

Aus der Klinik für Ophthalmologie
(Direktor: Prof. Dr. Johann Roeder)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Der Einfluss von
aktiviertem Retinalen Pigmentepithel auf die
Migration und den Phänotyp von Monozyten**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Christin Hettich geb. Berg
aus Schwerin
Kiel 2016

1. Berichterstatter: Prof. Dr. J. Roider, Klinik für Ophthalmologie

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Felix Treumer, Klinik für Ophthalmologie

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Oktober 2017

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 26. 06. 2017

gez.: Prof. Dr. Thomas Herdegen
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungen	3
2	Einleitung	5
2.1	Anatomie der Netzhaut	5
2.1.1	Die Makula	6
2.1.2	Blutversorgung der Retina.....	7
2.1.3	Retinales Pigmentepithel (RPE).....	7
2.2	Altersabhängige Makuladegeneration (AMD)	8
2.3	Monozyten und Makrophagen	11
2.3.1	Phänotypen von Monozyten.....	12
2.4	Interaktion zwischen Monozyten und RPE	13
2.5	Toll-like-Rezeptor 3 (TLR3).....	14
2.6	Bedeutung des Toll-like-Rezeptors 3 bei der Entstehung der AMD	15
2.7	Das Schwein als Versuchsmodell für humane Augenerkrankungen.....	16
2.8	Fragestellung und Zielsetzung.....	17
3	Material und Methoden	18
3.1	Material.....	18
3.1.1	Geräte.....	18
3.1.2	Software	18
3.1.3	Verbrauchsgegenstände.....	19
3.1.4	Chemikalien	19
3.1.5	Medium und Serum	20
3.1.6	Antikörper	21
3.2	Methoden	21
3.2.1	Prinzip der Durchflusszytometrie.....	21
3.2.2	Etablierung der Monozytenpräparation aus Schweineblut.....	22
3.2.2.1	Herausforderungen bei der Etablierung	22
3.2.2.2	Dichtegradientenzentrifugation	23
3.2.2.3	Vorversuche zur Trennung von Monozyten und Lymphozyten	24
3.2.2.4	Vorversuche zur Monozytenablösung	26
3.2.2.5	Detaillierte Darstellung der etablierten Monozytenpräparation.....	26
3.2.2.6	Bestimmung der Zellzahl und Vitalität	28

3.2.3	Bestimmung der Monozytenreinheit	28
3.2.4	Präparation der Zellen des Retinalen Pigmentepithels.....	29
3.2.5	Aktivierung der RPE-Zellen durch Stimulation des TLR-3	30
3.2.6	Untersuchung der Monozytenmigration mittels Boyden-Kammer.....	30
3.2.7	Behandlung der Monozyten mit den Stimulanzen und anschließende Bestimmung von Oberflächenmolekülen mittels Durchflusszytometrie	35
3.2.8	Statistische Auswertung der gemessenen Daten.....	36
4	Ergebnisse	37
4.1	Monozytenpräparation	37
4.1.1	Ergebnisse der Vorversuche zur Monozytenpräparation	37
4.1.1.1	Vorversuche zur Monozytenisolierung	37
4.1.1.2	Vorversuche zur Monozytenablösung	38
4.1.2	Monozytenreinheit und Zellzahl mit etablierter Methode.....	40
4.1.3	Monozytenvitalität	41
4.2	CD163 Expression.....	42
4.3	Migration.....	43
4.4	Fas Ligand Expression	44
5	Diskussion	45
6	Zusammenfassung	50
7	Literaturverzeichnis	52
8	Anhang	62
8.1	Danksagung.....	62
8.2	Veröffentlichungen.....	63
8.3	Lebenslauf	75

1 Abkürzungen

A.	Arteria
AMD	altersabhängige Makuladegeneration
Aqua dest.	aqua destillata (destilliertes Wasser)
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Rinder Serum Albumin)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CNV	choroidale Neovaskularisation
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CO ₂	Kohlendioxid
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et alii/ et aliae/ et alia (und andere)
evtl.	eventuell
FasL	Fas Ligand (CD95 Ligand)
FCS	<i>fetal calf serum</i> (Fetales Kälber Serum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat (ein Fluoreszenzfarbstoff)
FL	Fluoreszenz
FSC	<i>Forward Scatter</i>
g	Gramm / Erdbeschleunigung (bei Zentrifugation)
GA	Geografische Atrophie
GM-CSF	<i>granulocyte/macrophage - colony stimulating factor</i>
h	Stunden
H	Hintergrund
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperatiny]-ethansulfonat
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid

MCP-1	<i>monocyte chemo-attractant protein-1</i>
mg	Milligramm
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
min	Minuten
mind.	mindestens
Mio	Million(en)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
Nr.	Nummer
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PC	<i>Personal Computer</i>
PE	Phycoerythrin (ein Fluoreszenzfarbstoff)
Poly I:C	<i>Polyinosinic : polycytidylic Acid</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RPE	Retinales Pigmentepithel
R-PE	R-Phycoerythrin (ein Fluoreszenzfarbstoff)
siRNA	<i>small interfering RNA</i> (kleine interferierende RNA)
SSC	<i>Side Scatter</i>
TLR3	<i>Toll like receptor 3</i> (Toll ähnlicher Rezeptor 3)
TNF	Tumornekrosefaktor
u. a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
v. a.	vor allem
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
W	<i>Well</i> (Vertiefung in der Migrationskammer)
WHO	<i>World Health Organization</i>
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

2 Einleitung

2.1 Anatomie der Netzhaut

Die Netzhaut (Retina) kleidet den hinteren Teil des Bulbus aus und wandelt das einfallende Licht in Nervenimpulse um (Patzelt 2009). Histologisch kann man sie in 10 gut abgrenzbare Schichten untergliedern (Lüllmann-Rauch 2006). Die äußere Schicht bildet das Retinale Pigmentepithel. Die restlichen 9 Schichten bilden die neurosensorische Retina (siehe Abbildung 1).

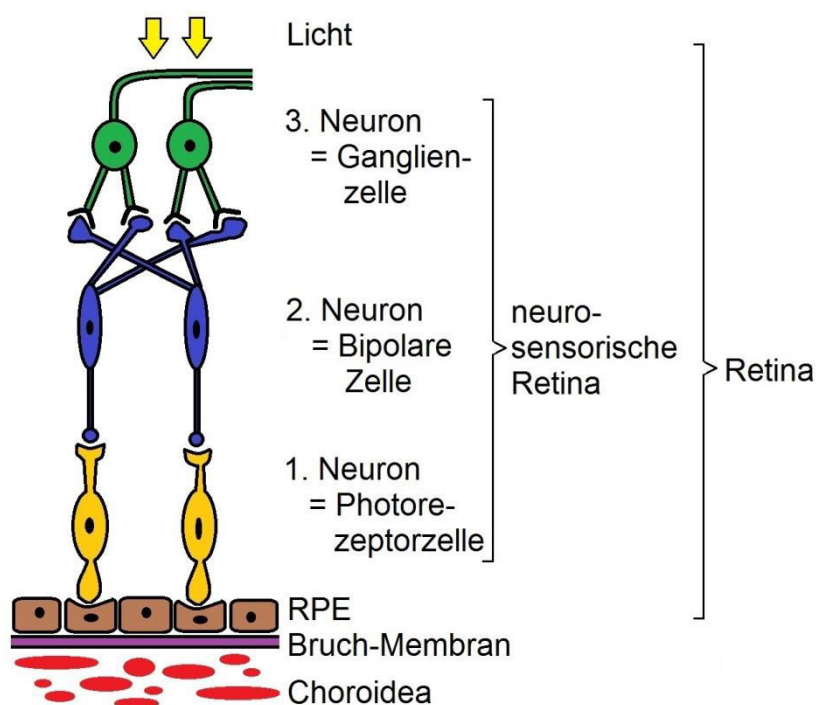


Abbildung 1. Schematische – stark vereinfachte – Darstellung der Retina mit angrenzenden Teilen der Choroidea.

In der neurosensorischen Retina finden sich die ersten Neurone der Sehbahn. Die Photorezeptorzellen stellen das erste Neuron dar und setzen die Lichtreize in elektrische Signale um. Dabei unterscheidet man Stäbchen von Zapfen. Die Zapfen sind vor allem für das Farbsehen und die Stäbchen für das Dämmerungssehen zuständig. Das zweite Neuron stellen die bipolaren Zellen dar. Sie nehmen die Signale von den Photorezeptorzellen auf, um sie an die Ganglienzellen weiterzugeben. Die Ganglienzellen tragen die Informationen zum Gehirn. Ihre Axone verlaufen von der Retina über den Sehnerv bis ins Zwischenhirn. Sie stellen das dritte Neuron der Sehbahn dar.

Die Retina wird nach außen hin von der Choroidea umgeben. Die Choroidea, auch Aderhaut, dient der Blutversorgung des Auges. Die Grenzschicht zwischen Retina und Choroidea ist die Bruch-Membran. Diese besteht aus einem Netz von elastischen Fasern und bildet die stabile und faltenfreie Unterlage für die Retina (Lüllmann-Rauch 2006).

2.1.1 Die Makula

Die meisten Zapfenzellen liegen in der Makula, ein Bereich von ca. 3 mm Durchmesser. Die Makula liegt zentral in der Retina und durch sie verläuft die optische Achse (siehe Abbildung 2). In der Mitte der Makula befindet sich die Fovea, eine trichterförmige Vertiefung mit ca. 1,5 mm Durchmesser. Die Fovea ist die Stelle mit der höchsten Sehschärfe. In diesem Bereich sind die nachgeschalteten Neurone zur Seite verlagert, was einerseits die Trichterform verursacht und andererseits dafür sorgt, dass in diesem Bereich das einfallende Licht nicht durch darüber liegende Zellschichten gestreut wird. Außerdem sind die Photorezeptorzellen in der Fovea fast ausschließlich 1:1 mit den Ganglienzellen verschaltet, was die Sehschärfe besonders fördert. Im Gegensatz dazu konvergieren in der Netzhautperipherie viele Rezeptoren auf eine Ganglienzelle (Lüllmann-Rauch 2006).

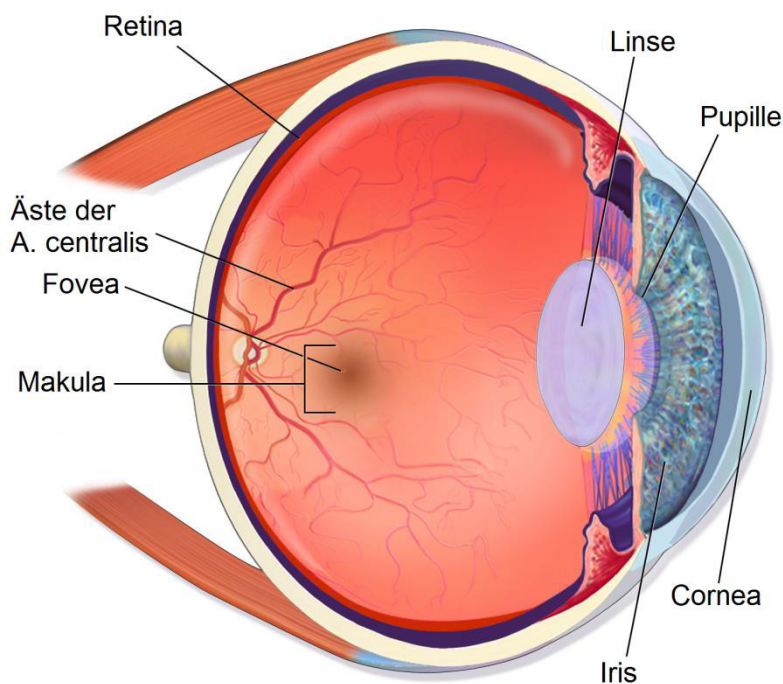


Abbildung 2. Anatomie des Auges.

A. centralis = Arteria centralis retinae.

Quelle:

Blausen.com staff.

Blausen gallery 2014.

Wikiversity Journal of Medicine.

DOI:10.15347/wjm/2014.

010. ISSN 20018762

2.1.2 Blutversorgung der Retina

Die Retina wird von zwei Seiten mit Blut versorgt. Die inneren Schichten der Retina bis einschließlich des 2. Neurons werden über Äste der Arteria centralis retinae versorgt, die über den Sehnerv eintritt (siehe Abbildung 2). Die Photorezeptoren und das RPE werden über Gefäße der Choroidea versorgt.

Es gibt eine Blut-Retina-Schranke. Diese Schranke entsteht durch das geschlossene Endothel der Äste der A. centralis und die dichten Haftkomplexe (*Tight junctions*) zwischen den Zellen des RPEs. Die Blut-Retina-Schranke garantiert, dass die Retina vor im Blut zirkulierenden hydrophilen Stoffen abgeschirmt wird, um sie vor möglichen Schadstoffen zu schützen (Lüllmann-Rauch 2006). Außerdem wird so ein unkontrollierter Übertritt von Entzündungszellen verhindert, um die Retina vor überschießenden Infektionen zu bewahren.

2.1.3 Retinales Pigmentepithel (RPE)

Das Retinale Pigmentepithel ist ein einschichtiges kubisches Epithel, welches zahlreiche Melanosomen enthält. Es bildet die äußerste Schicht der Retina und sitzt fest auf der Bruch-Membran (Lüllmann-Rauch 2006).

Das RPE hat eine Vielzahl von Funktionen für die Retina (Strauss 2005). Zum einen sind die Zellen des RPEs, wie oben erwähnt, über *Tight junctions* miteinander verbunden und stellen daher einen Teil der Blut-Retina-Schranke dar. Zum anderen vermittelt das RPE den Stoffaustausch zwischen der Choroidea und den Photorezeptoren und ist daher für die Versorgung der Retina unerlässlich. Außerdem verhindert das Pigment (Melanin) Lichtreflexe, die Streulicht erzeugen würden und ist somit von großer Bedeutung für die Sehschärfe.

Eine entscheidende Aufgabe des RPEs ist die Regulation der Immunantwort in der Retina (Detrick & Hooks 2010); (Klettner 2015). Das Auge ist eine klassische immunprivilegierte Region, das heißt, es findet im Auge eine physiologische Immunsuppression statt. Der Grund dafür ist, dass Entzündungen im Auge schnell zur Einschränkung des Sehvermögens führen und dass eine unspezifische Zerstörung von Nachbargewebe, wie der nicht regenerationsfähigen Retina, dramatische Folgen hätte. Daher werden bestimmte Bereiche der Immunantwort unterdrückt (Ferguson & Griffith 2006); (Stein-Streilein 2008). Ein Beispiel, wie die RPE-Zellen dieses Immunprivileg unterstützen, ist die Expression des Fas Liganden.

Der Fas Ligand kann an einen Fas-Rezeptor binden und die rezeptortragende Zelle zur Apoptose zwingen. Da Fas-Rezeptoren u.a. auf Zellen des Immunsystems wie T-Lymphozyten exprimiert werden, hat der Fas Ligand eine immunsupprimierende Wirkung (Sharma et al. 2000). Generell fördern die RPE-Zellen ein anti-inflammatorisches Milieu, indem sie u.a. Zytokine produzieren, die die Immunantwort unterdrücken (Sugita et al. 2006), wie z.B. Thrombospondin (Zamiri et al. 2007) und indem sie z.B. durch die Expression des Komplementfaktors H die Aktivierung des Komplementsystem regulieren (Klettner 2015).

Im Rahmen seiner Funktion als Blut-Retina-Schranke liegt das RPE sehr nahe an der Choroidea und ist daher ein leichtes Ziel für mögliche systemische Infektionen, z.B. für Viren (Huemer et al. 1996). Daher exprimieren die Zellen des RPEs Mustererkennungsrezeptoren (*Pattern recognition receptors*), mit denen sie bestimmte Oberflächenstrukturen erkennen können, die für den Körper eine Gefahr bedeuten. Die RPE-Zellen sind in der Lage auf solche Gefahren zu reagieren, indem sie Zytokine produzieren. Sie können also auch zu einer Entzündung im Auge beitragen (Kaarniranta & Salminen 2009). Zu diesen *Pattern recognition receptors* gehört auch der Toll-like-Rezeptor 3 (TLR3), auf den im Weiteren noch eingegangen wird (siehe Kapitel 2.5).

2.2 Altersabhängige Makuladegeneration (AMD)

Die altersabhängige Makuladegeneration ist eine Erkrankung, die den älteren Menschen betrifft und zu einem Verlust des zentralen Sehvermögens führt. Die AMD ist nach Katarakt und Glaukom weltweit die dritthäufigste Erblindungsursache. In den westlichen Industrienationen verursacht sie zurzeit sogar die meisten Erblindungsfälle (WHO 2016). Pathophysiologisch scheint die AMD eine sehr komplexe Erkrankung zu sein, die aus einem Zusammenspiel von Alterungsprozessen, genetischen Prädispositionen, Umweltfaktoren und Entzündungsreaktionen resultiert (Miller 2013). Eine Schlüsselrolle in der Entstehung scheint das Retinale Pigmentepithel zu spielen, welches maßgeblich an dem in der AMD gestörten Fettstoffwechsel des Auges beteiligt ist. Die Zellen des RPE sind im Laufe der Erkrankung als erstes betroffen und gehen zunehmend zugrunde. Es wird vermutet, dass sie daraufhin an der Vermittlung einiger pathologischer Antworten, wie einer überschießenden Entzündungsreaktion beteiligt sind (Miller 2013). Der wichtigste Risikofaktor für eine AMD ist das Alter. Die natürlichen Alterungsprozesse

im Auge schaffen die Voraussetzungen zur Entstehung einer AMD, sind alleine aber nicht in der Lage die Erkrankung auszulösen. Zu diesen Alterungsprozessen gehört u. a. eine zunehmende Ablagerung von Lipiden in und unter das RPE und eine Anreicherung von Lipofuscin im RPE, welche den oxidativen Stress in den Zellen verstärken kann und toxische Eigenschaften besitzt (Lamb & Simon 2004). Die entstehenden Lipidablagerungen sammeln sich in einer Lipid-Schicht auf der Bruch-Membran und sind wahrscheinlich Vorläufer der pathologischen Drusen einer AMD (Curcio et al. 2011). Drusen sind Ablagerungen von extrazellulärem Material unterhalb der Retina. Bei der Funduskopie (Spiegelung des Augenhintergrunds) imponieren sie als gelbe Flecken in der zentralen Retina. Erst ab einer bestimmten Größe haben sie einen Krankheitswert und sind ein Kennzeichen der AMD. Die Lipidablagerungen sind am stärksten in der Makula lokalisiert. Dies kommt wahrscheinlich durch den venösen Druck zustande, der in der Makula am größten ist, weil hier das choroidale Venensystem am weitesten vom Herz entfernt liegt (Friedman 2008). Eine AMD wird begünstigt, wenn auch genetische Prädispositionen vorliegen. In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von Genen identifiziert, die mit der Entstehung der AMD in Verbindung gebracht werden. Diese Gene liegen vor allem auf zwei Genorten (1q32 und 10q26) und kodieren zusammen für wichtige Bestandteile von biologischen Vorgängen, die in der Entstehung der AMD eine Rolle spielen. Die Gene kodieren z.B. für die Entzündungsreaktion und das Immunsystem, für den Fettstoffwechsel und -transport, für die Aufrechterhaltung der Extrazellulärmatrix oder für die Angiogenese. Hinzukommende Umweltfaktoren können sich negativ auf die genetischen Prädispositionen und Alterungsprozesse auswirken und so einen frühen Krankheitsbeginn und ein schnelles Fortschreiten der AMD bewirken. Zu den entscheidenden Umweltfaktoren bei der AMD gehören das Rauchen, das den oxidativen Stress der Zellen verstärken kann und eine fettreiche Ernährung, welche den Fettstoffwechsel zusätzlich belastet. Man geht davon aus, dass eine chronische Entzündungsreaktion Teil der Pathogenese der AMD ist und zum einen über die Aktivierung des Komplementsystems, zum anderen durch die Rekrutierung und Aktivierung inflammatorischer Zellen, wie Makrophagen vermittelt wird. Auch die Lipidablagerungen könnten Substrate einer solchen Entzündungsreaktion darstellen, welche vermutlich auch über das Komplementsystem vermittelt wird. In früheren Forschungen konnten verschiedene

Proteine des Komplementsystems in Drusen, dem RPE, der Bruch-Membran und der Retina gefunden werden (Ambati et al. 2003).

Generell unterscheidet man zwei Formen der AMD, die trockene und die feuchte AMD. Die trockene AMD, die auch als nicht exsudative Form beschrieben wird, tritt deutlich häufiger auf als die unten beschriebene feuchte Form der AMD. Auf die dabei entstehende Atrophie des RPEs folgt eine Zerstörung der Choroidea und der Photorezeptoren der Retina (McLeod et al. 2009). Klinisch imponiert eine Verschlechterung der zentralen Sehschärfe, die sich langsam über Monate bis Jahre entwickelt. Breitet sich die Atrophie flächig immer weiter aus, spricht man von geografischer Atrophie (GA), dem Spätstadium der AMD. Eine trockene AMD kann auch in die feuchte Form der AMD übergehen (Patzelt 2009).

