15: Regenerationsprozess von RPE-Zellen nach Selektiver Retina-Therapie (SRT) in der Calceinfärbung. Ein Tag nach der Laserbehandlung mit einer Energiedichte von 140 mJ/cm^2 pro Puls und einer Spotgröße von $200 \mu\text{m}$ zeigte sich in der Calceinfärbung der selektive Zerstörungseffekt der SRT auf die RPE-Zellen (a). Vier Tage nach SRT-Behandlung wurde der Defekt in der RPE-Schicht durch die Regeneration der RPE-Zellen verschlossen. Es zeigten sich dabei vergrößerte und irregulär geformte Zellen mit auffälligen und doppelten Zellkernen (Pfeil, b).

Zur weiteren Charakterisierung des Regenerationsprozesses wurde die Zellzahl und -größe der Zellen innerhalb der behandelten Region bestimmt.

Es zeigte sich, dass die Zellzahl in der behandelten Fläche ($0,04 \text{ mm}^2$) kontinuierlich und signifikant zwischen den Untersuchungstagen anstieg (Tag 2-4, $p < 0,01$). Die RPE-Zellzahl in den unbehandelten Bereichen wurde als Basis-Zellzahl mit 133 Zellen ($\text{SEM} \pm 6$) pro $0,04 \text{ mm}^2$ definiert. Zwei Tage nach SRT befanden sich 8 % (11 Zellen, $\text{SEM} \pm 2$) der RPE-Zellen in dem behandelten Areal verglichen mit der Basis-Zellzahl. Nach 3 Tagen zeigte die Zellzahlanalyse einen Anstieg der Zellzahl auf 37 % (50 Zellen, $\text{SEM} \pm 3$) und 53 % (70 Zellen, $\text{SEM} \pm 3$) nach 4 Tagen im Vergleich zu der Basiszellzahl (Abb. 16 a).

Die Zellzahl in dem behandelten Areal erreichte auch nach Verschließen der Läsion nicht die Höhe der Basis-Zellzahl in den unbehandelten Arealen. Es zeigte sich jedoch eine signifikante Zunahme der Zellgröße auf das 2,4-fache ($874 \mu\text{m}$, $\text{SEM} \pm 98$, $p < 0,01$) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($360 \mu\text{m}$, $\text{SEM} \pm 32$) an Tag 4 nach SRT (Abb. 16 b).

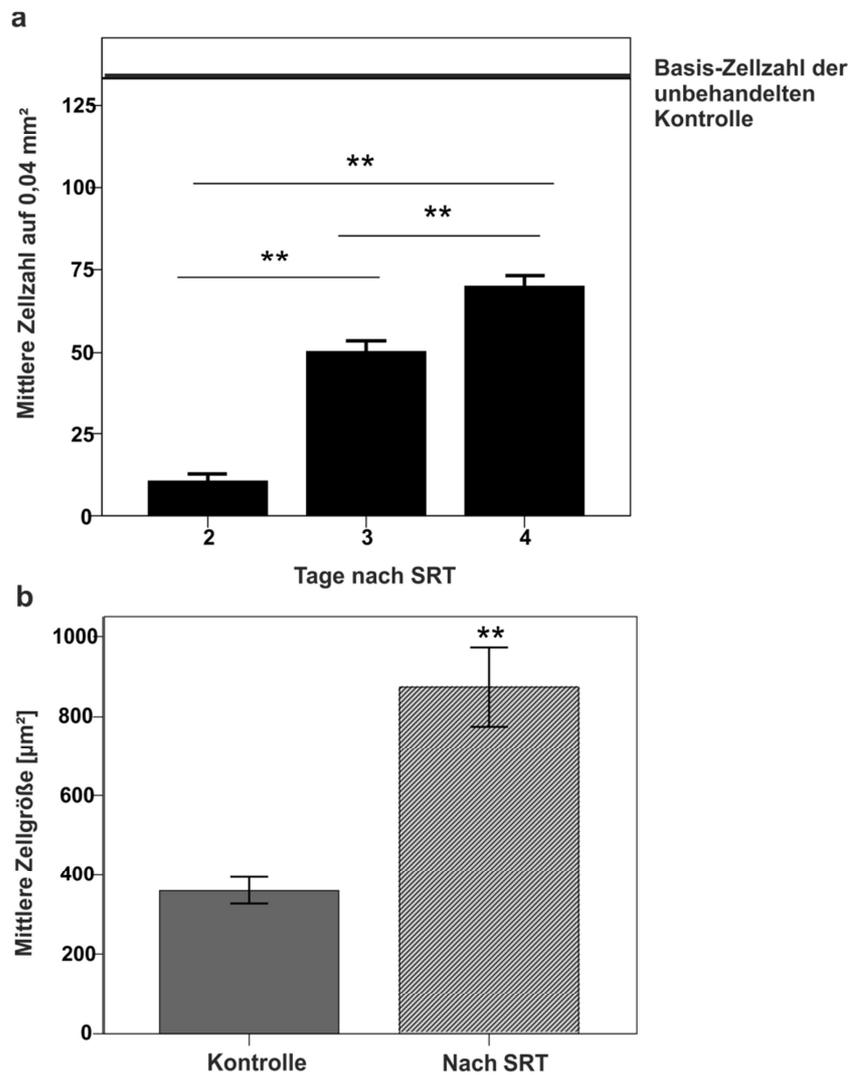


Abbildung 16: Variation der Zellzahl und –größe nach Selektiver Retina-Therapie (SRT). Die mittlere Zellgröße ist in $\mu\text{m} \pm \text{SEM}$ angegeben. Im Laufe der Regeneration des retinalen Pigmentepithels (RPE) nahm die Zellzahl in dem behandelten Bereich zu. Zwei Tage nach SRT-Behandlung waren 8 % der RPE-Zellen in dem behandelten Bereich vorhanden, verglichen mit der Basis-Zellzahl (133 Zellen $\text{SEM} \pm 6$). Drei Tage nach SRT-Behandlung stieg die Zellzahl auf 37 %. Vier Tage nach Laserbehandlung stieg die Zellzahl in dem behandelten Bereich auf 53 % verglichen mit der Basis-Zellzahl (a). Vier Tage nach SRT-Behandlung stieg die mittlere Zellgröße innerhalb des regenerierten Bereichs um das 2,4-fache im Vergleich zu den unbehandelten RPE-Zellen (b, ** $p < 0,01$).

Die immunhistologische Untersuchung der Organkultur-*flat mounts* zeigte, dass die Zellen im Bereich der SRT-Behandlung ein positives Signal für den Proliferationsmarker Ki-67 aufwiesen, wohingegen die unbehandelten Zellen kein Signal für Ki-67 zeigten. Die regenerierenden Zellen zeigten somit mitotische Aktivität (Abb. 17).

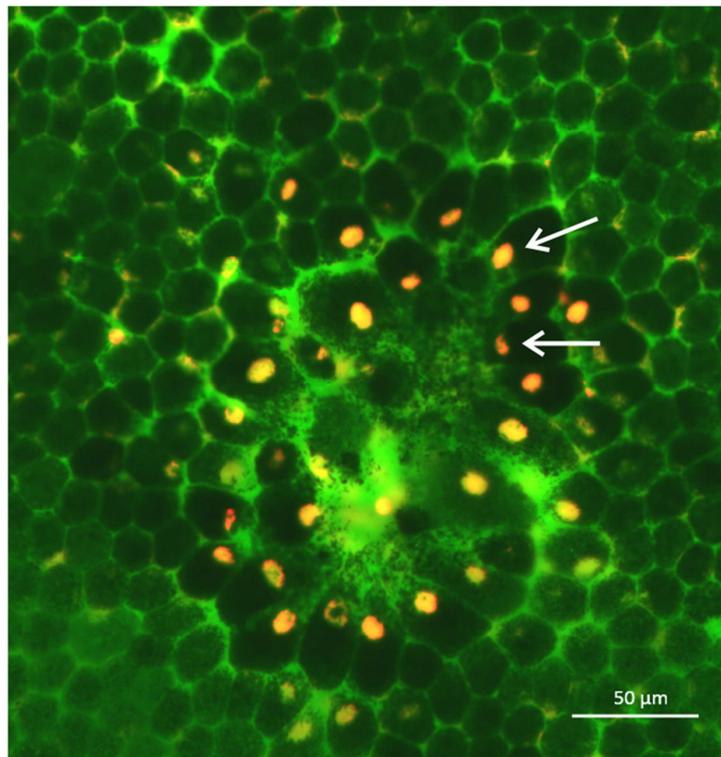


Abbildung 17: Immunfluoreszenzfärbung des Proliferationsmarkers Ki-67 in Organkultur-*flat mounts* 3 Tage nach Selektiver Retina-Therapie (SRT). Es zeigte sich ein lokalisiertes positives Signal (Pfeile) des Proliferationsmarkers Ki-67 (orange) in den Zellen des retinalen Pigmentepithels (RPE), die eine SRT-induzierte Läsion (200 μm Spots, 140 mJ/cm² pro Puls) verschlossen. Die umgebenen RPE-Zellen zeigten kein Signal für Ki-67.

4.5. Sekretion und Expression AMD-relevanter Zellmediatoren

Im Folgenden wird der Einfluss beider Laserverfahren auf die Sekretion AMD-relevanter Zellmediatoren dargestellt. Dazu gehören u.a. inflammatorische Zytokine und MMPs, welche am ständigen Umbau der Extrazellulärmatrix in der BrM beteiligt sind. Des Weiteren wurde die Sekretion des VEGF untersucht, welcher als wichtigster pro-angiogener Faktor bei der CNV-Entstehung im Rahmen der feuchten AMD gilt sowie dessen Antagonist, das anti-angiogen wirkende PEDF.

Aufbauend auf den Untersuchungen zur Induktion eines AMD-relevanten Zytokinprofils wurde geprüft, ob sich Unterschiede in der Zytokinsekretion nach der Behandlung mit großen bzw. kleinen Laserspots zeigten und ob die Dichte der gesetzten Spots eine Rolle bei der Sekretion spielt. Dazu wurde die Zellantwort nach der Behandlung mit unterschiedlichen Spotgrößen und -dichten verglichen.

4.5.1. Die Induktion von MMPs durch Laserbehandlungen

Im nachfolgenden Abschnitt werden die Ergebnisse zur Induktion der MMP-2 und -9 nach der Behandlung mit TSR und SRT, unter Verwendung unterschiedlicher Spotgrößen und -dichten, aufgeführt.

4.5.1.1. MMP-Induktion nach SRT-Behandlung

Der Einfluss der SRT-Behandlung auf die Sekretion bzw. Expression von MMPs wurde mittels Zymographie und Immunhistochemie analysiert.

MMP-Sekretion

Untersucht wurden die basolateralen Überstände aus den modifizierten Ussingkammern, um den Einfluss der SRT auf den basalen Komplex aus BrM und Choroidea zu analysieren. Es wurden die Überstände von Tag 4 der Kultivierung nach SRT aufgetragen und mit den gepaarten unbehandelten Kontrollen verglichen. Ein repräsentatives Zymographiegel für den MMP-Nachweis in gelaserten und unbehandelten Explantaten ist in Abb. 18 aufgeführt. Pro-MMP-9 (98 kDa) konnte in allen basolateralen Kompartimenten nachgewiesen werden, wohingegen aktives MMP-9 in keiner der Proben detektiert werden konnte. Pro-MMP-2 (65 kDa) und aktives MMP-2 (56 kDa) konnten ebenfalls in allen basolateralen Überständen nachgewiesen werden. Das Zymogram zeigt die Induktion von aktivem MMP-2 nach SRT-Behandlung (200 µm Spotgröße), verglichen mit der Kontrolle. Aufgrund des Zusatzes von 5 % FCS in dem Organkulturmedium, welches für die Vitalität der Kulturen benötigt wurde, zeigt die Mediumkontrolle eine geringfügige Hintergrundaktivität von Pro-MMP-2.

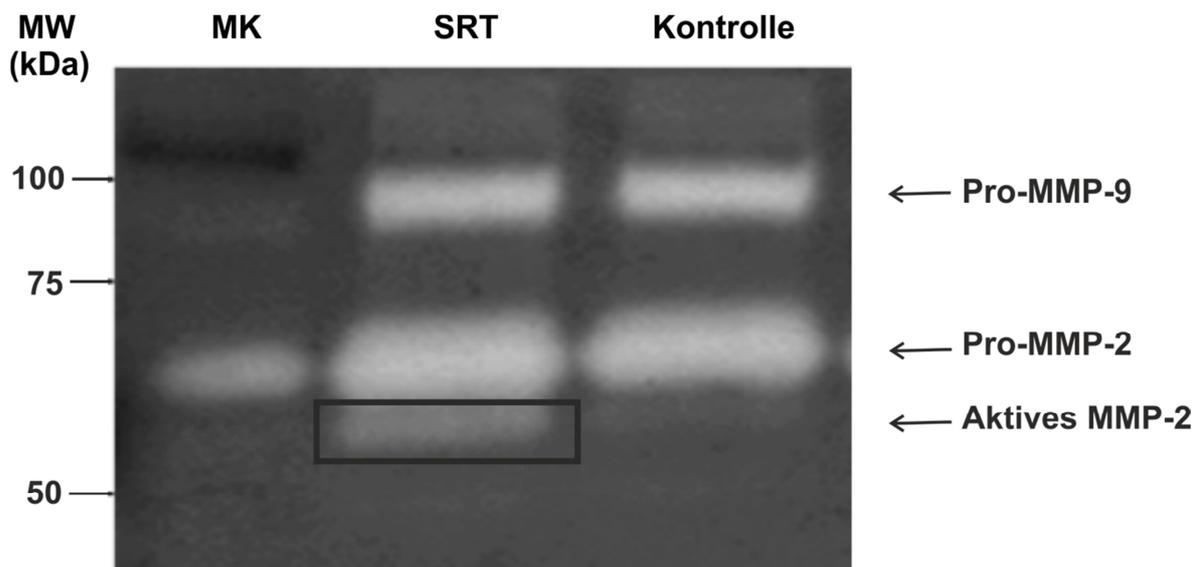


Abbildung 18: Basolaterale Sekretion von Matrixmetalloproteasen (MMPs) an Tag 4 nach Selektiver Retina-Therapie (SRT) in der Zymographie. Untersucht wurden die basolateralen Überstände der modifizierten Ussingkammern von SRT-behandelte Organkulturexplantaten und unbehandelten Kontrollen. Eine Mediumkontrolle (MK) wurde mitgeführt. Die Größe der Proteine ist in Kilodalton (kDa) angegeben. Pro-MMP-9 (98 kDa), Pro-MMP-2 (65 kDa) und aktives MMP-2 (56 kDa) konnte in allen Proben nachgewiesen werden. Aktives MMP-9 konnte in keiner der Proben detektiert werden. Aufgrund des Zusatzes von 5 % FCS im Organkulturmedium zeigt die MK eine geringfügige Hintergrundaktivität von Pro-MMP-2. Das Zymogram zeigt die Induktion von aktivem MMP-2 nach SRT-Behandlung (200 μm Spotgröße, 140 mJ/cm^2 pro Puls, etwa 70 Spots pro Explantat), verglichen mit der unbehandelten Kontrolle.

Die Induktion der MMP-Sekretion als Zellantwort auf die Laserbehandlung wurde nach der Behandlung mit unterschiedlichen Spotgrößen und -dichten verglichen. Es wurden drei verschiedene Arten der SRT-Behandlung durchgeführt, mit a) großen 200 μm Spots, b) kleinen 100 μm Spots „*Low density*“ und c) kleinen 100 μm Spots „*High density*“. Die kumulativ behandelte Fläche der *Low density*-Gruppe entsprach der gleichen Fläche wie in der Behandlung mit den großen Spots, wohingegen die Fläche in der *High density*-Behandlung größer war. Die MMP-Sekretion ist im Folgenden als x-faches der unbehandelten Kontrolle (\pm SEM) angegeben.

An Tag 4 der Kultivierung mit 100 μm Spots und einer *Low density*-Behandlung zeigte sich kein Unterschied zwischen der gelaserten und unbehandelten Gruppe. Der Gehalt von Pro-MMP-9 lag bei dem 1,05-fachen (\pm 0,09) der unbehandelten Kontrolle, von Pro-MMP-2 bei dem 0,99-fachen (\pm 0,06) und 1,03-fachen (\pm 0,14) im Fall des aktiven MMP-2 (Abb. 19).

Im Vergleich dazu wurde in der *High density*-Gruppe mit 100 µm Spots ein moderater, aber signifikanter 1,28-facher ($\pm 0,07$, $p < 0,05$) Anstieg des aktiven MMP-2 beobachtet. Die Sekretion des Pro-MMP-9 (1,02-fach $\pm 0,07$) und Pro-MMP-2 (1,01-fach $\pm 0,04$) wurden nicht moduliert (Abb. 19).

Vier Tage nach der Behandlung mit 200 µm Spots lag die Sekretion des pro-MMP-9 bei dem 1,10-fachen ($\pm 0,05$) der Kontrolle. Die Sekretion des Pro-MMP-2 zeigte keinen Unterschied zur Kontrolle (1,05-fach $\pm 0,04$). Im Kontrast dazu, stieg das aktive MMP-2 signifikant auf das 1,75-fache ($\pm 0,21$, $p < 0,01$) der unbehandelten Kontrolle an.

Die Zymographie zeigte, dass die Sekretion des aktiven MMP-2 in Abhängigkeit von der Spotgröße und -dichte induziert wird (Abb. 19).

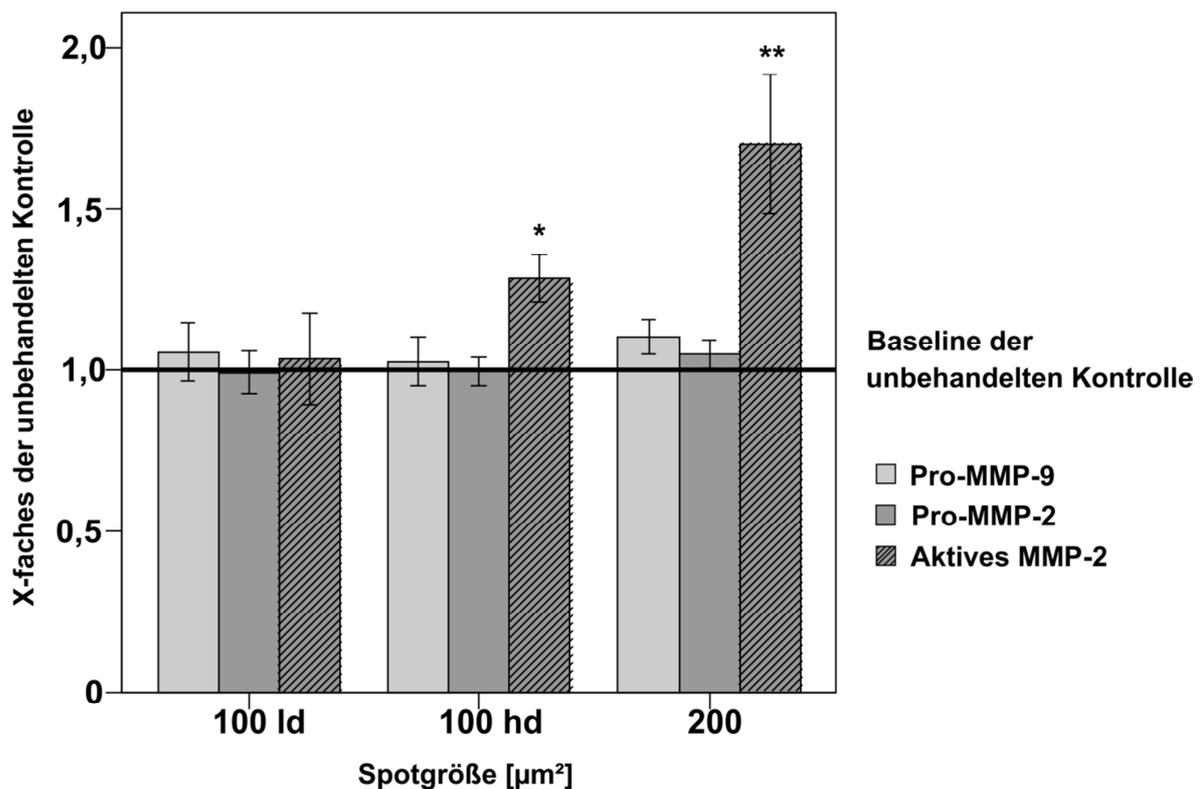


Abbildung 19: Sekretion der Matrixmetalloproteasen (MMP)-2 und -9 nach Selektiver Retina-Therapie (SRT) mit unterschiedlichen Spotgrößen und -dichten. Die Organkultur-Explantate wurden mit dem SRT-Laser behandelt oder als unbehandelte Kontrollen in den modifizierten Ussingkammern kultiviert. Der MMP-Gehalt in den untersuchten Organkulturüberständen ist als x-faches (\pm SEM) der unbehandelten Kontrolle angegeben. An Tag 4 der Kultivierung mit 100 µm Spots und einer *Low-density*-Behandlung (Id; 200 mJ/cm² pro Puls) zeigte sich kein Unterschied zwischen gelaserten und unbehandelten Proben. In der *High-density*-Gruppe (hd) mit 100 µm Spots zeigte sich ein signifikanter Anstieg des aktiven MMP-2. Die Sekretion des Pro-MMP-9 und -2 wurden nicht moduliert. Nach der Behandlung mit 200 µm Spots (140 mJ/cm² pro Puls) stieg das aktive MMP-2 signifikant an im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, wohingegen die Sekretion des Pro-MMP-9 und -2 unbeeinflusst blieb (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

MMP-Expression

Die Lokalisation der SRT-induzierten MMP-2 Expression nach der Behandlung mit 200 μm Spots wurde mittels Immunhistochemie an Organkultur-*flat-mounts* untersucht. Es wurde sowohl das Pro-MMP-2 als auch das aktive MMP-2 mit dem verwendeten Antikörper nachgewiesen.

Es zeigte sich innerhalb der regenerierenden Läsion eine lokale Expression des MMP-2 im Bereich der Zellkerne und in Bereichen der Zellmembranen. Die umgebenden Zellen zeigten keine positiven Signale für MMP-2 im Zellkern, jedoch sporadisch an den Zellmembranen (Abb. 20).

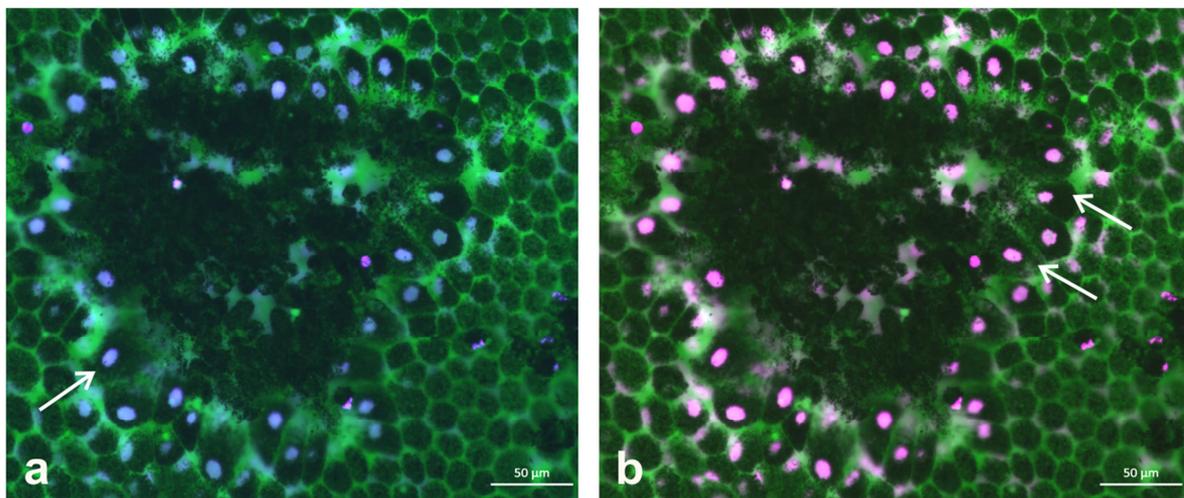


Abbildung 20: Immunfluoreszenzfärbung der Matrixmetalloprotease (MMP)-2 Expression in Organkultur-Explantaten nach Selektiver Retina-Therapie (SRT) mit 200 μm Spots (140 mJ/cm^2 pro Puls). Drei Tage nach Laserbehandlung wurde das F-Aktin durch den Farbstoff Phalloidin (grün), die Zellkerne mit Hoechst (blau, Pfeil a) und MMP-2 mit Alexa Fluor 647 (violett, b) gefärbt. In den regenerierenden RPE-Zellen zeigte sich eine lokale Expression des MMP-2 in dem Bereich der Zellkerne und –membranen (Pfeile, b). Unbehandelte RPE-Zellen zeigten kein positives Signal für MMP-2 in den Zellkernen, jedoch sporadisch an den Zellmembranen.

4.5.1.2. Die Induktion von MMPs nach TSR-Behandlung

Der Einfluss der subletalen TSR-Behandlung auf die Sekretion bzw. Expression von MMPs wurde mittels Zymographie und qRT-PCR untersucht.

MMP-Sekretion

Die Untersuchungen wurden analog zu den beschriebenen Versuchen nach SRT-Behandlung durchgeführt. Die MMP-Sekretion ist im Folgenden als x-faches der unbehandelten Kontrolle (\pm SEM) angegeben.

An Tag 4 nach der TSR-Behandlung mit 100 μ m Spots und einer *Low density*-Behandlung zeigte sich kein Unterschied zwischen der gelaserten und unbehandelten Gruppe. Der Gehalt von Pro-MMP-9 lag bei dem 0,89-fachen der unbehandelten Kontrolle (\pm 0,06), von Pro-MMP-2 bei dem 1,01-fachen (\pm 0,07) und 1,22-fachen (\pm 0,30) im Fall des aktiven MMP-2 (Abb. 21).

Im Vergleich dazu wurde in der *High density*-Gruppe mit 100 μ m Spots ein signifikanter Anstieg des aktiven MMP-2 auf das 2,20-fache (\pm 0,52, $p < 0,01$) beobachtet. Die Sekretion des Pro-MMP-9 (1,06-fach \pm 0,06) und Pro-MMP-2 (1,10-fach \pm 0,09) wurden nicht moduliert (Abb. 21).

Nach der Behandlung mit 300 μ m großen Spots wurde die Sekretion aller untersuchten MMPs signifikant induziert. Vier Tage nach der Behandlung lag die Sekretion des pro-MMP-9 bei dem 1,11-fachen (\pm 0,04, $p < 0,05$) der Kontrolle und auch die Sekretion des Pro-MMP-2 stieg auf das 1,12-fache (\pm 0,05, $p < 0,05$) an. Das aktive MMP-2 stieg signifikant auf das 1,56-fache (\pm 0,15, $p < 0,01$) der unbehandelten Kontrolle an.

Die Ergebnisse der Zymographie zeigten, dass die Sekretion des aktiven MMP-2 in Abhängigkeit von der Spotgröße und -dichte induziert wird (Abb. 21).