Die feuchte bzw. exsudative AMD ist zwar deutlich seltener, verursacht aber trotzdem den größten Anteil der Erblindungen durch eine AMD. Bei dieser Form kommt es zusätzlich zu einer Zerstörung der Blut-Retina-Schranke. Dadurch können sich Ödeme bilden und Blutgefäße aus der Choroidea einsprossen. Bei diesen sogenannten choroidalen Neovaskularisationen (CNV) können die Kapillaren der Choroidea sowohl unter das RPE als auch zwischen das RPE und die sensorische Netzhaut proliferieren (Miller et al. 2003). Häufige Komplikationen der CNVs sind Fibrosierungen und Blutungen in diesem Bereich (Böcker et al. 2004). Eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der CNVs spielt der *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), der sowohl vom RPE als auch von beteiligten Makrophagen ausgeschüttet werden kann (Miller et al. 2013). Der VEGF stellt ein typisches angiogenetisches Signal dar und ist an der Migration und Proliferation von Endothelzellen beteiligt. Klinisch imponiert auch bei der feuchten AMD eine zentrale Sehverschlechterung, welche allerdings deutlich schneller fortschreiten kann, als bei der trockenen AMD. Akut auftretende Metamorphopsien (verzerrtes Sehen) oder auch plötzliche rapide Sehverschlechterungen sind typisch und Korrelate der auftretenden Ödeme bzw. Blutungen (Patzelt 2009).

Eine kausale Therapie existiert zurzeit nicht. Generell können zur symptomatischen Therapie vergrößernde Sehhilfen herangezogen werden. Außerdem hat sich im letzten Jahrzehnt die Anti-VEGF-Therapie zur symptomatischen Behandlung der feuchten AMD durchgesetzt. Mit lokal angewendeten VEGF-Antikörpern wie

Bevacizumab oder VEGF-Antikörperfragmenten wie Ranibizumab konnte in über 90 % der Fälle ein Fortschreiten des Sehverlusts aufgehalten werden und in einem Drittel der Fälle sogar Sehverbesserungen erzielt werden (Miller 2013); (Martin et al. 2012). Da die Anti-VEGF-Therapie auf die Behandlung in einem eher späten Erkrankungsstadium abzielt, ist es weiterhin ein zentrales Forschungsziel, Therapiestrategien für ein frühes Erkrankungsstadium zu etablieren, um einen möglichen Progress der AMD aufzuhalten.

2.3 Monozyten und Makrophagen

Monozyten sind im Blut zirkulierende Immunzellen, die zu den Leukozyten gehören. Es sind annähernd kugelige Zellen, die einen Durchmesser von bis zu 20 μm erreichen können. Sie stammen aus dem Knochenmark, wo sie sich aus einer myeloischen Vorläuferzelle entwickeln und dann ins Blut abgegeben werden. Sie sind in der Lage zu phagozytieren, zytotoxische Aktivität zu entfalten und eine Vielzahl biologisch aktiver Mediatoren zu sezernieren. Monozyten verlassen nach 1 bis 3-tägiger Zirkulation das Blut und wandeln sich im Gewebe zu ortsansässigen Makrophagen oder dendritischen Zellen um (Lüllmann-Rauch 2006). Wenn sie auswandern, behalten sie viele ihrer Fähigkeiten und werden vom umliegenden Gewebe zu zusätzlichen speziellen Funktionen veranlasst, denen sie dort monatelang nachkommen können (Böcker et al. 2004). Eine dieser Aufgaben der Makrophagen ist die Beseitigung von untergegangenen Zellen und Mikroorganismen mittels Phagozytose. Des Weiteren besitzen sie zytotoxische Aktivität gegenüber Parasiten, Tumorzellen und virusinfizierten Zellen. Bei letzteren können sie durch unterschiedliche Mechanismen eine Apoptose auslösen. Makrophagen sind in der Lage innerhalb kürzester Zeit nach Stimulation viele Proteine wie Enzyme und Zytokine zu sezernieren. Die meisten davon werden sofort abgegeben und nicht erst in der Zelle gespeichert. Makrophagen haben einen wichtigen Anteil am Ablauf von Entzündungsreaktionen. Nach der Phagozytose von Infektionserregern wird das aufgenommene Material gespalten und die entstehenden Peptide werden mit Hilfe spezieller MHC-Moleküle (*Major Histocompatibility Complex*) auf der Oberfläche der Makrophagen präsentiert. Nur durch eine Präsentation können Antigene von T-Lymphozyten erkannt werden. Daher sind Makrophagen u.a. die Zellen, welche die Verbindung zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystems darstellen (Martin & Resch 2009). Des Weiteren sind auch Monozyten und

Makrophagen in der Lage, im Laufe ihrer Entwicklung und bei entsprechender Stimulation den Fas Liganden zu exprimieren und so eine immunmodulierende Wirkung zu entfalten (Brown & Savill 1999).

Es gibt einige Hinweise darauf, dass Monozyten bzw. Makrophagen an der Pathogenese der AMD beteiligt sind (Klettner 2015). In der gesunden Retina befinden sich normalerweise keine Monozyten oder Makrophagen, da sie die Blut-Retina-Schranke nicht überwinden können. Wenn aber unter pathologischen Bedingungen die Blut-Retina-Schranke gestört ist, wird es auch Monozyten ermöglicht in den subretinalen Raum zu infiltrieren. So konnten in Augen, bei denen eine AMD diagnostiziert wurde, Makrophagen gefunden werden, welche die Bruch-Membran überwunden haben und in den subretinalen Raum eingewandert sind (Cherepanoff et al. 2010). Die genauen Angaben zur Bedeutung der Makrophagen im Rahmen der AMD-Genese sind teilweise widersprüchlich. Viele Veröffentlichungen beschreiben einen Einfluss der Makrophagen bei der Entstehung der CNVs. Dabei wird von einigen Autoren eine protektive und anti-angiogenetische Wirkung der Makrophagen geschildert (Apte et al. 2006). Andere Autoren behaupten, dass Monozyten eine destruktive und pro-angiogenetische Rolle in der Entwicklung der CNVs bei der AMD spielen (Espinosa-Heidmann et al. 2003); (Shi et al. 2011). Wegen dieser widersprüchlichen Veröffentlichungen ist eine weiterführende Untersuchung der genauen Mechanismen der Makrophagenbeteiligung an der AMD sinnvoll.

2.3.1 Phänotypen von Monozyten

Alle Monozyten kann man anhand ihres Oberflächenmarkers CD14 identifizieren. CD14 stellt einen Teil des Rezeptors für Lipopolysaccharid (LPS) dar und wird im Blut ausschließlich von den Monozyten exprimiert (Gordon & Taylor 2005).

Je nach Autor werden 2 bis 4 Monozytenuntergruppen mit unterschiedlicher Nomenklatur unterschieden (Gordon & Taylor 2005); (Mantovani et al. 2004); (Mosser 2003). Diese Untergruppen unterscheiden sich z.B. in der Expression verschiedener Oberflächenmoleküle und der Produktion von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen. Durch ihre variierenden Eigenschaften haben sie zum Teil sehr unterschiedliche physiologische Bedeutung (Mantovani et al. 2004). Sie können entweder pro- oder anti-inflammatorische Eigenschaften zeigen und auch im Hinblick

auf die Angiogenese gegenteilige Effekte hervorrufen (Ferguson & Griffith 2006). Dabei sind die Grenzen zwischen den einzelnen Phänotypen jedoch nicht deutlich, da es zum Teil diverse Zwischenformen gibt, für die man noch keine eindeutigen Marker kennt (Mosser 2003). Viele Veröffentlichungen deuten darauf hin, dass die unterschiedlichen Monozytenuntergruppen die verschiedenen Entwicklungsstadien und das Alter der Monozyten auf ihrem Weg von den klassischen Monozyten bis hin zu gewebständigen Makrophagen oder dendritischen Zellen widerspiegeln (Gordon & Taylor 2005); (Mantovani et al. 2005). Diese Entwicklung stellt allerdings keinem starren linearen Prozess dar. Sie kann durch die Anwesenheit unterschiedlicher Stimulanzen wesentlich beeinflusst werden. Zum Beispiel kann die Anwesenheit von GM-CSF (*granulocyte/macrophage - colony stimulating factor*) und Interleukin-4 jederzeit die Differenzierung zur dendritischen Zelle veranlassen (Gordon & Taylor 2005).

Neben CD14, den man auf allen Monozyten findet, ist auch CD16 ein wichtiger Oberflächenmarker, der unter anderem von Monozyten und Makrophagen exprimiert wird. Allerdings findet sich CD16 nicht auf allen humanen Monozyten, sodass man mit Hilfe dieses Markers zwei humane Monozytenuntergruppen unterscheiden kann. Dabei stellen die CD16+ Monozyten eine weiterentwickelte Form dar, die makrophagenähnliche Eigenschaften zeigt (Ziegler-Heitbrock et al. 1993). Im Gegensatz dazu wird beim Schwein von allen Monozyten CD16 exprimiert (Sánchez et al. 1999 p. 1). Da die Versuche dieser Dissertation im Schweinmodell durchgeführt werden sollten, wurde im Folgenden von einer Bestimmung von CD16 abgesehen.

CD163 ist ein Marker, der sowohl auf gewebständigen Makrophagen als auch auf einer bestimmten Monozytenuntergruppe exprimiert wird. Diese CD163 positiven Monozyten repräsentieren weiterentwickelte Monozyten. Sie können im Gegensatz zu den klassischen CD163 negativen Monozyten große Mengen des anti-inflammatorischen Interleukins-10 produzieren und haben damit eher immunregulatorische Funktionen (Mantovani et al. 2004).

2.4 Interaktion zwischen Monozyten und RPE

Das RPE kann mit Zellen des angeborenen Immunsystems interagieren, dies wurde auch für Monozyten bzw. Makrophagen beobachtet.

Unter physiologischen Bedingungen besteht im Auge kein direkter Zell-Zell-Kontakt zwischen dem RPE und den Monozyten (Yang et al. 2002). Allerdings kann es bei pathologischen Veränderungen, wie z.B. der AMD oder der proliferativen Vitreoretinopathie zu solchen Zell-Zell-Kontakten kommen (Cherepanoff et al. 2010); (Jerdan et al. 1989). Ein direkter Kontakt zwischen dem RPE und Monozyten kann weitreichende Folgen für die Funktion beider Zellen haben. Zum einen wurde gezeigt, dass ein Zell-Zell-Kontakt die Monozytendifferenzierung vorantreibt (Osuský et al. 1997) und zum anderen, dass durch den Kontakt die Expression von MCP-1 und IL-8 in den RPE-Zellen veranlasst wird (Bian et al. 2003). Außerdem wurde veröffentlicht, dass aktivierte Monozyten bei einem Zell-Zell-Kontakt eine Apoptose in den RPE-Zellen auslösen können (Elner et al. 2003).

Die RPE-Zellen sind aber auch ohne einen direkten Kontakt zu den Monozyten in der Lage mit ihnen zu kommunizieren, indem sie lösliche Produkte wie Zytokine abgeben. Dies machen sie vor allem, wenn sie über ihre Rezeptoren mögliche Gefahrenquellen erkannt haben (Lau & Taylor 2009).

2.5 Toll-like-Rezeptor 3 (TLR3)

Der Toll-like-Rezeptor 3 gehört zu den Mustererkennungsrezeptoren (*Pattern recognition receptors*), die in der Lage sind, Gefahren zu erkennen, um eine Abwehrreaktion einzuleiten. Diese Rezeptoren kommen auf allen Zellen des angeborenen Immunsystems vor, wurden jedoch auch bei diversen anderen Zelltypen gefunden. Generell erkennen Mustererkennungsrezeptoren Pathogen-assoziierte molekulare Muster, jedoch keine individuellen Erregerarten.

Eine Gruppe der Mustererkennungsrezeptoren stellen die Toll-ähnlichen-Rezeptoren (*Toll-like-receptors*, TLR) dar. Ihren Namen verdanken sie ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit dem Molekül „Toll“, das ursprünglich in der Fruchtfliege identifiziert wurde. Toll-ähnliche-Rezeptoren sind entwicklungsgeschichtlich sehr alt und kommen bereits in sehr einfachen mehrzelligen Lebensformen vor. Im Menschen sind mindestens 12 unterschiedliche TLRs identifiziert worden. Bei 10 davon kennt man bereits die genauen Liganden. Alle Toll-ähnlichen-Rezeptoren sind Transmembranproteine. Das bedeutet, dass sie die Zellmembran komplett durchspannen und daher Anschluss zu den Räumen beider Seiten der Membran haben.

Man unterscheidet generell zwei Gruppen von TLRs. Zur ersten Gruppe gehören TLRs, die vor allem auf der Zelloberfläche exprimiert werden. Sie erkennen hauptsächlich Strukturen, die sich auf der Oberfläche von Erregern befinden. Zum anderen gibt es TLRs, die eher in der Membran von Endosomen und Lysosomen exprimiert werden und die zweite Gruppe bilden. Sie erfassen hauptsächlich körperfremde Nukleinsäuren. Diese sind vorher über Phagozytose oder gezielte Invasion (bei Viren) in die Endosomen der Zelle gelangt. Zu dieser zweiten Gruppe gehört auch der Toll-like-Rezeptor 3 (Martin & Resch 2009).

Der Toll-like-Rezeptor 3 erkennt doppelsträngige RNA (Vercammen et al. 2008); (Matsumoto et al. 2002), die man vor allem in Viren findet. Der Toll-like-Rezeptor 3 wird generell von Zellen des angeborenen Immunsystems exprimiert, konnte jedoch auch auf RPE-Zellen gefunden werden (Kumar et al. 2004). Außerdem wurde gezeigt, dass der TLR3 auf den Zellen des RPE nicht nur in Endosomen, wie oben beschrieben, sondern auch auf der Zelloberfläche exprimiert wird (Kleinman et al. 2012).

2.6 Bedeutung des Toll-like-Rezeptors 3 bei der Entstehung der AMD

Wie zuvor erwähnt, erkennt der TLR3 doppelsträngige RNA, die man vor allem in Viren findet. Es wurde allerdings gezeigt, dass der TLR3 auch von *small interfering RNA* (siRNA) aktiviert werden kann. Diese siRNA kann auch nach dem Zelltod von RPE-Zellen gefunden werden. Dies könnte einen entscheidenden Einfluss auf die Entstehung der geografischen Atrophie (GA), der späten Form der AMD haben (Kleinman et al. 2012).

Die Aktivierung von TLR3 wurde als ein möglicher Faktor für die Zerstörung des RPEs bei der GA diskutiert. Hierbei wurde die Toxizität einer TLR3-Aktivierung für die Zellen des RPEs aufgezeigt und ein Zusammenhang zwischen TLR3-Polymorphismen und einem Schutz vor der Entwicklung einer GA gesehen (Yang et al. 2008). Der Zusammenhang zwischen TLR3-Polymorphismen und der GA wird allerdings kontrovers diskutiert. Während einige Autoren keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen TLR3-Polymorphismen und einer AMD oder CNV sehen (Cho et al. 2009), beschreiben andere, dass genetische Varianten des TLR3s durchaus einen Schutz vor der Entstehung einer GA bewirken können, indem sie die Bindungskapazität des TLR3 an siRNAs vermindern (Zhou et al. 2011).

Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass RPE-Zellen auf eine TLR3-Aktivierung mit der Ausschüttung verschiedener Zytokine reagieren. Diese Zytokine sind zum Beispiel Interleukin-6, Interleukin-8, Interferon- β , *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) oder *monocyte chemo-attractant protein-1* (MCP-1) (Kumar et al. 2004); (Klettner et al. 2013). MCP-1 ist ein Chemokin, das in der Lage ist Monozyten anzulocken.

Die Beteiligung des TLR3 an der Entwicklung der AMD ist also ungeklärt und bedarf noch genauerer Untersuchungen.

2.7 Das Schwein als Versuchsmodell für humane Augenerkrankungen

Um an Pathophysiologien der AMD zu forschen, benötigt man RPE-Zellen. Allerdings stehen Primärzellen von humanem Retinalen Pigmentepithel nur in sehr geringem Maße für Forschungszwecke zur Verfügung. Daher muss man entweder auf eine immortalisierte Zelllinie wie ARPE-19 zurückgreifen oder die Versuche mit Zellen einer anderen Spezies durchführen. Ein entscheidender Nachteil von immortalisierten Zelllinien ist, dass sie oft nur noch wenige ihrer ursprünglichen physiologischen Eigenschaften besitzen (Schmitz 2011). Daher sollten die Versuche für diese Arbeit mit primären tierischen Zellen durchgeführt werden.

Um humane Pathophysiologien zu erforschen, werden häufig tierische Zellen und darunter vor allem Zellen der Maus verwendet. Die Nutzung von Zellen aus dem Schwein ist nicht ganz so üblich. Allerdings ist das Auge des Schweins dem humanen Auge anatomisch und physiologisch sehr ähnlich, z.B. in Bezug auf die Morphologie, Größe, Perfusion und Organisation der Retina (Sanchez et al. 2011); (Lassota 2008). Auch wenn Schweine im Gegensatz zum Menschen keine Makula besitzen, sind ihre Augen den humanen sehr ähnlich, da auch sie tagaktive Wesen sind, was ein entscheidender Unterschied zu Ratten und Mäusen ist. Auch in immunologischer Hinsicht ähneln sich die Augen von Schwein und Mensch, z.B. bezüglich der Anwesenheit von Zellen des Immunsystems unter physiologischen Bedingungen in der Retina (Yang et al. 2002).

Des Weiteren hat die Nutzung des Schweinmodells auch ethische Vorteile. Die benötigten Materialien wie Augen und Blut fallen bei einer normalen Schlachtung als Abfallprodukt an, sodass für die Forschung an ihnen keine gesonderten Tierversuche durchgeführt werden müssen.

Hinzukommend wurde bereits nachgewiesen, dass auch auf RPE-Zellen des Schweins TLR3 exprimiert wird (Klettner et al. 2013) und dass man auch im Schweinmodell ein Ortholog zum humanen CD163 gefunden hat. Dieses sogenannte 2A10 erlaubt die Unterscheidung verschiedener Monozytenuntergruppen, wobei auch hier CD163 (2A10) von den weiterentwickelten, makrophagenähnlichen Monozyten exprimiert wird (Chamorro et al. 2005).

Durch diese Gegebenheiten wurde das Schwein als optimales Versuchsmodell für folgende Experimente betrachtet.

2.8 Fragestellung und Zielsetzung

Monozyten stehen im Verdacht an einer Vielzahl von Pathophysiologien im Auge beteiligt zu sein. Sie spielen unter anderem eine Rolle bei der Entstehung der altersabhängigen Makuladegeneration, welche die häufigste Ursache für die Erblindung älterer Menschen in der industrialisierten Welt ist. Die Rolle der Monozyten bei der Entwicklung der AMD wird jedoch kontrovers diskutiert. Ihnen wird sowohl eine protektive als auch eine destruktive Wirkung vor allem in Bezug auf die Angiogenese zugeschrieben.

Ziel dieser Arbeit ist es, eine Methode zu etablieren, mit Hilfe derer man Monozyten in hoher Reinheit aus Schweineblut isolieren kann, um eine Untersuchung der Pathophysiologie der AMD in einem Schweinmodell zu ermöglichen.

Ein weiteres Ziel ist es, einen tieferen Einblick auf die Interaktion von Monozyten und RPE bei der Entstehung der AMD zu bekommen. Zum einen stellt sich die Frage, ob Monozyten verstärkt von TLR3-aktivierten RPE-Zellen zur Migration angeregt werden. Zum anderen, ob Monozyten, die mit TLR3-aktivierten RPE-Zellen kommunizieren, bestimmte Oberflächenmoleküle exprimieren, die eine Aussage über ihre Funktion im Rahmen der AMD zulassen. Hierbei interessiert vor allem die Expression des Fas Liganden und des Oberflächenmarkers CD163.

Dadurch können nicht nur grundlegende Erkenntnisse sondern auch mögliche therapeutische Ansätze zur Verhinderung einer AMD aufgezeigt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

<u>Gerät</u>	<u>Hersteller</u>
Brutschrank	Labotect Labortechnik, Göttingen
Durchflusszytometer (Cytomics FC 500)	Beckman Coulter Inc., Brea, USA
Eismaschine (Scotsman AF80)	Enodis, Vernon Hills, USA
Migrationskammer (48-Well-chemotaxis chamber)	NeuroProbe Inc., Gaithersburg, USA
Migrationskammer-Zellschaber (Wiper blade)	NeuroProbe Inc., Gaithersburg, USA
Mikroskop (Axiovert1000)	Carl Zeiss AG, Henningsdorf
Neubauer-Zählkammer	Superior Marienfeld, Lauda-Königshofen
Pipetten (Research®)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe, elektrisch (Pipetus®)	Hirschmann Laborgeräte GmbH, Eberstadt
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik, Hannover
Zellkulturwerkbank (Antair BSK)	A.Sternkopf GmbH, Lübeck
Zentrifuge (Sorvall ST40)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Zentrifuge (Centrifuge 5414)	Eppendorf AG, Hamburg

3.1.2 Software

<u>Software</u>	<u>Hersteller</u>
Durchflusszytometer-Software (CXP Cytomics 500 Analysis Software)	Beckman Coulter Inc., Brea, USA

3.1.3 Verbrauchsgegenstände

<u>Gegenstand</u>	<u>Hersteller</u>
Einweg Pipettenspitzen für elektrische Pipetierhilfe (<i>serological pipette</i>)	Th. Geyer, Hamburg
Falcons (<i>High-Clarity Propylene Conical Tube</i>)	BD Bioscience, Heidelberg
Filter zum Sterilfiltrieren (<i>Nalgene Syringe Filter 0,2 µm</i>)	Thermo FisherScientific, Dreieich
Injektionsspritzen zum Sterilfiltrieren	Braun Melsungen AG, Melsungen
Migrations-Filter (<i>5 µm pore polycarbon filter</i>)	NeuroProbe Inc., Gaithersburg, USA
Reagenzgefäße (Microtube 1,5 ml)	Sarstedt, Nürnberg
Saugpumpe (<i>Vacunsafe comfort</i>)	Integra Bioscience AG, Zizers, Schweiz
Zellkulturflaschen groß (<i>Cellstar</i>)	Greiner Bio-One GmbH, Ficklenhausen
Zellkulturflaschen klein (25 cm ² Wachstumsfläche)	TPP, Schwerin
Zellkulturschalen	Nunc A/S, Roskilde, Dänemark
Zellschaber	Sarstedt, Nürnberg

3.1.4 Chemikalien

<u>Chemikalie</u>	<u>Hersteller</u>
Amino Acids (<i>MEM Non Essential Amino Acids 100x</i>)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Aqua bidest (Ampuva® Spüllösung)	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Betaisodonalösung	Mundipharma GmbH, Limburg (Lahn)
Biocoll Lösung (<i>Separating Solution</i>)	Biochrom Ag, Berlin
BSA (<i>Albumin from Bovine Serum</i>)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
EDTA Pulver	Sigma- Aldrich Chemie

(<i>Tetrasodium salt hydrate, practicalgrade, approx. 95 %</i>)	GmbH, Steinheim
Glyceringelatine (Kaisers)	Merck KGaA, Darmstadt
Hämalaunlösung (Mayer's)	Merck KGaA, Darmstadt
HEPES (2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperatiny]-ethansulfonat)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Methanol (Emsure)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchloridlösung (steril)	Fresenius Kabi, Bad Homburg
PBS (Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Penicillin/Streptomycin (10.000 µg/ml)	PAA Laboratories, Pasching Österreich
Poly I:C (<i>Polyinosinic : polycytidylic Acid</i>)	Calbiochem EMD Chemicals, San Diego, USA
Sodium-Pyruvat	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Trypanblau	Biochrom AG, Berlin
Trypsin	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Trypsin-EDTA	PAA Laboratories, Pasching, Österreich

3.1.5 Medium und Serum

<u>Medium/Serum</u>	<u>Hersteller</u>
DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium, High Glucose 4,5 g/l</i>)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
FCS (auch BSF, Fetales Kälber Serum)	Linaris GmbH, Wertheim-Bettingen
Monozytenmedium (RPMI 1640 + 1% Penicillin/Streptomycin + 10 % FCS)	Siehe jeweilige Chemikalie
<i>Porcine Serum</i>	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
RPMI 1640	PAA Laboratories, Pasching, Österr.

3.1.6 Antikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
CD14	MY4-FITC	Beckman Coulter Inc., Brea, USA
-Negativkontrolle CD14-	MslgG2b-FITC	Beckman Coulter Inc., Brea, USA
FasLigand (<i>Monoclonal Antibody to CD178/FasLigand – PE</i>)	SM2269RF	Acris Antibodies GmbH, Herford
CD163 (2A10)	MCA2311PE	AbD SeroTec, Oxford, GB
-Negativkontrolle FasL und CD163 - <i>Mouse IgG1Negative Control : R-PE</i>	MCA928PE	AbD SeroTec, Oxford, GB

3.2 Methoden

In diesem Projekt wurde der Einfluss des Retinalen Pigmentepithels auf Migration und Phänotyp von Monozyten im Schwein untersucht. Im ersten Teil der Arbeit wurde zunächst eine Methode etabliert, mit der man Monozyten mit hohem Reinheitsgrad aus Schweineblut gewinnen kann. Im zweiten Teil der Arbeit wurden die Monozyten mit dem Überstand des Retinalen Pigmentepithels behandelt, welches zuvor aus Schweineaugen präpariert und mit unterschiedlichen Konzentrationen eines TLR-3-Agonisten aktiviert wurde. Anschließend wurde das Migrationsverhalten der Monozyten mit einer Boyden-Kammer untersucht und die Expression zweier Oberflächenmoleküle mit Hilfe eines Durchflusszytometers gemessen.

3.2.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können Zellen bezüglich ihrer Größe, Granularität und ihres Fluoreszenzverhaltens untersucht werden. Dafür passieren die Zellen in hoher Geschwindigkeit eine nach der anderen einen speziellen Kanal. In diesem Kanal treffen sie auf einen Laserstrahl. Die Emissionen, die sie dabei erzeugen, werden von einer optischen Einheit registriert. Die Lichtstreuung in Vorwärtsrichtung (*Forward Scatter* = FSC) gibt Aufschluss über die Größe bzw. das Volumen der Zelle. Die Lichtstreuung im rechten Winkel (*Side Scatter* = SSC) gibt Aufschluss über

die Granularität der Zelle. Dadurch können einzelne Zellpopulationen gut voneinander abgegrenzt werden. Neben dieser Lichtstreuung werden durch den Laser auch Fluoreszenzen angeregt, die in unterschiedlichen Wellenlängenbereichen ermittelt werden. Daher kann eine vorherige Kopplung an fluoreszierende Antikörper genutzt werden, um z.B. bestimmte Oberflächenmarker wie CD14 auf den Zellen nachzuweisen. Optische Einheiten nehmen die Lichtimpulse wahr und leiten sie an einen Signalwandler weiter, welcher mit einem Computer verbunden ist (Rothe 2007); (siehe Abbildung 3). Die Versuchsdurchführung wird im Kapitel 3.2.3 erläutert.

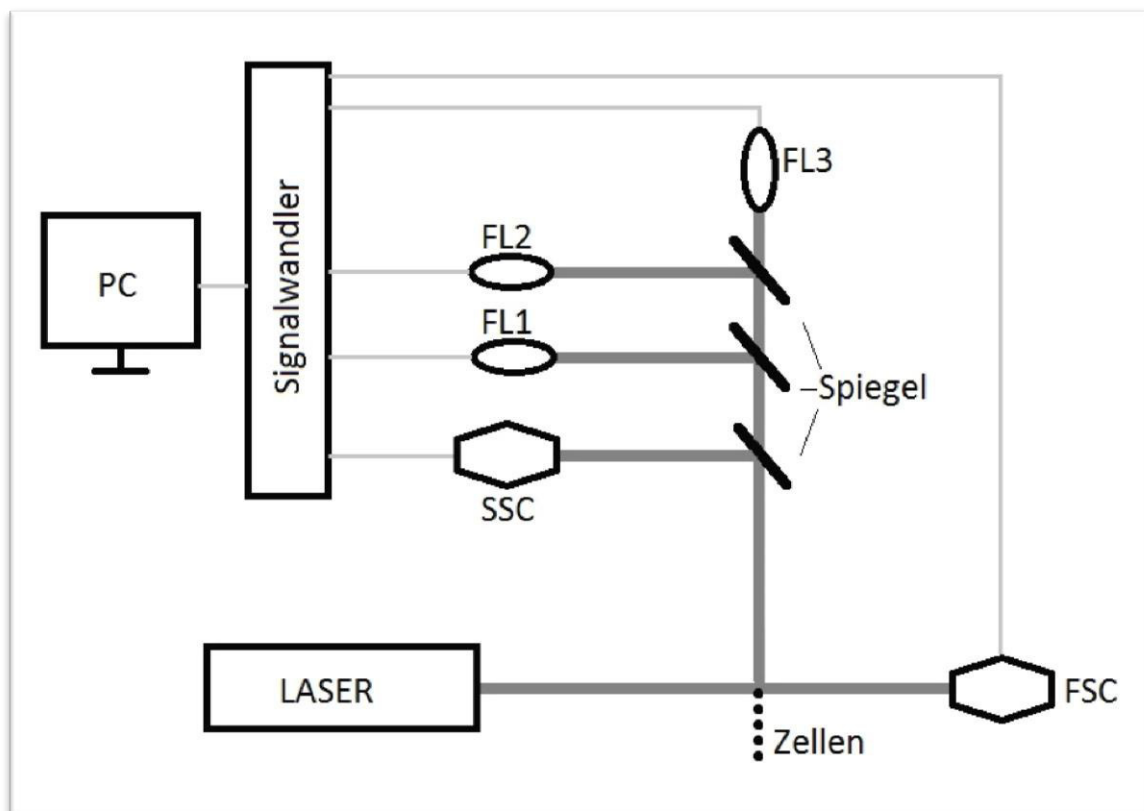


Abbildung 3. Stark vereinfachte Darstellung der Durchflusszytometrie. Die Zellen treffen auf einen Laserstrahl. Die dabei entstehende Lichtstreuung in Vorwärtsrichtung (FSC = Forward Scatter) und Seitwärtsrichtung (SSC = Side Scatter) wird registriert. Außerdem können Fluoreszenzen unterschiedlicher Wellenlänge (FL1 – 3) erkannt werden. PC = Computer.

3.2.2 Etablierung der Monozytenpräparation aus Schweineblut

3.2.2.1 Herausforderungen bei der Etablierung

Es gibt viele Veröffentlichungen über die Präparation von humanen Monozyten (Wahl et al. 2006); (Leb et al. 1983), aber man findet in der Literatur nur wenige Daten, wie man eine möglichst reine Monozytenkultur aus Schweineblut isolieren kann. Es ist

nicht sicher, ob man die Methoden im Detail vom menschlichen Modell übernehmen kann. Außerdem werden bei humanen Monozyten häufig teure und sehr spezielle Verfahren wie *magnetic antibody cell sorting* (Carrillo et al. 1994) oder auch Elutriationszentrifugen (Malefyt et al. 1991) benötigt, welche für dieses Projekt jedoch nicht zur Verfügung standen. Daher musste zunächst ein zuverlässiges Verfahren zur Isolierung von Schweinemonozyten im Rahmen der vorhandenen Möglichkeiten etabliert werden.

3.2.2.2 Dichtegradientenzentrifugation

In vielen Veröffentlichungen werden die Blutzellen zunächst mit einer Dichtegradientenzentrifugation voneinander separiert. Dafür schichtet man Blut über eine Trennflüssigkeit wie z. B. Biocoll. Durch eine Zentrifugation trennen sich die Zellen entlang des Dichtegradienten auf. So sammeln sich die peripheren mononukleären Zellen, die aus Monozyten und Lymphozyten bestehen, in einem Interphasenring und können separat entnommen werden (siehe Abbildung 4); (Methode im Detail siehe Kapitel 3.2.2.5).

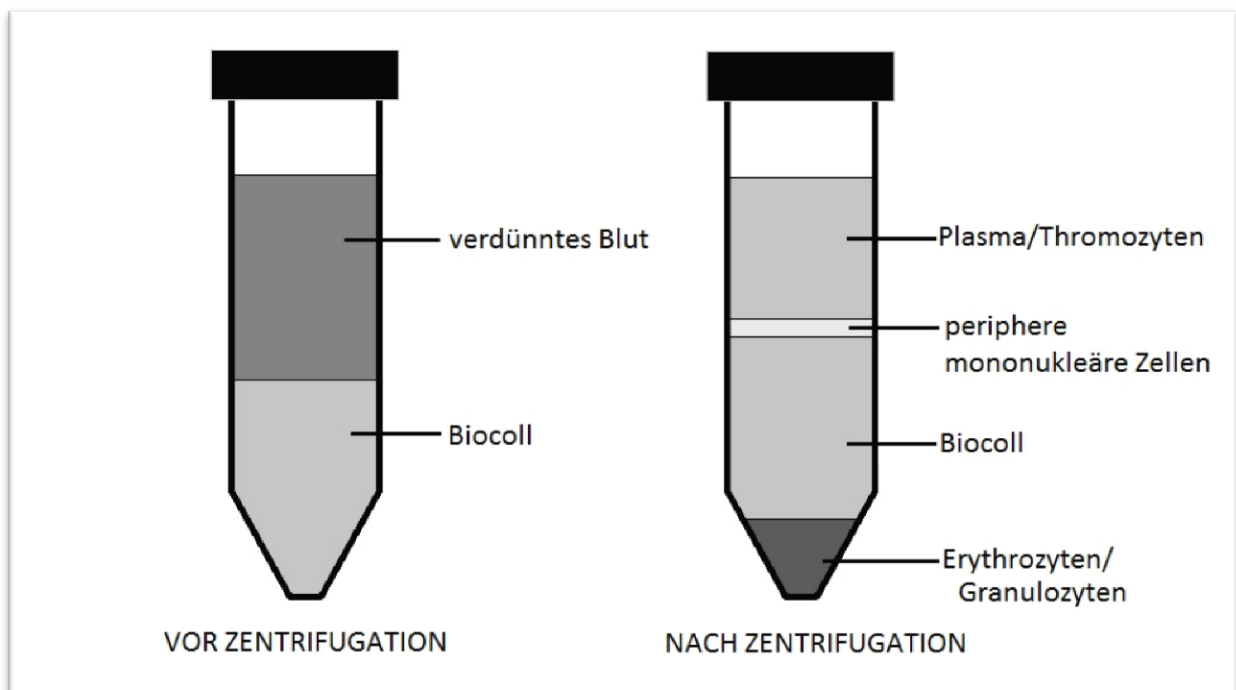


Abbildung 4. Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation. Nach der Zentrifugation sammeln sich die peripheren mononukleären Zellen (Monozyten und Lymphozyten) in einem Interphasenring.

3.2.2.3 Vorversuche zur Trennung von Monozyten und Lymphozyten

Um eine möglichst reine Monozytenkultur herzustellen, musste zunächst ein Weg gefunden werden, um nach der Dichtegradientenzentrifugation die Monozyten von den Lymphozyten zu trennen. Die Lymphozyten setzen sich zusammen aus B-Lymphozyten, T-Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Zunächst wurde gemessen, wie hoch der Anteil der Monozyten nach der Dichtegradientenzentrifugation ist, um einen Ausgangswert zu bekommen. Dazu wurde die Durchflusszytometrie genutzt (siehe Kapitel 3.2.1 und Kapitel 3.2.3).

3.2.2.3.1 Variante A : Rosettierung mit Schafserythrozyten

Zunächst wurde eine Rosettierung mit Schafserythrozyten versucht, durch die man die T-Lymphozyten und NK-Zellen binden und somit entfernen kann. Die T-Lymphozyten und NK-Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche CD2, das mit CD58 auf Schafserythrozyten interagiert. So kommt es zu einer Bindung, bei der sich die T-Lymphozyten und NK-Zellen wie Rosetten um die Schafserythrozyten lagern. Diese Rosetten haben eine relativ große Dichte, wodurch sie mittels einer erneuten Dichtegradientenzentrifugation von den verbleibenden Monozyten und B-Lymphozyten getrennt werden konnten. Nutzt man bei diesem Prinzip Neuraminidase - behandelte Schafserythrozyten, kann die Interaktion der beiden Liganden erleichtert und so die Rosettenbildung noch verstärkt werden (Luttmann et al. 2014). Die verbliebenen Zellen wurden wieder im Durchflusszytometer gemessen.

3.2.2.3.2 Variante B: Teflon-beschichtete Zellkulturschalen

Im Weiteren wurde versucht die Monozyten von den Lymphozyten zu trennen, indem man sie für eine Stunde in Teflon-beschichteten Zellkulturschalen inkubierte. Diese Methode war bereits für humane Monozyten beschrieben (Shin 2000). Während der Inkubation der Zellen auf Teflon sollte es nur den Monozyten gelingen, am Teflon zu binden und alle weiteren Zellen sollten danach einfach abzuwaschen sein. Im weiteren Verlauf sollten die Monozyten dann durch eine Kältereaktion wieder vom Teflon gelöst werden können.

3.2.2.3.3 Variante C: Serum-vorbehandelte Zellkulturschalen

Bei dieser Variante wurde versucht die Monozyten von den Lymphozyten zu trennen, indem man das Gemisch für eine Stunde in Serum-vorbehandelten Zellkulturschalen inkubiert (nach Kumagai et al. 1979). Dabei sollten die Monozyten an den serum-

vorbehandelten Zellkulturschalen binden und die nicht adhärenen Zellen konnten abgewaschen werden. (Methode im Detail siehe Kapitel 3.2.2.5)

3.2.2.3.4 Variante C*: Optimierung der Vorbehandlung

Da Variante C die vielversprechendsten Ergebnisse lieferte, wurde sie in den Versuchen weiterverwendet und noch verbessert. Zunächst wurde versucht, die Vorbehandlung der Zellkulturflaschen zu optimieren. Die Flaschen wurden vor der Verwendung mit *Porcine Serum* für eine Stunde inkubiert. Danach musste das *Porcine Serum* entfernt werden und die Flasche wurde mit PBS gereinigt. Wenn für diese Reinigung das PBS nur sehr kurz in der Flasche verblieben ist, konnte die Reinheit weiter gesteigert werden.

3.2.2.3.5 Variante C**: Verbesserung des Waschvorgangs

Im Weiteren wurde das Abwaschen der Lymphozyten verbessert. Nachdem die Zellen im Brutschrank in den serum-beschichteten Zellkulturschalen inkubiert wurden, mussten die nicht adhärenen Lymphozyten abgespült werden. Indem wir die Spülvorgänge dafür optimierten, konnten wir die Reinheit nochmals verbessern. Zu dieser Optimierung zählte, dass mindestens 4 Mal gespült wurde, dass mit warmem Medium gespült wurde, dass während des Spülvorgangs seitlich geklopft wurde und dass am Ende mikroskopisch beurteilt wurde, ob sich noch weitere Zellen lösen und bei Bedarf die Spülung weiter fortgeführt wurde (Methode im Detail siehe Kapitel 3.2.2.5).

Während der Etablierungsversuche sind außerdem noch einige Details aufgefallen, die wesentlich zur guten Reinheit und zum ausreichenden Ertrag beigetragen haben. Zum einen ist die anfängliche Antikoagulation des Schweineblutes mit EDTA sehr wichtig. Im Vergleich zu Citrat und Heparin konnten mit EDTA die besten Ergebnisse erzielt werden. Außerdem sollte das Blut möglichst frisch und natürlich nur von einem Tier sein. Wenn das Blut innerhalb der ersten zwei Stunden nach der Gewinnung weiterverarbeitet wurde, konnten die besten Ergebnisse erzielt werden. Eine weitere wichtige Erkenntnis war, dass man das Material stets kühlen sollte, wenn eine Bindung der Monozyten unerwünscht war. So konnte der Ertrag deutlich gesteigert werden.

3.2.2.4 Vorversuche zur Monozytenablösung

Eine weitere Herausforderung stellte die erneute Ablösung der Monozyten von den Zellkulturflaschen dar. Diese war für die Bestimmung der Reinheit und für die weiteren Versuche allerdings erforderlich.

Dafür wurden mehrere Verfahren zum Ablösen der Zellen ausprobiert. Eine Ablösung mit EDTA, Trypsin EDTA oder einem Zellschaber verursachte eine zu geringe Vitalität der Zellen, weshalb diese Verfahren ausgeschlossen wurden.

Im Weiteren wurde die Ablösung der Monozyten mit Kälte versucht (Nielsen 1987); (Leb et al. 1983). Indem man sie eine Stunde auf Eis lagerte, konnten die Monozyten gelöst werden und zeigten bezüglich der Vitalität gute Ergebnisse. Allerdings konnten nach der Ablösung immer noch sehr viele Monozyten in der Zellkulturflasche mittels Mikroskop gesehen werden, weshalb die Methode noch optimiert wurde. Zum einen wurde die Kühlung intensiviert, indem die Flaschen auch von oben mit Eis bedeckt wurden und zum anderen konnte die Ablösung durch starkes Klopfen auf einen harten Untergrund deutlich verbessert werden.