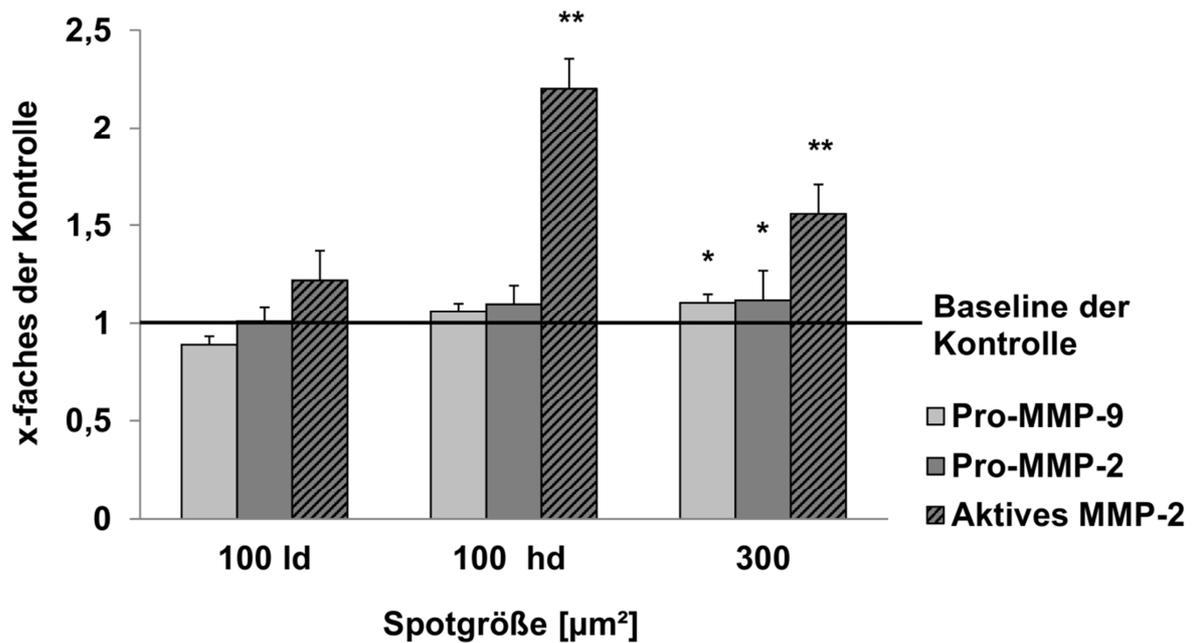


Abbildung 21: Sekretion der Matrixmetalloproteasen (MMP)-2 und -9 nach Thermischer Stimulationstherapie der Retina (TSR) mit unterschiedlichen Spotgrößen und -dichten. Die Organkultur-Explantate wurden mit dem TSR-Laser behandelt oder als unbehandelte Kontrollen in den modifizierten Ussingkammern kultiviert. Der MMP-Gehalt in den untersuchten Organkulturüberständen ist als x-faches (\pm SEM) der unbehandelten Kontrolle angegeben. An Tag 4 der Kultivierung mit 100 μm Spots und einer Low-density-Behandlung (ld; 15 mW, 100 ms) zeigte sich kein Unterschied zwischen der gelaserten und unbehandelten Gruppe. In der High-density-Gruppe (hd) mit 100 μm Spots zeigte sich ein signifikanter Anstieg des aktiven MMP-2. Die Sekretion des Pro-MMP-9 und -2 wurden nicht moduliert. Nach der Behandlung mit 300 μm Spots (45 mW, 100 ms) stiegen das Pro-MMP-9 und -2 sowie das aktive MMP-2 signifikant an im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

MMP-Expression

Die Expression des MMP-2 in den Explantaten wurde nach der Behandlung mit den drei beschriebenen Modifikationen an Tag 4 der Kultivierung mittels qRT-PCR bestimmt. Es wurde sowohl das aktive als auch das Pro-MMP-2 nachgewiesen. Die MMP-Expression ist im Folgenden als x-faches der unbehandelten Kontrolle (\pm SEM) angegeben (Abb. 22).

Nach der subletalen Behandlung mit 100 μm Spots in der *Low density*-Behandlung (1,06-fach, \pm 0,05) zeigte sich kein Unterschied im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Behandlung mit 100 μm Spots in der *High density*-Gruppe führte zu einer signifikanten Expressionssteigerung des MMP-2 auf das 1,49-fache (\pm 0,05, $p < 0,05$) der Kontrolle. Nach der Behandlung mit 300 μm Spots zeigte sich eine Steigerung (1,56-fach, \pm 0,36), die jedoch keine Signifikanz erreichte (Abb. 22).

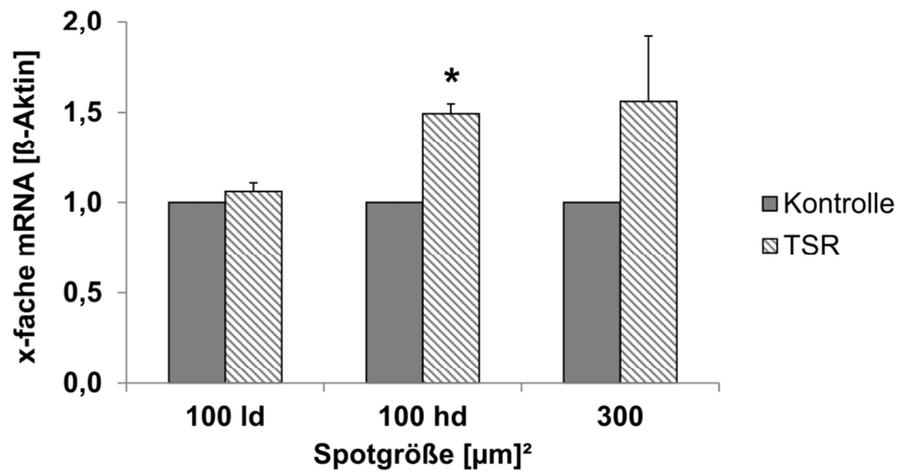


Abbildung 22: Expression der Matrixmetalloprotease (MMP)-2 nach Thermischer Stimulationstherapie der Retina (TSR) mit unterschiedlichen Spotgrößen und –dichten. Die Organkultur-Explantate wurden mit dem TSR-Laser behandelt oder als unbehandelte Kontrollen in den modifizierten Ussingkammern kultiviert. Die MMP-Expression in den untersuchten Explantaten ist als x-fache mRNA (\pm SEM) der unbehandelten Kontrolle nach Verrechnung mit dem β -Aktin-Gehalt angegeben. An Tag 4 der Kultivierung mit 100 μ m Spots und einer *Low-density*-Behandlung (ld; 15 mW, 100 ms) zeigte sich kein Unterschied zwischen der gelaserten und unbehandelten Gruppe. In der *High-density*-Gruppe (hd) mit 100 μ m Spots zeigte sich ein signifikanter Anstieg der MMP-2-Expression. Nach der Behandlung mit 300 μ m Spots (45 mW, 100 ms) stieg das MMP-2 an, jedoch ohne dabei das Signifikanzniveau zu erreichen (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

4.5.2. Einfluss der Laserbehandlung auf pro- und anti-angiogene Faktoren

Im nachfolgenden Abschnitt werden die Ergebnisse zum Einfluss der TSR- und SRT-Behandlung auf die Sekretion pro- und anti-angiogener Faktoren, unter Verwendung unterschiedlicher Spotgrößen und –dichten, aufgeführt.

4.5.2.1. Einfluss der SRT auf pro- und anti-angiogene Faktoren

VEGF-Sekretion

Der Einfluss der SRT-Behandlung auf die Sekretion des pro-angiogenen Faktors VEGF wurde mittels ELISA untersucht. Es wurden die drei beschriebenen Behandlungsregime angewandt. Die VEGF-Sekretion ist im Folgenden als x-faches der unbehandelten Kontrolle (\pm SEM) angegeben.

Bei der Behandlung mit 100 µm Spots in der *Low density*-Gruppe zeigte sich kein Unterschied in der VEGF-Sekretion zwischen der behandelten Gruppe und der unbehandelten Kontrolle (0,92-faches der Kontrolle ± 0,09) an Tag 4 der Kultivierung. In der 100 µm *High density*-Gruppe wurde eine moderate, aber signifikante VEGF-Reduktion auf das 0,91-fache der Kontrolle registriert (± 0,04, $p < 0,05$). Nach der Behandlung mit 200 µm Spots wurde die VEGF-Sekretion signifikant auf das 0,88-fache (± 0,05, $p < 0,05$) der Kontrolle reduziert (Abb. 23). Der ELISA zeigte, dass die Sekretion des VEGF in Abhängigkeit von der Spotgröße und -dichte reduziert wird.

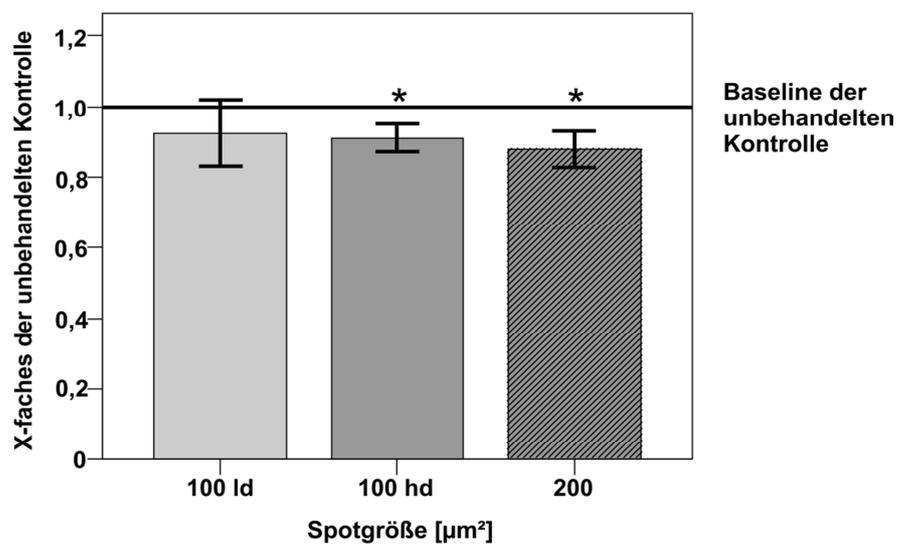


Abbildung 23: Reduktion der Sekretion des *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) in Organkultur-Explantaten nach Selektiver Retina-Therapie (SRT) mit unterschiedlichen Spotgrößen und -dichten. Die Explantate wurden mit dem SRT-Laser behandelt oder als unbehandelte Kontrollen in den modifizierten Ussingkammern kultiviert. Der VEGF-Gehalt in den untersuchten Organkulturüberständen ist als x-faches (± SEM) der unbehandelten Kontrolle angegeben. An Tag 4 der Kultivierung zeigte sich kein Unterschied in der *Low-density* (ld)-Gruppe mit 100 µm großen Spots (200 mJ/cm² pro Puls) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. In der *High density* (hd)-Gruppe mit 100 µm Spots und mit 200 µm großen Spots (140 mJ/cm² pro Puls) zeigte sich eine signifikante Reduktion der VEGF-Sekretion (* $p < 0,5$).

PEDF-Sekretion

Die Sekretion des physiologischen VEGF-Gegenspielers PEDF wurde mittels ELISA untersucht. Es wurden die drei beschriebenen Behandlungsregime angewandt. Die PEDF-Sekretion ist im Folgenden als x-faches der unbehandelten Kontrolle (± SEM) angegeben.

Es zeigte sich bei der Behandlung mit 100 µm Spots weder in der *Low density*-Gruppe (1,05-fach ± 0,06), noch in der *High density*-Gruppe (1,07-fach ± 0,04) ein Unterschied zur

unbehandelten Kontrolle. Im Gegensatz dazu zeigte sich nach der Behandlung mit 200 µm Spots eine signifikante Induktion der PEDF-Sekretion auf das 1,25-fache ($\pm 0,08$, $p < 0,05$) der Kontrolle an Tag 4 nach SRT in dem basolateralen Kompartiment (Abb. 24). Die Untersuchung zeigte, dass die Sekretion des PEDF in Abhängigkeit von der Spotgröße und –dichte induziert wird.

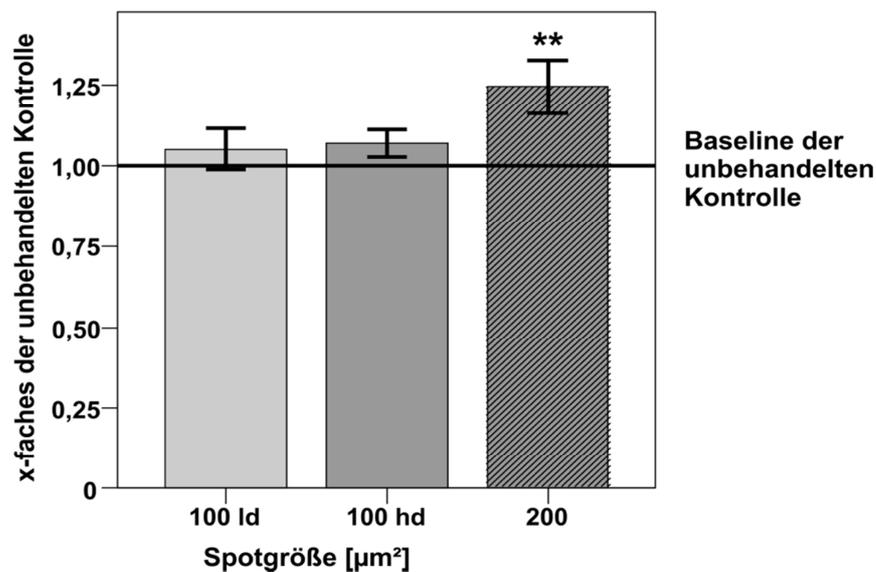


Abbildung 24: Sekretion des *Pigment Epithelium Derived Factor* (PEDF) von Organkultur-Explantaten nach Selektiver Retina Therapie (SRT) mit unterschiedlichen Spotgrößen und –dichten. Die Explantate wurden mit dem SRT-Laser behandelt oder als unbehandelte Kontrollen in den modifizierten Ussingkammern kultiviert. Der basolaterale PEDF-Gehalt in den untersuchten Organkulturüberständen ist als x-faches (\pm SEM) der unbehandelten Kontrolle angegeben. An Tag 4 der Kultivierung zeigte sich kein Unterschied in der *Low Density* (ld)- und *High Density* (hd)-Gruppe mit 100 µm großen Spots (200 mJ/cm² pro Puls) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Nach SRT-Behandlung mit 200 µm großen Spots (140 mJ/cm² pro Puls) zeigte sich eine signifikante PEDF-Induktion (** $p < 0,01$).

4.5.2.2. Einfluss von TSR auf pro- und anti-angiogene Faktoren

VEGF-Sekretion

Es zeigte sich in keiner der untersuchten Gruppen ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle an Tag 4 der Kultivierung.

Bei der Behandlung mit 100 µm Spots in der *Low density*-Gruppe lag der VEGF-Gehalt bei einem 0,89-fachen der Kontrolle ($\pm 0,12$), in der 100 µm *High density*-Gruppe lag der

VEGF-Gehalt bei dem 0,82-fachen der Kontrolle ($\pm 0,06$) und nach Behandlung mit 300 μm Spots bei dem 1,03-fachem ($\pm 0,14$) der Kontrolle.

Der ELISA zeigte, dass die Sekretion des pro-angiogenen VEGF nicht durch die Laserbehandlung induziert wurde (Abb. 25).

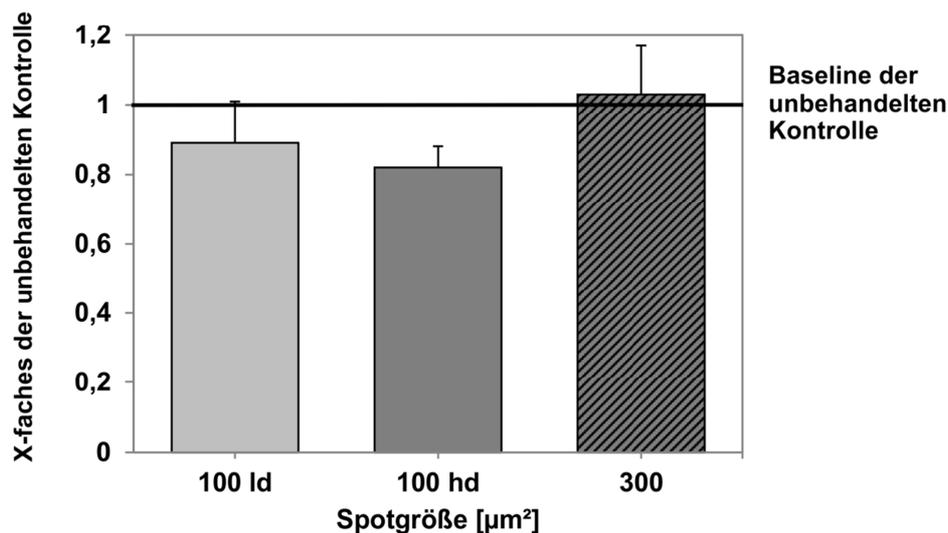


Abbildung 25: Sekretion des *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) in Organkultur-Explantaten nach Thermischer Stimulationstherapie der Retina (TSR) mit unterschiedlichen Spotgrößen und -dichten. Die Explantate wurden mit dem TSR-Laser behandelt oder als unbehandelte Kontrollen in den modifizierten Ussingkammern kultiviert. Die subletale Behandlung wurde für die Gruppe der 100 μm Spots mit einer Leistung von 15 mW durchgeführt, wohingegen bei den 300 μm mit 45 mW, 100 ms behandelt wurde. Der VEGF-Gehalt in den untersuchten Organkulturüberständen ist als x-faches (\pm SEM) der unbehandelten Kontrolle angegeben. Es zeigte sich an Tag 4 der Untersuchung in keinem Behandlungsmodus ein Unterschied zwischen den gelaserten Explantaten und den unbehandelten Kontrollen.

PEDF-Sekretion

Die Sekretion des physiologischen VEGF-Gegenspielers PEDF wurde mittels ELISA untersucht. Es wurden die drei beschriebenen Behandlungsregime angewandt. Die PEDF-Sekretion ist im Folgenden als x-faches der unbehandelten Kontrolle (\pm SEM) angegeben.

Es zeigte sich bei der Behandlung mit 100 μm Spots in der *Low density*-Gruppe kein Unterschied zur unbehandelten Kontrolle (1,08-fach $\pm 0,08$). Im Gegensatz dazu zeigte sich nach der Behandlung mit 100 μm Spots in der *High density*-Gruppe und nach der Behandlung mit 300 μm Spots eine signifikante Induktion der PEDF-Sekretion auf das 1,29-fache ($\pm 0,13$, $p < 0,05$) beziehungsweise das 1,20-fache ($\pm 0,08$, $p < 0,01$) der

Kontrolle an Tag 4 nach TSR in dem basolateralen Kompartiment (Abb. 26). Die Untersuchung zeigte, dass die Sekretion des PEDF in Abhängigkeit von der Spotgröße und –dichte induziert wird.

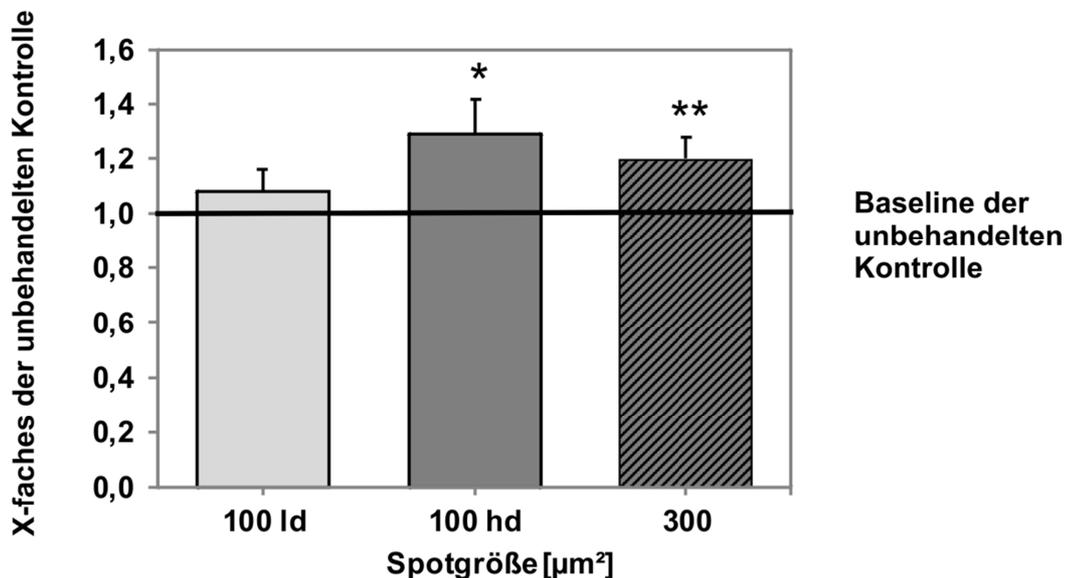


Abbildung 26: Sekretion des *Pigment Epithelium Derived Factor* (PEDF) von Organkultur-Explantaten nach Thermischer Stimulationstherapie der Retina mit unterschiedlichen Spotgrößen und –dichten. Die Explantate wurden mit dem TSR-Laser behandelt oder als unbehandelte Kontrollen in den modifizierten Ussingkammern kultiviert. Die subletale Behandlung wurde für die Gruppe der 100 µm Spots mit einer Leistung von 15 mW durchgeführt, wohingegen bei den 300 µm mit 45 mW, 100 ms behandelt wurde. Der basolaterale PEDF-Gehalt in den untersuchten Organkulturüberständen ist als x-faches (\pm SEM) der unbehandelten Kontrolle angegeben. An Tag 4 der Kultivierung zeigte sich kein Unterschied in der *Low Density* (ld)-Gruppe mit 100 µm großen Spots im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Nach TSR-Behandlung mit 300 µm Spots und 100 µm Spots in der *High Density* (hd)-Behandlung zeigte sich eine signifikante PEDF-Induktion (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

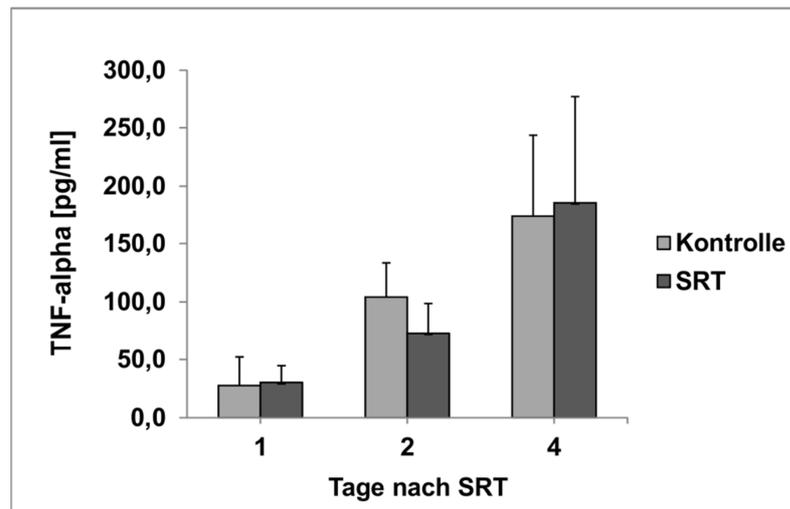
4.5.3. Ausschüttung inflammatorischer Zytokine nach Laserbehandlung

Die Sekretion der inflammatorischen Zytokine TNF- α , TGF- β und IL-6 wurden nach der SRT-Behandlung mit 200 µm und 140 mJ/cm² pro Puls an mehreren Kultivierungstagen mittels ELISA untersucht. Die SRT-Behandlung zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die untersuchten inflammatorischen Zytokine. Die Zytokin-Sekretion ist im Folgenden in pg/ml im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle (\pm STABW) angegeben.

In Abb. 27 a ist dargestellt, dass die Sekretion von TNF- α während der Kultivierung von Tag 1 bis Tag 4 anstieg, jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen der behandelten und der Kontrollgruppe zu verzeichnen war (Tag 1: 27,60 \pm 24,47 vs. 30,18 \pm 14,52; Tag 2: 104,27 \pm 29,19 vs. 73,23 \pm 25,50; Tag 3: 174,30 \pm 69,32 vs. 185,72 pg/ml \pm 90,90).

Die Sekretion von IL-6 zeigte einen leichten Trend zugunsten einer IL-6 Reduktion nach SRT über die Dauer der Kultivierung, jedoch erreichte dieser keine Signifikanz (Tag 1: $2174,59 \pm 568,69$ vs. $1857,03 \pm 689,28$; Tag 2: $2089,04 \pm 640,67$ vs. $1518,09 \pm 803,44$; Tag 3: $1770,00 \pm 439,00$ vs. $1513,00 \text{ pg/ml} \pm 795,00$; Abb. 27 b).

a) TNF-alpha



b) IL-6

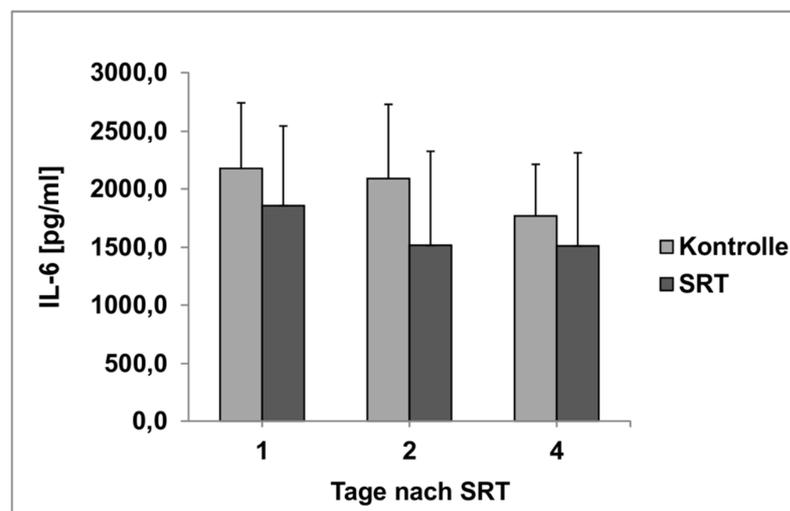


Abbildung 27: Sekretion inflammatorischer Zytokine von Organkultur-Explantaten nach Selektiver Retina-Therapie (SRT). Die Explantate wurden mit der SRT-Methode behandelt oder als unbehandelte Kontrollen in den modifizierten Ussingkammern kultiviert (Tag 1-4). Es wurde mit $200 \mu\text{m}$ großen Spots und 140 mJ/cm^2 pro Puls behandelt. Der basolaterale Gehalt der Zytokine ist in pg/ml (\pm STABW) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle dargestellt. Die SRT-Behandlung zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die untersuchten inflammatorischen Zytokine *Tumor Necrosis Factor-alpha* (TNF- α) und Interleukin-6 (IL-6).

Die Sekretion von TGF- β wurde an Tag 4 der Kultivierung getestet. Aufgrund limitierter Ressourcen musste sich bei dieser Untersuchung auf einen Untersuchungszeitpunkt beschränkt werden. Es zeigte sich keine Beeinflussung durch die SRT-Behandlung ($409,33 \pm 126,51$ vs. $390,35 \pm 126,79$; Abb. 28).

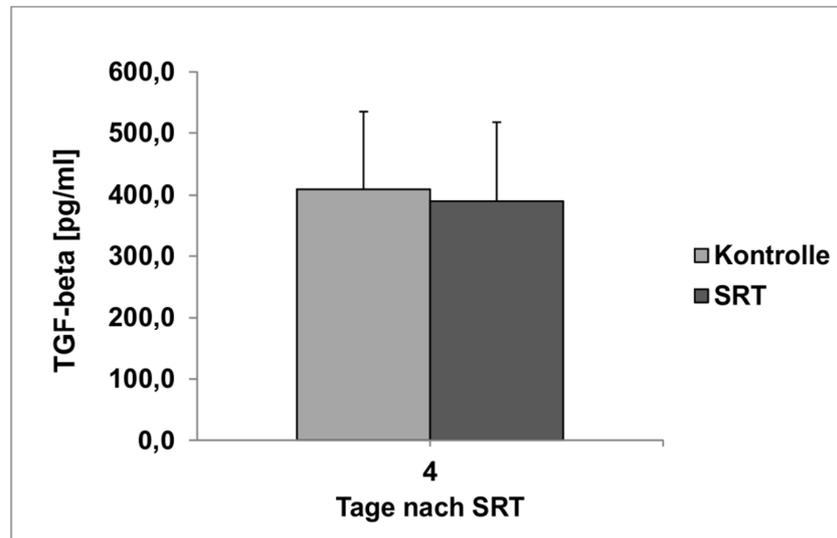


Abbildung 28: TGF- β -Sekretion von Organkultur-Explantaten nach Selektiver Retina-Therapie (SRT). Die Explantate wurden mit der SRT-Methode behandelt oder als unbehandelte Kontrollen in den modifizierten Ussingkammern kultiviert. Es wurde mit 200 μm großen Spots und 140 mJ/cm^2 pro Puls behandelt. Der basolaterale Gehalt der Zytokine ist in pg/ml (\pm STABW) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle an Tag 4 der Kultivierung dargestellt. Die SRT-Behandlung zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Sekretion des *Transforming Growth Factor-beta* (TGF- β).