3.2.2.5 Detaillierte Darstellung der etablierten Monozytenpräparation

Es wurden 150 - 200 ml Blut direkt nach der Schlachtung eines Schweins in einer EDTA-Lösung aus 0,4 g EDTA Pulver und 40 ml PBS (phosphatgepufferte Salzlösung) aufgefangen und kurz geschwenkt. Anschließend wurde das Blut innerhalb der nächsten 2 Stunden weiterverarbeitet, dazu wurde unter möglichst keimfreien Bedingungen unter einer Zellkulturwerkbank gearbeitet. Das Blut wurde zunächst 1 zu 1 mit PBS verdünnt. Je 30 ml von dem entstandenen Gemisch wurden in 50 ml-Falkons über je 20 ml Biocoll geschichtet. Dabei wurde sehr darauf geachtet, dass sich die beiden Phasen nicht vermischten. Anschließend wurden die Falkons mit 600 g für 20 min ohne Bremse zentrifugiert, sodass sich die peripheren mononukleären Zellen in einem Interphasenring sammelten (nach Böyum 1968, mit Abwandlungen). Durch leichtes und langsames Schwenken konnten die festsitzenden Bereiche des Interphasenringes von der Falconwand gelöst werden. Nun wurde der gesamte Interphasenring abpipettiert und in kaltem (ca. 5 °C) Monozytenmedium aufgefangen. Die gewonnenen Zellen wurden nun gereinigt, indem sie dreifach in kaltem (ca. 5 °C) PBS bei 200 g zentrifugiert wurden, zunächst einmal für 10 min und dann zweimal für je 5 min. Zwischen den einzelnen

Zentrifugationen wurde jeweils der Überstand komplett abgesaugt und danach wurden die Zellen wieder in neuem kaltem PBS resuspendiert. Nach dieser Reinigung wurde der Überstand komplett abgesaugt und die Zellen in 60 ml 21 °C warmem Monozytenmedium mit 0,1% BSA (*Bovines Serum Albumin*) resuspendiert und dann direkt auf 4 speziell vorbereitete Cellstar-Zellkulturflaschen aufgeteilt. Für die Vorbereitung mussten diese Zellkulturflaschen vorher mindestens eine Stunde mit je 10 ml *Porcine Serum* im Brutschrank bei 37 °C stehen. Danach wurde das *Porcine Serum* entfernt und die Flaschen einmal nur ganz kurz und vorsichtig mit PBS gespült. Dann wurden sie zeitnah, wie oben beschrieben, mit den Zellen befüllt. Diese Vorbereitung ermöglichte den Monozyten eine schnelle und feste Bindung an die Zellkulturflaschen (nach Kumagai et al. 1979, mit Abwandlungen). Anschließend wurden die mit den Zellen befüllten Flaschen für eine Stunde bei 37 °C in den Brutschrank gestellt. Danach wurden die Flaschen gut geschwenkt und das Medium abgesaugt und verworfen. Erneut wurde je 10 ml warmes (ca. 37 °C) Monozytenmedium in die Zellkulturflaschen gefüllt. Im Anschluss wurden die Flaschen wieder gut geschwenkt und mit der Seite gegen einen festen Gegenstand geklopft (nach Freundlich & Avdalovic 1983, mit Abwandlungen), um danach das Medium wieder abzusaugen und zu verwerfen. Dieser Waschvorgang wurde mindestens 4 Mal wiederholt. So lösten sich die nicht festsitzenden Zellen und nur die am Boden haftenden Monozyten verblieben in der Zellkulturflasche. Nach dem letzten Waschgang wurde unter dem Mikroskop beurteilt, ob sich beim Schwenken noch weitere Zellen lösten. Wenn dies der Fall war, wurde der Waschgang noch ein weiteres Mal wiederholt. Die so gewonnene Monozytenkultur wurde mit je 15 ml Monozytenmedium bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Nach 20 bis 24 Stunden mussten die Monozyten zur Bestimmung der Reinheit und Zellzahl vom Boden der Zellkulturflaschen gelöst werden. Dies gelang, indem die Zellkulturflaschen aus dem Brutschrank genommen und eine Stunde auf Eis gelagert wurden. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Flaschen auch von oben gut mit Eis bedeckt waren und der Deckel fest verschlossen war. Durch die Kälte konnten sich die Monozyten vom Boden der Zellkulturflasche lösen (Nielsen 1987); (Leb et al. 1983). Um diesen Vorgang noch zu unterstützen, wurden die Flaschen, nachdem sie aus dem Eis kamen, mit der Unterseite fest auf eine Arbeitsplatte geklopft. Anschließend wurde mittels einer elektrischen Pipettierhilfe der Inhalt der

Zellkulturflaschen einige Male über den Boden gespült, um auch die letzten Zellen zu lösen. Das Medium mit den nun gelösten Monozyten wurde in vorgekühlten 15 ml-Falkons gesammelt, um anschließend für 8 min bei 200 g zentrifugiert zu werden. Der Überstand konnte nun abgesaugt werden und die Monozyten wurden in der gewünschten Menge PBS resuspendiert. Um eine unerwünschte Bindung der Monozyten an die Falkonwand zu verhindern, wurde darauf geachtet, dass die Falkons mit den Monozyten stets kühl blieben.

3.2.2.6 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt und durch eine Färbung mit Trypanblau die Vitalität der Zellen sichergestellt. Zum weiteren Nachweis der Vitalität, wurden einige Monozyten wieder in Zellkulturflaschen ausgesetzt und für mehrere Tage mit Monozytenmedium bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, wobei das Medium alle 2 Tage gewechselt wurde. Mit Hilfe einer Mikroskopkamera konnte so die weitere Entwicklung dokumentiert werden (siehe Ergebnisse Kapitel 4.1.3).

3.2.3 Bestimmung der Monozytenreinheit

Zur Bestimmung der Monozytenreinheit wurde mittels Durchflusszytometrie das Vorhandensein von CD14 auf der Zelloberfläche ermittelt. Dazu wurden in 2 Reagenzgefäßen je 2×10^5 Zellen in 100 µl PBS + 1 % BSA gelöst. In das eine Reagenzgefäß wurden 10 µl des CD14 Antikörpers MY4-FITC (Ziegler-Heitbrock et al. 1994) gegeben und in das andere Reagenzgefäß als Negativkontrolle 10 µl eines Antikörpers des gleichen Isotyps MslgG2b-FITC. Nachdem alles gut gemischt wurde, verblieben die Gefäße für 30 min bei Raumtemperatur und Dunkelheit in Ruhe. Anschließend wurde je 1 ml PBS + 1 % BSA dazu geben und die Zellen mit einer Zentrifuge für einige Sekunden runterzentrifugiert. Nachdem der Überstand vorsichtig abgesaugt wurde, wurden die Zellen erneut in 400 µl PBS + 1 % BSA gelöst. Diese Lösung wurde anschließend im Durchflusszytometer Cytomics FC 500 gemessen und der prozentuale Anteil CD14-positiver Zellen ermittelt. Dieser wurde mit der Monozytenreinheit gleichgesetzt.

3.2.4 Präparation der Zellen des Retinalen Pigmentepithels

Die Präparation des Retinalen Pigmentepithels wurde nach einer bereits bekannten und bewährten Methode durchgeführt (Klettner & Roider 2008); (Wiencke et al. 2003). Dazu wurden die Augen von frisch geschlachteten Schweinen verwendet und zunächst von Geweberesten und Muskeln befreit. Anschließend wurden sie für 3 min in einer Betaisodonalösung desinfiziert und danach in sterile Natriumchloridlösung gelegt. Der vordere Augenabschnitt wurde mit samt der Linse und des Glaskörpers entfernt. In den hinteren Augenabschnitt wurde warme PBS-Lösung gegeben und die Retina vorsichtig abpräpariert und verworfen. Jeder Augenbecher wurde nun für 5 min bei 37°C mit Trypsin inkubiert. Im nächsten Schritt wurde das Trypsin wieder entnommen und die Augenbecher wurden für 45 min bei 37 °C mit Trypsin-EDTA inkubiert, um die Zellen zu lösen. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig von der Choroidea pipettiert und in einem Zellkulturmedium gesammelt. Dieses Zellkulturmedium setzte sich zusammen aus *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), 25 mM 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperatiny]-ethansulfonat (HEPES), 1 % Penicillin/Streptomycin, 110 mg/ml Natrium Pyruvat und 10 % fötalem Kälberserum (*fetal calf serum* (FCS)). Anschließend folgten noch zwei Waschvorgänge. Dazu wurden die Zellen zwei Mal in ihrem Zellkulturmedium für 5 min bei 900 U/min zentrifugiert und anschließend in frischem Medium resuspendiert. Im letzten Schritt wurden die Zellen nun mit ihrem Zellkulturmedium in 60 mm Zellkulturschalen gegeben und bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert.

Bei den kultivierten RPE-Zellen wurde zwei Mal pro Woche das Medium erneuert und regelmäßig die Morphologie im Lichtmikroskop beobachtet. Bei erfolgreichem Wachstum konnten die Zellen weiter vermehrt werden. Dazu wurde zunächst das Zellkulturmedium abgenommen und die Zellen einmal mit warmer PBS-Lösung gespült. Im nächsten Schritt wurden die Zellen für 5 min bei 37 °C mit Trypsin-EDTA inkubiert, um sie zu lösen. Nachdem das Trypsin-EDTA entnommen wurde, konnte man die Zellen vorsichtig mit einem Zellschaber von den Zellkulturschalen lösen. Anschließend wurden die Zellen in PBS gewaschen, indem sie für 5 min bei 900 U/min zentrifugiert wurden. Im letzten Schritt wurden die RPE-Zellen in frischem Medium resuspendiert und in neue Zellkulturschalen ausgesetzt.

In diesem Projekt wurden für die Versuche RPE-Zellen der zweiten Passage verwendet. Diese Zellen zeigten die typische Pflasterstein-Morphologie und waren teilweise pigmentiert (siehe Abbildung 5).

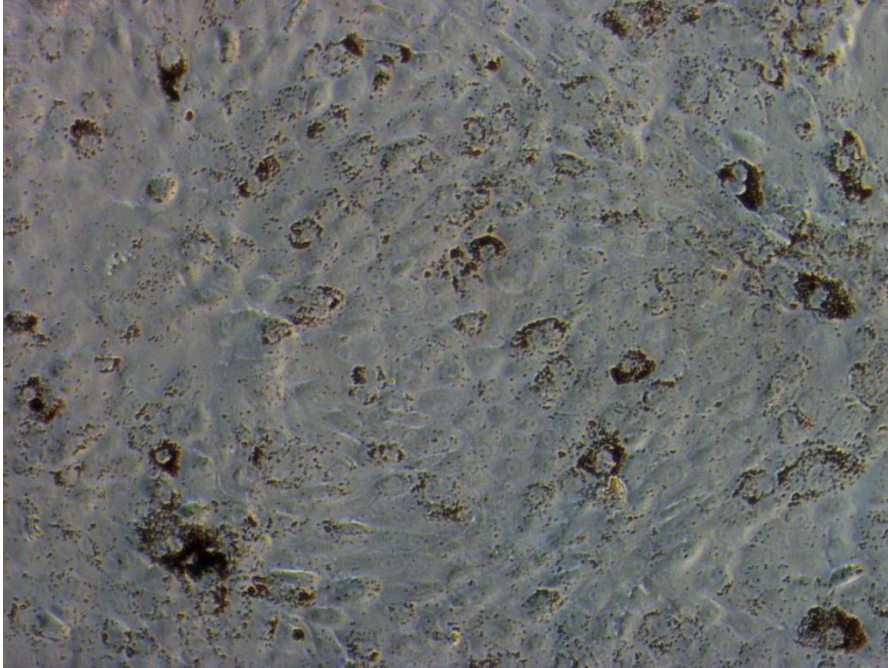


Abbildung 5. RPE-Zellen der zweiten Passage. Das Bild zeigt die typische pflastersteinartige Morphologie der Zellen. Eine Pigmentierung ist deutlich zu erkennen. Das Bild wurde mit 100 facher Vergrößerung durch ein Lichtmikroskop gemacht.

3.2.5 Aktivierung der RPE-Zellen durch Stimulation des TLR-3

Zur Herstellung der Stimulationslösung wurden RPE-Zellen der zweiten Passage für 24 h mit einem Versuchsmedium aus DMEM + 5 % *Amino Acids* + 5 % Penicillin/Streptomycin und Poly I:C (*polyinosinic : polycytidylic acid*) in unterschiedlichen Konzentrationen von 0 µg/ml, 1 µg/ml und 10 µg/ml bei 37 °C inkubiert. Als Negativkontrolle wurde das Versuchsmedium mit der entsprechenden Poly I:C-Konzentration zu gleichen Bedingungen inkubiert. Nach 24 h wurde das Medium abgenommen, steril filtriert und als Stimulationslösung weiter verwendet. Im Vorfeld wurde gezeigt, dass TLR3 auf RPE-Zellen des Schweins exprimiert wird und dass Poly I:C über den TLR3 eine Zytokinproduktion in den RPE-Zellen hervorruft (Klettner et al. 2013).

3.2.6 Untersuchung der Monozytenmigration mittels Boyden-Kammer

Zunächst wurde der untere Teil einer 48-Well-Migrationskammer (siehe Abbildung 6), auch Boyden-Kammer genannt, mit den vorher gewonnenen Stimulanzen der

aktivierten RPE-Zellen (siehe Kapitel 3.2.5) bestückt. Dazu wurden pro *Well* 28,5 μ l der jeweiligen Stimulationslösung blasenfrei pipettiert. Es wurden mit jeder Stimulationslösung je 6 *Wells* bestückt, um später einen Mittelwert aus diesen 6 Werten zu bilden (siehe Abbildung 7).

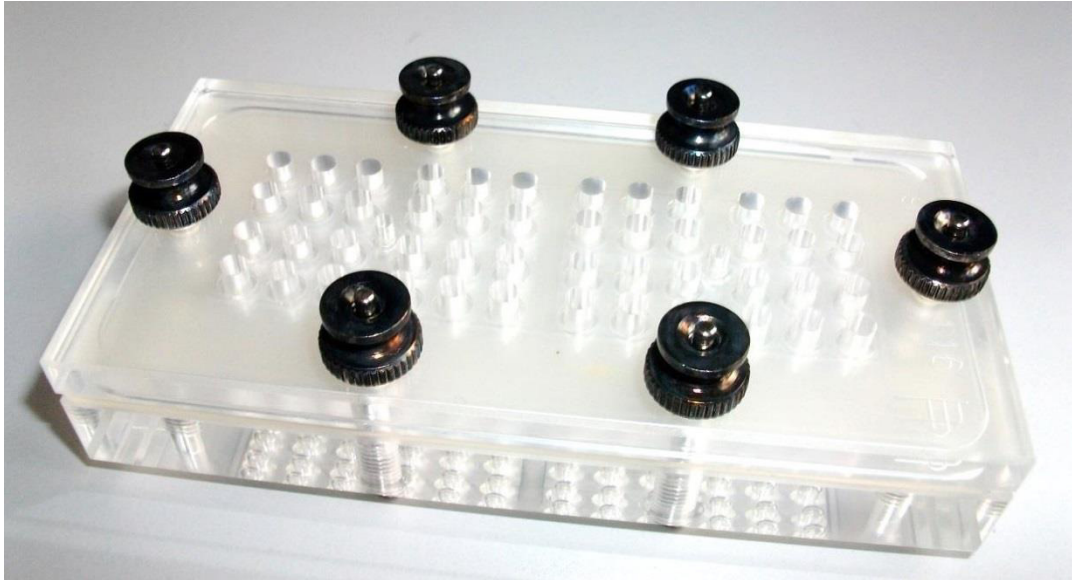


Abbildung 6. 48- Well- Migrationskammer von NeuroProbe.

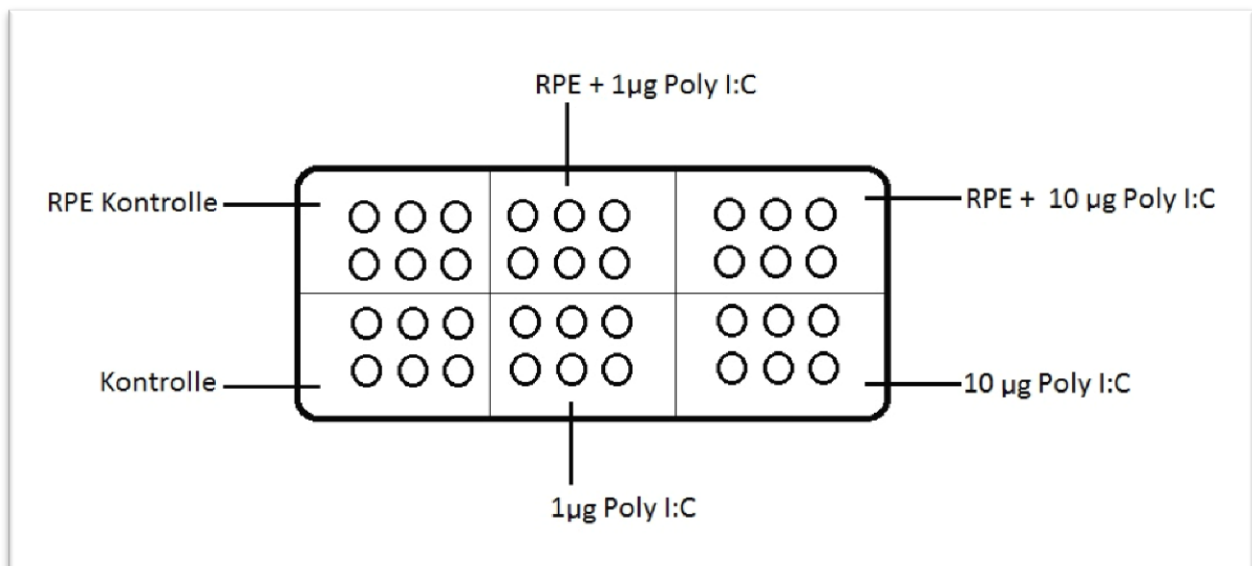


Abbildung 7. Versuchsaufbau Migrationskammer. Es wurden mit der jeweiligen Stimulationslösung je 6 *Wells* befüllt. Die eine Seite wurde mit den Stimulationslösungen der RPE-Zellen und die andere Seite mit den jeweiligen Negativkontrollen (Versuchsmedium + Poly I:C) befüllt. RPE Kontrolle = Überstand von RPE-Zellen, die nicht mit Poly I:C behandelt wurden. Kontrolle = reines Versuchsmedium.

Anschließend setzte man den Polycarbonat-Filter mit einer Porengröße von 5 μm vorsichtig auf die Stimulanzen und baute die Kammer vollständig zusammen. In alle oberen *Wells* wurden nun je 50 μl einer Monozytenlösung mit 2,5 Mio Monozyten/ml in einem Medium aus DMEM + 5 % *Amino Acids* + 5 % Penicillin/Streptomycin blasenfrei pipettiert. Dabei wurde sehr darauf geachtet, dass der Filter weder berührt noch durchstoßen wurde. Anschließend wurde die Kammer bei 37 °C für 20 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurde die Kammer wieder geöffnet und der Filter vorsichtig entnommen. Im Folgenden wurden dann die migrierten Monozyten, die auf der Unterseite des Filters gebunden hatten, dargestellt. Abbildung 8 zeigt schematisch den Migrationsversuch.

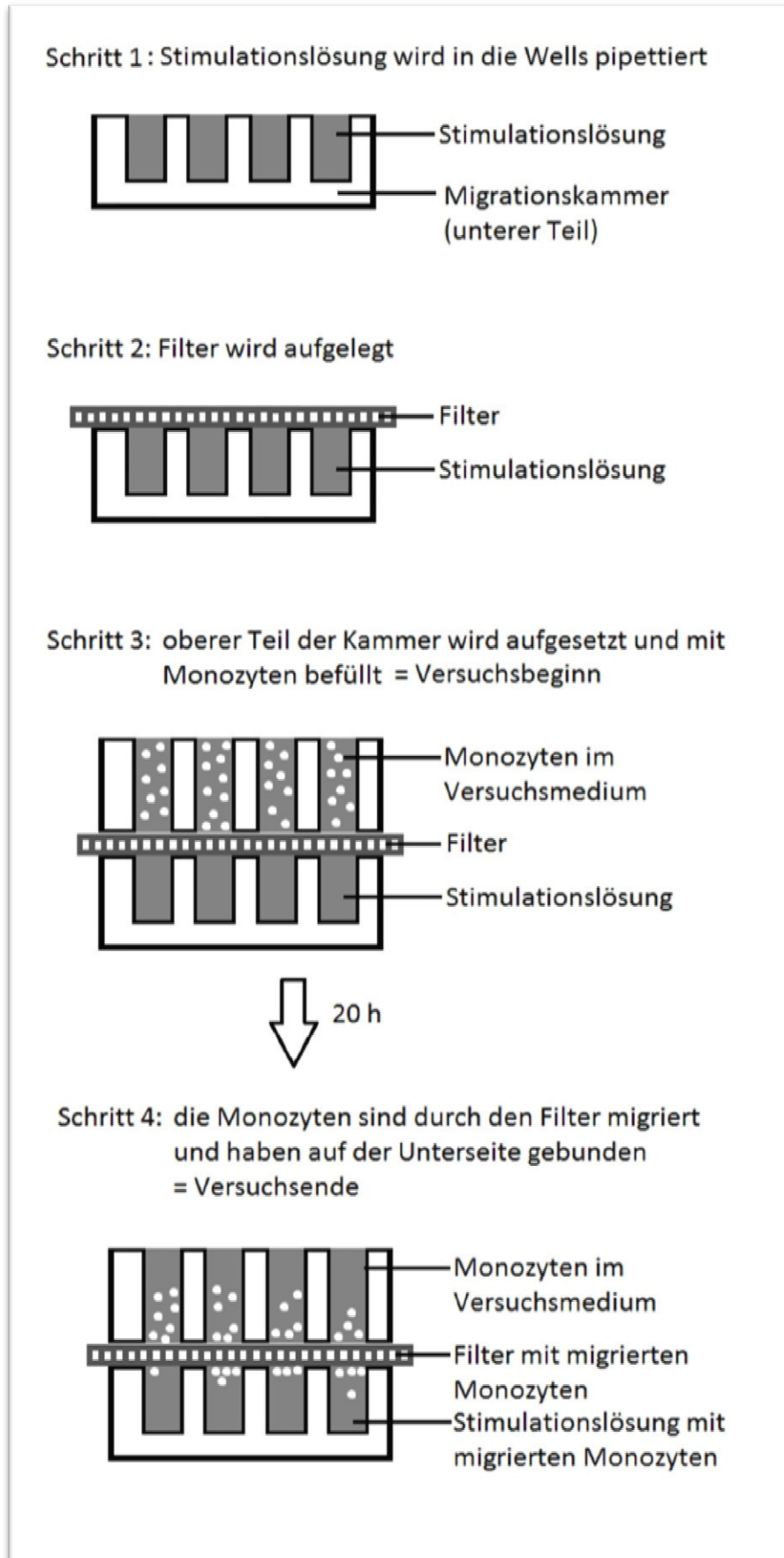


Abbildung 8. Vereinfachte Darstellung des Migrationsversuchs.

Um nur die Monozyten auf der Unterseite des Filters darstellen zu können, mussten die nicht migrierten Monozyten auf der Oberseite des Filters entfernt werden. Dazu wurde dieser mit der betroffenen Seite dreifach über einen speziellen Zellschaber gezogen und zwischendurch mit PBS benetzt. Anschließend wurden die migrierten Monozyten auf der Unterseite fixiert und gefärbt, indem der Filter zunächst für 10 min in Methanol und anschließend für 15 min in Hämalaunlösung eingetaucht wurde. Danach wurde er in Aqua dest. gespült und getrocknet. Der Filter wurde auf einen Objektträger gelegt und mit Hilfe von Glyceringelatine eingedeckelt. Anschließend wurde der Objektträger eingescannt und mit Hilfe des graphischen Programmes PCBAS2.0 die optische Dichte der einzelnen Migrationsbereiche bestimmt und miteinander verglichen. Dafür wurde für jedes *Well* die optische Dichte pro Fläche gemessen ($W1 - W6$). Um die teilweise unterschiedlich starke Grundfärbung des Filters insgesamt zu berücksichtigen, wurde jeweils die optische Dichte auch in einem Bereich des Hintergrunds H neben den *Wells* bestimmt und dann von den Werten der *Wells* subtrahiert (z.B. $W1 - H = W1^*$). Von den 6 Bereichen derselben Konzentration wurde der Mittelwert gebildet ($\bar{x}(W1^*-W6^*)$); (siehe Abbildung 9).

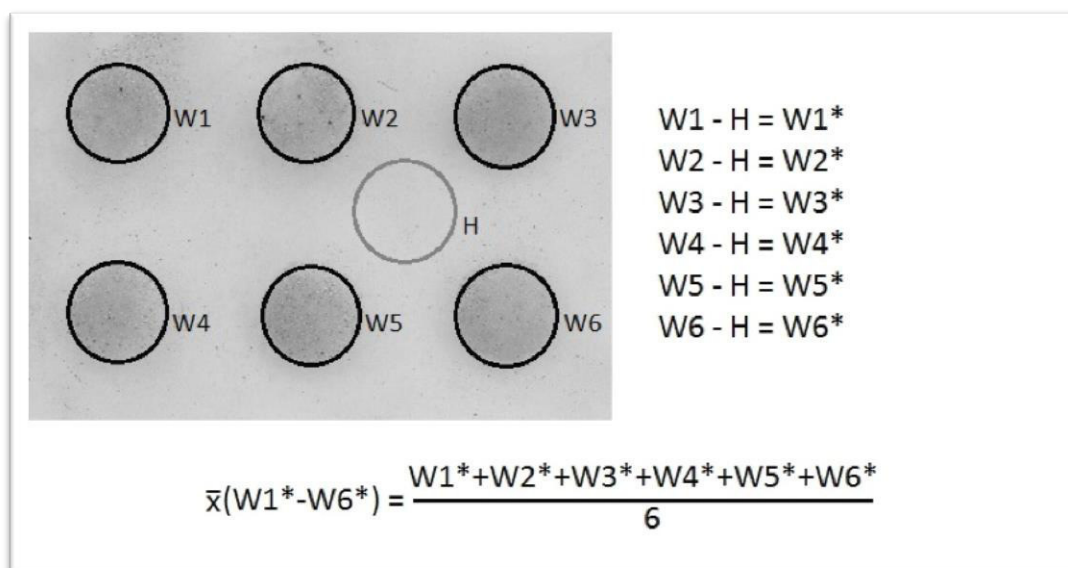


Abbildung 9. Auswertungsbeispiel und Rechenformel zum Migrationsversuch. Es wurde jeweils die optische Dichte pro Fläche gemessen. Um die unterschiedlich starke Grundfärbung des Filters zu berücksichtigen, wurde die optische Dichte vom Hintergrund H von den Werten der einzelnen Wells $W1 - W6$ subtrahiert. Anschließend wurde der Mittelwert \bar{x} aus den korrigierten Werten $W1^* - W6^*$ ermittelt.

3.2.7 Behandlung der Monozyten mit den Stimulanzen und anschließende Bestimmung von Oberflächenmolekülen mittels Durchflusszytometrie

Zur Bestimmung der Oberflächenmoleküle wurden die Monozyten zunächst in kleinen Zellkulturflaschen mit mind. 1 Mio Zellen pro Flasche und 5 ml Monozytenmedium für 24 h inkubiert. So konnten die Monozyten am Boden der Flasche binden. Anschließend wurde das Monozytenmedium abgesaugt und die zuvor gewonnene Stimulationslösung der RPE-Zellen (siehe Kapitel 3.2.5) auf die Monozyten gegeben (siehe Tabelle 1). So wurden die Zellen für 4 Tage inkubiert.

Monozytenzellkulturflasche	Hinzugefügte Stimulationslösung aus
Nr. 1	RPE-Überstand, unstimuliert
Nr. 2	Negativkontrolle: reines Versuchsmedium
Nr. 3	RPE-Überstand mit 1 µg Poly I:C
Nr. 4	Negativkontrolle: Versuchsmedium mit 1 µg Poly I:C
Nr. 5	RPE-Überstand mit 10 µg Poly I:C
Nr. 6	Negativkontrolle: Versuchsmedium mit 10 µg Poly I:C

Tabelle 1. Versuchsaufbau Monozytenkultivierung mit unterschiedlichen Stimulationslösungen.

Anschließend mussten die Monozyten erneut vom Boden der Zellkulturflaschen gelöst werden. Dazu wurden sie direkt aus dem Brutschrank 1 h auf Eis gelagert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Flaschen auch von oben gut mit Eis bedeckt waren und der Deckel fest verschlossen war. Nachdem die Flaschen aus dem Eis kamen, wurden sie mit der Unterseite fest auf eine Arbeitsplatte geklopft. Anschließend wurde mittels einer elektrischen Pipettierhilfe der Inhalt der Zellkulturflaschen einige Male über den Boden gespült, um alle Zellen zu lösen. Das Medium mit den nun gelösten Monozyten wurde in vorgekühlten 15 ml-Falkons gesammelt und anschließend für 8 min bei 200 g zentrifugiert. Der Überstand konnte anschließend abgesaugt werden und die Monozyten wurden in Reagenzgefäßen mit je 100 µl PBS + 1% BSA verteilt.

Zur Bestimmung der Oberflächenmoleküle FasL und CD163 (2A10) wurden die Monozyten mit den entsprechenden Antikörpern oder Isotypkontrollen gefärbt (siehe Tabelle 2).

Antikörper	Passende Isotyp(Negativ)kontrolle
Fas Ligand – PE (IgG1)	<i>Mouse IgG1Negative Control – R-PE</i>
CD163(2A10) – PE (IgG1)	<i>Mouse IgG1Negative Control – R-PE</i>

Tabelle 2. Verwendete Antikörper mit dazu passender Isotypkontrolle.

Nachdem die Monozyten mit den Antikörpern gut gemischt wurden, verblieben die Gefäße für 30 min bei Raumtemperatur und Dunkelheit in Ruhe. Anschließend wurde je 1 ml PBS + 1 % BSA dazu geben und die Zellen mit einer Zentrifuge für einige Sekunden abzentrifugiert. Nachdem der Überstand vorsichtig abgesaugt wurde, wurden die Zellen erneut in 400 µl PBS + 1 % BSA gelöst. Diese Lösung wurde anschließend im Durchflusszytometer Cytomics FC 500 gemessen (siehe Kapitel 3.2.1).

3.2.8 Statistische Auswertung der gemessenen Daten

Zur Etablierung des Verfahrens der Monozytenisolierung wurde dieses Verfahren insgesamt 33 Mal durchgeführt, um die durchschnittliche Reinheit der Monozyten zu berechnen. Die in den Experimenten aktivierten Monozyten, deren Migrationsverhalten und Phänotyp gemessen wurde, entsprachen alle einer ähnlichen Reinheit. Alle Versuche wurden drei bis fünf Mal wiederholt. Die Signifikanz wurde mit dem T-Test für unabhängige Stichproben erhoben. Ein P-Wert von 0,05 oder weniger wurde für das Signifikanzniveau festgelegt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel. In den dargestellten Graphen sind Mittelwerte und Standardabweichungen angezeigt.

4 Ergebnisse

4.1 Monozytenpräparation

4.1.1 Ergebnisse der Vorversuche zur Monozytenpräparation

4.1.1.1 Vorversuche zur Monozytenisolierung

Das Gemisch aus Monozyten und Lymphozyten nach der Dichtegradientenzentrifugation (Ausgangswert) zeigte einen Monozytenanteil (CD14-positive Zellen) von unter 35 % im Durchflusszytometer. In der Variante A wurden die T-Lymphozyten und NK-Zellen mittels einer Rosettierung mit Schafserythrozyten entfernt. Die verbliebenen Zellen wurden im Durchflusszytometer gemessen. Dabei konnte man noch wie erwartet zwei unterschiedliche Zellpopulationen erkennen. Der Anteil der CD14-positiven Monozyten lag unter 45 % und war damit noch nicht zufriedenstellend. Variante B stellte die Inkubation in Teflonschalen dar. Mit dieser Methode konnte bei unseren Schweinemonozyten nur eine Reinheit von unter 50 % erzielt werden, wobei der Ertrag der Zellen sehr gering war. Unter dem Lichtmikroskop konnte beobachtet werden, dass die Monozyten nur in geringer Zahl am Teflon gebunden hatten. Daher wurde auch diese Methode nicht weiter verfolgt. Mit Variante C, die die Inkubation in serum-behandelten Schalen beinhaltete, wurde anfangs eine Monozytenreinheit von knapp unter 70 % erzielt. Da dies die besten Ergebnisse bisher waren, wurde diese Methode weiter verwendet und modifiziert. In Variante C* wurde die Serumvorbehandlung optimiert und es wurden Monozytenreinheiten zwischen 70 und 80 % erzielt. Mit Variante C** konnten durch Optimierung der Lymphozytenabspülung Monozytenreinheiten von über 86 % erreicht werden (siehe Tabelle 3).

<u>Variante</u>	<u>Methode</u>	<u>Monozytenreinheit in %</u>
Ausgangswert	Dichtegradientenzentrifugation	< 35
A	Dichtegradientenzentrifugation und Rosettierung mit Schafserythrozyten mit anschließender erneuter Dichtegradientenzentrifugation	< 45
B	Dichtegradientenzentrifugation und Inkubation für 1 h in Teflonschalen bei 37 °C	< 50
C	Dichtegradientenzentrifugation und Inkubation für 1 h in serum-behandelten Schalen bei 37 °C	< 70
C*	Wie C, mit sehr kurzem und vorsichtigem Spülen mit PBS nach der Serumvorbehandlung der Schalen	70 - 80
C**	Wie C*, mit Begutachtung unterm Mikroskop und anschließend evtl. weiterem Abspülen der Lymphozyten	> 86

Tabelle 3. Vorversuche zur Monozytenisolierung. Die Tabelle fasst die unterschiedlichen Methoden zusammen, mit denen versucht wurde, Monozyten aus Schweineblut zu isolieren. Die Spalte Monozytenreinheit in % gibt den prozentualen Anteil der Zellen wieder, die im Durchflusszytometer eine CD14 Expression zeigten.

4.1.1.2 Vorversuche zur Monozytenablösung

Für die Loslösung der Monozyten von der Zellkulturflasche wurden mehrere Verfahren getestet. Eine Ablösung mit EDTA, Trypsin EDTA oder einem Zellschaber verursachte eine zu geringe Vitalität der Zellen, weshalb diese Verfahren ausgeschlossen wurden.

Mittels einer Lagerung für eine Stunde auf Eis konnten viele Monozyten gelöst werden, ohne dabei abzusterben. Wurde diese Kühlung noch intensiviert und die Ablösung durch starkes Klopfen auf einen harten Untergrund unterstützt, konnte der

größte Teil der Zellen gelöst werden und zeigte bezüglich der Vitalität gute Ergebnisse.

<u>Ablösung durch</u>	<u>Probleme</u>
Trypsin EDTA	Vitalität ↓
EDTA	Zu geringe Ablösung, Vitalität ↓
Zellschaber	Vitalität ↓
Lagerung für 1 h auf Eis	Zu geringe Ablösung
Lagerung für 1 h auf Eis + Klopfen	-

Tabelle 4. Vorversuche zur Monozytenablösung. Die Tabelle zeigt zusammenfassend welche Methoden zur Ablösung der Monozyten aus den Zellkulturflaschen getestet wurden und die jeweiligen Probleme der Methode. Die Lagerung der Monozyten für eine Stunde auf Eis mit anschließendem Klopfen der Flaschen erzielte die besten Ergebnisse.

4.1.2 Monozytenreinheit und Zellzahl mit etablierter Methode

Die Monozytenreinheit wurde durch die Bestimmung von CD14 auf der Zelloberfläche der präparierten Zellen ermittelt. Es wurde eine mittlere Reinheit von $92,63 \pm 3,06$ % in 33 Präparationen erzielt. Abbildung 10 zeigt ein stellvertretendes Beispiel. Aus 125 ml Schweineblut konnten im Mittel $15 \pm 5,79$ Mio Zellen gewonnen werden. Die etablierte Methode eignete sich daher sehr gut, um eine Monozytenkultur herzustellen.

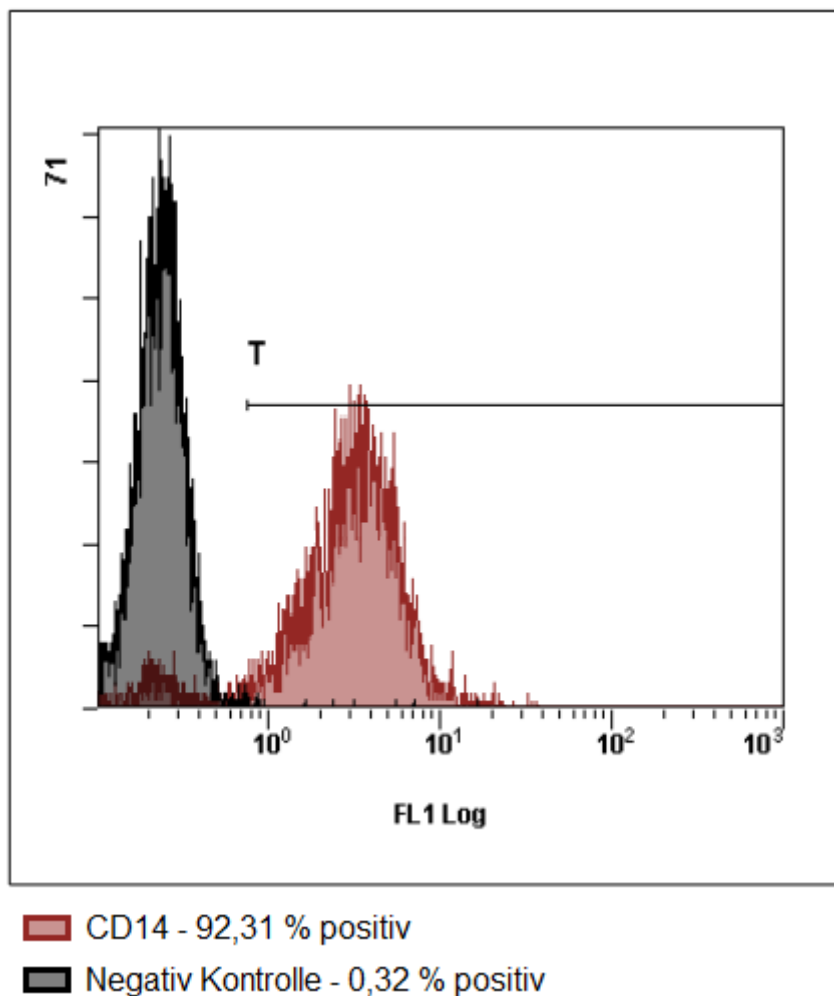


Abbildung 10. CD14 Expression. Frisch präparierte Monozyten wurden mittels Durchflusszytometrie auf ihre CD14 Expression untersucht. Die Abbildung zeigt ein stellvertretendes Beispiel. Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit einer IgG2b-Isotypkontrolle gemessen. Die X-Achse gibt hier die logarithmisch dargestellte Fluoreszenzintensität wieder, die Y-Achse zeigt die Zellzahl. Der Balken T gibt den Anteil positiver Zellen wieder. Aus der Publikation (Hettich et al. 2014).

4.1.3 Monozytenvitalität

Die Vitalität der isolierten Monozyten wurde mittels einer Färbung mit Trypanblau gemessen und lag stets bei über 95 %. Eine gute Weiterentwicklung der Monozyten konnte mit Hilfe eines Lichtmikroskops beobachtet werden (siehe Abbildung 11).

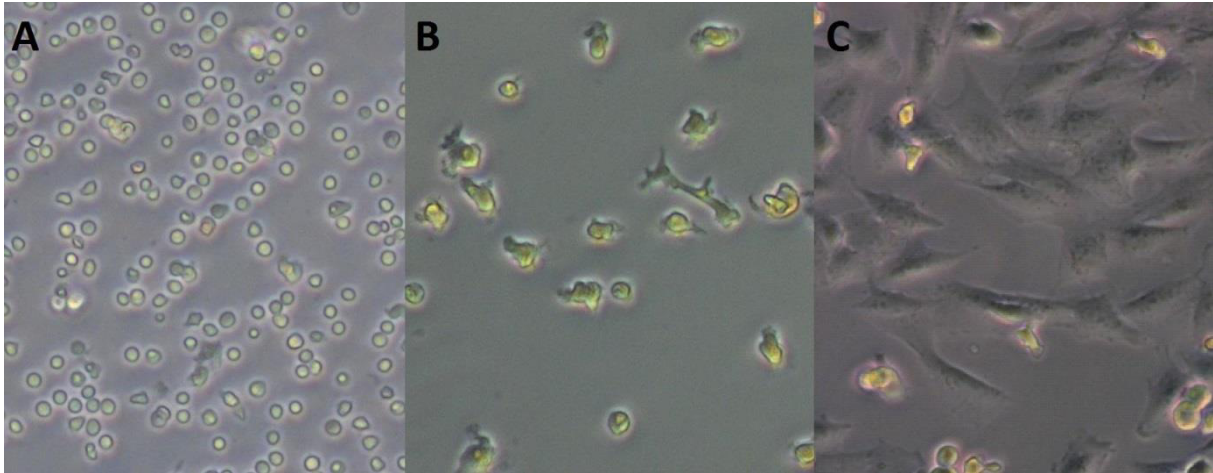


Abbildung 11. Kultivierte Monozyten an A Tag 1, B Tag 3 und C Tag 8. Die Fotos wurden durch ein Lichtmikroskop mit 100 facher Vergrößerung gemacht und dokumentieren die Weiterentwicklung der Monozyten. Die Zellen werden größer und bilden weite und flache Zellausläufer, wie man sie von Makrophagen oder dendritischen Zellen kennt. Man kann daraus auf eine gute Weiterentwicklung und Vitalität der Zellen schließen. Aus der Publikation (Berg et al. 2013), mit Abwandlungen.

4.2 CD163 Expression

Auf frisch isolierten Monozyten konnte eine Expression von CD163 zwischen 20 und 50 % gemessen werden (Daten sind nicht in der Graphik enthalten). Alle Zellen zeigten nach den 4-tägigen Versuchen eine Steigerung der Expression von CD163. Diese war allerdings weitestgehend unabhängig von einer vorherigen Stimulation mit RPE-Überständen (siehe Abbildung 12). Da es sich bei CD163 um einen Marker handelt, der in hohem Maße auf Schweinemakrophagen exprimiert wird, kann man davon ausgehen, dass sich während der Versuche die Monozyten zu Makrophagen weiterentwickelt haben.