Die SRT zeigt kein inflammatorisches Potenzial bei den untersuchten Faktoren. Aufgrund der Datenlage nach SRT-Behandlung und limitierter Ressourcen wurde der Einfluss der TSR auf inflammatorischer Zytokine nicht untersucht.

4.5.4. Einfluss der TSR auf das Hitzeschockprotein 70

Die Pathophysiologie der AMD ist multifaktoriell und noch nicht vollständig verstanden. Neben den Faktoren, die auf die ECM, Angiogenese und Inflammation Einfluss nehmen, wurden weitere Proteine untersucht. Dazu gehört das HSP70, als wichtiger Marker der intrazellulären Stressantwort (siehe 1.3.2.). Die Untersuchungen wurden nur für den TSR-Modus durchgeführt, da für HSPs eine Induktion durch thermische Laserstimulation beschrieben ist (siehe 1.3.2.).

HSP70-Sekretion

Zum Nachweis der Expression von HSP70 wurden porcine Organkulturexplantate lysiert und im Western Blot analysiert. Die mögliche Sekretion von HSP70 wurde von Lee *et al.* (2006) beschrieben und in dieser Arbeit via ELISA getestet.

Für den Western Blot wurde ein Primärantikörper gewählt, der die induzierte Form des HSP70 nachweist, wobei das *Hela Whole Cell Lysate* als Positivkontrolle diente. In Vorversuchen wurde im TSR-Modus behandelt (300 µm, 45 mW, 100 ms) und evaluiert nach welcher Dauer (1 h vs. 24 h) die Expression den höchsten Wert erreichte. Die höchste Expression zeigte sich 24 h nach Laserbehandlung (Kalibriertes Volumen 0,47 vs. 0,70 HSP70/β-Aktin; Abb. 29 a).

Zur Untersuchung des Einflusses der thermischen Stimulation auf HSP70 wurden die Explantate mit dem TSR-Laser behandelt (300 µm, 45 mW, 100 ms), kultiviert und nach 24 h lysiert. Es zeigte sich eine 1,10-fache Expression (STABW ± 0,28) im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 29 b), die sich als nicht signifikant erwies.

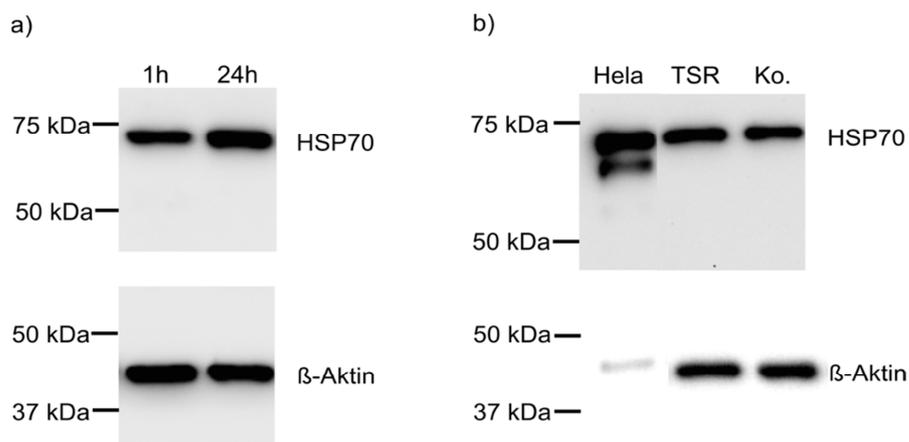


Abbildung 29: Hitzeschockprotein (HSP)70-Expression von porcinen Organkulturexplantaten Thermischer Stimulationstherapie der Retina. Die Organkulturen wurden mit der Thermischen Stimulationstherapie der Retina (TSR) und einer Spotgröße von 300 µm und 45 mW, 100 ms behandelt, kultiviert und lysiert. Nach 24 h der Kultivierung zeigte sich eine höhere Expression als nach 1 h, weshalb dieser Zeitpunkt für die weiteren Versuche gewählt wurde (a). Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Hsp70-Expression zwischen den gelaserten Proben und unbehandelten Kontrollen nachgewiesen werden (b).

Um zu untersuchen, ob sich die Proteinexpression des vollständigen Explantats von der Expression der isolierten RPE-Zellen unterschied bzw. die Expression der RPE-Zellen durch den Hintergrund maskiert werden könnte, wurden die RPE-Zellen der Kulturen isoliert. Die Untersuchung der RPE-Lysate führte in mehreren Versuchen zu keinem validen

Ergebnis, da der HSP70-Gehalt zwischen den Proben starken Schwankungen unterlag. Dieser Versuchsansatz wurde daher nicht weiterverfolgt.

Neben der HSP70-Expression sollte auch die HSP70-Sekretion untersucht werden. Die Explantate wurden wie beschrieben behandelt und in modifizierten Ussingkammern kultiviert. Die untersuchten Überstände stammten von Tag 4 nach Laserbehandlung. In diesen Proben konnte kein Nachweis von sezerniertem Hsp70 erbracht werden.

4.6. AMD-artige Veränderungen in Nrf2- und ApoE-defizienten Mäusen

Es wurden klinisch bildgebende Verfahren, histologische Untersuchungen und genetische Analysen an den Mäusen durchgeführt, die zur Beschreibung AMD-artiger Veränderungen in beiden Mausmodellen dienen.

4.6.1. Genotypisierung der Nrf2 Knock-out Mäuse

Die Verpaarung der Nrf2 Knock-out Mäuse sollte nach Angaben des Jackson Laboratory mit einem homozygoten und einem heterozygoten Tier erfolgen. Um zu bestimmen, in welcher Ausprägung die Mutation im Nrf2-Gen vorlag, wurde eine PCR-Reaktion zur Genotypisierung der Tiere an unserer Klinik etabliert. Es konnten in der PCR die homozygoten und heterozygoten Träger des Knock-outs nachgewiesen werden. Der Wildtyp wurde in der Nrf2 $-/-$ Zucht nicht nachgewiesen (Abb. 30).

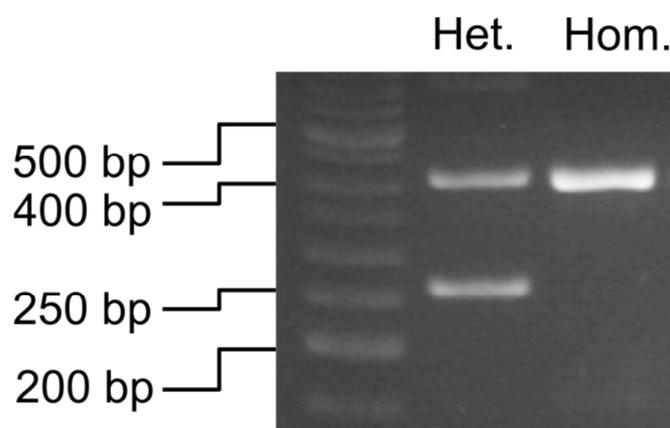


Abbildung 30: Genotypisierung von *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2) Knock-out Mäusen. Die Zucht der Nrf2-defizienten Mäuse wurde mittels PCR genotypisiert. Es wurden heterozygote (Het.) und homozygote (Hom.) Träger des Nrf2 Knock-outs über die PCR Reaktion nachgewiesen.

4.6.2.AMD-artige Veränderungen in bildgebenden Untersuchungsverfahren

Die Untersuchung der Mäuseaugen mittels Funduskopie, OCT und FAG wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Jan Tode an der Augenklinik etabliert.

In Abb. 31 a sind zwei zentrale Fundusbilder der BL/6J-Kontrollmäuse dargestellt, die keine AMD-typischen Fundusveränderungen aufweisen. Bei den ApoE ^{-/-} Mäusen wurden moderate (Abb. 31 b, oben) bis starke (Abb. 31 b, unten) Veränderungen gesichtet, welche als Drusen-artige Veränderungen bewertet wurden. Die Nrf2^{-/-} Mäuse zeigten ebenfalls moderate bis starke Veränderungen (Abb. 31 c, oben) sowie das Auftreten von spontan entstandenen CNV an 16 von 75 untersuchten Tieren (Abb. 31 c, unten).

In der OCT konnten in beiden Mausmodellen verschiedene AMD-typische Veränderungen gezeigt werden. In Abb. 31 sind Veränderungen unterhalb des RPE in Richtung BrM und Choroidea (d), Drusen-artige Ablagerungen oberhalb des RPE (e) sowie eine CNV mit Durchbruch zwischen Choroidea und den neuroretinalen Schichten (f) dargestellt.

In der FAG (Abb. 31) zeigte sich meist ein unauffälliges Bild des retinalen Gefäßsystems (g). Drusen-artige Veränderungen in den AMD-Mausmodellen konnten nicht punktuell und klar abgrenzbar nachgewiesen werden, sondern zeigten sich als diffuse Fluoreszenz in den korrelierenden Bereichen (h). Das Auftreten von CNVs bei den Nrf2 ^{-/-} Mäusen konnte als deutlicher Flüssigkeitsaustritt nachgewiesen werden (i).

Die Bewertung der ophthalmologischen Veränderungen erfolgte unter Berücksichtigung der aktuellen Literatur und Rücksprache mit Ophthalmologen und Naturwissenschaftlern mit ophthalmologischer Expertise.

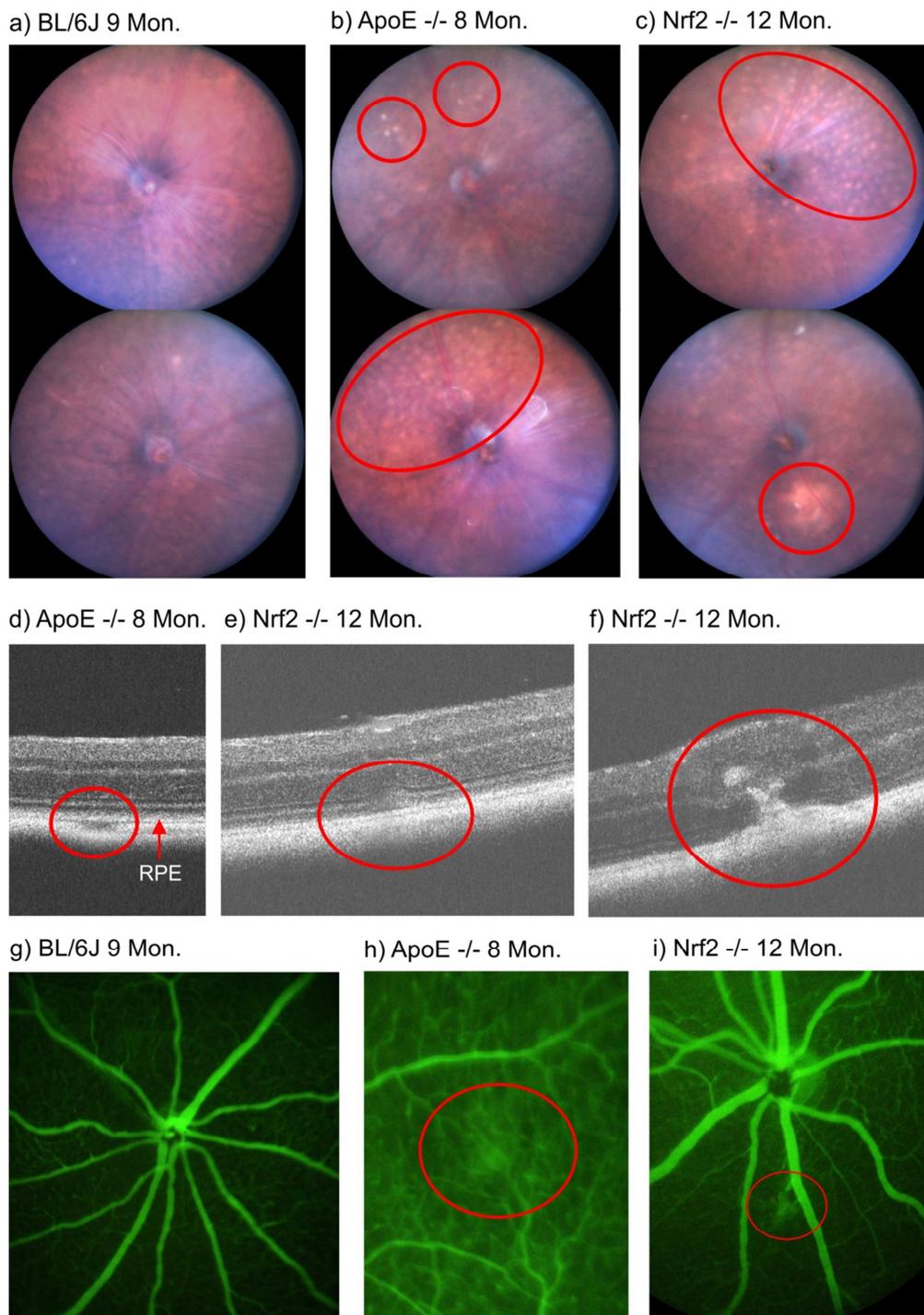


Abbildung 31: Fundusveränderungen der Maus in bildgebenden Untersuchungsverfahren, die typische Alterationen der altersabhängigen Makuladegeneration (AMD) zeigen. Es wurden Black-6/J (BL/6J) Kontrollmäuse, Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) Knock-out Mäuse und Apolipoprotein E (ApoE) defiziente Mäuse untersucht. a-c: Funduskopische Aufnahmen von BL/6J, ApoE $-/-$ und Nrf2 $-/-$ Mäusen, welche moderate bis starke Drusen-artige Veränderungen (b) sowie die Ausbildung einer Choroidalen Neovaskularisation (CNV) (c, unten) zeigen. d-f: Die Aufnahmen der Optischen Kohärenztomographie zeigten AMD-typische Veränderungen unterhalb des retinalen Pigmentepithels (RPE) in Richtung Bruch'scher Membran und Choroidea (d), Drusen-artige Ablagerungen oberhalb des RPE (e) sowie eine CNV (f). g-i: Die Aufnahmen der Fluoreszenzangiographie zeigten meist ein unauffälliges Bild des retinalen Gefäßsystems (g). Drusen-artige Veränderungen zeigten sich als diffuse Fluoreszenz in den korrelierenden Bereichen (h). Im Bereich einer CNV konnte ein deutlicher Flüssigkeitsaustritt nachgewiesen werden (i).

4.6.3. Charakterisierung histologischer Veränderungen in beiden AMD-Mausmodellen

Für die Charakterisierung histologischer Veränderungen wurden Hämatoxylin-Eosin-Färbungen nach Mayer sowie Toluidinblaufärbungen durchgeführt und die Schnitte lichtmikroskopisch begutachtet.

In der Histologie der Mäuseaugen konnten alle Schichten des Bulbus erfolgreich nachgewiesen werden. Mit Ausnahme der Ganglienzellschicht, Nervenfaserschicht und Äußerer Grenzmembran sind die Choroidea und retinalen Schichten unter Abb. 32 dargestellt. Es konnten die die Innere plexiforme Schicht (IP), Innere Körnerschicht (IK), Äußere plexiforme Schicht (ÄP), Äußere Körnerschicht (ÄK), Photorezeptorschicht (PRS), Retinales Pigmentepithel (RPE) und Choroidea (Ch) erfolgreich dargestellt werden. Neben der natürlichen Histologie der Choroidea und Retina, hier an BL/6J-Mäusen dargestellt (Abb. 32 a), konnten AMD-typische Veränderungen in den Augen von Nrf2 ^{-/-} Mäusen nachgewiesen werden. Es ließen sich Veränderung in der BrM in Richtung der Choroidea nachweisen (Pfeil, Abb. 32 b). Es ließ sich dabei nicht eindeutig sagen, ob es sich dabei um Drusen-artige Ablagerungen aus der BrM handelte oder um Fusionen von Kapillaren aus der Choroidea mit der BrM. In Abb. 32 c (Pfeil) sind Abhebungen und vakuoläre Veränderungen in Richtung der PRS dargestellt. Des Weiteren sind in Abb. 32 d Drusen-artige Ablagerungen des RPE, wie sie auch in den bildgebenden Verfahren gesichtet wurden, dargestellt.

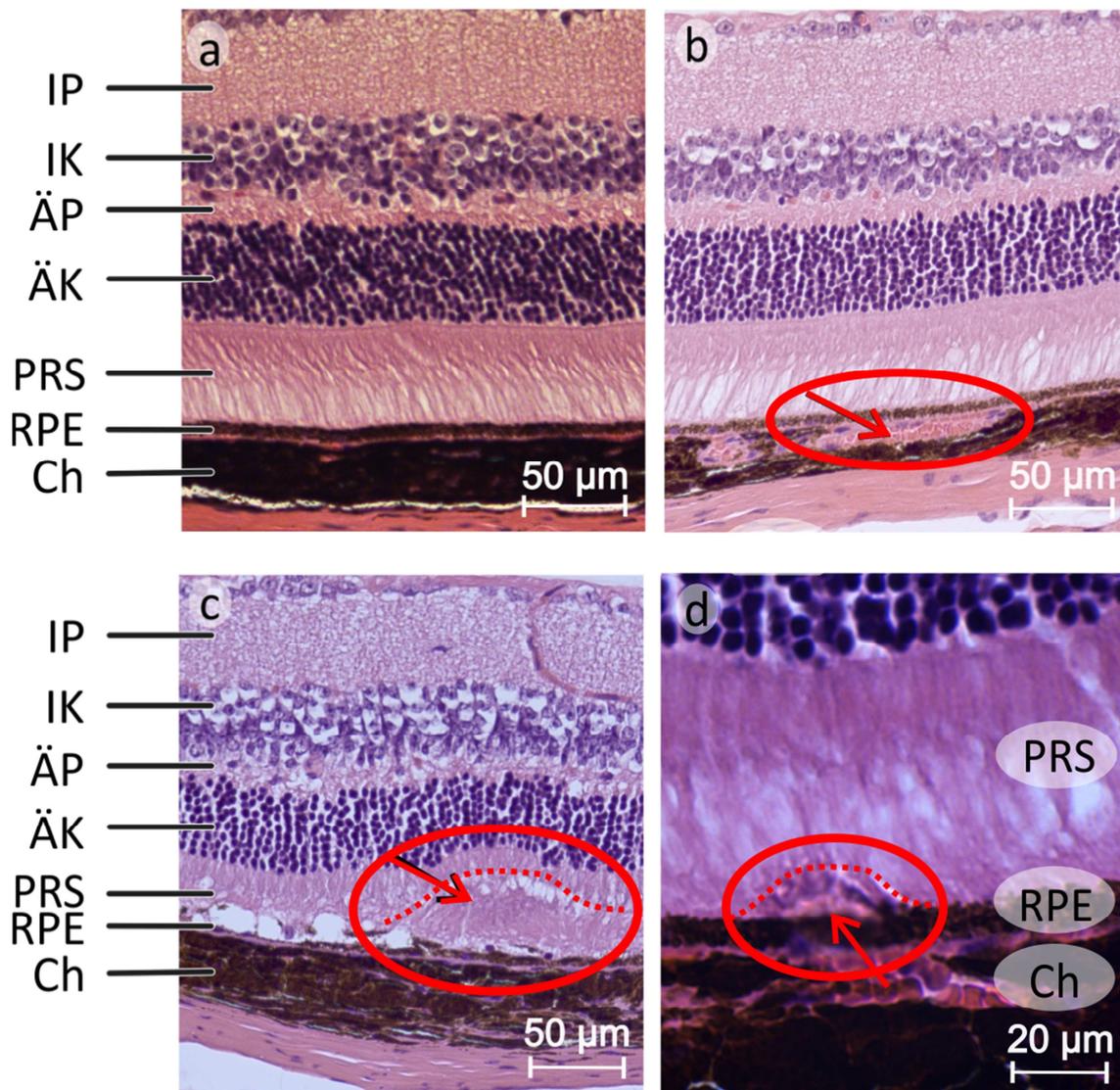


Abbildung 32: Histologie der retinalen Schichten und der Choroidea im Mausauge. Dargestellt sind die retinalen Schichten mit IP= Innerer plexiformer Schicht, IK= Innerer Körnerschicht, ÄP= Äußerer plexiformer Schicht, ÄK= Äußerer Körnerschicht, PRS= Photorezeptorschicht, RPE= retinalem Pigmentepithel und Ch= Choroidea. Die murinen Augen wurden mittels Hämatoxylin und Eosin nach Mayer gefärbt. Die Pfeile deuten auf AMD-typische Veränderungen. a) Natürliche Histologie der retinalen Schichten und Choroidea, b) Veränderung in der BrM in Richtung der Choroidea, c) Abhebung und Veränderung der PRS, d) Drusenartige Ablagerungen des RPE.

Zur Beschreibung der Modelle sollte untersucht werden, ob sich die Dicke der Photorezeptoren zwischen den AMD-Modellen und den BL/6J Kontrollmäusen unterscheidet. Für diese Untersuchung wurden Toluidinblauschnitte genutzt.

Es wurden jeweils drei unbehandelte BL/6J, Nrf2 ^{-/-} und ApoE ^{-/-} Mäuse unterschiedlichen Alters untersucht. Es wurden drei Stufen jedes Auges untersucht und jeweils ein Bild im zentralen Bereich des Sehnervs aufgenommen. Pro Bild wurden links

und rechts vom Sehnerv zwei Messungen der Dicke der PRS durchgeführt, wodurch sich 12 Messungen pro Auge ergaben. Die Dicke der PRS ist im Folgenden in μm (\pm STABW) angegeben.

Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der PRS der 5 Monate alten ApoE $-/-$ Mäuse ($40,41 \pm 1,98$) im Vergleich zu den gleichaltrigen Kontrollmäusen ($46,83 \pm 2,34$, $p < 0,01$). Bei den 9 Monate alten ApoE $-/-$ Mäusen sowie bei den 10 und 13 Monate alten Nrf2 $-/-$ Mäusen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (Abb. 33).

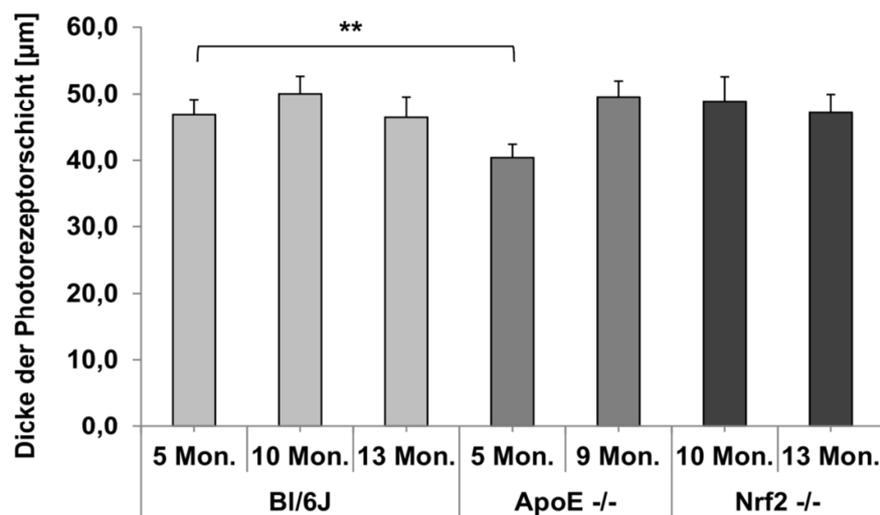


Abbildung 33: Messung der Dicke der Photorezeptorschicht (PRS) in Kontroll- und AMD-Mäusen. Zur Messung der Dicke der PRS wurden Toluidinblauschnitte angefertigt und lichtmikroskopisch untersucht. Die Auswertung erfolgte mittels AxioVision Software. Es wurden unbehandelte BL/6J, Nrf2 $-/-$ und ApoE $-/-$ Mäuse unterschiedlichen Alters untersucht. Die Dicke der PRS ist in $\mu\text{m} \pm$ STABW angegeben. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der PRS der 5 Monate alten ApoE $-/-$ Mäuse im Vergleich zu den gleichaltrigen Kontrollmäusen. Bei den 9 Monate alten ApoE $-/-$ Mäusen sowie bei den 10 und 13 Monate alten Nrf2 $-/-$ Mäusen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (** $p < 0,01$).

4.6.4. Untersuchung ultrastruktureller Veränderungen des RPE/BrM/Choroidea-Komplexes mittels TEM

Zur Untersuchung ultrastruktureller Veränderungen des Komplexes aus RPE, BrM und Choroidea wurden die Augen elektronenmikroskopisch untersucht. Das Verfahren für die Untersuchung der Mäuseaugen wurde erfolgreich an der Augenklinik und am Anatomischen Institut in Kiel etabliert.

Der ultrastrukturelle Aufbau ist in Abb. 34 a exemplarisch abgebildet und besteht aus 1) der Basallamina des RPE, 2) innerer kollagener Schicht, 3) Schicht aus elastischen Fasern,

4) äußerer kollagener Schicht und 5) der Basallamina der Choriocapillaris. Es zeigten sich in beiden Knock-out Modellen AMD-typische Veränderungen, wie das Spleißen der Basallamina der Choriocapillaris (Abb. 34 b, Pfeil) und der Verlust der Fenestrierung des Endothels der Choriocapillaris (Abb. 34 b, **). Des Weiteren zeigten sich eine allgemeine Dickenzunahme der BrM mit Ablagerungen (Abb. 34 c, Pfeil rechts zwischen 4 und 5) und Vakuolen (Abb. 34 d, *) in der äußeren kollagenen Schicht.

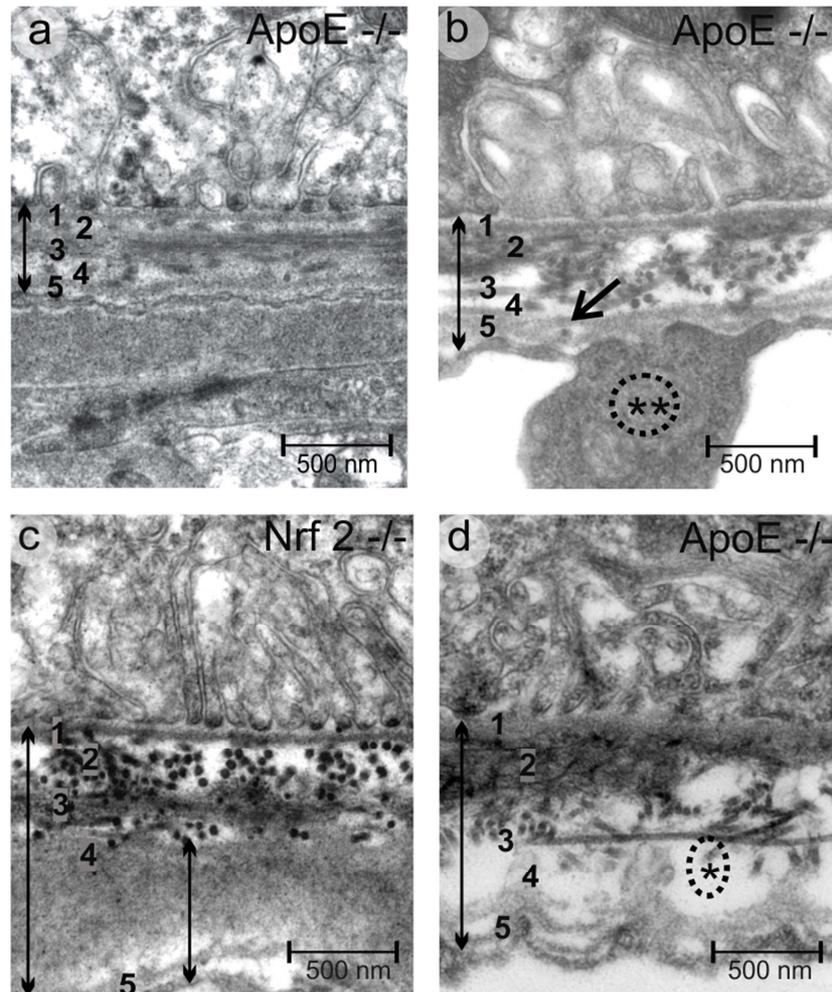


Abbildung 34: Elektronenmikroskopische Untersuchung der Bruch'schen Membran (BrM) von AMD-Knock-out Mäusen. a) Detailaufnahmen der BrM bestehend aus 1) der Basallamina des RPE, 2) innerer kollagener Schicht, 3) Schicht elastischer Fasern, 4) äußerer kollagener Schicht und 5) der Basallamina der Choriocapillaris. b) Es wurden verschiedene AMD-typische Alterationen in den Knock-out Mäusen nachgewiesen, wie z.B. das Spleißen der Basallamina der Choriocapillaris (Pfeil) und Verlust der Fenestrierung des Endothels der Choriocapillaris (**). c) Es zeigte sich eine Verdickung der BrM mit Ablagerungen in der äußeren kollagenen Schicht (Pfeil rechts). d) Des Weiteren wurde das Auftreten von Vakuolen in der äußeren kollagenen Schicht (*) nachgewiesen.