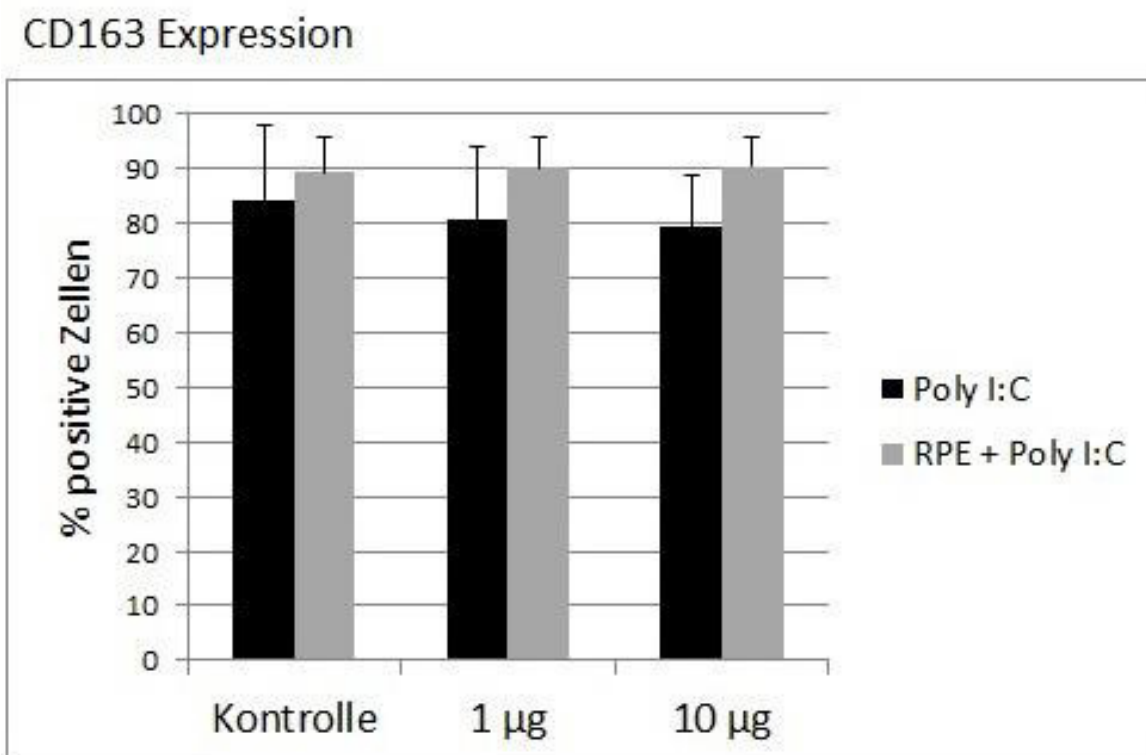


Abbildung 12. Ergebnisse CD163 Expression. Monozyten wurden mit den Überständen von RPE-Zellen, die zuvor mit 1 µg, 10 µg oder ohne Poly I:C inkubiert wurden, behandelt (ohne Poly I:C = Kontrolle). Die CD163 Expression wurde mittels Durchflusszytometrie gemessen. Als Negativkontrolle wurden die Monozyten mit dem Versuchsmedium behandelt, das dieselbe Menge Poly I:C enthielt, aber nicht mit RPE-Zellen inkubiert wurde (schwarze Balken). Alle Zellen zeigten zu Versuchsende eine gesteigerte Expression von CD163. Diese war weitestgehend unabhängig von einer vorherigen Behandlung mit RPE-Überständen.

4.3 Migration

Monozyten, die mit RPE-Überständen behandelt wurden, zeigten ein gesteigertes Migrationsverhalten. Dieses gesteigerte Migrationsverhalten wurde dann signifikant, wenn die RPE-Zellen mit einer Konzentration von 1 µg/ml Poly I:C behandelt wurden. Das Migrationsverhalten der Monozyten, die mit der Kontrolle behandelt wurden, wurde als 100 % festgesetzt (siehe Abbildung 13).

Migration

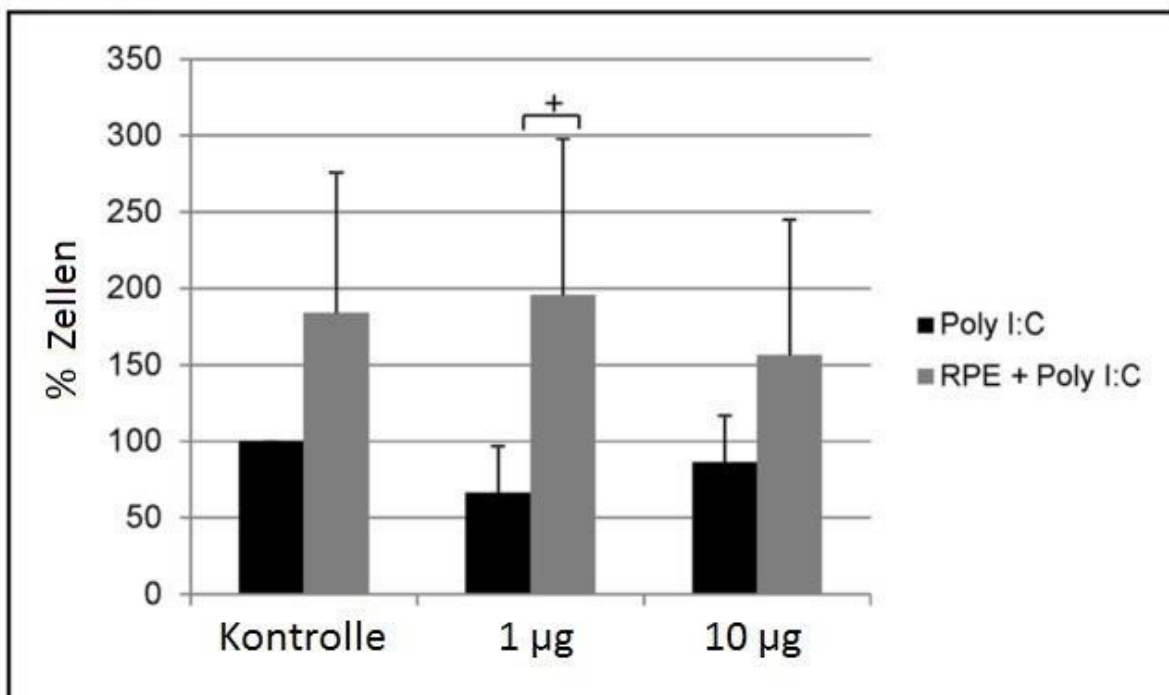


Abbildung 13. Migrationsergebnisse. Monozyten wurden von den Überständen von RPE-Zellen, die zuvor mit 1 µg, 10 µg oder ohne Poly I:C inkubiert wurden, angelockt (ohne Poly I:C = Kontrolle). Die Monozytenmigration wurde mit Hilfe einer Boyden-Kammer untersucht. Als Negativkontrolle diente ein Medium, das dieselbe Menge Poly I:C enthielt, aber nicht mit RPE-Zellen inkubiert wurde (schwarze Balken). Das Migrationsverhalten der Monozyten, die mit der Kontrolle ohne RPE-Zellen behandelt wurden, wurde als 100 % festgesetzt. Die Monozyten zeigen ein signifikant gesteigertes Migrationsverhalten, wenn sie von Überständen von RPE-Zellen angelockt werden, die zuvor mit 1 µg Poly I:C stimuliert wurden. Aus der Publikation (Hettich et al. 2014).

4.4 Fas Ligand Expression

Makrophagen, die zuvor mit Überständen von RPE-Zellen behandelt wurden, zeigten eine signifikant erhöhte Expression des Fas Liganden auf der Zelloberfläche. Diese erhöhte Expression war allerdings unabhängig von einer vorherigen Behandlung der RPE-Zellen mit Poly I:C (siehe Abbildung 14). Auf Monozyten, die frisch aus Schweinblut isoliert wurden, konnte keine Fas Liganden Expression nachgewiesen werden (<1%; Daten sind nicht in der Graphik enthalten).

Fas Ligand Expression

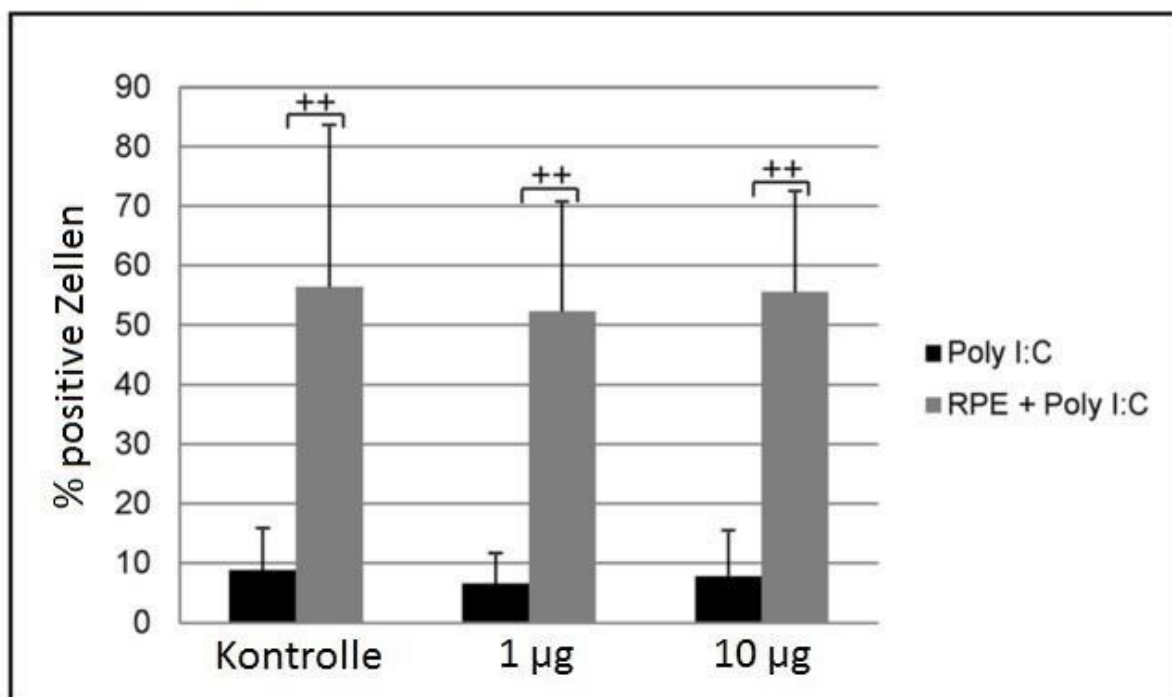


Abbildung 14. Ergebnisse Fas Ligand Expression. Monozyten wurden mit den Überständen von RPE-Zellen, die zuvor mit 1 µg, 10 µg oder ohne Poly I:C inkubiert wurden, behandelt (ohne Poly I:C = Kontrolle). Die Fas Liganden Expression wurde mittels Durchflusszytometrie gemessen. Als Negativkontrolle wurden die Monozyten mit dem Versuchsmedium behandelt, das dieselbe Menge Poly I:C enthielt (schwarze Balken). Die Makrophagen zeigten eine signifikant erhöhte Expression des Fas Liganden, wenn sie mit Überständen von RPE-Zellen behandelt wurden. Diese Steigerung war allerdings unabhängig von einer vorherigen Stimulation der RPE-Zellen mit Poly I:C. Aus der Publikation (Hettich et al. 2014).

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde zunächst eine Methode zur Isolierung von Monozyten aus Schweineblut etabliert, um dann den Einfluss von RPE-Zellen mit und ohne eine TLR3-Aktivierung auf den Phänotyp und die Migrationseigenschaften von Monozyten zu untersuchen. Das Ziel war, neue Erkenntnisse über die Pathophysiologie der Altersabhängigen Makuladegeneration aufzuzeigen. TLR3 ist ein Rezeptor, der in der Lage ist, virale Infektionen zu erkennen, aber auch an RNA von nekrotischen Zellen bindet und somit bei Gewebsdegeneration, wie zu Beginn der AMD, aktiviert wird (Matsumoto et al. 2002); (Kleinman et al. 2012).

In den Experimenten wurde mit Zellen des Schweins gearbeitet, da einerseits primäre humane RPE-Zellen für Forschungszwecke kaum zur Verfügung stehen und andererseits die anatomischen und physiologischen Bedingungen im Auge bei Schwein und Mensch sehr ähnlich sind. Außerdem hatte die Arbeit mit dem Schwein als Versuchsmodell einen entscheidenden ethischen Vorteil, da die benötigten Materialien wie Blut und Augen bei einer Schlachtung als Abfallprodukte anfallen und keine Tierversuche nötig waren.

Dafür musste zunächst eine Methode entwickelt werden, mit Hilfe derer man Monozyten in hoher Reinheit und gutem Ertrag aus Schweineblut gewinnen konnte. Mit einer Kombination von verschiedenen modifizierten Verfahren, die zuvor für humane Monozyten verwendet wurden, konnte eine sehr zuverlässige und kosteneffektive Methode entwickelt werden. Dazu wurde zunächst eine initiale Dichtegradientenzentrifugation (Böyum 1968) durchgeführt, durch die man die Monozyten und Lymphozyten aus dem Vollblut des Schweins gewinnen konnte. Anschließend wurden diese Zellen in Serum-vorbehandelten Zellkulturflaschen inkubiert (Kumagai et al. 1979), sodass es nur den Monozyten gelang, eine feste Bindung einzugehen und die Lymphozyten konnten durch Spülvorgänge und bestimmtes Klopfen (Freundlich & Avdalovic 1983) gelöst und entfernt werden. Eine entscheidende Rolle für den Erfolg der Monozytenisolation spielte die initiale Antikoagulation des Blutes (Nielsen 1985). Die besten Ergebnisse wurden in diesen Versuchen mit einer Antikoagulation durch EDTA erzielt. Außerdem wurde der Ertrag deutlich gesteigert, indem man sehr genau darauf achtete, die Monozyten stets zu kühlen, wenn man eine Bindung, zum Beispiel an die Falkonwand, verhindern wollte.

Denn in früheren Veröffentlichungen wurde für Monozyten beschrieben, dass sie bei Kälte nicht binden können und sich ablösen (Nielsen 1987); (Leb et al. 1983). Somit ist es gelungen, eine zuverlässige Methode zu etablieren, mit Hilfe derer man ohne großen Kostenaufwand und spezielle Ausrüstungen (Geräte für *magnetic antibody cell sorting* oder Elutriationszentrifugation) eine primäre Monozytenkultur gewinnen kann. Diese könnte es vor allem auch kleineren Laboren ermöglichen, an Monozyten vom Schwein zu forschen.

In den jeweiligen Versuchen wurde immer nur mit Monozyten eines einzelnen Schweins gearbeitet, was sich teilweise auch in den Standardabweichungen bemerkbar macht. Diese sind wahrscheinlich zum einen Ausdruck der genetisch individuellen Schweine und zum anderen durch die Lebensumstände der Tiere verursacht, denn die untersuchten Schweine wurden unter normalen Bedingungen auf einem Bauernhof gehalten und waren dort einem üblichen Keimspektrum ausgesetzt. So reflektieren die Daten eher normale Lebensumstände als es bei steril herangezüchteten Zelllinien der Fall wäre.

In den Versuchen zeigten alle Monozyten nach der Kultivierung eine gesteigerte Expression von CD163. Diese war weitestgehend unabhängig von einer Behandlung mit RPE-Überständen. CD163 ist ein Marker, der vor allem auf gewebständigen Makrophagen exprimiert wird. Es gibt auch eine Monozytenuntergruppe, die CD163 exprimiert. Diese CD163 positiven Monozyten repräsentieren weiterentwickelte Monozyten, die sich wahrscheinlich in der Umwandlung zu Makrophagen befinden. Für sie ist beschrieben, dass sie im Gegensatz zu den jungen klassischen Monozyten auch anti-inflammatorische Zytokine produzieren können (Mantovani et al. 2004). Durch die Anwesenheit bestimmter Zytokine, wie GM-CSF und IL-4, können sich allerdings alle Monozyten in Dendritische Zellen umwandeln, wobei die Expression von CD163 abfallen würde (Chamorro et al. 2004). Die Versuchsergebnisse lassen also auf eine Weiterentwicklung der Monozyten zu Makrophagen und nicht zu Dendritischen Zellen schließen, die unabhängig von der Behandlung mit RPE-Überständen war. Die Expression von CD163 wurde schon früher als ein Effekt des Zellalters der Monozyten beschrieben, wobei eine Steigerung der Expression mit zunehmendem Alter der Zellen stattfand (Chamorro et al. 2000). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, weshalb die Ergebnisse innerhalb der Versuche sehr ähnlich waren. Die erhobenen Daten deuten stark darauf hin, dass die

RPE-Zellen keinen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Ausreifung nehmen und nicht zu einer Entwicklung zu dendritischen Zellen führen.

In den Experimenten konnte gezeigt werden, dass RPE-Zellen die Migration von Monozyten steigern. Diese Migrationssteigerung wurde dann signifikant, wenn die RPE-Zellen mäßig TLR3-stimuliert wurden (mit 1 µg/ml Poly I:C). Diese Daten stimmen gut mit Aussagen früherer Studien überein. Diese Studien besagen, dass RPE-Zellen chemotaktische Zytokine produzieren, welche die Migration von Monozyten anregen (Rosenbaum et al. 1987) und dass eine TLR3-Aktivierung in RPE-Zellen eine gesteigerte Sekretion von MCP-1 auslöst (Ebihara et al. 2007). Auch unter physiologischen Gesichtspunkten, ist dieser Effekt plausibel. Denn wenn z.B. eine virale Infektion von den RPE-Zellen über den Toll-like-Rezeptor 3 erkannt wird, könnten sie durch die Steigerung der Monozytenmigration zu einer Abwehr des Infekts beitragen. Wird die TLR3-Aktivierung allerdings nicht durch eine Virusinfektion sondern durch Gewebsdegenerationen ausgelöst und das RPE reagiert, indem es die Monozytenmigration steigert, so könnte die hervorgerufene Entzündungsreaktion einen weiteren Progress der Gewebsdegeneration bewirken. Geht man nun davon aus, dass solch ein gesteigertes Migrationsverhalten zu einem Zell-Zell-Kontakt zwischen RPE-Zellen und Monozyten führt, könnte dies einen zu beachtenden Faktor in der Pathogenese der AMD ausmachen. Denn diese Zell-Zell-Interaktion löst in RPE-Zellen wiederum eine Steigerung der MCP-1 Produktion aus (Bian et al. 2003), was noch mehr Monozyten anziehen könnte. Im Vorfeld wurde gezeigt, dass MCP-1 aktivierte Monozyten die Apoptose von RPE-Zellen auslösen (Yang et al. 2011) und dass ein Zell-Zell-Kontakt zur Zerstörung der RPE-Zellen führt (Yoshida et al. 2003). Daher könnte man davon ausgehen, dass die Steigerung der Monozytenmigration zu einer Zerstörung des Retinalen Pigmentepithels beiträgt. Allerdings muss hier erwähnt werden, dass die Steigerung der Migration, die in den Experimenten gesehen wurde, nicht hochgradig war und deshalb nicht sicher zu einem entscheidenden Zell-Zell-Kontakt zwischen Monozyten und RPE führen muss. Dies gilt vor allem auch dann, wenn die Bruch-Membran und die Blut-Retina-Schranke noch intakt sind.

Die erhobenen Daten zeigen, dass RPE-Zellen die Expression des Fas Liganden (FasL) auf Monozyten deutlich steigern. Diese Steigerung war unabhängig von einer vorherigen TLR3-Stimulation der RPE-Zellen. Auf frischen Monozyten konnte keine

Expression des FasL nachgewiesen werden. Aber Monozyten sind in der Lage, im Laufe ihrer Entwicklung und bei entsprechender Stimulation den FasL zu exprimieren (Brown & Savill 1999). Der Fas Ligand (auch CD95 Ligand) ist in der Lage durch die Bindung an den Fas Rezeptor (auch CD95) eine Apoptose in der rezeptortragenden Zelle auszulösen. Diese Interaktion findet hauptsächlich zur Regulation des Immunsystems statt. Hier kann der Fas Rezeptor unter anderem auf T-Lymphozyten exprimiert werden. Der FasL spielt aber auch eine entscheidende Rolle bei der anti-angiogenetischen Regulation in der Retina, denn es konnte gezeigt werden, dass Mäuse mit einem genetischen Defekt des FasL deutlich mehr retinale Neovaskularisationen aufzeigten als ihre Artgenossen (Kaplan et al. 1999); (Davies et al. 2003). Auch für die Expression des FasL auf Monozyten wurde in einer früheren Veröffentlichung beschrieben, dass sie in einer Reduktion der CNV resultiert, welche über einen FasL-induzierten Zelltod vermittelt wird (Apte et al. 2006). Die ermittelten Daten zeigen, dass RPE-Überstände die Expression des FasL auf Monozyten generell steigern, sodass RPE-Zellen eine aktive Rolle bei der Aufrechterhaltung des anti-angiogenetischen Umfelds in der Retina spielen könnten und somit einem Übergang von der trockenen zur feuchten AMD entgegenwirken würden.

Ein wichtiger Bestandteil des Immunprivilegs des Auges ist die Regulation der T-Lymphozyten (Klettner 2015). Durch die Möglichkeit über den Fas Rezeptor T-Lymphozyten zum Zelltod zu zwingen ist der FasL ein entscheidender Faktor bei der Wahrung des Immunprivilegs des Auges und limitiert die Entzündungsreaktion bei viralen Infektionen (Ferguson & Griffith 2006); (Griffith et al. 1995). Geht man davon aus, dass auch Monozyten über den FasL T-Zellen zur Apoptose zwingen können (Daigneault et al. 2012), dann kann den RPE-Zellen durch die Steigerung der FasL Expression auf Monozyten auch eine anti-inflammatorische Wirkung zugeschrieben werden. Wie bereits erwähnt, wurde in früheren Veröffentlichungen beschrieben, dass ein direkter Zell-Zell-Kontakt von Monozyten und RPE-Zellen zu einer Zerstörung des RPEs führt (Yoshida et al. 2003). Man könnte annehmen, dass diese Zerstörung evtl. über den FasL vermittelt wird, der von Monozyten exprimiert wird, wenn diese von RPE-Zellen dazu stimuliert wurden. Allerdings sind RPE-Zellen recht resistent gegenüber FasL-induziertem Zelltod, es sei denn, bestimmte pro-inflammatorische Zytokine sind anwesend, wie z.B. TNF α oder IFN γ (Esser et al.

1995). Da bisher noch nicht beschrieben wurde, dass eine TLR3-Aktivierung von RPE-Zellen einen Anstieg von TNF α oder IFN γ veranlasst, ist es eher unwahrscheinlich, dass die Zerstörung des RPEs bei einem Zell-Zell-Kontakt mit Monozyten über den FasL vermittelt wird.

Zusammenfassend konnte eine neue Methode zur Isolierung von Schweinemonozyten etabliert werden und es wurde gezeigt, dass sich die gewonnenen Monozyten im Laufe der Versuche zu Makrophagen ausdifferenziert haben. Außerdem konnte gezeigt werden, dass RPE-Zellen Monozyten zur Expression des Fas Liganden stimulieren, welcher anti-angiogenetisch wirkt. Unter einer TLR3-Aktivierung, wie bei viralen Infektionen und nekrotischen Gewebsdegenerativen, lösen die RPE-Zellen eine gesteigerte Monozytenmigration aus und halten auch hier den anti-angiogenetischen Phänotyp der Monozyten durch deren Fas Liganden Expression aufrecht. Eine generelle Aussage zur Beteiligung der Monozyten an der Entstehung der AMD kann nicht getroffen werden. Die gewonnenen Daten weisen darauf hin, dass die Interaktion zwischen RPE und Monozyten insgesamt keine entscheidende Bedeutung in der Pathogenese der AMD zu haben scheint. Weitere Untersuchungen sind von Nöten, um diese Fragestellung genauer beantworten zu können. Mit dieser Arbeit wurde die Grundlage für Untersuchungen der Interaktion zwischen RPE und Monozyten in einem primären Zellkulturmodell gelegt.

6 Zusammenfassung

Die Altersabhängige Makuladegeneration ist in den westlichen Industrienationen die häufigste Ursache der Erblindung bei älteren Menschen. Pathophysiologisch kommt es durch degenerative Veränderungen, genetische Prädispositionen, Umwelteinflüsse und Entzündungsreaktionen zunächst zu einem Untergang des Retinalen Pigmentepithels, welcher auch zu einer Zerstörung der Photorezeptoren in der Retina führt. Klinisch imponiert eine Verschlechterung der zentralen Sehschärfe. Im Verlauf der Erkrankung können Gefäße aus der Choroidea in den subretinalen Raum einsprossen und ein rapides Fortschreiten der Sehverschlechterung hervorrufen. Zurzeit existiert noch keine kausale Therapie der Erkrankung.

Makrophagen stehen schon seit Längerem im Verdacht bei der Entstehung der altersabhängigen Makuladegeneration beteiligt zu sein. Ihre pathophysiologische Bedeutung wird allerdings kontrovers diskutiert. Ihnen wird sowohl eine protektive als auch eine destruktive Wirkung vor allem in Bezug auf die Angiogenese zugeschrieben.

Der Toll-like-Rezeptor 3 ist ein Mustererkennungsrezeptor, der unter anderem auf Zellen des Retinalen Pigmentepithels exprimiert wird. Er ist in der Lage eine virale Infektion zu detektieren, kann aber auch bei Gewebsdegenerationen, wie bei der altersabhängigen Makuladegeneration, aktiviert werden. Die Aktivierung des Toll-like-Rezeptors 3 wurde bereits als ein möglicher Faktor für die Zerstörung des Retinalen Pigmentepithels bei der fortgeschrittenen altersabhängigen Makuladegeneration diskutiert.

Daher war das Ziel dieser Arbeit, den Einfluss des Retinalen Pigmentepithels mit und ohne Aktivierung des Toll-like-Rezeptors 3 auf die Migrationseigenschaften und den Phänotyp von Monozyten zu untersuchen. Hierbei interessierte vor allem die Expression des Fas Liganden und des Oberflächenmarkers CD163 auf den Monozyten.

Da die Versuche im Schweinemodell durchgeführt werden sollten, war ein weiteres Ziel der Arbeit eine Methode zur Isolierung von Monozyten aus Schweineblut zu etablieren. Durch eine Kombination verschiedener modifizierter Verfahren zur Isolation von humanen Monozyten konnte eine sehr zuverlässige und kosteneffektive

Methode entwickelt werden. Weil für dieses etablierte Verfahren keine spezielle Ausrüstung benötigt wird, sollte es auch kleineren Laboren in Zukunft die Möglichkeit bieten, eine reine Monozytenkultur vom Schwein herzustellen.

Die isolierten Monozyten zeigten in allen Versuchen eine gesteigerte Expression von CD163, welche eine Ausreifung der Monozyten zu Makrophagen anzeigt. Diese Ausreifung war unabhängig von dem Einfluss des Retinalen Pigmentepithels. In den Experimenten konnte gezeigt werden, dass Zellen des Retinalen Pigmentepithels, die zuvor über den Toll-like-Rezeptor 3 stimuliert wurden, die Migration von Monozyten signifikant steigern. Außerdem fördern Zellen des Retinalen Pigmentepithels die Expression des Fas Liganden auf den Monozyten. Dieser Mechanismus zeigte sich sowohl für Retinale Pigmentepithelzellen, die über den Toll-like-Rezeptor 3 aktiviert wurden, als auch für solche ohne eine Aktivierung. Dem Fas Liganden werden in der Retina anti-angiogenetische und immunregulatorische Eigenschaften zugeschrieben.

Zusammenfassend kann eine Aktivierung des Toll-like-Rezeptors 3 von Zellen des Retinalen Pigmentepithels eine gesteigerte Monozytenmigration auslösen. Allerdings ist der Einfluss des Retinalen Pigmentepithels auf den Phänotyp von Monozyten unabhängig von einer Aktivierung des Toll-like-Rezeptors 3. Generell weisen die gewonnenen Daten nicht daraufhin, dass die Interaktion von Retinalem Pigmentepithel und Monozyten entscheidend an der Entstehung der Altersabhängigen Makuladegeneration beteiligt ist. Mit dieser Arbeit wurde die Grundlage für weitere Untersuchungen der Interaktion in einem primären Zellkulturmodell gelegt, welche von Nöten sind, um die Fragestellung genauer klären zu können.

7 Literaturverzeichnis

- Ambati J, Anand A, Fernandez S, Sakurai E, Lynn BC, Kuziel WA, Rollins BJ & Ambati BK (2003): An animal model of age-related macular degeneration in senescent Ccl-2- or Ccr-2-deficient mice. *Nat Med*, 9, 1390–1397.
- Apte RS, Richter J, Herndon J & Ferguson TA (2006): Macrophages inhibit neovascularization in a murine model of age-related macular degeneration. *PLoS Med*, 3, 310.
- Berg C, Wilker S, Roeder J & Klettner A (2013): Isolation of porcine monocyte population: a simple and efficient method. *Vet Res Commun*, 37, 239–241.
- Bian Z-M, Elnor SG, Yoshida A & Elnor VM (2003): Human RPE-monocyte co-culture induces chemokine gene expression through activation of MAPK and NIK cascade. *Exp Eye Res*, 76, 573–583.
- Böcker W, Denk H & Heitz PU (2004): *Pathologie* (3. Auflage). Urban & Fischer, München.
- Böyum A (1968): Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Investig Suppl*, 97, 77–89.
- Brown SB & Savill J (1999): Phagocytosis triggers macrophage release of Fas ligand and induces apoptosis of bystander leukocytes. *J Immunol*, 162, 480–485.
- Carrillo C, Borca MV, Afonso CL, Onisk DV & Rock DL (1994): Long-term persistent infection of swine monocytes/macrophages with African swine fever virus. *J Virol*, 68, 580–583.

- Chamorro S, Revilla C, Álvarez B, Alonso F, Ezquerra Á & Domínguez J (2005): Phenotypic and functional heterogeneity of porcine blood monocytes and its relation with maturation. *Immunology*, 114, 63–71.
- Chamorro S, Revilla C, Alvarez B, López-Fuertes L, Ezquerra A & Domínguez J (2000): Phenotypic characterization of monocyte subpopulations in the pig. *Immunobiology*, 202, 82–93.
- Chamorro S, Revilla C, Gómez N, Alvarez B, Alonso F, Ezquerra A & Domínguez J (2004): In vitro differentiation of porcine blood CD163- and CD163+ monocytes into functional dendritic cells. *Immunobiology*, 209, 57–65.
- 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. *Br J Ophthalmol*, 94, 918–925.
- Cho Y, Wang JJ, Chew EY, Ferris FL, Mitchell P, Chan C-C & Tuo J (2009): Toll-like receptor polymorphisms and age-related macular degeneration: replication in three case-control samples. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50, 5614–5618.
- Curcio CA, Johnson M, Rudolf M & Huang J-D (2011): The oil spill in ageing Bruch membrane. *Br J Ophthalmol*, 95, 1638–1645.
- Daigneault M, De Silva TI, Bewley MA, Preston JA, Marriott HM, Mitchell AM, Mitchell TJ, Read RC, Whyte MKB & Dockrell DH (2012): Monocytes regulate the mechanism of T-cell death by inducing Fas-mediated apoptosis during bacterial infection. *PLoS Pathog*, 8, e1002814.
- Davies MH, Eubanks JP & Powers MR (2003): Increased retinal neovascularization in Fas ligand-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44, 3202–3210.
- Detrick B & Hooks JJ (2010): Immune regulation in the retina. *Immunol Res*, 47, 153–161.

- Ebihara N, Chen L, Tokura T, Ushio H, Iwatsu M & Murakami A (2007): Distinct functions between toll-like receptors 3 and 9 in retinal pigment epithelial cells. *Ophthalmic Res*, 39, 155–163.
- Elnér SG, Yoshida A, Bian Z-M, Kindezelskii AL, Petty HR & Elnér VM (2003): Human RPE cell apoptosis induced by activated monocytes is mediated by caspase-3 activation. *Trans Am Ophthalmol Soc*, 101, 77-89-91.
- Espinosa-Heidmann DG, Suner IJ, Hernandez EP, Monroy D, Csaky KG & Cousins SW (2003): Macrophage depletion diminishes lesion size and severity in experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44, 3586–3592.
- Esser P, Heimann K, Abts H, Fontana A & Weller M (1995): CD95 (Fas/APO-1) antibody-mediated apoptosis of human retinal pigment epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 213, 1026–1034.
- Ferguson TA & Griffith TS (2006): A vision of cell death: Fas ligand and immune privilege 10 years later. *Immunol Rev*, 213, 228–238.
- Freundlich B & Avdalovic N (1983): Use of gelatin/plasma coated flasks for isolating human peripheral blood monocytes. *J Immunol Methods*, 62, 31–37.
- Friedman E (2008): The Pathogenesis of Age-related Macular Degeneration. *Am J Ophthalmol*, 146, 348–349.
- Gordon S & Taylor PR (2005): Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*, 5, 953–964.
- Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR & Ferguson TA (1995): Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science*, 270, 1189–1192.

- Hettich C, Wilker S, Mentlein R, Lucius R, Roeder J & Klettner A (2014): The retinal pigment epithelium (RPE) induces FasL and reduces iNOS and Cox2 in primary monocytes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 252, 1747–1754.
- Huemer HP, Larcher C, Kirchebner W, Klingenschmid J, Göttinger W & Irschick EU (1996): Susceptibility of human retinal pigment epithelial cells to different viruses. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 234, 177–185.
- Jerdan JA, Pepose JS, Michels RG, Hayashi H, de Bustros S, Sebag M & Glaser BM (1989): Proliferative vitreoretinopathy membranes. An immunohistochemical study. *Ophthalmology*, 96, 801–810.
- Kaarniranta K & Salminen A (2009): Age-related macular degeneration: activation of innate immunity system via pattern recognition receptors. *J Mol Med Berl Ger*, 87, 117–123.
- Kaplan HJ, Leibole MA, Tezel T & Ferguson TA (1999): Fas ligand (CD95 ligand) controls angiogenesis beneath the retina. *Nat Med*, 5, 292–297.
- Kleinman ME, Kaneko H, Cho WG, Dridi S, Fowler BJ, Blandford AD, Albuquerque RJC, Hirano Y, Terasaki H, Kondo M, Fujita T, Ambati BK, Tarallo V, Gelfand BD, Bogdanovich S, Baffi JZ & Ambati J (2012): Short-interfering RNAs induce retinal degeneration via TLR3 and IRF3. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*, 20, 101–108.
- Klettner A (2015): The retinal pigment epithelium in the immune regulation of the retina. In: Hogarth A (Hrsg.) *Recent Advances in Eye Research*, S. 31-52, Nova Publishers, Kiel.
- Klettner A, Koinzer S, Meyer T & Roeder J (2013): Toll-like receptor 3 activation in retinal pigment epithelium cells - Mitogen-activated protein kinase pathways of cell death and vascular endothelial growth factor secretion. *Acta Ophthalmol*, 91, e211-218.

- Klettner A & Roeder J (2008): Comparison of bevacizumab, ranibizumab, and pegaptanib: efficiency and possible additional pathways. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 49, 4523–4527.
- Kumagai K, Itoh K, Hinuma S & Tada M (1979): Pretreatment of plastic petri dishes with fetal calf serum. A simple method for macrophage isolation. *J Immunol Methods*, 29, 17–25.
- Kumar MV, Nagineni CN, Chin MS, Hooks JJ & Detrick B (2004): Innate immunity in the retina: Toll-like receptor (TLR) signaling in human retinal pigment epithelial cells. *J Neuroimmunol*, 153, 7–15.
- Lamb LE & Simon JD (2004): A2E: a component of ocular lipofuscin. *Photochem Photobiol*, 79, 127–136.
- Lassota N (2008): Clinical and histological aspects of CNV formation: studies in an animal model. *Acta Ophthalmol*, 86 Thesis 2, 1–24.
- Lau CH & Taylor AW (2009): The immune privileged retina mediates an alternative activation of J774A.1 cells. *Ocul Immunol Inflamm*, 17, 380–389.
- Leb L, Crusberg T, Fortier N & Snyder LM (1983): Evaluation of methods using adherence to substrate and density gradient for the isolation of human monocytes. *J Immunol Methods*, 58, 309–321.
- Lüllmann-Rauch R (2006): *Taschenlehrbuch Histologie (2. Auflage)*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Luttmann W, Bratke K, Küpper M & Myrtek D (2014): *Der Experimentator: Immunologie (4. Auflage)*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Malefyt R de W, Abrams J, Bennett B, Figdor CG & de Vries JE (1991): Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med*, 174, 1209–1220.

- Mantovani A, Sica A & Locati M (2005): Macrophage polarization comes of age. *Immunity*, 23, 344–346.
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A & Locati M (2004): The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*, 25, 677–686.
- Martin DF, Maguire MG, Fine SL, Ying G, Jaffe GJ, Grunwald JE, Toth C, Redford M & Ferris FL (2012): Ranibizumab and Bevacizumab for Treatment of Neovascular Age-related Macular Degeneration. *Ophthalmology*, 119, 1388–1398.
- Martin M & Resch K (2009): *Immunologie*. Eugen Ulmer KG, Stuttgart.
- Matsumoto M, Kikkawa S, Kohase M, Miyake K & Seya T (2002): Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling. *Biochem Biophys Res Commun*, 293, 1364–1369.
- McLeod DS, Grebe R, Bhutto I, Merges C, Baba T & Luty GA (2009): Relationship between RPE and choriocapillaris in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50, 4982–4991.
- Miller DW, Jousseaume AM & Holz FG (2003): The molecular mechanisms of neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmologie*, 100, 92–96.
- Miller JW (2013): Age-related macular degeneration revisited--piecing the puzzle: the LXIX Edward Jackson memorial lecture. *Am J Ophthalmol*, 155, 1–35.e13.
- Miller JW, Le Couter J, Strauss EC & Ferrara N (2013): Vascular endothelial growth factor a in intraocular vascular disease. *Ophthalmology*, 120, 106–114.
- Mosser DM (2003): The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol*, 73, 209–212.

- Nielsen H (1985): Influence of five different anticoagulants on human blood monocyte isolation and functional activities. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand C*, 93, 49–52.
- Nielsen H (1987): Isolation and functional activity of human blood monocytes after adherence to plastic surfaces: comparison of different detachment methods. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand C*, 95, 81–84.
- Osuský R, Malik P, Aurora Y & Ryan SJ (1997): Monocyte-macrophage differentiation induced by coculture of retinal pigment epithelium cells with monocytes. *Ophthalmic Res*, 29, 124–129.
- Patzelt J (2009): *Basics Augenheilkunde (2. Auflage)*. Elsevier, Urban & Fischer, München.
- Rosenbaum JT, O'Rourke L, Davies G, Wenger C, David L & Robertson JE (1987): Retinal pigment epithelial cells secrete substances that are chemotactic for monocytes. *Curr Eye Res*, 6, 793–800.
- Rothe G (2007): Technische und methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie. In: Sack U, Tárnok A & Rothe G (Hrsg.) *Zelluläre Diagnostik*, S. 27-70, KARGER, Basel.
- Sánchez C, Doménech N, Vázquez J, Alonso F, Ezquerro A & Domínguez J (1999): The porcine 2A10 antigen is homologous to human CD163 and related to macrophage differentiation. *J Immunol*, 162, 5230–5237.
- Sanchez I, Martin R, Ussa F & Fernandez-Bueno I (2011): The parameters of the porcine eyeball. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 249, 475–482.
- Schmitz S (2011): *Der Experimentator: Zellkultur (3.Auflage)*. Springer-Verlag, Heidelberg.

- Sharma K, Wang RX, Zhang LY, Yin DL, Luo XY, Solomon JC, Jiang RF, Markos K, Davidson W, Scott DW & Shi YF (2000): Death the Fas way: regulation and pathophysiology of CD95 and its ligand. *Pharmacol Ther*, 88, 333–347.
- Shi Y, Wang Y, Zhang Z, Cai Y, Zhou J, Hou H & van Rooijen N (2011): Monocyte/macrophages promote vasculogenesis in choroidal neovascularization in mice by stimulating SDF-1 expression in RPE cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 249, 1667–1679.
- Shin D-I (2000): Mechanismus der Interleukin-10 vermittelten Suppression der TNF- α Produktion in gereinigten Monozyten. *Med. Diss., Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*.
- Stein-Streilein J (2008): Immune regulation and the eye. *Trends Immunol*, 29, 548–554.
- Strauss O (2005): The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev*, 85, 845–881.
- Sugita S, Futagami Y, Smith SB, Naggar H & Mochizuki M (2006): Retinal and ciliary body pigment epithelium suppress activation of T lymphocytes via transforming growth factor beta. *Exp Eye Res*, 83, 1459–1471.
- Vercammen E, Staal J & Beyaert R (2008): Sensing of viral infection and activation of innate immunity by toll-like receptor 3. *Clin Microbiol Rev*, 21, 13–25.
- Wahl LM, Wahl SM, Smythies LE & Smith PD (2006): Isolation of human monocyte populations. *Curr Protoc Immunol*, Chapter 7, Unit 7.6A.
- WHO | Priority eye diseases (2016)
<http://www.who.int/blindness/causes/priority/en/index7.html>
- Wiencke AK, Kiilgaard JF, Nicolini J, Bundgaard M, Röpke C & La Cour M (2003): Growth of cultured porcine retinal pigment epithelial cells. *Acta Ophthalmol Scand*, 81, 170–176.