Es wurde an allen untersuchten Schnitten die Höhe des RPE als interne Referenz untersucht. Dies wurde durchgeführt, um einerseits zu prüfen, ob die Augen immer in der korrekten horizontalen Orientierung geschnitten wurden und andererseits um zu

untersuchen, ob die Dicke des RPE zwischen den einzelnen Zuchtlinien und dem Alter der Mäuse variiert. Für den Vergleich der RPE-Höhe zwischen den Zuchtlinien wurden unbehandelte BL/6J Kontrollmäuse, Nrf2 Knock-out Mäuse und ApoE defiziente Mäuse unterschiedlichen Alters untersucht. Die Anzahl der untersuchten Tiere ist unter 3.5.2 aufgeführt.

Es zeigte sich dabei, dass sich die Höhe des RPE weder zwischen den unterschiedlichen Altersgruppen innerhalb der einzelnen Zuchtlinien signifikant unterschied, noch die Höhe des RPE zwischen den drei Zuchtlinien. Da keine Schnitte mit starken Abweichungen innerhalb der RPE-Höhe gesichtet wurden, konnten alle Schnitte in die Studie eingeschlossen werden. Die Höhe des RPE ist im Folgenden in μm (\pm STABW) angegeben (Abb. 35).

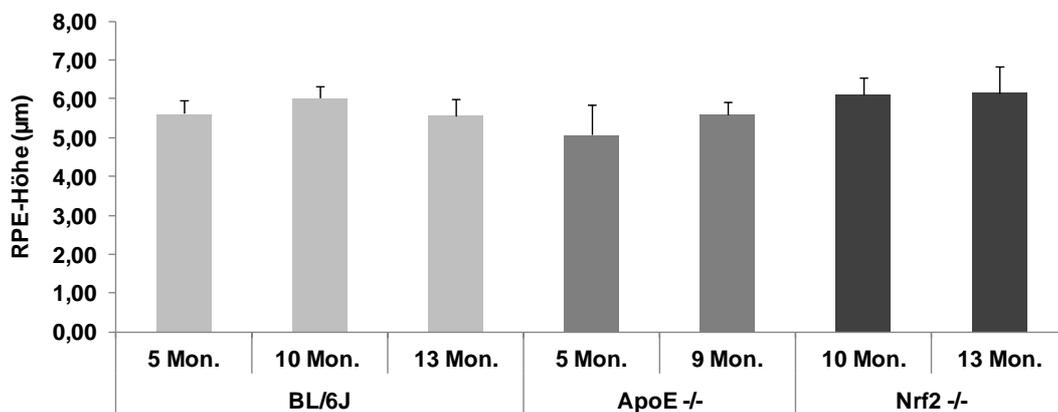


Abbildung 35: Höhe des retinalen Pigmentepithels (RPE) in verschiedenen murinen Zuchtlinien. Es wurden unbehandelte Black-6/J (BL/6J) Kontrollmäuse, *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2) Knock-out Mäuse und Apolipoprotein E (ApoE) defiziente Mäuse untersucht. Es sind die Höhen ($\mu\text{m} \pm$ STABW) des RPE aufgetragen. Es zeigte sich, dass sich die Höhe des RPE weder zwischen den unterschiedlichen Altersgruppen innerhalb der einzelnen Zuchtlinien signifikant unterschied, noch zwischen den drei Zuchtlinien.

Die Dicke der BrM ist die zentrale Prüfgröße zur Beurteilung des Lasererfolges in dieser Arbeit. Daher wurden die beiden Mausmodelle gewählt, da für diese das Auftreten einer verdickten BrM beschrieben wurde (Zhao *et al.* 2011; Dithmar *et al.* 2000). Um zu prüfen, ob die Knock-out Mäuse als AMD-Modelle geeignet sind, wurde die Dicke der BrM in einem standardisierten Verfahren quantifiziert. Es wurden die BrM-Dicke von BL/6J Kontrollen mit unbehandelten Mäusen beider Knock-out Linien verglichen. Die Anzahl der untersuchten Tiere ist unter 3.5.2 aufgeführt. Die Dicke der BrM ist in nm (\pm SEM) angegeben.

Es zeigte sich eine signifikante Dickenzunahme der BrM innerhalb der BL/6J Kontrollgruppe zwischen 5 ($442,06 \pm 5,43$, $p < 0,001$) und 10 Monaten ($537,65 \pm 8,00$, $p < 0,001$), wohingegen sich nach 13 Monaten ($545,79 \pm 8,98$) keine weitere Zunahme zeigte (Abb. 36).

Bei dem Vergleich der BrM-Dicke zwischen BL/6J Kontrollmäusen und ApoE Knock-out Mäusen zeigte sich sowohl ein signifikanter Unterschied in der Gruppe der 5 Monate alten Mäuse ($551,04 \pm 9,46$, $p < 0,001$) als auch bei den 9 Monate alten ApoE -/- Mäusen ($579,05 \pm 10,04$, $p < 0,01$) (Abb. 36).

Auch bei dem zweiten AMD-Modell zeigte sich nach 10 Monaten ($562,65 \pm 11,75$, $p < 0,05$) und 13 Monaten ($634,11 \pm 14,68$, $p < 0,001$) eine signifikante Zunahme der BrM-Dicke im Vergleich zu den BL/6J Kontrollmäusen (Abb. 36).

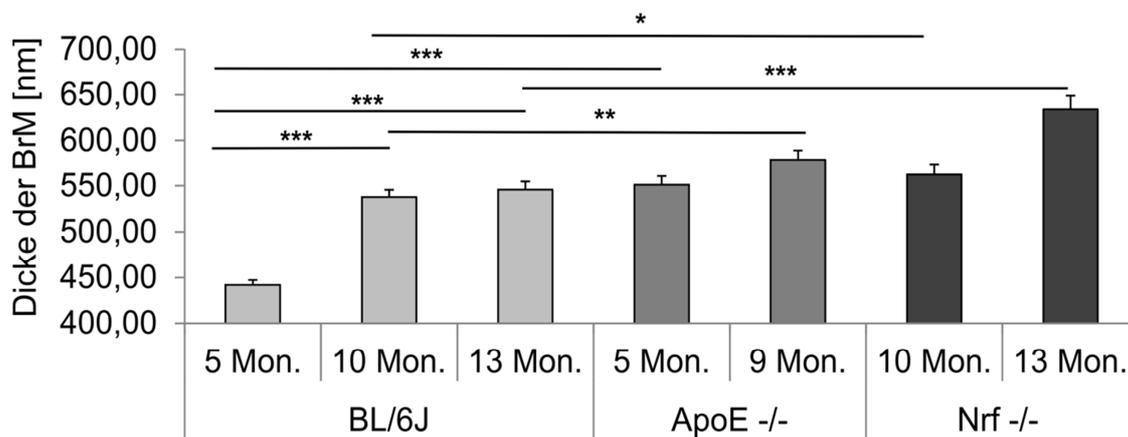


Abbildung 36: Zunahme der Dicke der Bruch'schen Membran (BrM) bei Mäusen unterschiedlichen Alters und genetischem Hintergrund. Es wurde die BrM-Dicke von Black-6/J (BL/6J) Kontrollmäuse, *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2) Knock-out Mäuse und Apolipoprotein E (ApoE) defiziente Mäuse verglichen. Die Dicke der BrM ist in nm ± SEM angegeben. Es zeigte sich eine signifikante Dickenzunahme der BrM innerhalb der BL/6J Kontrollgruppe zwischen 5 und 10 Monaten. Bei dem Vergleich der BrM-Dicke zwischen BL/6J Kontrollmäusen und ApoE Knock-out Mäusen zeigte sich in beiden Altersgruppen ein signifikanter Unterschied. Bei den Nrf2 -/- Mäusen zeigte sich nach 10 und 13 Monaten eine signifikante Zunahme der BrM-Dicke (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

4.6.5. Zusammenhang von funduskopischen Veränderungen und der $Crb1^{rd8}$ -Mutation

Die Mutation des *Crb1*-Gens stellt eine häufige Mutation bei Zuchtmäusen dar. Infolge einer homozygoten Mutation des Gens wird die Ausbildung bestimmter AMD-relevanter Fundusveränderungen in der Maus beschrieben (Mehalow *et al.* 2003). Um nachzuweisen, ob der spezifische Knock-out unserer Mäuse für den ophthalmologischen Phänotyp verantwortlich ist, oder ob dieser lediglich durch die $Crb1^{rd8}$ -Mutation bedingt

ist, wurde eine Genotypisierung durchgeführt. Dies ist wichtig, um zu bewerten, ob die gesichteten Veränderungen auf den Knock-out oder die Hintergrundmutation zurückzuführen sind. Zu diesem Zweck wurden die Tiere nach der Geburt über die PCR-Reaktion auf das homozygote Vorhandensein der Mutation untersucht. Die PCR wurde in zwei Ansätzen durchgeführt. Der erste Ansatz diente zum Nachweis des Wildtypen (Wt.) und der zweite Ansatz zum Nachweis der Mutation (Mut). Es konnten homozygote (Hom.) und heterozygote (Het.) Träger der $Crb1^{rd8}$ -Mutation nachgewiesen werden (Abb. 37). Der reine Wildtyp wurde in der Zucht nicht nachgewiesen.

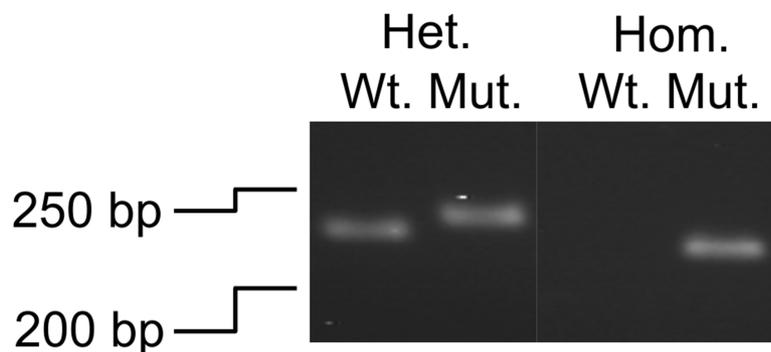


Abbildung 37: Genotypisierung von *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2) und Apolipoprotein E (ApoE)-defizienten Mäusen. Die PCR wurde in zwei Ansätzen durchgeführt. Der erste Ansatz diente zum Nachweis des Wildtypen (Wt.) und der zweite Ansatz zum Nachweis der Mutation (Mut). Es konnten heterozygote (Het.) und homozygote (Hom.) Träger der $Crb1^{rd8}$ Mutation nachgewiesen werden.

Bei der Genotypisierung zeigte sich, dass in der Zucht der ApoE $-/-$ Mäuse ausschließlich heterozygote Individuen nachgewiesen wurden. In unserer Nrf2 $-/-$ Mauslinie zeigte sich jedoch, dass 19 % der 75 untersuchten Tiere die Mutation heterozygot trugen und 81 % der Mäuse die Mutation homozygot trug. Um zu überprüfen, ob die $Crb1^{rd8}$ -Mutation mit den Fundusveränderungen zusammenhängt, wurden alle 9-12 Monate alten Nrf2 $-/-$ Knock-out Mäuse der Studie mit den beschriebenen klinischen bildgebenden Verfahren untersucht.

Die AMD-typischen Veränderungen wurden klinisch klassifiziert, wobei 1= physiologische Retina, 2= 1-14 Drusen, 3= 15-100 Drusen, 4= >100 Drusen, 5= Drusen und RPE-Veränderungen, 6= Atrophie, 7= Drusen und CNV, 8= Hämorrhagien und 10= eine Kombination unterschiedlicher Veränderungen. In Abb. 38 sind die Ergebnisse zum Zusammenhang zwischen Fundusveränderungen und der $Crb1^{rd8}$ -Mutation aufgeführt. In 14,3 % der heterozygoten und 3 % der homozygoten Mäuse zeigte sich eine physiologische Retina. Bei 46,4 % der heterozygoten Träger zeigten sich AMD-typische

Veränderungen des Grad 2 verglichen mit einem geringeren Anteil von 28,7 % der homozygoten Mäuse. Der Grad 3 AMD-typischer Veränderungen zeigte sich in 13 % der homozygoten und einem höheren Anteil von 25 % bei den heterozygoten Tieren. Bei dem Grad 4 der Veränderungen lag der Anteil der homozygoten Träger mit 36,1% höher als bei den heterozygoten Trägern mit 14,3 %. Der Grad 5 konnte bei 5,7 % der homozygoten Träger nachgewiesen werden, jedoch nicht bei den Heterozygoten. AMD-typische Veränderungen höher dem Grad 5 wurden zusammengefasst und lagen bei den homozygoten Trägern bei 13,1 %, wohingegen die heterozygoten Träger keine Veränderungen höher des Grades 5 aufwiesen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die leichteren Veränderungen bis Grad 3 zu einem höheren Anteil bei den heterozygoten Tieren gesichtet wurde, wohingegen die schwereren Veränderungen ab Grad 4 bei den homozygoten Trägern stärker ausgeprägt waren bzw. der Grad 5 und höher ausschließlich bei den homozygoten Tieren nachgewiesen wurde. Die Mutation des *Crb1^{rd8}* hat demnach einen Einfluss auf den Grad der AMD-typischen Veränderungen und der CNV-Entwicklung, jedoch scheinen diese auch unabhängig von der homozygoten Mutation zu entstehen.

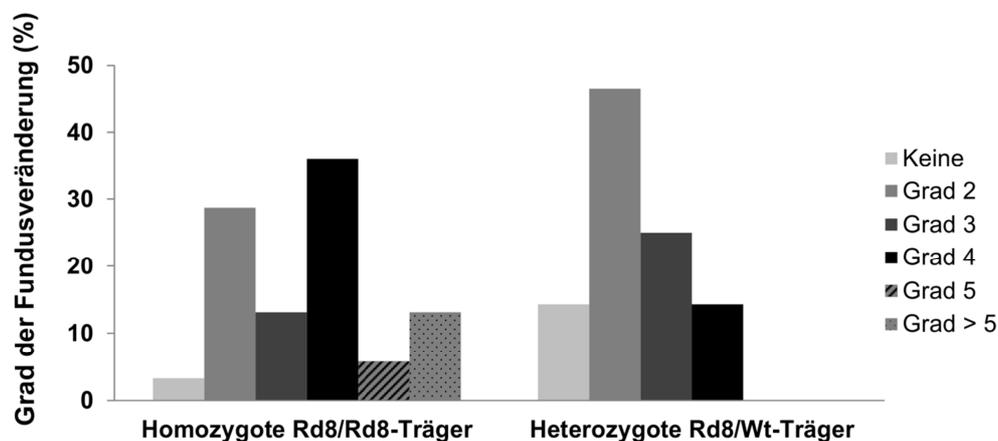


Abbildung 38: Zusammenhang zwischen funduskopischen Veränderungen und der *Crb1rd8*-Mutation. In der *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (*Nrf2*) Zucht zeigte sich, dass 19 % der 75 untersuchten Tiere die Mutation heterozygot trugen und 81 % der Mäuse homozygot. Um zu überprüfen, ob die *Crb1rd8*-Mutation mit den Fundusveränderungen zusammenhängt, wurden alle 9-12 Monate alten *Nrf2* *-/-* Knock-out Mäuse der Studie mit den beschriebenen klinischen bildgebenden Verfahren untersucht. Die AMD-typischen Veränderungen wurden klinisch klassifiziert, wobei 1= physiologische Retina, 2= 1-14 Drusen, 3= 15-100 Drusen, 4= >100 Drusen, 5= Drusen und RPE-Veränderungen, 6= Atrophie, 7= Drusen und CNV, 8= Hämorrhagien und 10= eine Kombination unterschiedlicher Veränderungen. In den heterozygoten Mäusen zeigte sich ein höherer Anteil mit einer physiologischen Retina. Der Anteil der Grad 2 und 3 Veränderungen lag ebenfalls bei den heterozygoten Tieren höher als bei den homozygoten Trägern. Bei dem Grad 4 der Veränderungen lag der Anteil der homozygoten Träger höher als bei den heterozygoten Trägern. Der Grad 5 und höher konnten nur bei homozygoten Trägern nachgewiesen werden.

4.7. Effekte der Laserbehandlungen in Nrf2- und ApoE-defizienten Mäusen

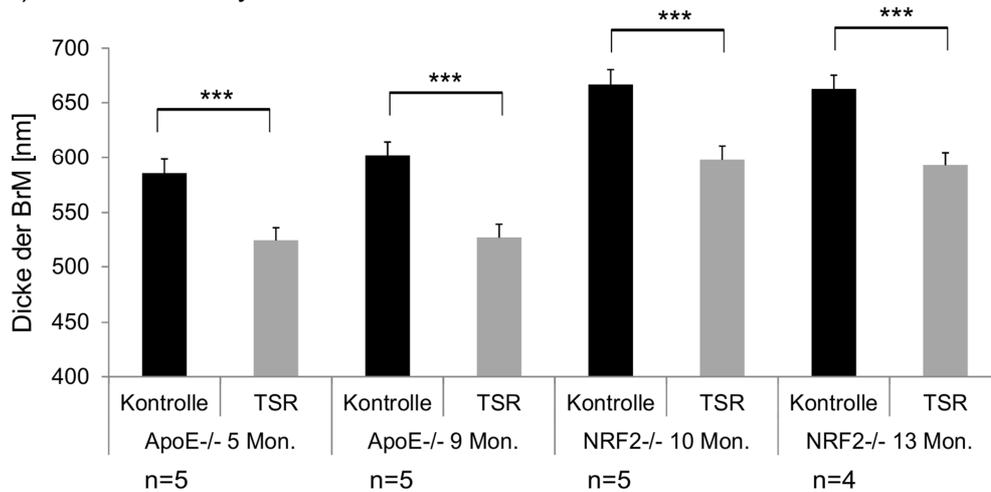
Die beschriebenen *in vitro* Untersuchungen zeigen eine Induktion der MMP-Sekretion nach den beiden Laserbehandlungen. In Anlehnung an diese Ergebnisse wurde die Hypothese aufgestellt, dass sich die Dicke der BrM durch den Einsatz der Laserbehandlungen modulieren lässt. Dies wäre im Hinblick auf die AMD-Pathologie ein Resultat von zentraler Bedeutung. Um diesen Effekt zu untersuchen wurde die Dicke der BrM nach Laserbehandlung in der TEM in einem verblindeten und standardisierten Verfahren untersucht. Die BrM sowie AMD-artige Veränderungen konnten hier in 12.000-facher Vergrößerung exzellent dargestellt werden.

4.7.1 Veränderung der Dicke der BrM nach TSR und SRT

Die Untersuchung erfolgte an beiden Knock-out Modellen mit Mäusen unterschiedlichen Alters für den TSR- und SRT-Modus unter Verwendung unterschiedlicher Parameter (*Low density* und *High density*). Da nicht alle Tiere aus dem Projektplan in die Studien eingeschlossen werden konnten, ist die Anzahl der untersuchten Tiere in den Abb. 39 und Abb. 40 aufgeführt. Die Dicke der BrM ist in nm (\pm SEM) angegeben.

In Abb. 39 a ist die Reduktion der Dicke der BrM nach der TSR-Behandlung in der *Low density*-Gruppe dargestellt. Es zeigte sich sowohl bei den 5 Monate alten ApoE $-/-$ Mäusen eine signifikante Reduktion der Dicke der BrM ($524,8 \pm 11,4$, $p < 0,001$) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollaugen ($585,7 \pm 12,9$) als auch bei den 9 Monate alten Tieren ($527,4 \pm 12,0$ vs. $602,7 \pm 12,2$, $p < 0,001$). In dem Nrf2 $-/-$ Modell zeigte sich ebenfalls eine signifikante Reduktion der Dicke der BrM sowohl bei den 10 Monate alten Tieren ($597,99 \pm 13,07$, $p < 0,001$) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($666,33 \pm 13,32$) als auch bei den 13 Monate alten Mäusen ($593,13 \pm 11,79$ vs. $662,49 \pm 12,20$, $p < 0,001$). Im Gegensatz dazu zeigte sich in keiner der untersuchten Gruppen eine Veränderung der BrM nach der TSR-Behandlung in der *High density*-Gruppe (Abb. 39 b).

a) TSR low density



b) TSR high density

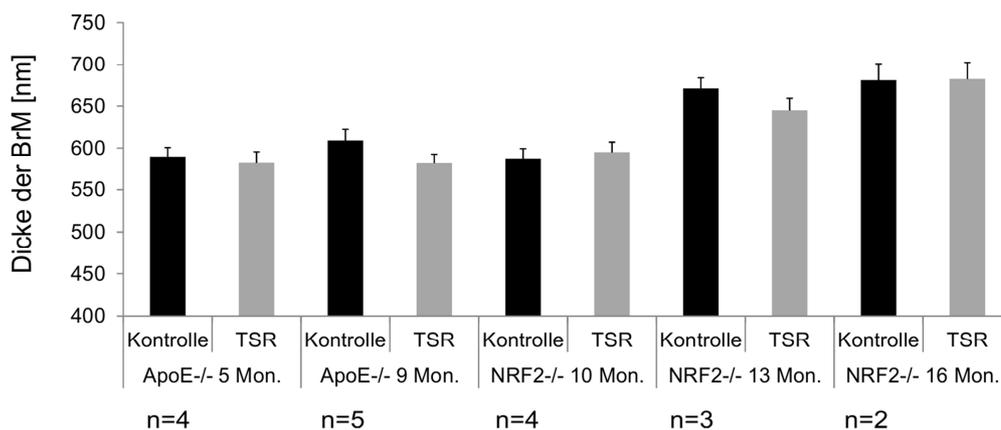


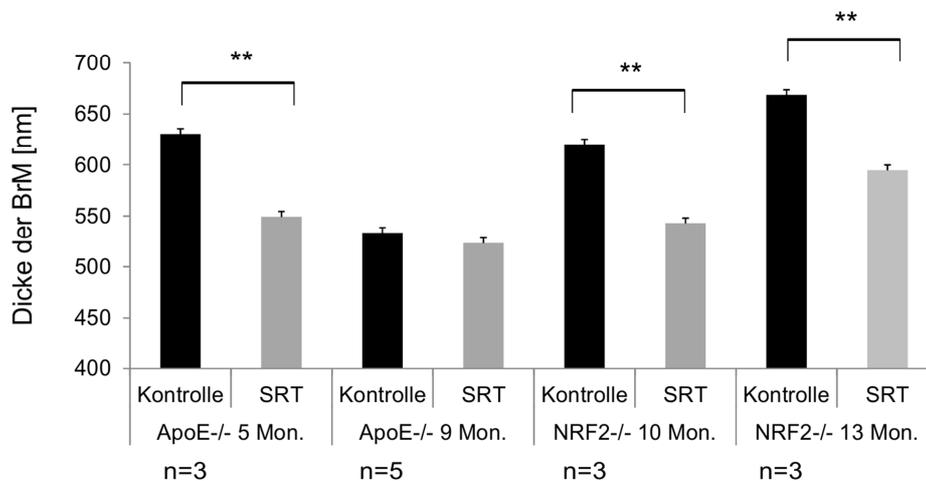
Abbildung 39: Beeinflussung der Dicke der Bruch’schen Membran (BrM) durch Thermische Stimulationstherapie der Retina (TSR) in zwei AMD-Mausmodellen. Die Untersuchung erfolgte an *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2) Knock-out Mäusen und Apolipoprotein E (ApoE) defizienten Mäusen unterschiedlichen Alters unter Verwendung unterschiedlicher Parameter (*low density* [ld] und *high density* [hd]). Die Dicke der BrM ist in nm ± SEM angegeben. a) Reduktion der Dicke der BrM nach der TSR-Behandlung in der ld-Gruppe bei 5 und 9 Monate alten ApoE^{-/-} Mäusen und bei 10 und 13 Monate alten Nrf2^{-/-} Mäusen. b) Es zeigte sich in keiner der untersuchten Gruppen eine Veränderung der BrM nach der TSR-Behandlung in der hd-Gruppe.

In Abb. 40 a sind die Ergebnisse zur Dickenmessung der BrM nach SRT-Behandlung in der *Low density*-Gruppe aufgeführt. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der BrM nach SRT bei den 5 Monate alten ApoE^{-/-} Mäusen ($549,35 \pm 17,50$ vs. $630,65 \pm 19,18$, $p < 0,01$), bei den 10 Monate alten Nrf2^{-/-} Mäusen ($543,06 \pm 12,89$ vs. $620,30 \pm 16,99$,

$p < 0,01$) und 13 Monate alten Nrf2 $-/-$ Tieren ($594,71 \pm 13,53$ vs. $668,66 \pm 15,24$, $p < 0,01$). Bei den 9 Monate alten ApoE $-/-$ Mäusen zeigte sich keine Veränderung.

Bei der SRT-Behandlung in der *High density*-Gruppe zeigte sich eine signifikante Reduktion der BrM bei den 9 Monate alten ApoE $-/-$ Mäusen ($573,00 \pm 10,00$ vs. $534,00 \pm 12,00$, $p < 0,05$) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollaugen. Bei den Nrf2 $-/-$ Tieren zeigte sich bei keiner der untersuchten Altersgruppen ein signifikanter Unterschied (Abb. 40 b).

a) SRT low density



b) SRT high density

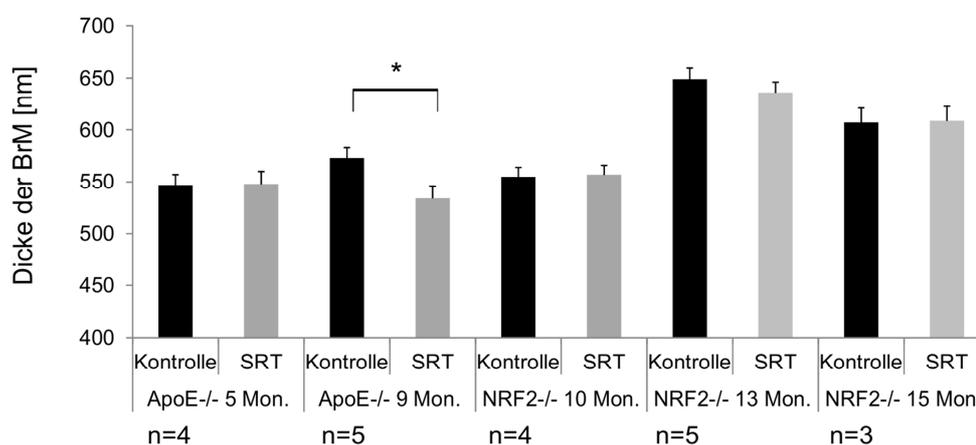


Abbildung 40: Beeinflussung der Dicke der Bruch'schen Membran (BrM) durch Selektive Retina-Therapie (SRT) in zwei AMD-Mausmodellen. Die Untersuchung erfolgte an *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2) Knock-out Mäusen und Apolipoprotein E (ApoE) defizienten Mäusen unterschiedlichen Alters unter Verwendung unterschiedlicher Parameter (*low density* [ld] und *high density* [hd]). Die Dicke der BrM ist in $\text{nm} \pm \text{SEM}$ angegeben. a) Signifikante Reduktion der BrM nach SRT bei den 5 Monate alten ApoE $-/-$ Mäusen sowie bei den 10 und 13 Monate alten Nrf2 $-/-$ Tieren. b) Bei der SRT-Behandlung in der hd-Gruppe zeigte sich eine signifikante Reduktion der BrM bei den 9 Monate alten ApoE $-/-$ Mäusen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollaugen (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Eine exemplarische elektronenmikroskopische Abbildung zur Darstellung der Reduktion der Dicke der BrM nach TSR-Laserbehandlung ist in Abb. 41 dargestellt.

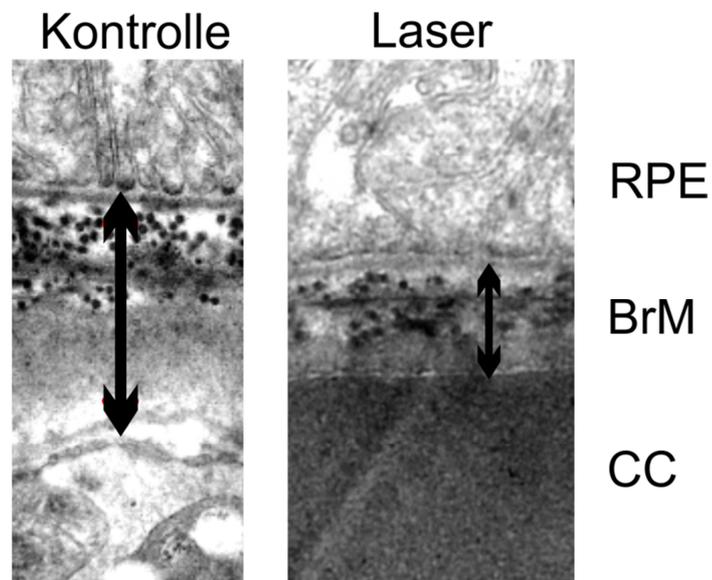


Abbildung 41: Elektronenmikroskopischer Nachweis der Dicke der Bruch'schen Membran (BrM) im AMD-Mausmodell. Es ist die Reduktion der Dicke der BrM nach der Laserbehandlung dargestellt. RPE= Retinales Pigmentepithel, CC= Choriocapillaris.

5. DISKUSSION

5.1 Die altersabhängige Makuladegeneration und aktuelle Therapieansätze

Die AMD ist die häufigste Erblindungsursache älterer Menschen in der westlichen Welt (Schrader 2006). Es gibt eine Vielzahl von Faktoren, denen ein Einfluss auf die AMD zugesprochen wird. Eine adäquate Behandlungsmöglichkeit der frühen Form der AMD steht bis heute nicht zur Verfügung.

Der Einsatz von Laserverfahren in der Ophthalmologie hat eine lange Tradition, wobei es sich bei den konventionellen Einsatzbereichen um stark überschwelligen Laserbehandlungen handelte, die zu einer thermischen Nekrose im Bereich der Retina und Choroidea führten. Dieser Therapieansatz wurde bis 2006 angewandt, um Neovaskularisationen im Rahmen der feuchten Form der AMD zu veröden, und damit eine Progression der AMD zu unterbinden. Die Behandlungen wurden mittels Xenonlicht, Argon- und Kryptonlaser oder der photodynamischen Therapie mit Licht und einem lichtaktivierbaren Farbstoff durchgeführt. Seit der Einführung der VEGF-Inhibitoren ab 2006 ist die Behandlung der feuchten Form der AMD durch Laserbehandlungen jedoch stark zurückgegangen (Klettner 2015b; Schmidt-Erfurth *et al.* 2014).

Im Gegensatz zu der stark überschwelligen Behandlung weist die aktuelle Tendenz in der Entwicklung von laserbasierten Verfahren zur AMD-Behandlung in die Richtung der schonenden und stimulierenden Behandlungen, anstelle von Lasertherapien mit hohem Zerstörungscharakter. In dieser Arbeit standen zwei schonende Laserverfahren im Fokus der Untersuchungen, die TSR für die thermische Stimulation und die SRT für eine selektive Zerstörung von RPE-Zellen mit anschließendem Regenerationsprozess. Ziel dieser Behandlungen, im Gegensatz zu dem früheren Wirkprinzip der thermischen Nekrose, ist eine Zellstimulation, die zwar wirksam sein soll, jedoch zu keiner Schädigung der Neuroretina, BrM und Choroidea führt. Damit wäre eine Behandlung in der Macula lutea möglich, dem wichtigsten Ort des AMD-Krankheitsgeschehens, ebenso wie ein präventiver Einsatz denkbar wäre.

5.2 Einfluss der Laserbehandlung auf Zellmediatoren im Organkultursystem

Es wurde der Einfluss zweier Laserverfahren als Behandlungsoption der frühen AMD untersucht. Die SRT ist eine Laserbehandlung, die mit kurzen repetitiven Pulsen behandelt, deren Dauer und Form vermessen wurden. Es zeigte sich, dass die Dauer und Signalform der Pulse in Abhängigkeit von der gewählten Energie variierten und sich bei höheren Energien die Bildung einer sogenannten „Schulter“ zeigte, welche zu einer entsprechenden Verlängerung der Pulsdauern führte. Die Pulse für die SRT-Kultivierungsversuche mit 200 µm Spots waren demnach länger als die Pulse bei der Behandlung mit 100 µm Spotgröße. Es stellte sich die Frage, ob dies einen Einfluss auf die Proteinsekretion haben könnte. Bei der Analyse der Zytokinsekretion nach SRT mit 100 µm Spots, bei denen keine Verlängerung des Pulses durch eine Schulterform auftrat, zeigte sich allerdings ein vergleichbarer Effekt auf die Proteinsekretion wie bei der Behandlung mit 200 µm Spots. Es ist also davon auszugehen, dass die längeren Pulse keine zusätzliche Wirkung auf die Proteinsekretion der RPE-Zellen aufweisen. Für zukünftige Versuche könnten Glasfilter zur Abschwächung der Laserenergie verwendet werden. In diesem Fall würde man eine höhere Energie am Gerät einstellen (Pulsform mit Schulter), jedoch die Energie durch den optischen Filter auf das angestrebte Maß abschwächen. Die Energien würden sich dann wie gewünscht unterscheiden, aber die Pulsformen wären vergleichbar.

Für die Behandlung mit der TSR und SRT war es von zentraler Bedeutung welchen RPE-Zellschaden die Behandlungen verursachten, da das übergeordnete Ziel am Patienten ist, im Bereich der Macula lutea zu behandeln. Um dies zu prüfen, wurde die Schwelle des RPE-Zellschadens mit unterschiedlichen Spotgrößen titriert. In dieser Arbeit wurden Unterschiede in den Zelltodschwelen zwischen der SRT-Behandlung mit 100 µm und 200 µm großen Spots festgestellt, welches in früheren Studien nicht beschrieben wurde (Brinkmann *et al.* 2000). Eine Erklärung dafür ist die individuellen Variationen in der Pigmentierung der porcinen Explantate, die z.B. durch den nicht-genormten genetischen Hintergrund der Tiere auftreten. Diese führen zu Unterschieden in der Absorption des Laserlichts sowie der Formation der Mikroblasen an den Melanosomen und damit zu

Abweichungen in der Zerstörung der RPE-Zellen. Daher wurde auch eine allmähliche Zunahme der Zellschädigung, anstelle des Auftretens eines abrupten 100 %-igen Zelltods beobachtet. Dieser Effekt ist auch für die Behandlung am AMD-Patienten von Relevanz, da auch hier individuelle Unterschiede in der Pigmentierung auftreten, welche zu Variationen in der Zellschädigung führen und daher die Laserleistung individuell angepasst werden muss (Koinzer *et al.* 2012; Velez-Montoya *et al.* 2010).

Die Kultivierungsversuche wurden mit unterschiedlichen Spotgrößen durchgeführt, bei denen im SRT-Modus auf bzw. über der Zelltodschwelle und bei der TSR-Behandlung unter der Zelltodschwelle behandelt wurde (siehe 3.6.3.).

Für die Kultivierungsversuche und Zytokinanalyse der Organkulturen nach SRT-Laserbehandlung wurde für die Spots mit 100 μm Kantenlänge mit 200 mJ/cm^2 im klar überschwelligen Bereich behandelt. Für die 200 μm Spots wurde mit 140 mJ/cm^2 behandelt, was jedoch nicht klar überschwellig wie bei den 100 μm Spots war, sondern direkt auf der Zelltodschwelle. Der Grund für die Applikation einer höheren Energie bei den 100 μm Spots war das Ziel mit den kleinen Spots auch tatsächlich komplette Läsionen zu erzeugen und dadurch Zytokin-Effekte nachzuweisen. Im Laufe dieser Studie und zunehmender Routine in der Verwendung von kleinen Spots zeigte sich jedoch, dass auch bei den kleinen Spots ein vollständiger SRT-Effekt in Form von zuverlässig auftretenden Läsionen erreicht wurde, sodass bei weiteren Versuchen auch hier die Energie leicht reduziert werden kann. Der Nachweis, dass durch die kleineren Spots in einer höheren Dichte der gleiche Effekt erzeugt werden kann, wie bei der Behandlung mit größeren Spots, ist für die Behandlung am AMD-Patienten von großer Bedeutung, da bisherige vergleichbare Laserverfahren nur mit sehr großen Spots ($> 300 \mu\text{m}$) durchgeführt wurden (Jobling *et al.* 2015). Das Ziel ist es jedoch im Bereich der Macula lutea zu behandeln und eine geringere Spotgröße würde eine sehr viel präzisere Behandlung erlauben.

Ein weiterer Diskussionspunkt ist die Wahl der Laser-Leistung für die TSR-Kultivierungsversuchen. Bei der Bestimmung der Zelltodschwelle wurde diese für die TSR mit 300 μm Spots auf 80 mW festgelegt und für die Behandlung mit 100 μm auf 25 mW. Daraufhin wurde die unterschwellige TSR an den Organkulturen mit 45 mW (300 μm Spots) bzw. 15 mW (100 μm) durchgeführt. Beide Leistungen, die für die Kultivierungsversuche gewählt wurden, befanden sich nachweislich im unterschwelligen

Bereich und entsprachen, anders als bei der Behandlung der Mäuse, 56 % bzw. 60 % der Zelltodschwelle. In dem zweiten Teil dieser Arbeit, den Laserbehandlungen der Mäuse, wurde in Anlehnung an die Arbeiten von Lavinsky *et al.* (2016) die Behandlungsleistung auf 30 % der letzten sichtbaren Schädigung reduziert, weil dadurch zuverlässig keine Schädigung der Neuroretina hervorgerufen wurde. Dies sollte bei weiteren Versuchen mit den Organkulturen ebenfalls beachtet werden. Wie bereits erwähnt ist das Ziel die Behandlung im Bereich der Macula lutea und daher ist es am Patienten unbedingt notwendig im unterschweligen Bereich zu arbeiten, weil es ansonsten zu thermischen Nekrosen, Narbenbildungen und zum Visusverlust kommen würde (Elsner *et al.* 2006b, Roider 2006).

Die Analysen am porcinen Organkulturmodell dienen der Untersuchung der laserinduzierten Effekte auf AMD-relevante Zellmediatoren. Das Organkulturmodell ermöglicht die Untersuchung der Interaktionen zwischen RPE, BrM und Choroidea als funktionelle Einheit und befindet sich damit näher an der *in vivo* Situation, als es bei Untersuchungen an Zellkulturen der Fall ist. Die porcinen Augen wurden als geeignetes Modell befunden, da diese dem humanen Auge in vielerlei Hinsicht sehr ähnlich sind. Es finden sich dort ebenfalls eine Blutversorgung durch ein retinales und choroidales Gefäßsystem sowie ein zehnschichtiger Aufbau der Retina. Wie bei allen nicht-Primaten fehlt bei dem porcinen Auge jedoch eine Macula lutea, welche den primären Ort der AMD-Pathologie darstellt. Dennoch ist die Retina des Schweineauges der humanen Retina, u.a. durch die hohe Zapfendichte, sehr ähnlich (Middleton 2010). In Hinblick auf ethische Aspekte bietet dieses Modell einen weiteren Vorteil, da die Schweineaugen bei der Schlachtung der Tiere für die Nahrungsmittelindustrie routinemäßig entfernt werden und so die Verwendung von Organkulturen zur Reduktion von Tierversuchen beiträgt.

Die porcinen Organkulturen wurden in modifizierten Ussingkammern kultiviert. Diese ermöglichen eine Differenzierung zwischen apikaler und basolateraler Proteinsekretion. Die Möglichkeit dieser Differenzierung stellt die Besonderheit des Systems dar, da sich auch *in vivo* ein Unterschied zwischen apikaler und basolateraler Proteinsekretion der RPE-Zellen findet (Blaauwgeers *et al.* 1999; Strauss 2005). Die Vitalität und Integrität der porcinen Organkulturexplantate wurde mittels Calceinassay überprüft und zeigten sich über einen Kultivierungszeitraum von 4 Tagen stabil. Ab dem vierten Kultivierungstag

fand eine Degeneration der Kulturen statt. Dies könnte mit der beobachteten Zunahme der TNF- α -Sekretion im Laufe der Kultivierung zusammenhängen, da TNF- α apoptotische Prozesse induziert. Eine erhöhte Apoptoserate in älteren Organkulturen wurde ebenfalls von Miura *et al.* (2010) beschrieben. Um eine unspezifische Variabilität in der Zytokinuntersuchung zu minimieren, wurde eine maximale Kultivierungsdauer von 4 Tagen nicht überschritten. Diese Zeitspanne wurde auch in vorherigen Studien als geeignete Kultivierungsdauer geschrieben (Treumer *et al.* 2012) und stellt eine gewisse Limitation des Systems dar, da Langzeituntersuchungen nicht durchgeführt werden können. Die Zugabe von Serum in das Organkulturmedium ist unerlässlich für die Vitalität, die Regenerationsfähigkeit der RPE-Zellen und für die Sekretion von MMPs (Ahir *et al.* 2002). Würde ein großer Anteil an Serum eingesetzt werden, könnte die MMP-Sekretion der RPE-Zellen jedoch maskiert werden. Aufgrund dessen wurde in dieser Studie 5-10 % FCS verwendet. Diese Menge wurde durch langjährige Erfahrung unserer Arbeitsgruppe und in früheren Studien von Miura *et al.* (2010) als angemessen für die Kultivierung der Organkulturen befunden. Wie in der Abbildung eines repräsentativen Zymograms dargestellt ist (Abb. 18), wurde stets eine Mediumkontrolle mit den Proben aufgetragen die zeigte, dass die MMP-Sekretion der Explantate nicht maskiert wurde.

Die Modifikationen des Organkultursystems bezüglich der Breite der Fixiererringe und der Fixationsfläche des Gewebes zwischen den Ringen zeigte, im Vergleich zu vorhergehenden Studien an unserer Klinik, eine positive Steigerung der Zellvitalität und der Qualität der Kulturen (Treumer *et al.* 2012). Dies spricht für die These, dass das Verhältnis zwischen exponierter und fixierter Fläche von hoher Relevanz für das Maß des Zellstresses und damit für die Vitalität der Explantate ist.

Die Möglichkeit der Mitose von RPE-Zellen im Laufe des Lebens oder nach Verletzungen ist Gegenstand aktueller Diskussionen (Ach *et al.* 2014; Flaxel *et al.* 2007; Kaldarar-Pedotti 1979; Treumer *et al.* 2012). Daher wurde die RPE-Regeneration nach Laserbehandlung in dieser Arbeit untersucht, weil sie Bestandteil der hypothetischen Re-Juvenilisierung von RPE-Zellen ist. Es wurde dabei die Zunahme der Zellgröße, das Auftreten von prominenten Zellkernen und das positive Signal für den Proliferationsmarker Ki-67 nach der SRT-Behandlung beobachtet (Abb. 15 und 17). Dies wurde auch von anderen Arbeitsgruppen nach der Anwendung von mechanischem Stress (Kiilgaard *et al.* 2007)

oder Laserbehandlung (Flaxel *et al.* 2007) beschrieben. Es ist anzunehmen, dass die Zellen den Defekt im RPE nicht allein über Zunahme der Zellgröße und Migration, sondern auch über mitotische Teilungen schließen. Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen für das Konzept der Re-Juvenilisation von RPE-Zellen. Dies ist für die AMD-Behandlung von Relevanz, da dies hypothetisch zur Funktionssteigerung von RPE-Zellen führen könnte, die durch altersbedingte Veränderungen wie z.B. Lipidablagerungen geschädigt sind. So wäre es vorstellbar, dass Prozesse wie der Transport von Nährstoffen zu der Neuroretina, das Recycling von Photorezeptoraußensegmenten, oxidative Schutzmechanismen sowie der Abtransport und die Verstoffwechslung von Abbauprodukten wieder verstärkt durch die RPE-Zellen aufgenommen würden und dadurch das Fortschreiten der frühen trockenen AMD verlangsamt oder gar verhindert werden kann.

Bei der AMD kommt es zur Verdickung der BrM und zur Einschränkung dieses Stoffaustausches. Die MMPs sind Gelatinasen, welche alle bekannten Bestandteile der ECM und damit der BrM spalten können (Woessner 1991). Es konnte in der vorliegenden Studie die Induktion von aktivem MMP-2 sowohl nach der TSR-Behandlung als auch nach der SRT-Behandlung gezeigt werden. Es wird angenommen, dass die gesteigerte MMP-2-Sekretion von den RPE-Zellen der Explantate und nicht zusätzlich von den choroidalen Endothelzellen ausgeht, obgleich diese selbst auch in geringem Maße MMPs sezernieren und ebenfalls Teil der Organkulturen waren. Der Einfluss choroidaler Endothelzellen auf die MMP-2 Sekretion kann jedoch als unwahrscheinlich betrachtet werden, da Ahir *et al.* (2002) bei der Kultivierung von humanen Explantaten, die lediglich die BrM und Choroidea enthielten, keine Freisetzung von MMPs beobachteten.

Die nachgewiesene Induktion von MMP-2 könnte zu einer Re-Modellierung der BrM und zu einer Abnahme der Dicke der BrM, wie sie bei der AMD auftritt, führen. Dadurch könnte die Versorgung der Neuroretina mit Nährstoffen wieder erhöht werden. Diese Theorie wird durch frühere Studien unterstützt, die zeigten, dass die Behandlung humaner BrM mit aktivierten MMPs zu einer Steigerung der Transportkapazität führte (Ahir *et al.* 2002). Es wäre also denkbar, dass die beobachtete MMP-Induktion auch zu diesem Ergebnis führen würde, wenngleich dies in dieser Arbeit nicht untersucht wurde. Würde es zu diesem Effekt kommen, könnte dies die Konvertierung der Frühformen der AMD in die geographische Atrophie vermindern oder gar unterbinden. Dies würde sich

positiv auf den Visus auswirken und daher von großem Nutzen in der AMD-Therapie sein. Nach dem Nachweis der MMP-Induktion durch die Laserbehandlung, wäre es folglich für weitere Studien von Interesse den Einfluss auf die Transportfähigkeit der BrM zu testen. Des Weiteren wurde für das MMP-2 von Hollborn *et al.* 2007 gezeigt, dass dieses die VEGF-Sekretion reduzieren kann. Da in dieser Arbeit eine VEGF-Reduktion nach Laserbehandlung nachgewiesen wurde, ist es denkbar, dass dieses durch die ebenfalls nachgewiesenen MMP-2-Induktion vermittelt wurde. Die MMP-2 Expression nach SRT-Behandlung wurde in der Immunfluoreszenz an Organkultur *Flat mounts* untersucht. Der verwendete Antikörper differenzierte nicht zwischen dem aktiven und inaktiven MMP-2. Innerhalb der regenerierenden Läsionen zeigte sich eine lokale Expression des MMP-2 im Bereich der Zellkerne und in Bereichen der Zellmembranen. Die umgebenden Zellen zeigten keine positiven Signale für MMP-2 im Zellkern, jedoch sporadisch an den Zellmembranen (Abb. 20). Es wird davon ausgegangen, dass es sich bei dem positiven Signal an den Zellmembranen um aktives MMP-2 handelt, da sich dort der membranständige Aktivierungskomplex des Pro-MMP-2 befindet (Hofmann *et al.* 2000). Eine moderate Aktivierung zeigt sich an den Zellmembranen von unbehandelten RPE-Zellen, wobei jedoch auffällig ist, dass sich ein verstärktes Signal in den Bereichen der SRT-Läsion findet. In den Bereichen der Läsion findet die Regeneration der RPE-Zellen statt, welche zu dem Auftreten prominenter, mitotisch aktiver Zellkerne führt, die trotz der starken Pigmentierung der RPE-Zellen sichtbar sind und die ebenfalls positiv für MMP-2 gefärbt wurden (Abb. 15 und Abb. 20). Das Vorhandensein von MMP-2 in Zellkernen von Endothelzellen wurde bereits von Sinha *et al.* (2014) beschrieben. Die Funktion der MMP-2 im Zellkern ist noch nicht vollständig verstanden. Es wird angenommen, dass MMP-2 dort Aufgaben wie die Re-Modellierung des Chromatins, Erhalt der nukleären Matrix, Apoptose und Regulierung der Zellproliferation übernimmt (Sinha *et al.* 2014). Da die Regulierung der Proliferation auch bei dem Re-Juvenilisierungsprozess des RPE angesprochen wird, ist das nukleäre Auftreten des MMP-2 in diesem Bereich plausibel.

Die Laserbehandlung zeigte keinen Einfluss auf das MMP-9. Ahir *et al.* (2002) konnten in Zellkulturversuchen zeigen, dass aktives MMP-9 in Abhängigkeit von dem Zellzyklus, bis zu 24 h nach Aussäen humaner RPE-Zellen auf neuen Zellkulturschalen, sezerniert wurde. Dies entsprach dem Zeitpunkt, an dem die Zellen halb-konfluent die Schale

besiedelt hatten. Dies lässt darauf schließen, dass die Aktivierung von MMP-9 in einem sehr frühen Stadium der Zellproliferation stattfindet. Da der MMP-Nachweis in dieser Studie am vierten Tag nach Laserbehandlung durchgeführt wurde, ist es möglich, dass die MMP-9-Aktivierung bis zu diesem Zeitpunkt wieder abgeklungen ist und demnach nicht mehr nachgewiesen werden kann. Zusammenfassend ist die Abwesenheit von aktivem MMP-9 jedoch als positiv zu bewerten, da eine Induktion des aktiven MMP-9 die Bildung von CNV fördern könnte (Lambert *et al.* 2002). Diese These wird unterstützt durch Arbeiten von Bergers *et al.* (2000) und Hollborn *et al.* (2007), die zeigten, dass MMP-9 die Fähigkeit besitzt VEGF hochzuregulieren und dessen Bioverfügbarkeit zu erhöhen. Es kann somit festgehalten werden, dass die Laserbehandlungen nicht die Sekretion des pro-angiogenen VEGF über die Aktivierung von MMP-9 fördern.

Das Gleichgewicht zwischen der Expression von pro-angiogenen Zellmediatoren wie dem VEGF und anti-angiogenen Zellmediatoren wie dem PEDF ist in dem Komplex aus Choroidea, BrM und RPE stark reguliert. Um die AMD-Entwicklung sowie die Progression von nicht-exsudativer AMD in die exsudative AMD zu unterbinden, wäre eine Therapie mit einem Einfluss auf pro- und anti-angiogene Zytokine sinnvoll. Die Ergebnisse unserer Studie zeigten eine Erhöhung des anti-angiogenen PEDF nach TSR und SRT, wohingegen das pro-angiogenen VEGF reduziert bzw. nicht beeinflusst wurde. Dies könnte durch die indirekte anti-angiogene Wirkung von MMP-2 verursacht worden sein, die bereits beschrieben wurde. In jedem Fall wird deutlich, dass die Laserbehandlungen keine pro-angiogene Wirkung auf das VEGF aufweisen und vielmehr das Verhältnis von VEGF zu PEDF verringern. Damit könnte ein anti-angiogenes Zytokinprofil erzeugt werden, welches für die Behandlung der AMD-Frühformen geeignet wäre, um z.B. die Bildung von CNVs zu verhindern.

In dieser Arbeit wurde der Sicherheitsaspekt der SRT bezüglich der Induktion inflammatorischer Prozesse überprüft. Es sollte damit sichergestellt werden, dass durch die SRT keine unkontrollierten inflammatorischen Ereignisse induziert werden. Obwohl frühere Studien die Induktion inflammatorischer Zytokine durch Laserbehandlungen zeigten (Ishida *et al.* 1998; Yamamoto *et al.* 1998), konnten wir dies für die SRT-Methode ausschließen und halten fest, dass die SRT nicht die AMD-Entstehung oder Progression durch die Induktion von inflammatorischen Zytokinen fördert. Aufgrund begrenzter

Ressourcen und der Ergebnisse zu der Untersuchung nach SRT-Behandlung wurde der Einfluss der TSR auf inflammatorische Zytokine nicht getestet.

Neben den Faktoren, die auf die ECM, Angiogenese und Inflammation Einfluss nehmen, wurde ein Faktor untersucht, das HSP70, als wichtiger Marker der intrazellulären Stressantwort. Bei der AMD ist das Potential der RPE-Zellen gegen oxidativen Stress herabgesetzt, welches zur Schädigung der RPE-Zellen und damit einhergehend auch zur Beeinträchtigung der BrM und Neuroretina führt (Klettner *et al.* 2013a). Die Erhöhung von Schutzmechanismen gegen den oxidativen Stress in den RPE-Zellen wäre demnach für die Behandlung der AMD von Vorteil. Eine sanfte Stimulation der RPE-Zellen und die damit verbundene Expression dieser Proteine könnte zu einer Reduktion apoptotischer und inflammatorischer Zytokine führen, welche zur Schädigung der Zellen im Rahmen der AMD beitragen (Beckham *et al.* 2008; Lanneau *et al.* 2007; Söti *et al.* 2005; Sramek *et al.* 2011). Es wurde bereits gezeigt, dass RPE-Zellen auf einen moderaten Temperaturanstieg mit der Expression von HSPs reagieren (Lavinsky *et al.* 2016). In dieser Arbeit wurde HSP70 im Western Blot nachgewiesen, wobei sich jedoch entgegen der Erwartungen kein Unterschied zwischen den behandelten und unbehandelten Zellen zeigte. Somit kann eine protektive Wirkung des Lasers über die Induktion von HSP70 nicht bestätigt werden.

Da die Pathologie der AMD die Region der Macula lutea betrifft, wäre es von Interesse in dieser Region sehr präzise mit kleinen Laserspots zu behandeln. In dieser und in früheren Arbeiten (Treumer *et al.* 2012) zeigte sich der Einfluss von Laserbehandlungen auf z.B. die Sekretion von MMPs. Ob die Zytokinmodulation von Spotgröße und Spotdichte abhängt wurde nach aktuellem Stand der Literatur allerdings noch nicht beschrieben. Es wurde daher in der vorliegenden Arbeit die Abhängigkeit der Zytokinfreisetzung von Spotgrößen (100-300 μm) und Spotdichten (*Low density* und *High density*) untersucht. Es zeigte sich im Falle der MMPs, des PEDF und des VEGF eine Modulation der Sekretion durch die SRT und TSR, die durch die Spotgröße und die Spotdichte zu beeinflussen war. Es zeigte sich, dass die Zytokine unter Verwendung großer Spotgrößen (300 μm bei TSR und 200 μm bei SRT) zumeist beeinflusst werden konnten. Wenn jedoch kumulativ die gleiche Fläche mit kleinen 100 μm Spots (*Low density*) behandelt wurde, dann zeigte sich bei keinem der untersuchten Zytokine ein Effekt. Wurde die Anzahl der kleinen 100 μm Spots erhöht (*High density*), dann zeigte sich ein sehr ähnlicher Effekt wie bei der Behandlung mit

großen Spots. Die Beobachtungen, dass die beiden schonenden Laserverfahren eine Wirkung auf das Zytokinmilieu haben und dass diese Modulationen zusätzlich von der Spotgröße abhängig sind, stellen neue Erkenntnisse dar, welche von hoher Relevanz für weitere *in vivo* Studien sind. Da gezeigt wurde, dass auch mit kleinen Spots in hoher Dichte ein Effekt erzeugt werden kann, wäre es möglich mit diesen kleinen Spots nahe oder sogar im Bereich der Macula lutea zu behandeln, also dem Ort des Krankheitsgeschehens.

5.3 Wirkung der Laserbehandlungen im murinen AMD-Modell

In dieser Arbeit wurden zwei murine AMD-Modelle untersucht. Die allgemeine Limitation des murinen Modells, bezogen auf die Ophthalmologie und die AMD, ist das Fehlen einer Macula lutea bei der Maus, wenngleich auch im murinen Modell eine Region des zentralen Fundus mit einer erhöhten Photorezeptordichte beschrieben ist (Volland *et al.* 2015). Da die primäre Messgröße in dieser Arbeit die Dicke der BrM ist und diese durch die beschriebenen genetischen Veränderungen in beiden verwendeten Mausmodellen verdickt ist, werden diese Modelle als geeignet für die Fragestellung in dieser Arbeit angesehen. Grundsätzlich hat die Untersuchung von gentechnisch veränderten Knock-out Mäusen das Verständnis für okuläre Erkrankungen stark verbessert. Da Mäuse sich relativ leicht genetisch modifizieren lassen, konnten mehrere Maus-Modelle mit degenerativen Veränderungen der Retina entwickelt werden (Chang *et al.* 2013). Bezugnehmend auf die Pathologie der AMD gibt es verschiedene Mausmodelle, die jeweils bestimmte Faktoren der AMD widerspiegeln. Aktuell steht jedoch kein Mausmodell zur Verfügung, welches die multifaktorielle AMD Pathogenese vollständig aufgreift.

Bei den bildgebenden Untersuchungen der Mäuse an unserer Klinik sind einige Besonderheiten gesichtet worden. So wurde in der funduskopischen Untersuchung der Nrf2 Knock-out Tiere bei 16 von 75 Tieren die spontane Bildung einer CNV gesichtet, welche auch im OCT und FAG bestätigt werden konnte. Dies wurde in der Literatur nur sporadisch beschrieben (Zhao *et al.* 2011) und stellt eine Besonderheit dieses Modells dar. Die konventionelle Methode eine CNV in der Maus zu induzieren umfasst den Einsatz stark überschwelliger Laserenergie, die punktförmig den gesamten retinalen Komplex

durch die BrM bis hin zur Choroidea zerstört und so das Aussprossen der choroidalen Gefäße ermöglicht (Tobe *et al.* 1998). Eine spontane CNV-Entwicklung böte jedoch einige Vorteile, da die laser-induzierte CNV eine Wundheilungsreaktion ist, die schwer reproduzierbar ist, häufig technische Artefakte aufweist und lokale unspezifische inflammatorische Reaktionen auslöst (Malek *et al.* 2005). Es handelt sich dabei nicht um den chronischen Verlauf der AMD, sondern um ein akutes Wundheilungs- und Entzündungsgeschehen. Eine spontane CNV hingegen spiegelt einen chronischen Prozess wieder, wie er bei AMD-Patienten anzutreffen ist, weshalb sich dieses Modell für diese AMD-Studie besonders gut eignet.

In der OCT zeigten sich Veränderungen unterhalb des RPE in Richtung BrM und Choroidea. Es kann bisher nicht mit Sicherheit bestimmt werden, um was für Veränderungen es sich handelt, da sie häufig, jedoch nicht durchgängig, mit Drusenartigen Veränderungen im Fundusbild auftreten. Es könnte sich um Ablagerungen im Bereich der BrM handeln oder um atrophische Bereiche des RPE. Des Weiteren könnte es sich um Gefäße der Choriocapillaris handeln, die in die BrM übergehen. Dieses findet sich ebenfalls in der Histologie und zeigt Bereiche, die von Endothelzellen umgeben sind, welche in die BrM übergehen (Abb. 32 b). Dies sollte in folgenden Untersuchungen weiter untersucht werden, denn es wird diskutiert, dass die Choroidea einen weitaus größeren Anteil an der AMD-Pathologie aufweist, als allgemeinhin angenommen. Dies bietet ein großes Feld für weitere Untersuchungen (Bhutto und Luttj 2012).

Die ultrastrukturelle Untersuchung der Augen beider Knock-out Linien zeigte AMD-typische Veränderungen, wie das Spleißen der Basallamina der Choriocapillaris und der Verlust der Fenestrierung des Endothels der Choriocapillaris. Beim Menschen wurde eine Zunahme der BrM von 135 % (von 2 μm auf 4,7 μm) in zehn Lebensdekaden beschrieben, welche die Diffusionsstrecke für Nährstoffe und Sauerstoff verlängert (Ramrattan *et al.* 1994). Gleichzeitig nimmt jedoch die Dicke der elastischen Schicht der BrM ab (Chong *et al.* 2005) und es kommt zu Kongregation von Kollagen (Karwatowski *et al.* 1995). Auch bei den ApoE und Nrf2 Knock-out Mäusen wurde eine Dickenzunahme der BrM beobachtet, was die Modelle für die Fragestellung dieser Arbeit als optimale Modelle ausmacht. Andere Arbeitsgruppen füttern ihre ApoE-defizienten Mäuse noch zusätzlich mit einer sehr fettreichen Diät, welche die lipidhaltigen Ablagerungen noch verstärken soll (Malek *et al.* 2005). Eine weitere Steigerung der Dicke der BrM könnte wahrscheinlich auch bei

unseren Mäusen durch eine fetthaltigere Ernährung erreicht werden, wobei dies offensichtlich nicht zwingend notwendig ist, da auch unter Standarddiät die beschriebenen Veränderungen zu erkennen sind.

Es wurden auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen Veränderungen im Endothel der Choriocapillaris beobachtet. Dazu zählten die Dickenzunahme des Endothels und der teilweise Verlust der Fenestrierung. Dies wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (Schmidt-Erfurth *et al.* 2008) und eine Quantifizierung dieses Effekts in weiteren Untersuchungen wäre von Interesse, da auch dies ein wichtiger Faktor der AMD-Entstehung und Progression ist. Darüber hinaus wurde bei der Vermessung der Dicke der PRS eine Reduktion bei 5 Monate alten ApoE Knock-out Mäusen beobachtet, welche ebenfalls in LDL-defizienten Mäusen beschrieben wurde (Schmidt-Erfurth *et al.* 2008). Die Reduktion der PRS weist auf das Auftreten degenerativer Veränderungen in der Neuroretina hin, wie sie bei der geographischen Atrophie auftritt. Dies führt zum irreversiblen Verlust der Sehkraft in diesem Bereich und zum Fortschreiten der Erblindung bei der Spätform der trockenen AMD. Dass diese Veränderungen auch bei der AMD beobachtet werden spricht ebenfalls dafür, dass die ApoE-Maus ein geeignetes AMD-Modell darstellt.

Die Mutation des *Crb1*-Gens stellt eine häufige Mutation bei Zuchtmäusen dar und wurde in dieser Arbeit bei den beiden Knock-out Linien mittels PCR untersucht. Infolge einer homozygoten Mutation des Gens wird die Ausbildung bestimmter AMD-relevanter Fundusveränderungen in der Maus beschrieben (Mehalow *et al.* 2003). Es sind bisher 85 Mausstämme beschrieben, welche die Mutation tragen sollen. Für unsere *Nrf2* Knock-out Mäuse lagen bisher keine Daten in der Literatur vor. Mäuse mit BL/6J Hintergrund sollten diese Mutation jedoch nicht tragen (Chang *et al.* 2013). In unserer *Nrf2* *-/-* Mauslinie, welche über einen BL/6J Hintergrund verfügt, zeigte sich jedoch, dass 19 % der insgesamt 75 untersuchten Tiere die Mutation heterozygot trugen und 81 % der Mäuse die Mutation homozygot trug. Für die der Vermessung der Dicke der BrM in dieser Studie ist es zwar nicht von primärem Interesse durch was die Verdickung induziert wurde, allerdings ist diese Information von großer Relevanz für alle Forschungsgruppen, die sich mit retinalen Degenerationen beschäftigen und muss bei der Verwendung des Modells berücksichtigt werden. Auch zeigt es die Notwendigkeit der Überprüfung jedes Tieres für

das Vorhandensein der Mutation, da diese offensichtlich auch bei Stämmen mit BL/6J-Hintergrund auftritt. Das Auftreten eines reinen Wildtypen ist in unserer Zucht nicht nachgewiesen worden. Obwohl die Größen der Genprodukte für Mutante und Wildtyp stets mit den Literaturangaben übereinstimmten und daher die Ergebnisse plausibel sind, wäre es für weitere Untersuchungen interessant die Genprodukte einer Sequenzierung zu unterziehen und damit die Mutation weiter zu untersuchen.

Die primäre Fragestellung des zweiten Teils dieser Arbeit bestand aus der Untersuchung des Effekts zweier Laserbehandlungen auf die Dicke der BrM in zwei AMD-Mausmodellen. Die wissenschaftliche Rationale lag in den Erkenntnissen aus Teil 1 dieser Arbeit, welche zeigten, dass durch die Laserbehandlungen im Organkulturmodell verschiedene AMD-relevante Zellmediatoren beeinflusst werden, wie die MMPs. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Ausschüttung der MMPs zu einer Re-Modellierung der BrM führen würde, wenngleich der MMP-Nachweis in den murinen Augen nicht durchgeführt wurde. Für die Untersuchung dieser These wurden die Tiere unterschiedlichen Alters mit der SRT bzw. TSR behandelt und die Dicke der BrM in behandelten und unbehandelten Augen an elektronenmikroskopischen Aufnahmen ausgemessen. Es konnte gezeigt werden, dass es sowohl nach TSR als auch nach SRT zu einer Reduktion der Dicke der BrM kommt. Dieser Effekt wurde auch von Jobling *et al.* (2015) für eine gepulste Laserbehandlung beschrieben. Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen für die aufgestellte Hypothese, dass durch die vermehrte Ausschüttung von MMPs die Dicke der BrM auch *in vivo* reduziert werden könnte. Zudem könnten dieses Ergebnis ein Meilenstein in der Entwicklung neuer Therapien für die frühe Form der AMD darstellen, da es durch die Reduktion der Diffusionsstrecke zu einer besseren Versorgung der RPE-Zellen und Neuroretina mit Nährstoffen und Sauerstoff kommen könnte. Der Abtransport von Stoffwechselendprodukten von den RPE-Zellen in Richtung Choroidea könnte durch die durchlässigere BrM auch wieder erhöht werden, was die Akkumulation von Lipiden und anderen Stoffwechselendprodukten in den RPE-Zellen und der BrM verringern würde. Die RPE-Zellen könnten ihren vielfältigen Funktionen ausüben, es würde nicht zur Atrophie von RPE-Zellen und Photorezeptoren kommen und in Folge dessen auch nicht zu einer Beeinträchtigung der Sehkraft. Die schonenden Laserbehandlungen sprechen also gleichzeitig mehrere Faktoren der AMD-Pathogenese an, wie die Ablagerungen in der

BrM sowie die Funktionalität der RPE-Zellen und Photorezeptoren. Dies wäre der Vorteil der Laserbehandlung, die stimuliert, ohne dabei die BrM oder Neuroretina zu zerstören, im Gegensatz zu anderen Therapieansätzen, bei denen nur ein Faktor der AMD-Entstehung angesprochen wird. Die Laserbehandlungen könnten als mögliche Behandlungsoptionen in Frage kommen, um die Progression oder gar Entstehung der AMD zu unterbinden.

Bei der TSR wurden mit der *Low density*-Behandlung (2 Spot Interspotabstand, 10 ms Pulsdauer) in allen untersuchten Altersgruppen und bei beiden Knock-outs eine signifikante Reduktion der BrM-Dicke beobachtet. Dies konnte in der *High density*-Gruppe (1 Spots Interspotabstand, 30 ms Pulsdauer) nicht reproduziert werden. Es wird angenommen, dass die Anzahl der Spots bei diesem Ergebnis eine eher untergeordnete Rolle spielt, da in den Untersuchungen an Organkulturen die Laserbehandlung mit einer erhöhten Anzahl von Laserspots einen positiven Effekt zu Gunsten der Zytokinausschüttung zeigte. Jedoch könnte die Verlängerung der Pulsdauer einen Effekt auf die TSR-Wirkung zeigen. Um diesen Effekt zu untersuchen müssten immunhistochemische Untersuchungen an murinen *Flat mounts* durchgeführt werden, die zeigen könnten, ob es zu Unterschieden in der Proteinexpression bei längeren oder kürzeren Pulsdauern kommt.

Bei der Behandlung mit der SRT zeigte sich in der *Low density*-Gruppe (2 Spots Interspotabstand, 300 ms Behandlungsdauer, 100 Hz Frequenz, 30 Pulse) bei allen Gruppen, außer den 9 Monate alten ApoE^{-/-} Mäusen, eine Reduktion der Dicke der BrM. Bei der *High density*-Gruppe (1 Spot Interspotabstand, 300 ms Behandlungsdauer, 500 Hz Frequenz, 150 Pulse) zeigte sich lediglich bei der Gruppe der ApoE^{-/-} mit 9 Monaten ein Effekt. Das die Wirkung der SRT hauptsächlich in der *Low density* -Gruppe zu beobachten war, könnte daran liegen, dass die *High density*-Behandlung nicht nur auf das behandelte Auge, sondern auch auf das Partnerauge wirkt, welches als interne Kontrolle verwendet wurde. Dies hatte zur Folge, dass keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen behandeltem und unbehandeltem Augen zu erkennen waren, da beide Augen reagierten, wenngleich der Effekt bei den unbehandelten Augen etwas geringer ausfiel. Ein solcher Effekt wurde bereits in einer Arbeit von Jobling *et al.* (2015) beschrieben, die beobachteten, dass bei einseitiger Laserbehandlung auch das unbehandelte Partnerauge mitreagierte. Wenngleich die Ursachen für diesen Effekt weitestgehend unklar sind, ist er

für die Behandlung von AMD-Patienten von Interesse, da so in Fällen bei denen ein Auge stärker von frühen Veränderungen betroffen ist, eine monookuläre Behandlung durchgeführt werden könnte, die auch auf das Partnerauge wirken würde.

5.4 Fazit und Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die TSR und SRT einen Einfluss auf die Sekretion AMD-relevanter Zellmediatoren, wie MMPs, VEGF und PEDF aufweisen. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen wurde die unterschwellige Laserkoagulation im Mausmodell etabliert und der therapeutische Effekt der Laserbehandlung im erkrankten Organismus untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Dicke der BrM, als Marker AMD-artiger Veränderungen im Tiermodell, positiv durch die Laserbehandlungen beeinflusst werden kann. Dies spricht dafür, dass die SRT oder TSR als Präventionstherapie für frühe altersabhängige Veränderungen einsetzbar wäre. Die Besonderheit bei diesen schonenden Laserverfahren ist die Stimulation des Choroidea-BrM-RPE-Komplexes, welche die Zerstörung von Sinneszellen sicher vermeiden und dennoch effektiv sind.

Aufbauend auf den bisherigen Arbeiten sollten die beiden Verfahren in Zukunft weiter untersucht werden, um umfassende Aussagen über die molekularen Wirkmechanismen dieser vielversprechenden Behandlungsoptionen *in vitro* und *in vivo* treffen zu können. Das Ziel soll sein, den Paradigmenwechsel von der Therapie zur Prävention zu vollziehen und dem Vollbild der Erkrankung mit irreversiblen Verlust der Sehfähigkeit vorzubeugen. Der Fokus weiterer Untersuchungen sollte auf der Untersuchung des Lipidstoffwechsels, des oxidativen Stresses, der Inflammation und der Angiogenese liegen, welche die vier Hauptsäulen der AMD-Pathogenese darstellen. Durch den Einsatz von Gen-Arrays könnte der Einfluss der Lasertherapie auf eine Vielzahl von AMD-relevanten Zellmediatoren untersucht werden. Außerdem soll auf Basis von Dosis-Wirkungs-Untersuchungen im Mausmodell ein mögliches Therapiekonzept für eine spätere Behandlung von Patienten erarbeitet werden. Konkret soll dabei evaluiert werden, ob eine repetitive Anwendung der Laserbehandlung einen Vorteil gegenüber einmaligen Behandlungen bietet. Bei diesen Untersuchungen soll auch mit einfließen, ob die Verringerung der Dicke der BrM mit einer Regression der Drusen einhergeht und ob durch die Behandlung am Patienten

eine Visusverbesserung erwirkt werden kann. Diese Arbeiten sind die notwendige Grundlage und Voraussetzung für die Implementierung der Therapie in den Patienten.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die altersabhängige Makuladegeneration (AMD) ist die häufigste Erblindungsursache älterer Menschen in der westlichen Welt. Charakteristisch sind dabei das Auftreten fortschreitender degenerativer Veränderungen von Aderhaut, Bruch'scher Membran (BrM), retinalem Pigmentepithel (RPE) und neurosensorischer Netzhaut. Die frühe nicht-exsudative (trockene) Form der AMD ist gekennzeichnet durch das Auftreten von subretinalen Ablagerungen (Drusen), einer Verdickung der BrM und möglichen Veränderungen des Pigmentepithels. Die Verdickung der BrM führt zu einem eingeschränkten Gas- und Nährstoffaustausch zwischen Aderhaut und Netzhaut und damit zu einer Unterversorgung der Photorezeptoren. Im langfristigen Verlauf kann es zur Progression der frühen Form in die Spätformen kommen. Dazu zählen die geographische Atrophie, die zum Verlust von RPE-Zellen und Photorezeptoren führt oder die exsudative Spätform der AMD, bei der es zur Bildung von Ödemen und unkontrollierten Gefäßausprossungen aus der Aderhaut kommt. Für die Behandlung der häufigeren trockenen Form der AMD steht bis dato keine adäquate Pathomechanismus-basierte Form der Therapie zur Verfügung.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss zweier schonender Laserverfahren auf AMD-relevante Proteine und frühe degenerative Veränderungen der AMD untersucht. Der Hintergrund ist, dass durch einen präventiven Einsatz der Laserbehandlungen die Konvertierung der frühen AMD in das Spätstadium vermindert bzw. unterbunden werden soll. In dieser Arbeit standen zwei schonende Laserverfahren im Fokus der Untersuchungen, die Thermische Stimulationstherapie der Retina (TSR) und die Selektive Retina-Therapie (SRT), bei der es zu einer selektiven Zerstörung von RPE-Zellen mit anschließendem Regenerationsprozess kommt. Die Besonderheit beider Verfahren ist, dass sie zwar auf den Komplex aus BrM und RPE wirken, jedoch ohne dabei die Neuroretina zu schädigen.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass beide Laserverfahren die Sekretion von AMD-relevanten Zellmediatoren in einem porcinen Organkulturmodell beeinflussen. Dazu zählt die Induktion der Matrixmetalloprotease (MMP)-2, welche zusammen mit anderen MMPs am ständigen Umbau der BrM beteiligt ist. Die Stimulation der MMPs könnte zu einer Re-Modellierung der BrM führen, welches eine Verbesserung der Durchlässigkeit der BrM zur Folge hätte und damit die Progression der frühen AMD verlangsamen oder gar verhindern könnte. An der Konvertierung der trockenen Form in die feuchte Form der

AMD ist als wichtiger Faktor der pro-angiogene *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) beteiligt. Der Gegenspieler des VEGF ist der anti-angiogen wirkende *Pigment Epithelium Derived Factor* (PEDF). Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Sekretion des anti-angiogenen PEDF durch die Laserbehandlungen gesteigert wurde, während die Sekretion des pro-angiogenen VEGF nicht verändert wurde. Dies deutet auf einen positiven Einfluss der Laserbehandlungen zugunsten eines anti-angiogenen Zytokinmilieus hin. Des Weiteren wurde in dieser Arbeit erstmals gezeigt, dass die Beeinflussung der Zytokine abhängig von der Spotgröße des Lasers und von der Anzahl der gesetzten Laserspots ist, welches von Relevanz für die mögliche AMD-Behandlung im Bereich der Macula lutea ist.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der therapeutische Effekt der Laserbehandlungen *in vivo* in zwei AMD-Mausmodellen (ApoE $-/-$ und Nrf2 $-/-$) untersucht. Die Mäuse zeigten mit zunehmendem Alter diverse AMD-typische Veränderungen am Augenhintergrund, wie eine Dickenzunahme der BrM. Es konnte durch elektronenmikroskopische Untersuchungen gezeigt werden, dass die Dicke der BrM durch beide Laserbehandlungen reduziert werden konnte.

Die beiden stimulierenden Laserbehandlungen stellen damit einen vielversprechenden Ansatz für die mögliche Behandlung der frühen AMD dar. Sie beeinflussen zugleich mehrere Aspekte der multifaktoriellen AMD-Pathogenese, wie die Angiogenese und die Veränderungen der Extrazellulärmatrix, mit dem Ziel die Durchlässigkeit der BrM zu erhöhen und die Versorgung der Netzhaut zu gewährleisten und damit die Erblindung zu verhindern.

7. SUMMARY

Age-related macular degeneration (AMD) is the main cause for legal blindness of the elderly in western civilizations. In AMD we observe progressive degenerative changes of the choroid, Bruch's membrane (BrM), retinal pigmented epithelium (RPE) and neuroretina. Early non-exudative (dry) AMD is characterized by formation of sub-retinal deposits (drusen), thickening of BrM and possible alterations of pigment epithelium. Thickening of BrM results in reduced exchange of nutrients and oxygen between choroid and retina, following an under-supply of the neuroretina. During AMD progression dry AMD may develop to an advanced stage, called geographic atrophy, which is characterized by loss of RPE cells and photoreceptors or it may evolve to exudative (wet) AMD. Wet AMD is characterized by the appearance of edema and pathological neovascularization of the choroid. To date, no adequate pathomechanism based therapy for the much more common dry form of AMD exist.

In this study the effect of two mild laser therapies on AMD-relevant proteins and early degenerative changes was investigated. The underlying hypothesis was that due to a preventive laser treatment, the progression of early AMD may slow down or could be prevented. In this study we focused on two different laser methods, the Thermal Stimulation of the Retina (TSR) and Selective Retina Therapy (SRT) for selective effects on RPE cells with subsequent regeneration process. The characteristic feature of both treatments is the effect on BrM and RPE, without damaging the neuroretina.

This study shows the influence of both laser therapies on the release of different AMD-relevant cell mediators in porcine organ cultures. One of the cell mediators is the Matrix-Metalloprotease (MMP)-2, which takes part in BrM-remodeling. Theoretically, stimulation of the MMP pathway could be a therapeutic option to remodel a thickened BrM and thereby improve the flux across the BrM to slow down or prevent the progression of early AMD. One important factor in conversion of dry into wet AMD is the pro-angiogenic *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF). The antagonist of VEGF is the anti-angiogenic *Pigment Epithelium Derived Factor* (PEDF). This study shows the increase of anti-angiogenic PEDF after laser treatment, whereas the pro-angiogenic VEGF was not induced by SRT or TSR. This indicates an anti-angiogenic modulation of the cytokine milieu. Furthermore this study shows for the first time that an influence of laser treatment

depends on laser spot size and quantity of laser spots, which is important for a possible AMD-treatment of the macula lutea.

Additionally the therapeutic effect of laser treatments was investigated in two AMD mouse models (ApoE $-/-$ and Nrf2 $-/-$). Aged mice displayed different age-related alterations in fundus examinations such as BrM thickening. In electron microscopy it has been shown that both laser treatments reduce BrM thickness in AMD-mice.

Both stimulation laser therapies represent a promising approach for possible treatment option of early AMD. They showed influence on different aspects of multifactorial AMD development, such as angiogenesis and alterations of extracellular matrix with the aim to increase the flux across BrM and ensure nutrient supply of the retina.

8. LITERATURVERZEICHNIS

Ach T, Huisingh C, McGwin G Jr, Messinger JD, Zhang T, Bentley MJ, Gutierrez DB, Ablonczy Z, Smith RT, Sloan KR, Curcio CA. 2014. Quantitative autofluorescence and cell density maps of the human retinal pigment epithelium. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 55: 4832–41.

Adamis AP, Shima DT, Yeo KT, Yeo TK, Brown LF, Berse B, D'Amore PA, Folkman J. 1993. Synthesis and secretion of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human retinal pigment epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 193: 631–38.

Age-Related Eye Disease Study Research Group. 2001. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E and beta carotene for age-related cataract and vision loss: AREDS Report No. 9. *Archives of Ophthalmology* 119: 1439–52.

Ahir A, Guo L, Hussain AA, Marshall J. 2002. Expression of metalloproteinases from human retinal pigment epithelial cells and their effects on the hydraulic conductivity of bruch's membrane. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 43: 458–65.

Aisenbrey S, Zhang M, Bacher D, Yee J, Brunken W, Hunter DD. 2006. Retinal pigment epithelial cells synthesize laminins, including laminin 5, and adhere to them through alpha3- and alpha6-containing integrins. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 47: 5537–44.

Alexander JP, Bradley JM, Gabourel JD, Acott TS. 1990. Expression of matrix metalloproteinases and inhibitor by human retinal pigment epithelium. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 31: 2520–28.

Beckham JT, Wilmlink GJ, Mackanos MA, Takahashi K, Contag CH, Takahashi T, Jansen ED. 2008. Role of HSP70 in cellular thermotolerance. *Lasers in Surgery and Medicine* 40: 704–15.

Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, Tanzawa K, Thorpe P, Itohara S, Werb Z, Hanahan D. 2000. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nature Cell Biology* 2: 737–44.

Bhutto IA, McLeod DS, Hasegawa T, Kim SY, Merges C, Tong P, Lutty GA. 2006. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in aged human choroid and eyes with age-related macular degeneration. *Experimental Eye Research* 82: 99–110.

Bhutto IA, Lutty G. 2012. Understanding age-related macular degeneration (AMD): relationships between the photoreceptor/retinal pigment epithelium/bruch's membrane/choriocapillaris complex. *Molecular Aspects of Medicine* 33: 295–317.

Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA. 1993. Matrix metalloproteinases: a review. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine: An Official Publication of the American Association of Oral Biologists* 4: 197–250.

- Blaauwgeers HG, Holtkamp GM, Rutten H, Witmer AN, Koolwijk P, Partanen TA, Alitalo K, Kroon C, Kijlstra A, van Hinsbergh V, Schlingemann R. 1999. Polarized vascular endothelial growth factor secretion by human retinal pigment epithelium and localization of vascular endothelial growth factor receptors on the inner choriocapillaris. Evidence for a trophic paracrine relation. *The American Journal of Pathology* 155: 421–28.
- Bok D. 1993. The retinal pigment epithelium: a versatile partner in vision. *Journal of Cell Science* 17: 189–95.
- Bost LM, Aotaki-Keen AE, Hjelmeland LM. 1992. Coexpression of FGF-5 and bFGF by the retinal pigment epithelium in vitro. *Experimental Eye Research* 55: 727–34.
- Bouck N. 2002. PEDF: Anti-angiogenic guardian of ocular function. *Trends in Molecular Medicine* 8: 330–34.
- Boulton M, Dayhaw-Barker P. 2001. The role of the retinal pigment epithelium: topographical variation and ageing changes. *Eye* 15: 384–89.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 2:248-54.
- Brinkmann R, Hüttmann G, Rögener J, Roider J, Birngruber R, Lin CP. 2000. Origin of retinal pigment epithelium cell damage by pulsed laser irradiance in the nanosecond to microsecond time regimen. *Lasers in Surgery and Medicine* 27: 451–64.
- Brinkmann R, Roider J, Birngruber R. 2006. Selective Retina Therapy (SRT): A review on methods, techniques, preclinical and first clinical results. *Bulletin De La Société Belge D'ophtalmologie* 302: 51–69.
- Byeon SH, Lee SC, Choi SH, Lee HK, Lee JH, Chu YK, Kwon OW. 2010. Vascular endothelial growth factor as an autocrine survival factor for retinal pigment epithelial cells under oxidative stress via the VEGF-R2/PI3K/Akt. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 51: 1190–97.
- Cao W, Tombran-Tink J, Elias R, Sezate S, Mrazek D, McGinnis JF. 2001. In vivo protection of photoreceptors from light damage by pigment epithelium-derived factor. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 42: 1646–52.
- Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. 1996. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380: 435–39.
- Cascella R, Ragazzo M, Strafella C, Missiroli F, Borgiani P, Angelucci F, Marsella LT, Cusumano A, Novelli G, Ricci F, Giardina E. 2014. Age-related macular degeneration: insights into inflammatory genes. *Journal of Ophthalmology* 2014: 582842.
- CATT Research Group, Martin DF, Maguire MG, Ying G, Grunwald JE, Fine SL, Jaffe GJ. 2011. Ranibizumab and Bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration. *The New England Journal of Medicine* 364: 1897–1908.
- Chang B, Hurd R, Wang J, Nishina P. 2013. Survey of common eye diseases in laboratory mouse strains. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 54: 4974–81.

- Chen L, Miyamura N, Ninomiya Y, Handa JT. 2003. Distribution of the collagen IV isoforms in human bruch's membrane. *The British Journal of Ophthalmology* 87: 212–15.
- Chen M, Forrester JV, Xu H. 2007. Synthesis of complement factor H by retinal pigment epithelial cells is down-regulated by oxidized photoreceptor outer segments. *Experimental Eye Research* 84: 635–45.
- Cherepanoff S, McMenamin P, Gillies MC, Kettle E, Sarks SH. 2010. Bruch's membrane and choroidal macrophages in early and advanced age-related macular degeneration. *The British Journal of Ophthalmology* 94: 918–25.
- Chong NHV, Keonin J, Luthert PJ, Frennesson CI, Weingeist DM, Wolf RL, Mullins RF, Hageman GS. 2005. Decreased thickness and integrity of the macular elastic layer of bruch's membrane correspond to the distribution of lesions associated with age-related macular degeneration. *The American Journal of Pathology* 166: 241–51.
- Chou Q, Russell M, Birch DE, Raymond J, Bloch W. (1992) Prevention of pre-PCR mispriming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acids Research* 20: 1717–1723.
- Claudio L, Martiney JA, Brosnan CF. 1994. Ultrastructural studies of the blood-retina barrier after exposure to interleukin-1 beta or tumor necrosis factor-alpha. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 70: 850–61.
- Coleman HR, Chan CC, Ferris III FL, Chew EY. 2008. Age-related macular degeneration. *The Lancet* 372: 1835–45.
- Crabb JW, Miyagi M, Gu X, Shadrach K, West KA, Sakaguchi H, Kamei M, Hasan A, Yan L, Rayborn ME, Salomon RG, Hollyfield JG. 2002. Drusen proteome analysis: an approach to the etiology of age-related macular degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 14682–87.
- Curcio CA, Millican CL. 1999. Basal linear deposit and large drusen are specific for early age-related maculopathy. *Archives of Ophthalmology* 117: 329–39.
- Curcio CA, Millican CL, Bailey T, Kruth HS. 2001. Accumulation of cholesterol with age in human bruch's membrane. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 42: 265–74.
- Curcio CA, Johnson M, Rudolf M, Huang JD. 2011. The oil spill in ageing bruch membrane. *The British Journal of Ophthalmology* 95: 1638–45.
- D'Aquila RT, Bechtel LJ, Videler JA, Eron JJ, Gorczyca P, Kaplan JC. (1991) Maximizing sensitivity and specificity of PCR by pre-amplification heating. *Nucleic Acids Research* 19: 3749.
- Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, Crawford SE, Xu H, Benedict W, Bouck NP. 1999. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science* 285: 245–48.
- Del Priore LV, Kuo YH, Tezel TH. 2002. Age-related changes in human RPE cell density and apoptosis proportion in situ. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 43: 3312–18.
- Derevjanik NL, Vinores SA, Xiao WH, Mori K, Turon T, Hudish T, Dong S, Campochiaro PA. 2002. Quantitative assessment of the integrity of the blood-retinal barrier in mice. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 43: 2462–67.

- Despriet DD, Klaver CC, Wittteman JC, Bergen AA, Kardys I, de Maat MP, Boekhoorn SS, Vingerling JR, Hofman A, Oostra BA, Uitterlinden AG, Stijnen T, van Duijn CM, de Jong PT. 2006. Complement factor H polymorphism, complement activators, and risk of age-related macular degeneration. *The Journal of the American Medical Association* 296: 301–9.
- Detrick B, Hooks JJ. 2010. Immune regulation in the retina. *Immunologic Research* 47: 153–61.
- Deudero JJP, Caramelo C, Castellanos MC, Neria F, Fernández-Sánchez R, Calabia O, Peñate S, González-Pacheco FR. 2008. Induction of hypoxia-inducible factor 1 alpha gene expression by vascular endothelial growth factor. *The Journal of Biological Chemistry* 283: 11435–44.
- Dithmar S, Curcio CA, Le NA, Brown S, Grossniklaus HE. 2000. Ultrastructural changes in bruch's membrane of apolipoprotein E-deficient mice. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 41: 2035–42.
- Eckert WA, Kartenbeck J (1997) Proteine: Standardmethoden der Molekular- und Zellbiologie. 1. Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 275 S.
- Elsner H, Pörksen E, Klatt C, Bunse A, Theisen-Kunde D, Brinkmann R, Birngruber R, Laqua H, Roeder J. 2006b. Selective retina therapy in patients with central serous chorioretinopathy. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 244: 1638–45.
- Elsner H, Klatt C, Liew SHM, Pörksen E, Bunse A, Rudolf M, Brinkmann R, Hamilton RP, Birngruber R, Laqua H, Roeder J. 2006a. Selective retina therapy in patients with diabetic maculopathy. *Der Ophthalmologe: Zeitschrift Der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft* 103: 856–60.
- Evans JR, Lawrenson JG. 2014. A review of the evidence for dietary interventions in preventing or slowing the progression of age-related macular degeneration. *Ophthalmic & Physiological Optics: The Journal of the British College of Ophthalmic Opticians (Optometrists)* 34: 390–96.
- Fercher AF, Hitzenberger CK, Drexler W, Kamp G, Sattmann H. 1993. In vivo optical coherence tomography. *American Journal of Ophthalmology* 116: 113–14.
- Fercher AF, Mengedocht K, Werner W. 1988. Eye-length measurement by interferometry with partially coherent light. *Optics Letters* 13: 186–88.
- Ferrara N, Henzel WJ. 1989. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 161: 851–58.
- Ferrara N, Houck KA, Jakeman LB, Winer J, Leung DW. 1991. The vascular endothelial growth factor family of polypeptides. *Journal of Cellular Biochemistry* 47: 211–18.
- Ferris FL, Wilkinson CP, Bird A, Chakravarthy U, Chew E, Csaky K, Sadda SR, Beckman Initiative for Macular Research Classification Committee. 2013. Clinical classification of age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 120: 844–51.
- Flaxel C, Bradle J, Acott T, Samples JR. 2007. Retinal pigment epithelium produces matrix metalloproteinases after laser treatment. *Retina* 27: 629–34.

- Framme C, Brinkmann R, Birngruber R, Roeder J. 2002. Autofluorescence imaging after selective RPE laser treatment in macular diseases and clinical outcome: a pilot study. *The British Journal of Ophthalmology* 86: 1099–1106.
- Friberg TR, Brennen PM, Freeman WR, Musch DC, PTAMD Study Group. 2009. Prophylactic treatment of age-related macular degeneration report number 2: 810-nanometer laser to eyes with drusen: bilaterally eligible patients. *Ophthalmic Surgery, Lasers & Imaging: The Official Journal of the International Society for Imaging in the Eye* 40: 530–38.
- Fritsche LG, Igl W, Bailey JNC, Grassmann F, Sengupta S, Bragg-Gresham JL, Burdon KP, et al. 2016. A large genome-wide association study of age-related macular degeneration highlights contributions of rare and common variants. *Nature Genetics* 48: 134–43.
- Gao H, Hollyfield JG. 1992. Aging of the human retina. Differential loss of neurons and retinal pigment epithelial cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 33: 1–17.
- Gaudreault J, Fei D, Rusit J, Suboc P, Shiu V. 2005. Preclinical pharmacokinetics of Ranibizumab (rhuFabV2) after a single intravitreal administration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 46: 726–33.
- Gehlbach P, Demetriades AM, Yamamoto S, Deering T, Duh EJ, Yang HS, Cingolani C, Lai H, Wei L, Campochiaro PA. 2003. Periocular injection of an adenoviral vector encoding pigment epithelium-derived factor inhibits choroidal neovascularization. *Gene Therapy* 10: 637–46.
- Gold B, Merriam JE, Zernant J, Hancox LS, Taiber AJ, Gehrs K, Cramer K, Neel J, Bergeron J, Barile GR, Smith RT; AMD Genetics Clinical Study Group, Hageman GS, Dean M, Allikmets R. 2006. Variation in factor B (BF) and complement component 2 (C2) genes is associated with age-related macular degeneration. *Nature Genetics* 38: 458–62.
- Green WR. 1999. Histopathology of age-related macular degeneration. *Molecular Vision* 5: 27.
- Guo L, Hussain AA, Limb GA, Marshall J. 1999. Age-dependent variation in metalloproteinase activity of isolated human bruch's membrane and choroid. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 40: 2676–82.
- Hageman GS, Anderson DH, Johnson LV, Hancox LS, Taiber AJ, Hardisty LI, Hageman JL, Stockman HA, Borchardt JD, Gehrs KM, Smith RJ, Silvestri G, Russell SR, Klaver CC, Barbazetto I, Chang S, Yannuzzi LA, Barile GR, Merriam JC, Smith RT, Olsh AK, Bergeron J, Zernant J, Merriam JE, Gold B, Dean M, Allikmets R. 2005. A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 7227–32.
- Hampton BM, Kovach JL, Schwartz SG. 2015. Pharmacogenetics and nutritional supplementation in age-related macular degeneration. *Clinical Ophthalmology* 9: 873–76.
- Handa JT, Verzijl N, Matsunaga H, Aotaki-Keen A, Luttjans GA, te Koppele JM, Miyata T, Hjelmeland LM. 1999. Increase in the advanced glycation end product pentosidine in bruch's membrane with age. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 40: 775–79.

- Harman D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology* 11: 298–300.
- Hehlgans T, Pfeffer K. 2005. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 115: 1–20.
- Hewitt AT, Nakazawa K, Newsome DA. 1989. Analysis of newly synthesized bruch's membrane proteoglycans. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 30: 478–86.
- Hillenkamp J, Hussain AA, Jackson TL, Cunningham JR, Marshall J. 2004. The influence of path length and matrix components on ageing characteristics of transport between the choroid and the outer retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 45: 1493–98.
- Hofmann UB, Westphal JR, Zendman AJ, Becker JC, Ruiters DJ, van Muijen GN. 2000. Expression and activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and its co-localization with membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) correlate with melanoma progression. *The Journal of Pathology* 191: 245–56.
- Hollborn M, Stathopoulos C, Steffen A, Wiedemann P, Kohlen L, Bringmann A. 2007. Positive feedback regulation between MMP-9 and VEGF in human RPE cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 48: 4360–67.
- Hollyfield JG, Bonilha VL, Rayborn ME, Yang X, Shadrach KG, Lu L, Ufret RL, Salomon RG, Perez VL. 2008. Oxidative damage-induced inflammation initiates age-related macular degeneration. *Nature Medicine* 14: 194–98.
- Holmes DIR, Zachary I. 2005. The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease. *Genome Biology* 6: 209.
- Hussain AA, Starita C, Hodgetts A, Marshall J. 2010. Macromolecular diffusion characteristics of ageing human bruch's membrane: implications for age-related macular degeneration (AMD). *Experimental Eye Research* 90: 703–10.
- Hussain AA, Lee Y, Zhang JJ, Marshall J. 2011. Disturbed matrix metalloproteinase activity of bruch's membrane in age-related macular degeneration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 52: 4459–66.
- Hyman L, Neborsky R. 2002. Risk factors for age-related macular degeneration: an update. *Current Opinion in Ophthalmology* 13: 171–75.
- Ishida K, Yoshimura N, Yoshida M, Honda Y. 1998. Upregulation of transforming growth factor-beta after panretinal photocoagulation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 39: 801–7.
- Jablonski MM, Tombran-Tink J, Mrazek DA, Iannaccone A. 2000. Pigment epithelium-derived factor supports normal development of photoreceptor neurons and opsin expression after retinal pigment epithelium removal. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 20: 7149–57.
- Jin KL, Mao XO, Greenberg DA. 2000. Vascular endothelial growth factor: direct neuroprotective effect in in vitro ischemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 10242–47.

- Jobling AI, Guymer RH, Vessey KA, Greferath U, Mills SA, Brassington KH, Luu CD, Aung KZ, Trogrlic L, Plunkett M, Fletcher EL. 2015. Nanosecond laser therapy reverses pathologic and molecular changes in age-related macular degeneration without retinal damage. *The FASEB Journal* 29: 696–710.
- Jørgensen A, Wiencke AK, la Cour M, Kaestel CG, Madsen HO, Hamann S, Lui GM, Scherfig E, Prause JU, Svejgaard A, Odum N, Nissen MH, Röpke C. 1998. Human retinal pigment epithelial cell-induced apoptosis in activated T-cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 39: 1590–99.
- Kaldarar-Pedotti S. 1979. Mitotic activity of the pigment epithelium during embryonic and postembryonic development. *Advances in Ophthalmology* 39: 37–58.
- Kalluri R, Weinberg RA. 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Clinical Investigation* 119: 1420–28.
- Karwatowski WS, Jeffries TE, Duance VC, Albon J, Bailey AJ, Easty DL. 1995. Preparation of bruch's membrane and analysis of the age-related changes in the structural collagens. *The British Journal of Ophthalmology* 79: 944–52.
- Kiilgaard JF, Prause JU, Prause M, Scherfig E, Nissen MH, la Cour M. 2007. Subretinal posterior pole injury induces selective proliferation of RPE cells in the periphery in in vivo studies in pigs. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 48: 355–60.
- Kim KK, Kugler MC, Wolters PJ, Robillard L, Galvez MG, Brumwell AN, Sheppard D, Chapman HA. 2006. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 13180–85.
- Klein EA, Thompson I, Tangen CM, Lucia MS, Goodman P, Minasian LM, Ford LG, Parnes HL, Gaziano JM, Karp DD, Lieber MM, Walther PJ, Parsons JK, Chin J, Darke AK, Lippman SM, Goodman GE, Meyskens FL, Baker LH. 2011. Vitamin E and the risk of prostate cancer: the selenium and vitamin E cancer prevention trial (SELECT). *The Journal of the American Medical Association* 306: 1549–56.
- Klettner A, Roider J. 2008. Comparison of Bevacizumab, Ranibizumab, and Pegaptanib in vitro: efficiency and possible additional pathways. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 49: 4523.
- Klettner A, Roider J. 2009a. Constitutive and oxidative-stress-induced expression of VEGF in the RPE are differently regulated by different mitogen-activated protein kinases. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 247: 1487–92.
- Klettner A, Roider J. 2009b. Treating age-related macular degeneration - interaction of VEGF-antagonists with their target. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 9: 1127–35.
- Klettner A. 2012. Oxidative stress induced cellular signaling in RPE cells. *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)* 4: 392–411.
- Klettner A, Kauppinen A, Blasiak J, Roider J, Salminen A, Kaarniranta K. 2013a. Cellular and molecular mechanisms of age-related macular degeneration: from impaired autophagy to neovascularization. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 45: 1457–67.

- Klettner A, Westhues D, Lassen J, Bartsch S, Roeder J. 2013b. 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. *Molecular Vision* 19: 281–91.
- Klettner A. 2014. VEGF-A and its inhibitors in age-related macular degeneration – pharmacokinetic differences and their retinal and systemic implications. *Journal of Biochemical and Pharmacological Research* 2: 8-20.
- Klettner A. 2015a. The retinal pigment epithelium in the immune regulation of the retina. In: Hogarth A. Recent Advances in Eye Research. Nova Publishers, Nova Biochemical (New York): 31-52.
- Klettner A. 2015b. Age-related macular degeneration - biology and treatment. *Medizinische Monatsschrift für Pharmazeuten* 38: 258–64.
- Knauer C, Pfeiffer N. 2006. Erblindung in Deutschland - heute und 2030. *Der Ophthalmologe* 103: 735–41.
- Kneubühl FK, MW Sigrist (2008) Laser- Teubner Studienbücher Physik. 7. Auflage Vieweg+Teubner Verlag, 446 S.
- Knizetova P, Ehrmann J, Hlobilkova A, Vancova I, Kalita O, Kolar Z, Bartek J. 2008. Autocrine regulation of glioblastoma cell cycle progression, viability and radioresistance through the VEGF-VEGFR2 (kdr) interplay. *Cell Cycle* 7: 2553–61.
- Koinzer S, Schlott K, Ptaszynski L, Bever M, Kleemann S, Saeger M, Baade A, Caliebe A, Miura Y, Birngruber R, Brinkmann R, Roeder J. 2012. Temperature-controlled retinal photocoagulation-a step toward automated laser treatment. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 53: 3605–14.
- Koinzer S (2014) Photokoagulation - Eine überholte Therapie? *Der Augenspiegel* 12:26-30.
- Kolb H, Fernandez E, Nelson R. 1995. Anatomy and Physiology of the Retina. University of Utah Health Sciences Center.
- Krey HF, Grunau G, Bräuer H. 1986. Exempla ophthalmologica: Bildatlas zur Physiologie und Pathophysiologie des Auges. Albert-Roussel-Pharma-GmbH, 159 S.
- Kroll J, Waltenberger J. 1998. VEGF-A induces expression of enos and inos in endothelial cells via VEGF receptor-2 (KDR). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 252: 743–46.
- Lambert V, Munaut C, Jost M, Noël A, Werb Z, Foidart JM, Rakic JM. 2002. Matrix metalloproteinase-9 contributes to choroidal neovascularization. *The American Journal of Pathology* 161: 1247–53.
- Lanneau D, de Thonel A, Maurel S, Didelot C, Garrido C. 2007. Apoptosis versus cell differentiation: role of heat shock proteins HSP90, HSP70 and HSP27. *Prion* 1: 53–60.
- Lavinsky D, Palanker D. 2015. Nondamaging photothermal therapy for the retina: initial clinical experience with chronic central serous retinopathy. *Retina* 35: 213–22.
- Lavinsky D, Wang J, Huie P, Dalal R, Lee SJ, Lee DY, Palanker D. 2016. Nondamaging retinal laser therapy: rationale and applications to the macula. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 57: 2488–2500.

- Lee KJ, Kim YM, Kim DY, Jeoung D, Han K, Lee ST, Lee YS, Park KH, Park JH, Kim DJ, JH Hahn. 2006. Release of Heat Shock Protein 70 (Hsp70) and the Effects of Extracellular Hsp70 on Matrix Metalloproteinase-9 Expression in Human Monocytic U937 Cells. *Experimental & Molecular Medicine* 38: 364–74.
- Lentsch AB, Ward PA. 2000. Regulation of inflammatory vascular damage. *The Journal of Pathology* 190: 343–48.
- Lonn E, Bosch J, Yusuf S, Sheridan P, Pogue J, Arnold JM, Ross C, Arnold A, Sleight P, Probstfield J, Dagenais GR; HOPE and HOPE-TOO Trial Investigators. 2005. Effects of long-term vitamin e supplementation on cardiovascular events and cancer: a randomized controlled trial. *The Journal of the American Medical Association* 293: 1338–47.
- Lüllmann-Rauch R. 2015. Taschenlehrbuch Histologie. 5. Ausgabe. Georg Thieme Verlag, 700 S.
- Malek G, Johnson LV, Mace BE, Saloupis P, Schmechel DE, Rickman DW, Toth CA, Sullivan PM, Rickman C. 2005. Apolipoprotein e allele-dependent pathogenesis: a model for age-related retinal degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 11900–905.
- Marneros AG, Fan J, Yokoyama Y, Gerber HP, Ferrara N, Crouch RK, Olsen BR. 2005. Vascular endothelial growth factor expression in the retinal pigment epithelium is essential for choriocapillaris development and visual function. *The American Journal of Pathology* 167: 1451–59.
- McLeod DS, Lefer DJ, Merges C, Luty GA. 1995. Enhanced expression of intracellular adhesion molecule-1 and p-selectin in the diabetic human retina and choroid. *The American Journal of Pathology* 147: 642–53.
- Medawar PB. 1948. Immunity to Homologous Grafted Skin. III. The Fate of Skin Homographs Transplanted to the Brain, to Subcutaneous Tissue, and to the Anterior Chamber of the Eye. *British Journal Experimental Pathology* 29: 58–69.
- Medzhitov R. 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454: 428–35.
- Mehalow AK, Kameya S, Smith RS, Hawes NL, Denegre JM, Young JA, Bechtold L, Haider NB, Tepass U, Heckenlively JR, Chang B, Naggert JK, Nishina PM. 2003. CRB1 is essential for external limiting membrane integrity and photoreceptor morphogenesis in the mammalian retina. *Human Molecular Genetics* 12: 2179–89.
- Middleton S. 2010. Porcine ophthalmology. The Veterinary Clinics of North America. *Food Animal Practice* 26: 557–72.
- Miller ER, Pastor-Barriuso R, Dalal D, Riemersma RA, Appel LJ, Guallar E. 2005. Meta-analysis: high-dosage vitamin e supplementation may increase all-cause mortality. *Annals of Internal Medicine* 142: 37–46.
- Miura Y, Klettner A, Noelle B, Hasselbach H, Roider J. 2010. Change of morphological and functional characteristics of retinal pigment epithelium cells during cultivation of retinal pigment epithelium-choroid perfusion tissue culture. *Ophthalmic Research* 43: 122–33.
- Moore DJ, Clover GM. 2001. The effect of age on the macromolecular permeability of human bruch's membrane. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 42: 2970–75.

- Moore DJ, Hussain AA, Marshall J. 1995. Age-related variation in the hydraulic conductivity of bruch's membrane. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 36: 1290–97.
- Mori K, Duh E, Gehlbach P, Ando A, Takahashi K, Pearlman J, Mori K, Yang HS, Zack DJ, ETTYREDDY D, BROUGH DE, WEI LL, CAMPOCHIARO PA. 2001. Pigment epithelium-derived factor inhibits retinal and choroidal neovascularization. *Journal of Cellular Physiology* 188: 253–63.
- Mori K, Gehlbach P, Yamamoto S, Duh E, Zack DJ, Li Q, Berns KI, Raisler BJ, Hauswirth WW, Campochiaro PA. 2002a. AAV-mediated gene transfer of pigment epithelium-derived factor inhibits choroidal neovascularization. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 43: 1994–2000.
- Mori K, Gehlbach P, Ando A, McVey D, Wei L, Campochiaro PA. 2002b. Regression of ocular neovascularization in response to increased expression of pigment epithelium-derived factor. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 43: 2428–34.
- Mosser DM, Edwards JP. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews. Immunology* 8: 958–69.
- Moustakas A, Pardali K, Gaal A, Heldin CH. 2002. Mechanisms of TGF-beta signaling in regulation of cell growth and differentiation. *Immunology Letters* 82: 85–91.
- Mülhardt C (2013) *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. 7. Auflage. Springer Spektrum Verlag, 303 S.
- Mulisch M und Welsch U. 2010. *Romeis Mikroskopische Technik*. 18. Auflage. Springer Spektrum Verlag, 556 S.
- Mullis KB, Faloona FA. (1987) Specific Synthesis of DNA in vitro via a Polymerase-Catalysed Chain Reaction. *Methods in Enzymology* 155: 335–350.
- Mullis KB. (1990) Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Annales de Biologie Clinique* 48: 579-582.
- Nagineeni CN, Kommineni VK, William A, Detrick B, Hooks JJ. 2012. Regulation of VEGF expression in human retinal cells by cytokines: implications for the role of inflammation in age-related macular degeneration. *Journal of Cellular Physiology* 227: 116–26.
- Nagineeni CN, Samuel W, Nagineeni S, Pardhasaradhi K, Wiggert B, Detrick B, Hooks JJ. 2003. Transforming growth factor-beta induces expression of vascular endothelial growth factor in human retinal pigment epithelial cells: involvement of mitogen-activated protein kinases. *Journal of Cellular Physiology* 197: 453–62.
- Nagl W (1981) *Elektronenmikroskopische Laborpraxis : eine Methodensammlung mit Bildbeispielen für Lehre und Forschung in der Medizin und Zellbiologie*. 1. Auflage. Springer Verlag Berlin Heidelberg, 146 S.
- Neri S, Mariani E, Meneghetti A, Cattini L, Facchini A. 2001. Calcein-acetyoxymethyl cytotoxicity assay: standardization of a method allowing additional analyses on recovered effector cells and supernatants. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 8: 1131–35.

- Nickla DL, Wallman J. 2010. The multifunctional choroid. *Progress in Retinal and Eye Research* 29: 144–68.
- Nieder Korn JY. 2006. See no evil, hear no evil, do no evil: the lessons of immune privilege. *Nature Immunology* 7: 354–59.
- Nishijima K, Ng YS, Zhong L, Bradley J, Schubert W, Jo N, Akita J, Samuelsson SJ, Robinson GS, Adamis AP, Shima DT. 2007. Vascular endothelial growth factor- α is a survival factor for retinal neurons and a critical neuroprotectant during the adaptive response to ischemic injury. *The American Journal of Pathology* 171: 53–67.
- Novotny HR, Alvis DL. 1961. A method of photographing fluorescence in circulating blood in the human retina. *Circulation* 24: 82–86.
- Ogata N, Yamamoto C, Miyashiro M, Yamada H, Matsushima M, Uyama M. 1997. Expression of transforming growth factor- β mRNA in experimental choroidal neovascularization. *Current Eye Research* 16: 9–18.
- Okubo A, Rosa RH, Bunce CV, Alexander RA, Fan JT, Bird AC, Luthert PJ. 1999. The relationships of age changes in retinal pigment epithelium and Bruch's membrane. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 40: 443–49.
- Owens SL, Bunce C, Brannon AJ, Xing W, Chisholm IH, Gross M, Guymer RH, Holz FG, Bird AC, Drusen Laser Study Group. 2006. Prophylactic laser treatment hastens choroidal neovascularization in unilateral age-related maculopathy: final results of the drusen laser study. *American Journal of Ophthalmology* 141: 276–81.
- Padgett LC, Lui GM, Werb Z, Lavail MM. 1997. Matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in the retinal pigment epithelium and interphotoreceptor matrix: vectorial secretion and regulation. *Experimental Eye Research* 64: 927–38.
- Panda-Jonas S, Jonas JB, Jakobczyk-Zmija M. 1996. Retinal pigment epithelial cell count, distribution, and correlations in normal human eyes. *American Journal of Ophthalmology* 121: 181–89.
- Parmeggiani F, Sorrentino FS, Romano MR, Costagliola C, Semeraro F, Incorvaia C, D'Angelo S, Perri P, De Nardai K, Bonomo Roversi E, Franceschelli P, Sebastiani A, Rubini M. 2013. Mechanism of inflammation in age-related macular degeneration: an up-to-date on genetic landmarks. *Mediators of Inflammation* 2013: 435607.
- Parodi MB, Virgili G, Evans JR. 2009. Laser treatment of drusen to prevent progression to advanced age-related macular degeneration. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 3: CD006537.
- Pauleikhoff D, Zuels S, Sheridah GS, Marshall J, Wessing A, Bird AC. 1992. Correlation between biochemical composition and fluorescein binding of deposits in Bruch's membrane. *Ophthalmology* 99: 1548–53.
- Pfaffl MW (2004) Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum, Sonderausgabe PCR* 1: 92–95.
- Pfaffl MW, Riedmaier I (2011) Die Real-Time-RT-PCR-Datenanalyse im Fokus der MIQE-Richtlinie. *BIOspektrum* 17: 295–297.

- Ramrattan RS, van der Schaft TL, Mooy CM, de Bruijn WC, Mulder PG, de Jong PT. 1994. Morphometric analysis of bruch's membrane, the choriocapillaris, and the choroid in aging. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 35: 2857–64.
- Rehm H, Letzel T (2010) *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. 6. Auflage. Springer Spektrum Verlag, 390 S.
- Rofagha S, Bhisitkul RB, Boyer DS, Sadda SR, Zhang K, SEVEN-UP Study Group. 2013. Seven-year outcomes in ranibizumab-treated patients in ANCHOR, MARINA, and HORIZON: a multicenter cohort study (SEVEN-UP). *Ophthalmology* 120: 2292–99.
- Roider J, Michaud NA, Flotte TJ, Birngruber R. 1992. Response of the retinal pigment epithelium to selective photocoagulation. *Archives of Ophthalmology* 110: 1786–92.
- Roider J, Hillenkamp F, Flotte T, Birngruber R. 1993. Microphotocoagulation: selective effects of repetitive short laser pulses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 8643–47.
- Roider J, El Hifnawi ES, Birngruber R. 1998. Bubble formation as primary interaction mechanism in retinal laser exposure with 200-ns laser pulses. *Lasers in Surgery and Medicine* 22: 240–48.
- Roider J, Brinkmann R, Wirbelauer C, Laqua H, Birngruber R. 1999. Retinal sparing by selective retinal pigment epithelial photocoagulation. *Archives of Ophthalmology* 117: 1028–34.
- Roider J, Brinkmann R, Wirbelauer C, Laqua H, Birngruber R. 2000. Subthreshold (retinal pigment epithelium) photocoagulation in macular diseases: a pilot study. *The British Journal of Ophthalmology* 84: 40–47.
- Roider J. 2006. Selektive Retina Therapie-SRT. *Der Ophthalmologe* 103:837-838.
- Roider J, Liew SHM, Klatt C, Elsner H, Poerksen E, Hillenkamp J, Brinkmann R, Birngruber R. 2010. Selective retina therapy (SRT) for clinically significant diabetic macular edema. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 248: 1263–72.
- Sachsenweger M (2003) *Augenheilkunde*. 2. Auflage. Georg Thieme Verlag, 460 S.
- Saika S. 2005. TGF- β pathobiology in the eye. *Laboratory Investigation* 86: 106–15.
- Sandler A. 2007. Bevacizumab in non small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 13: s4613–16.
- Sarks S, Cherepanoff S, Killingsworth M, Sarks J. 2007. Relationship of basal laminar deposit and membranous debris to the clinical presentation of early age-related macular degeneration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 48: 968.
- Scheller J, Garbers C, Rose-John S. 2014. Interleukin-6: from basic biology to selective blockade of pro-inflammatory activities. *Seminars in Immunology* 26: 2–12.
- Schiller M, Javelaud D, Mauviel A. 2004. TGF-beta-induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing. *Journal of Dermatological Science* 35: 83–92.

- Schmidt-Erfurth U, Chong V, Loewenstein A, Larsen M, Souied E, Schlingemann R, Eldem B, Monés J, Richard G, Bandello F. 2014. Guidelines for the management of neovascular age-related macular degeneration by the european society of retina specialists (EURETINA). *British Journal of Ophthalmology* 98: 1144–67.
- Schmidt-Erfurth U, Rudolf M, Funk M, Hofmann-Rummelt C, Franz-Haas NS, Aherrahrou Z, Schlötzer-Schrehardt U. 2008. Ultrastructural changes in a murine model of graded bruch membrane lipoidal degeneration and corresponding VEGF164 detection. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 49: 390–98.
- Scholl HPN, Fleckenstein M, Fritsche LG, Schmitz-Valckenberg S, Göbel A, Adrion C, Herold C, Keilhauer CN, Mackensen F, Mössner A, Pauleikhoff D, Weinberger AW, Mansmann U, Holz FG, Becker T, Weber BH. 2009. CFH, C3 and ARMS2 are significant risk loci for susceptibility but not for disease progression of geographic atrophy due to AMD. *PloS One* 4: e7418.
- Schrader WF. 2006. Age-related macular degeneration: a socioeconomic time bomb in our aging society. *Der Ophthalmologe: Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft* 103: 742–48.
- Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. 1983. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219: 983–85.
- Serwer P. (1983) Agarose gels: Properties and use for electrophoresis. *Electrophoresis* 4: 375- 382.
- Shi X, Semkova I, Müther PS, Dell S, Kociok N, Jousseaume AM. 2006. Inhibition of TNF-alpha reduces laser-induced choroidal neovascularization. *Experimental Eye Research* 83: 1325–34.
- Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. 1992. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359: 843–45.
- Sinha SK, Asotra K, Uzui H, Nagwani S, Mishra V, Rajavashisth TB. 2014. Nuclear localization of catalytically active mmp-2 in endothelial cells and neurons. *American Journal of Translational Research* 6: 155–62.
- Söti C, Nagy E, Gircz Z, Vigh L, Csermely P, Ferdinandy P. 2005. Heat shock proteins as emerging therapeutic targets. *British Journal of Pharmacology* 146: 769–80.
- Spaide RF, Ho-Spaide WC, Browne RW, Armstrong D. 1999. Characterization of peroxidized lipids in bruch's membrane. *Retina* 19: 141–47.
- Sparrow JR, Parish CA, Hashimoto M, Nakanishi K. 1999. A2E, a lipofuscin fluorophore, in human retinal pigmented epithelial cells in culture. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 40: 2988–95.
- Spilisbury K, Garrett KL, Shen WY, Constable IJ, Rakoczy PE. 2000. Overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the retinal pigment epithelium leads to the development of choroidal neovascularization. *The American Journal of Pathology* 157: 135–44.

- Sramek C, Mackanos M, Spitler R, Leung LS, Nomoto H, Contag CH, Palanker D. 2011. Non-damaging retinal phototherapy: dynamic range of heat shock protein expression. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 52: 1780–87.
- Sternlicht MD, Werb Z. 2001. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 17: 463–516.
- Strauss O. 2005. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiological Reviews* 85: 845–81.
- Streilein JW, Ma N, Wenkel H, Ng TF, Zamiri P. 2002. Immunobiology and privilege of neuronal retina and pigment epithelium transplants. *Vision Research* 42: 487–95.
- Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI. 1995. Mechanism of cell surface activation of 72-kda type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *The Journal of Biological Chemistry* 270: 5331–38.
- Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA. 1991. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *The Journal of Biological Chemistry* 266: 11947–54.
- Tobe T, Ortega S, Luna JD, Ozaki H, Okamoto N, Derevjanić NL, Vinoses SA, Basilico C, Campochiaro PA. 1998. Targeted disruption of the FGF2 gene does not prevent choroidal neovascularization in a murine model. *The American Journal of Pathology* 153: 1641–46.
- Tombran-Tink J, Chader GG, Johnson LV. 1991. PEDF: A pigment epithelium-derived factor with potent neuronal differentiative activity. *Experimental Eye Research* 53: 411–14.
- Tombran-Tink J, Shivaram SM, Chader GJ, Johnson LV, Bok D. 1995. Expression, secretion, and age-related downregulation of pigment epithelium-derived factor, a serpin with neurotrophic activity. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 15: 4992–5003.
- Tonnesen MG, Feng X, Clark RA. 2000. Angiogenesis in wound healing. *The Journal of Investigative Dermatology. Symposium Proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc. [and] European Society for Dermatological Research* 5: 40–46.
- Treumer F, Klettner A, Baltz J, Hussain AA, Miura Y, Brinkmann R, Roeder J, Hillenkamp J. 2012. Vectorial release of matrix metalloproteinases (MMPs) from porcine RPE-choroid explants following selective retina therapy (SRT): towards slowing the macular ageing process. *Experimental Eye Research* 97: 63–72.
- van Lookeren Campagne M, Strauss EC, Yaspan BL. 2016. Age-related macular degeneration: complement in action. *Immunobiology* 221: 733–39.
- Velez-Montoya R, Guerrero-Naranjo JL, Gonzalez-Mijares CC, Fromow-Guerra J, Marcellino GR, Quiroz-Mercado H, Morales-Cantón V. 2010. Pattern scan laser photocoagulation: safety and complications, experience after 1301 consecutive cases. *British Journal of Ophthalmology* 94: 720–24.
- Volland S, Esteve-Rudd J, Hoo J, Yee C, Williams DS. 2015. A comparison of some organizational characteristics of the mouse central retina and the human macula. *PLoS One* 10: e0125631.

- Volpert OV, Zaichuk T, Zhou W, Reiher F, Ferguson TA, Stuart PM, Amin M, Bouck NP. 2002. Inducer-stimulated Fas targets activated endothelium for destruction by anti-angiogenic thrombospondin-1 and pigment epithelium-derived factor. *Nature Medicine* 8: 349–57.
- Vranka JA, Johnson E, Zhu X, Shepardson A, Alexander JP, Bradley JM, Wirtz MK, Weleber RG, Klein ML, Acott TS. 1997. Discrete expression and distribution pattern of TIMP-3 in the human retina and choroid. *Current Eye Research* 16: 102–10.
- Wakabayashi N, Shin S, Slocum SL, Agoston ES, Wakabayashi J, Kwak MK, Misra V, Biswal S, Yamamoto M, Kensler TW. 2010. Regulation of notch1 signaling by NRF2: implications for tissue regeneration. *Science Signaling* 3: ra52.
- Wang H, Geisen P, Wittchen ES, King B, Burridge K, D'Amore PA, Hartnett ME. 2011. The role of RPE cell-associated VEGF₁₈₉ in choroidal endothelial cell transmigration across the RPE. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 52: 570–78.
- Wangsa-Wirawan ND, Linsenmeier RA. 2003. Retinal Oxygen: fundamental and clinical aspects. *Archives of Ophthalmology* 121: 547–57.
- Waring MJ. (1965) Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *Journal of Molecular Biology* 13: 269-282.
- Westermeier R (2016) Elektrophorese leicht gemacht: Ein Praxisbuch für Anwender. 2. Auflage. Wiley-VCH Verlag, 474 S.
- Woessner JF. 1991. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 5: 2145–54.
- Writing Committee for the Diabetic Retinopathy Clinical Research Network, Fong DS, Strauber SF, Aiello LP, Beck RW, Callanan DG, Danis RP, Davis M, Feman SS, Ferris F, Friedman SM, Garcia CA, Glassman AR, Han DP, Le D, Kollman C, Lauer AK, Recchia FM, Solomon SD. 2007. Comparison of the Modified Early Treatment Diabetic Retinopathy Study and Mild Macular Grid Laser Photocoagulation Strategies for Diabetic Macular Edema. *Archives of Ophthalmology* 125: 469–80.
- Yamamoto C, Ogata N, Yi X, Takahashi K, Miyashiro M, Yamada H, Uyama M, Matsuzaki K. 1998. Immunolocalization of transforming growth factor beta during wound repair in rat retina after laser photocoagulation. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 236: 41–46.
- Yamazaki Y, Morita T. 2006. Molecular and functional diversity of vascular endothelial growth factors. *Molecular Diversity* 10: 515–27.
- Yanagida Y, Ueta T. 2014. Systemic safety of ranibizumab for diabetic macular edema: meta-analysis of randomized trials. *Retina* 34: 629–35.
- Yates JRW, Sepp T, Matharu BK, Khan JC, Thurlby DA, Shahid H, Clayton DG, Hayward C, Morgan J, Wright AF, Armbrecht AM, Dhillon B, Deary IJ, Redmond E, Bird AC, Moore AT; Genetic factors in AMD study group. 2007. Complement C3 variant and the risk of age-related macular degeneration. *The New England Journal of Medicine* 357: 553–61.

- Young RW. 1967. The renewal of photoreceptor cell outer segments. *The Journal of Cell Biology* 33: 61–72.
- Yuan X, Gu X, Crabb JS, Yue X, Shadrach K, Hollyfield JG, Crabb JW. 2010. Quantitative proteomics: comparison of the macular bruch membrane/choroid complex from age-related macular degeneration and normal eyes. *Molecular & Cellular Proteomics* 9: 1031–46.
- Zamiri P, Sugita S, Streilein JW. 2007. Immunosuppressive properties of the pigmented epithelial cells and the subretinal space. *Chemical Immunology and Allergy* 92: 86–93.
- Zarbin MA. 2004. Current concepts in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Archives of Ophthalmology* 122: 598–614.
- Zeisberg M, Yang C, Martino M, Duncan MB, Rieder F, Tanjore H, Kalluri R. 2007. Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *The Journal of Biological Chemistry* 282: 23337–47.
- Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, Dorfman AL, McMullen JR, Gustafsson E, Chandraker A, Yuan X, Pu WT, Roberts AB, Neilson EG, Sayegh MH, Izumo S, Kalluri R. 2007. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nature Medicine* 13: 952–61.
- Zhang JJ, Sun Y, Hussain AA, Marshall J. 2012. Laser-mediated activation of human retinal pigment epithelial cells and concomitant release of matrix metalloproteinases laser activation of human RPEs and MMP release. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 53: 2928–37.
- Zhao Z, Chen Y, Wang J, Sternberg P, Freeman ML, Grossniklaus HE, Cai J. 2011. Age-related retinopathy in NRF2-deficient mice. *PLoS One* 6: e19456.

9. PUBLIKATIONEN

POSTER

- 2016
- Richert E**, Tode J, Klettner A, Lucius R, Brinkmann R, Koinzer S, Roider J (2016) Subletale Lasertherapie zur Behandlung der Altersblindheit?
Life Sciences Student Conference, Kiel
- Richert E**, Koinzer S, Klettner A, Brinkmann R, Hillenkamp J, Roider J (2016) Response of RPE-Choroid Explants to Thermal Stimulation Therapy of the Retinal Pigment Epithelium (TS-R)
Abstract: Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 57: 4442.
ARVO-Conference, Seattle, Washington, USA
- Tode J, **Richert E**, Klettner A, Brinkmann R, Koinzer S, Roider J (2016) Laser Thermal Stimulation of the Retina (TS-R) reduces Thickness of Bruch's Membrane (BrM) in Apolipoprotein (Apo) E knock out Mice.
Abstract: Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 57: 4424.
ARVO-Conference, Seattle, Washington, USA
- Tode J, **Richert E**, Klettner A, Lucius R, Brinkmann R, Koinzer S, Roider J (2016) Thermische Stimulationstherapie der Retina (TS-R) führt zur Reduktion der Dicke der Bruch'schen Membran (BrM) in Apolipoprotein (Apo) E Knock-out Mäusen
Kongress der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft, Berlin
- 2015
- Richert E**, Klettner A, Koinzer S, Roider J, Hillenkamp J (2015) Release of different cell mediators during retinal pigment epithelium wound healing after Selective Retina Therapy (SRT) for prevention of early age-related macular degeneration
Abstract: Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2015; 56: 198.
ARVO-Conference, Denver, Colorado, USA

VORTRÄGE

- 2016
- Richert E**, Koinzer S, Klettner A, Tode J, Hillenkamp J, Roider J (2016) Cellular Effects after SRT
Sub-visible restorative retinal laser therapy- SIG-meeting
ARVO-Conference, Seattle, Washington, USA

Richert E, Koinzer S, Klettner A, Brinkmann R, Hillenkamp J, Roider J (2016) Einfluss der Thermischen Stimulationstherapie der Retina (TS-R) auf die Sekretion von Zellmediatoren

Tagung Norddeutscher Augenärzte, Bad Segeberg

Tode J, **Richert E**, Klettner A, Lucius R, Brinkmann R, Koinzer S, Roider J (2016) Thermische Stimulationstherapie der Retina (TS-R) führt zur Reduktion der Dicke der Bruch'schen Membran (BrM) im Mausmodell der altersabhängigen Makuladegeneration (AMD)

Tagung Norddeutscher Augenärzte, Bad Segeberg

Richert E, Koinzer S, Klettner A, Brinkmann R, Hillenkamp J, Roider J (2016) Einfluss der Thermischen Stimulationstherapie der Retina (TS-R) auf die Sekretion von Zellmediatoren

Kongress der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft, Berlin

Richert E, Tode, J, Koinzer S, Klettner A, Brinkmann R, Hillenkamp J, Roider J (2016) Reduktion der Dicke der Bruch'schen Membran nach thermischer Stimulationstherapie (TS-R) in zwei AMD Mausmodellen

Symposium „I-Search“, Münster

2015

Richert E, Koinzer S, Hillenkamp J, Roider J, Klettner A (2015) Einfluss der selektiven Retinatherapie (SRT) auf Zellmediatoren zur Präventionsbehandlung altersabhängiger Makuladegeneration (AMD)

Tagung Norddeutscher Augenärzte, Hamburg

Richert E, Klettner A, Hillenkamp J, Roider J, Koinzer S (2015) Einfluss der Selektiven Retinatherapie (SRT) auf die Sekretion von Zellmediatoren zur Präventionsbehandlung altersabhängiger Makuladegeneration (AMD)

Kongress der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft, Berlin

Richert E, Koinzer S, Tode J, Hillenkamp J, Klettner A, Roider J (2015) Einfluss der Selektiven Retinatherapie auf die Sekretion von Zellmediatoren zur Präventionsbehandlung der altersabhängigen Makuladegeneration

Symposium „I-Search“, Münster

PUBLIKATIONEN

- 2016 Klettner A, **Richert E**, Kuhlenbäumer G, Nölle B, Bhatia KP, Deuschl G, Roider J, Schneider SA (2016) Alpha synuclein and crystallin expression in human lens in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2016 Feb 16.
- Klettner A, Tholey A, Wiegandt A, **Richert E**, Nölle B, Deuschl G, Roider J, Schneider SA (2016) Reduction of GAPDH in lenses of Parkinson's disease patients: A possible new biomarker. *Mov Disord.* 2016 Nov 10.
- Richert E** (2016) Thermische Stimulationstherapie der Retina -Präventionsbehandlung der frühen AMD durch subletale Laserbehandlung? *Augenspiegel* 12/2016:18-21.
- 2015 **Richert E** (2015) Präventionsbehandlung der frühen AMD? Einfluss der Selektiven Retinatherapie auf die Sekretion von Zellmediatoren. *Ophthalmologische Nachrichten* 10/2015:18-19.
- 2014 Dithmer M, Fuchs S, Shi Y, Schmidt H, **Richert E**, Roider J, Klettner A (2014) Fucoïdan Reduces Secretion and Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in the Retinal Pigment Epithelium and Reduces Angiogenesis in Vitro'. *PLoS One* 9: e89150.
- Klettner A, Tahmaz N, Dithmer M, **Richert E**, Roider J (2014) Effects of Aflibercept on Primary RPE Cells: Toxicity, Wound Healing, Uptake and Phagocytosis'. *The British Journal of Ophthalmology* 98: 1448–52.

EINGEREICHTES MANUSKRIFT

Richert E, Koinzer S, Tode J, Schlott K, Brinkmann R, Hillenkamp J, Klettner A, Roider J (2016) Release of Age Related Macular Degeneration (AMD)-relevant Cell Mediators during Retinal Pigment Epithelium Regeneration (PER) following Selective Retina Therapy (SRT).
Eingereicht am 1.2.2016 bei Experimental Eye Research

10. AUSZEICHNUNGEN

2015

Vortragspreis

der Vereinigung Norddeutscher Augenärzte für den Beitrag
“Einfluss der Selektiven Retinatherapie (SRT) auf
Zellmediatoren”

in der wissenschaftlichen Sitzung „Netzhaut II“ im Rahmen
der 65. Tagung Norddeutscher Augenärzte in Hamburg

2016

Vortragspreis

der Vereinigung Norddeutscher Augenärzte für den Beitrag
“Einfluss der Thermischen Stimulationstherapie der Retina
(TSR) auf die Sekretion von Zellmediatoren”

in der wissenschaftlichen Sitzung „Uveitis/Grundlagen“ im
Rahmen der 66. Tagung Norddeutscher Augenärzte in Bad
Segeberg

11. CURRICULUM VITAE

PERSÖNLICHE DATEN

Elisabeth Dorothea Richert

Geboren am 21. Februar 1986 in Reinbek

UNIVERSITÄRE AUSBILDUNG

seit 12/2013

Promotionsstudium Biologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Promotion an der Klinik für Ophthalmologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein in Kiel

Direktor: Prof. Dr. J. Roeder

Unter der Betreuung von Prof. Dr. A. Klettner und externer Betreuung von Prof. Dr. M. Dittmar

Titel der Dissertation: „Wirkung schonender Laserverfahren auf den Komplex aus retinalem Pigmentepithel, Bruch'scher Membran und Choroidea - mögliche Therapieoption der frühen altersabhängigen Makuladegeneration“

10/2011 - 10/2013

Masterstudium Biologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

1. Vertiefungsrichtung: Genetik und Mikrobiologie

2. Vertiefungsrichtung: Molekulare Physiologie und Entwicklungsbiologie

Titel der Masterarbeit: „Entwicklung einer STR-Multiplex-PCR für die Identifikation europäischer Wildtiere in der Forensik“

Abschluss: Master of Science

10/2008 - 09/2011 Bachelorstudium Biologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Titel der Bachelorarbeit: „Einfluss der Hemmung des VEGF-Signalwegs auf die Expression des VEGF-Rezeptors II und weiterer relevanter Proteine“

Abschluss: Bachelor of Science

BERUFSAUSBILDUNG

10/2005 - 09/2008 Berufsausbildung zur Medizinisch-Technischen-Assistentin am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein in Kiel

Abschluss: Staatsexamen

SCHULBILDUNG

08/2002 - 07/2005 Berufliche Schule des Kreises Nordfriesland in Husum, Fachgymnasium im Bereich Ernährungslehre mit Chemie

Abschluss: Abitur

12. DANKSAGUNG

Mein Dank gilt **Prof. Dr. Johann Roider**, für die Möglichkeit meine Dissertation an der Klinik für Ophthalmologie anfertigen zu können, für die anregenden Fachgespräche und die Unterstützung der Forschung an der Klinik.

Vielen herzlichen Dank an **Prof. Dr. Alexa Klettner**, für die große Unterstützung und hervorragende Betreuung während meiner Doktorarbeit sowie auch in den Jahren zuvor und für das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Frau **Prof. Dr. Manuela Dittmar** danke ich herzlich für die Begutachtung dieser Arbeit und die freundliche Unterstützung während der Promotionsphase.

Vielen Dank an das Laborteam – **Andrea Hethke**, für Deine große Unterstützung im Labor und Dein allseits offenes Ohr, **Serap Luick** für die tausenden EIMi-Schnitte und Deine Geduld und **Monika Marquard** für die Unterstützung in der Histologie und die konstante Versorgung mit Süßigkeiten.

Ein großer Dank an **Dr. Jan Tode**, für die fachlichen Diskussionen und die Zusammenarbeit, für Deinen ansteckenden Optimismus (außer in Flugzeugen), für die netten Kongressausflüge und nicht zuletzt für ziemlich genau 132 Stücke Spanischen Mandelkuchen.

Des Weiteren danke ich **PD Dr. Stefan Koinzer** für die Betreuung in der Anfangsphase der Promotion und die stete Hilfsbereitschaft sowie **Dr. Claus von der Burchardt** für die fachlichen Diskussionen und die Unterstützung bei statistischen Fragen.

Vielen Dank an **das Team Fotoabteilung** für die Unterstützung mit den Fotos und Postern.

Vielen Dank an unsere Kooperationspartner des **Medizinischen Laserzentrums Lübeck** und der Firma **Thorlabs** für die Unterstützung bei Fragen rund um die Lasertechnik und Tomographie.

Herzlichen Dank an **Prof. Dr. Lucius** und die **Mitarbeiter des Anatomischen Instituts** für die Möglichkeit, das Elektronenmikroskop und die Mikrotome nutzen zu dürfen sowie die hervorragende Einarbeitung und Unterstützung.

Ich danke **Prof. Dr. Roeder** und dem **Team der Molekularen Zoophysiologie** für die Unterstützung bei der Durchführung der Real-time PCR.

Danke an **Dr. Amke Caliebe** für die Unterstützung bei der Statistik.

Herzlichen Dank an **meine Familie und Freunde**, weil Ihr mir immer alles zutraut, mich stundenlang von Lasern und übergewichtigen Mäusen erzählen lasst und mich nachts zu Vorträgen in die Uni begleitet.

Danke **Thomas** für das Wichtigste.

13. ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, Elisabeth Dorothea Richert, geboren am 21.02.1986 in Reinbek an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation - abgesehen von der Beratung durch meine Betreuerin - nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist. Diese Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden. Ich habe keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet. Wörtlich oder inhaltlich aus anderen Quellen entnommenen Stellen sind als solche gekennzeichnet. Ich erkläre hiermit, dass ich bis zum heutigen Tage weder an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel noch an einer anderen Hochschule ein Promotionsverfahren endgültig nicht bestanden habe oder mich in einem entsprechenden Verfahren befinde oder befunden habe. Die Arbeit hat weder ganz noch in Teilen einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen. Teile dieser Arbeit wurden bereits auf Kongressen vorgestellt oder bei Fachzeitschriften eingereicht/publiziert:

TAGUNGSBEITRÄGE POSTER

Richert E, Tode J, Klettner A, Lucius R, Brinkmann R, Koinzer S, Roider J (2016) Subletale Lasertherapie zur Behandlung der Altersblindheit?
Life Sciences Student Conference, Kiel

Richert E, Koinzer S, Klettner A, Brinkmann R, Hillenkamp J, Roider J (2016) Response of RPE-Choroid Explants to Thermal Stimulation Therapy of the Retinal Pigment Epithelium (TS-R)
Abstract: Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.; 57:4442.
ARVO-Conference, Seattle, Washington, USA

Tode J, **Richert E**, Klettner A, Brinkmann R, Koinzer S, Roider J (2016) Laser Thermal Stimulation of the Retina (TS-R) reduces Thickness of Bruch's Membrane (BrM) in Apolipoprotein (Apo) E knock out Mice
Abstract: Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.; 57: 4424.
ARVO-Conference, Seattle, Washington, USA

Richert E, Klettner A, Koinzer S, Roider J, Hillenkamp J (2015) Release of different cell mediators during retinal pigment epithelium wound healing after Selective Retina Therapy (SRT) for prevention of early age-related macular degeneration
Abstract: Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2015; 56: 198.
ARVO-Conference, Denver, Colorado

TAGUNGSBEITRÄGE VORTRÄGE

Richert E, Koinzer S, Klettner A, Tode J, Hillenkamp J, Roider J (2016) Cellular Effects after SRT

*Sub-visible restorative retinal laser therapy- SIG-meeting
ARVO-Conference, Seattle, Washington, USA*

Richert E, Koinzer S, Klettner A, Brinkmann R, Hillenkamp J, Roider J (2016) Einfluss der Thermischen Stimulationstherapie der Retina (TS-R) auf die Sekretion von Zellmediatoren
Tagung Norddeutscher Augenärzte, Bad Segeberg

Richert E, Koinzer S, Klettner A, Brinkmann R, Hillenkamp J, Roider J (2016) Einfluss der Thermischen Stimulationstherapie der Retina (TS-R) auf die Sekretion von Zellmediatoren
Kongress der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft, Berlin

Richert E, Tode J, Koinzer S, Klettner A, Brinkmann R, Hillenkamp J, Roider J (2016) Reduktion der Dicke der Bruch'schen Membran nach thermischer Stimulationstherapie (TS-R) in zwei AMD Mausmodellen
Symposium „I-Search“, Münster

Richert E, Koinzer S, Hillenkamp J, Roider J, Klettner A (2015) Einfluss der selektiven Retinatherapie (SRT) auf Zellmediatoren zur Präventionsbehandlung altersabhängiger Makuladegeneration (AMD)
Tagung Norddeutscher Augenärzte, Hamburg

Richert E, Klettner A, Hillenkamp J, Roider J, Koinzer S (2015) Einfluss der Selektiven Retinatherapie (SRT) auf die Sekretion von Zellmediatoren zur Präventionsbehandlung altersabhängiger Makuladegeneration (AMD)
Kongress der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft, Berlin

Richert E, Koinzer S, Tode J, Hillenkamp J, Klettner A, Roider J (2015) Einfluss der Selektiven Retinatherapie auf die Sekretion von Zellmediatoren zur Präventionsbehandlung der altersabhängigen Makuladegeneration
Symposium „I-Search“, Münster

PUBLIKATIONEN AUS INHALTEN DER VORLIEGENDEN ARBEIT

Richert E (2016) Thermische Stimulationstherapie der Retina-Präventionsbehandlung der frühen AMD durch subletale Laserbehandlung? *Augenspiegel* 12/2016:18-21.

Richert E (2015) Präventionsbehandlung der frühen AMD? Einfluss der Selektiven Retinatherapie auf die Sekretion von Zellmediatoren.
Ophthalmologische Nachrichten 10/2015:18-19.

EINGREICHTE PUBLIKATIONEN AUS INHALTEN DER VORLIEGENDEN ARBEIT

Richert E, Koinzer S, Tode J, Schlott K, Brinkmann R, Hillenkamp J, Klettner A, Roider J (2016) Release of Age Related Macular Degeneration (AMD)-relevant Cell Mediators during Retinal Pigment Epithelium Regeneration (PER) following Selective Retina Therapy (SRT).

Eingereicht am 1.2.2016 bei Experimental Eye Research

Richert E, Tode J, Klettner A, Koinzer S, Brinkmann R, Hillenkamp J, Lucius R, Roider J (2016) Reduction of Bruch`s Membrane (BrM) Thickness after Pulsed Laser Irradiation in Apolipoprotein (Apo) E Knock Out Mice

Eingereicht am 6.12.2016 bei der ARVO, Angenommen für die ARVO-Conference 2017 in Baltimore, MD, USA am 11.1.2017

Tode J, **Richert E**, Klettner A, von der Burchard C, Koinzer S, Roider J (2016) CRB-1 rd8 Mutation Influences the Extent of AMD-like Retinal Alterations in NRF2 Knock Out Mice and Favors CNV Formation

Eingereicht am 6.12.2016 bei der ARVO, Angenommen für die ARVO-Conference 2017 in Baltimore, MD, USA am 11.1.2017

Kiel, den

(Elisabeth Dorothea Richert)