- Yang D, Elnér SG, Chen X, Field MG, Petty HR & Elnér VM (2011): MCP-1-activated monocytes induce apoptosis in human retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52, 6026–6034.
- Yang P, Chen L, Zwart R & Kijlstra A (2002): Immune cells in the porcine retina: distribution, characterization and morphological features. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43, 1488–1492.
- Yang Z, Stratton C, Francis PJ, Kleinman ME, Tan PL, Gibbs D, Tong Z, Chen H, Constantine R, Yang X, Chen Y, Zeng J, Davey L, Ma X, Hau VS, Wang C, Harmon J, Buehler J, Pearson E, Patel S, Kaminoh Y, Watkins S, Luo L, Zabriskie NA, Bernstein PS, Cho W, Schwager A, Hinton DR, Klein ML, Hamon SC, Simmons E, Yu B, Campochiaro B, Sunness JS, Campochiaro P, Jorde L, Parmigiani G, Zack DJ, Katsanis N, Ambati J & Zhang K (2008): Toll-like receptor 3 and geographic atrophy in age-related macular degeneration. *N Engl J Med*, 359, 1456–1463.
- Yoshida A, Elnér SG, Bian Z-M, Kindezelskii AL, Petty HR & Elnér VM (2003): Activated monocytes induce human retinal pigment epithelial cell apoptosis through caspase-3 activation. *Lab Invest J Tech Methods Pathol*, 83, 1117–1129.
- Zamiri P, Masli S, Kitaichi N, Taylor AW & Streilein JW (2007): Thrombospondin plays a vital role in the immune privilege of the eye. *Ocul Immunol Inflamm*, 15, 279–294.
- Zhou P, Fan L, Yu K-D, Zhao M-W & Li X-X (2011): Toll-like receptor 3 C1234T may protect against geographic atrophy through decreased dsRNA binding capacity. *FASEB J*, 25, 3489–3495.
- Ziegler-Heitbrock HW, Appl B, Kafferlein E, Löffler T, Jahn-Henninger H, Gutensohn W, Nores JR, Mccullough K, Passlick B, Labeta MO & Izbicki J (1994): The

Antibody MY4 Recognizes CD14 on Porcine Monocytes and Macrophages.

Scand J Immunol, 40, 509–514.

Ziegler-Heitbrock HW, Fingerle G, Ströbel M, Schraut W, Stelter F, Schütt C, Passlick

B & Pforte A (1993): The novel subset of CD14⁺/CD16⁺ blood monocytes

exhibits features of tissue macrophages. Eur J Immunol, 23, 2053–2058.

8 Anhang

8.1 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Roider für die Vergabe des interessanten Promotionsthemas, für die Möglichkeit die Arbeit in der Klinik für Ophthalmologie durchführen zu können und für die Unterstützung während der Arbeit.

Bei Frau Prof. Dr. Klettner möchte ich mich ganz besonders für die außerordentlich intensive Betreuung während der gesamten Arbeit bedanken. Ihre wertvollen Anregungen und Ratschläge habe ich zu jedem Zeitpunkt sehr geschätzt. Durch ihre positive und motivierende Art konnte sie mich ganz schnell für die Wissenschaft und dieses Projekt begeistern.

Ich danke den wissenschaftlichen Mitarbeitern des Labors der Klinik für Ophthalmologie Serap Luick und Monika Marquardt, die mich in diverse praktische Fertigkeiten im Labor geduldig eingearbeitet haben und immer ein offenes Ohr für auftretende Fragen hatten. Ein besonderer Dank gilt Elisabeth Richert, die mir nicht nur einen Großteil der angewendeten Methoden vermittelt hat, sondern auch durch ihr freundliches Wesen im Labor immer für eine ausgesprochen angenehme Atmosphäre gesorgt hat. Unsere gemeinsamen Mittagspausen, die ich immer sehr genossen habe, sorgten für die nötige Abwechslung im Forschungsalltag.

Meinen Kommilitonen und Freunden danke ich für ihr stetiges Interesse an meiner Arbeit und ihre hilfreichen Ratschläge, vor allem auch in schwierigen Zeiten.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie, die mich in allen Lebenslagen begleitet, unterstützt und durch ihre Zuversicht gestärkt hat.

Meinem Mann Holger danke ich von ganzem Herzen für seine unermüdliche Unterstützung, seine Liebe und Motivation.

8.2 Veröffentlichungen

Berg C, Wilker S, Roider J, Klettner A

Isolation of porcine monocyte population: a simple and efficient method

Veterinary Research Communications, 2013, 37:239-241

(siehe Seite 64-66)

Hettich C, Wilker S, Mentlein R, Lucius R, Roider J, Klettner A

Retinal pigment epithelium (RPE) induces FasL and reduces iNOS and Cox2 in primary monocytes

Graefe`s Archive of Clinical and Experimental Ophthalmology, 2014; 252:1747-1754

(siehe Seite 67-74)

Kongressbeiträge

63. Tagung der Vereinigung Norddeutscher Augenärzte, 31. Mai - 1. Juni, Westerland, Sylt

Wilker S, **Berg C**, Lucius R, Klettner A

Modulation der Zytokinausschüttung von Monozyten durch TLR-3 aktiviertes retinales Pigmentepithel

ARVO Annual Meeting, Life-Changing Research, Seattle, Washington, May 5-9, 2013

Klettner A, Hamann T, Wilker S, **Berg C**, Schlüter K, Lucius R, Mentlein R, Roider J.

Differential effects of TLR-3 activated RPE on retinal microglia and blood-derived monocytes.

Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2013; 54:4519

Isolation of porcine monocyte population: a simple and efficient method

Christin Berg · Sebastian Wilker · Johann Roeder · Alexa Klettner

Accepted: 18 April 2013
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2013

Abstract Monocytes are important mediators of inflammatory processes and are in the focus of immunological studies. While the preparation of human monocytes is widely established, little is published on the isolation of porcine monocytes for experimental studies. The aim of this study is to establish a cost efficient method of preparing and culturing porcine monocytes of considerable purity and reasonable yield. In our method, we combined and modified different protocols of human monocyte preparation. The blood of a single pig is harvested and treated with EDTA to prevent coagulation. Peripheral blood mononuclear cells are obtained by a density gradient centrifugation using a Bicol gradient and monocytes are harvested by culturing on serum-treated culture flasks, rinsing and tapping. A high yield is obtained by constant cooling of flasks and tubes. The purity of the culture is evaluated by the expression of CD14, using flow cytometry. Using this method, we reached a purity of 92.6 % (+/- 3.06 %). With this procedure, we established a reliable method to prepare and cultivate porcine monocytes which can be performed cost effectively and does not require special equipment.

Keywords Monocyte isolation · Porcine culture · Cost effectiveness

Introduction

Blood monocytes belong to the innate immunity and are involved in a plethora of inflammatory processes in the body.

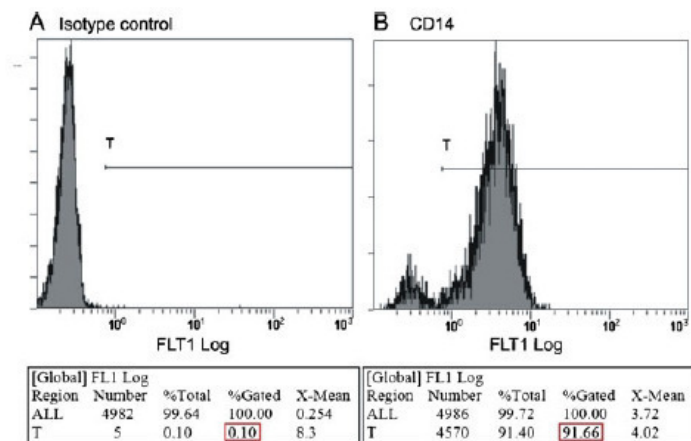
Monocytes of porcine origin are subject of a variety of studies, e.g. in the investigation of swine specific pathologies, such as the classical or African swine fever (Knoetig et al. 1999; Carrillo et al. 1994). Additionally, the innate immune system of swine and humans show many similarities (Fairbairn et al. 2011; Facci et al. 2010) and the pig is an interesting biomedical model organism (Piriou-Guzylack and Salmon 2008). While several protocols for isolating human monocytes exist in the literature (Wahl et al. 2006), (Leb et al. 1983), little is published on the isolation and culture of porcine monocytes. The aim of this study therefore was to establish a reliable protocol to isolate and culture monocytes of porcine origin. Current protocols for human monocytes isolation often involve expensive procedures, such as magnetic antibody cell sorting (Carrillo et al. 1994) or centrifugal elutriation (Malefyt de Waal et al. 1991), but we were aiming at a cost effective procedure that would result in a reasonable purity, based on density gradient centrifugation.

Material and methods

Monocytes were harvested using a Bicol-gradient centrifugation (based on Böyum 1968, with modifications). For this, 150–200 ml blood were collected immediately after slaughter in a 40 ml solution of PBS (PAA Laboratories, Pasching, Austria) with 0.4 g EDTA (SIGMA-Aldrich, Steinheim, Germany) and briefly swayed. Within two hours of collecting, the blood was further processed. The solution was diluted with an equal volume of PBS and 30 ml of this solution was carefully layered on 20 ml Bicol (Biochrom AG, Berlin, Germany) in a 50 ml Falcon tube. It is vital that the layers to not mix. The tubes were centrifuged at 600 g for 20 min without brakes. Peripheral mononuclear cells (PBMC) collect in the interphase ring. In order to detach parts of the interphase ring from the Falcon wall, the tube

C. Berg · S. Wilker · J. Roeder · A. Klettner (✉)
University Medical Center, Department of Ophthalmology,
University of Kiel, Arnold-Heller-Str. 3,
24105 Kiel, Germany
e-mail: aklettner@auge.uni-kiel.de

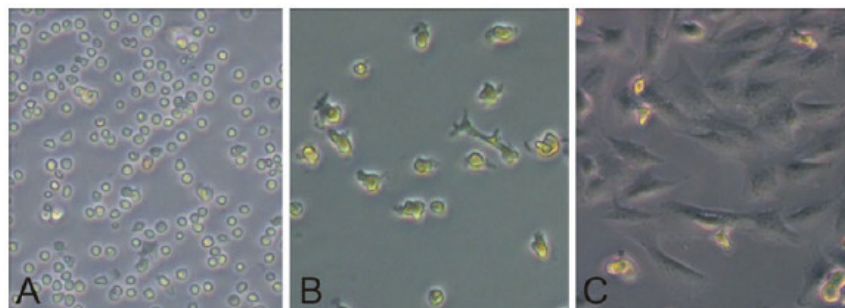
Fig. 1 Exemplary blot for cytometric measurement of CD14 on the cell surface by flow cytometry. **a** Measurement of the isotype control (negative control), **b** Measurement of CD14. Of the cells, 91.66 % are positive. In each measurement, 5,000 events were assessed



was lightly and slowly swayed. The interphase ring was collected in cold (4 °C) monocyte medium (RPMI 1640 (PAA), 1 % Penicillin/Streptomycin (PAA)+10 % fetal bovine serum (LINARIS GmbH, Wertheim-Bettingen, Germany)). The collected PBMC were washed in cold PBS. For this, they were centrifuged once for 10 min and twice for 5 min and the supernatant discharged and replaced. After the final wash, the supernatant was completely aspirated and the cells were resuspended in 60 ml monocyte medium at room-temperature with 0.1 % BSA (Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland) and equally applied to four prepared cell culture flasks (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany). In order to prepare the flasks, they were incubated at 37 °C with 10 ml/flask porcine serum (PAA) for at least an hour (based on Kumagi et al. 1979, with modifications). The serum was discarded and the flasks were briefly rinsed with PBS before the cells can be applied. The flasks filled with the cell suspension were incubated at 37 °C for an hour. After this time, the flasks were swayed, the medium discarded and warm (37 °C) monocyte medium was added. In order to remove non-adherent cells (based on Freundlich and Avdalovic 1983, with modifications), the flasks were again swayed and tapped with their side on a hard surface; the medium was discarded after this treatment. This was repeated at least four times in order to remove all cells that are not tightly bound to the surface of the flasks and to retain

only monocytes. After the last washing, it was controlled under the microscope whether cells still detach, and if so, the tapping and washing needed to be continued. After this procedure, 15 ml of monocyte medium was added and the flasks were incubated over night at 37 °C. For further processing the monocytes had to be detached from the surface of the flask. This was achieved by placing the flasks in ice for 1 h. For this, both the bottom and the top of the flask needed to be covered with ice. The cold induced a detachment of the cells. After the incubation on ice, the flasks were tapped strongly on a hard surface for several times and the medium was rinsed several times across the inner surface of the flask in order to detach all monocytes. The medium with the detached cells was collected in cooled 15 ml tubes and centrifuged for 8 min at 200 g. It is vital to keep the monocytes in cooled falcons only. The supernatant was aspirated and the monocytes were resuspended in PBS in order to assess their cell number in a trypan blue exclusion assay (Biochrom AG, Berlin, Germany) using a Neubauer counting chamber. The cells were cultured in monocytes medium at 37 °C and the medium was changed every 2 days. The culture was daily examined by light microscopy. The purity of the culture was evaluated by presence of CD14 on the cell surface by flow cytometry. For this, 10⁵ cells were resuspended in 1 % BSA in 100 µl PBS and 10 µl of the CD14 antibody MY4-FITC (Beckman Coulter Inc., Brea,

Fig. 2 Culture monocytes on (a) day1, b day 3 and (c) day 8 of culture. Pictures were taken with a light microscope



USA)(Ziegler-Heitbrock et al. 1994) or of MsIgG2b –FITC (Beckman Coulter Inc., Brea, USA) as a negative control was added, resuspended and incubated for 30 min in the dark at room temperature. The cells were washed, resuspended in 1 % BSA in PBS and applied to a Cytomics FC 500 (Beckman Coulter Inc., Brea, USA) flow cytometer. The percentage of CD14 positive cells was assessed and considered as purity (Fig. 1).

Results and discussion

With this protocol, we combined several known protocols of human monocyte preparation (Bøyum 1968; Kumagi et al. 1979; Freundlich and Avdalovic 1983) and modified the known protocols in order to establish a cost effective and reliable method for porcine monocyte preparation and culture.

We achieved a reproducible purity of the monocytes of 92.63 %±3.06 % in 33 different preparations (Fig. 1). From 125 ml porcine blood, we purified $15 \times 10^6 \pm 5.79 \times 10^6$ cells, with a vitality of more than 95 %. The monocytes displayed a morphological differentiation in culture as seen in the microscope (Fig. 2).

A crucial parameter for the successful preparation is the initial anticoagulation of the blood (Nielsen 1985), which worked best with using EDTA. The yield of the preparation is strongly dependent on the cooling of the monocytes during preparation to avoid binding of the monocytes to the tube walls, as monocytes detach in cool temperatures (Nielsen 1987), (Leb et al. 1983). Also, in our hands, of the different methods described for monocyte detachment, the cooling methods served best in order to detach monocytes from the culture flask for further evaluation (Nielsen 1987), (Leb et al. 1983).

In conclusion, we established a reliable method for the preparation of porcine monocytes of reasonable purity which can be cost effectively conducted and does not need special equipment as needed for magnetic bead isolation or centrifugal elutriation. This may help particularly small labs to prepare and do research on porcine monocytes.

Acknowledgments This project was financially supported by a research grant of the German Ophthalmological Society.

References

- Bøyum A (1968) Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest* 97(Suppl):77–89
- Carrillo C, Borca MV, Afonso CL, Onisk DV, Rock DL (1994) Long-term persistent infection of swine monocytes/macrophages with African swine fever virus. *J Virol* 68:580–583
- Facci MR, Auray G, Buchanan R, Van Kessel J, Thompson DR, Mackenzie-Dyck S, Babiuk LA, Gerds V (2010) A comparison between isolated blood dendritic cells and monocyte-derived dendritic cells in pigs. *Immunology* 129:396–405
- Fairbairn L, Kapetanovic R, Sester DP, Hume DA (2011) The mononuclear phagocyte system of the pig as a model for understanding human innate immunity and disease. *J Leukoc Biol* 89:855–871
- Freundlich B, Avdalovic N (1983) Use of gelatin/plasma coated flasks for isolating human peripheral blood monocytes. *J Immunol Meth* 62:31–37
- Knoetig SM, Summerfield A, Spagnuolo-Weaver M, McCullough KC (1999) Immunopathogenesis of classical swine fever: role of monocyte cells. *Immunology* 97:359–366
- Kumagi K, Itoh K, Hinuma S, Tada M (1979) Pretreatment of plastic Petri dish with fetal calf serum. A simple method for macrophage isolation. *J Immunol Methods* 29:17–25
- Leb L, Crusberg T, Fortier N, Snyder LM (1983) Evaluation of methods using adherence to substrate and density gradient for the isolation of human monocytes. *J Immunol Methods* 58:309–321
- Malefyt de Waal R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE (1991) Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 174:1209–1220
- Nielsen H (1985) Influence of five different anticoagulants on human blood monocyte isolation and functional activities. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand C* 93:49–52
- Nielsen H (1987) Isolation and functional activity of human blood monocytes after adherence to plastic surfaces: comparison of different detachment methods. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand C* 95:81–84
- Pirou-Guzylack L, Salmon H (2008) Membrane markers of the immune cells in swine: an update. *Vet Res* 39:54
- Wahl LM, Wahl SM, Smythies LE, Smith PD (2006) Isolation of human monocyte populations. *Curr Protoc Immunol* Chapter 7, Unit 7.6A
- Ziegler-Heitbrock HW, Appl B, Käßlerlein E, Löffler T, Jahn-Henninger H, Gutensohn W, Nores JR, McCullough K, Passlick B, Labeta MO et al (1994) The antibody MY4 recognizes CD14 on porcine monocytes and macrophages. *Scand J Immunol* 40:509–514

The retinal pigment epithelium (RPE) induces FasL and reduces iNOS and Cox2 in primary monocytes

Christin Hettich · Sebastian Wilker · Rolf Mentlein ·
Ralph Lucius · Johann Roeder · Alexa Klettner

Received: 10 March 2014 / Revised: 30 June 2014 / Accepted: 8 July 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract

Purpose Retinal pigment epithelium (RPE) cells may alter the phenotype of monocytes by soluble factors that may be influenced by stimulation of the RPE. Since RPE cells carry the toll-like receptor-3 (TLR3) that detects and reacts to viral infection through binding of dsRNA we investigated the effects of RPE cells with or without TLR3 stimulation on blood-derived monocytes with respect to regulation of pro-/anti-inflammatory cytokines, anti-angiogenic factors and migratory properties.

Methods Primary RPE cells were prepared from porcine eyes; monocytes were prepared from porcine blood. TLR3 activation was induced by polyinosinic:polycytidylic acid (Poly I:C). RPE cells were stimulated with Poly I:C in different concentrations for 24 hours and a cell culture supernatant was applied to the monocytes. Expression of CD14 and Fas ligand (FasL) was determined via flow cytometry. The expression of IL-6, IL-1 β , TNF α , Cox2, iNOS and IL-10 was determined via quantitative RT-PCR. Migration was determined using Boyden chamber experiments.

Results The supernatant of RPE cells, irrespective of TLR3 activation, induced FasL expression in the monocytes. Expression of iNOS and Cox2 was reduced by RPE cells and the reduction of Cox2 but not if iNOS was lost under TLR3 activation. No induction of IL-6, IL-1 β , IL-10 or TNF α by the RPE was seen. TLR3-activated RPE cells induced monocyte migration.

Conclusion RPE cells induce an upregulation of FasL and a downregulation of iNOS and Cox2 without upregulating

inflammatory cytokines, possibly inducing an anti-angiogenic phenotype in the monocytes. This phenotype is still upheld after challenging RPE cells with dsRNA, mimicking a viral infection.

Keywords RPE · Monocytes · TLR3 · Inflammation

Introduction

Monocytes are suggested to be involved in the pathology of various ocular diseases, including age-related macular degeneration (AMD). The involvement of monocytes in AMD is controversially discussed as both protective and degenerative functions of monocytes have been described [1, 2]. Monocytes can assume different phenotypes that may either be pro-inflammatory and anti-angiogenic, or anti-inflammatory and pro-angiogenic, depending on the expression of different cytokines and surface molecules by the monocytes [3]. These phenotypes may be induced by external stimuli and also change as an effect of aging; with aging monocytes displaying a reduced expression of FasL and an increased expression of IL-10 [4].

The RPE is located between the choroid and the photoreceptors. It has a plethora of functions in the retina [5] of which one is the regulation of the immune response in the retina [6]. The eye is a classic immune-privileged region where this privilege is actively maintained. The RPE plays a pivotal role in upholding the immune privilege since these cells express FasL that inactivates or kills T-cells and secrete cytokines such as pigment epithelium-derived factor (PEDF) or thrombospondin, both suppressing the immune response [7–12]. At the same time the RPE is at the front line of potential infections in the retina and an easy target (e.g., for viral infection) [13]. Consequently, the RPE expresses several receptors as danger signals and is equipped to react to them by

C. Hettich · S. Wilker · J. Roeder · A. Klettner (✉)
Department of Ophthalmology, University of Kiel, University
Medical Center, Arnold-Heller-Str. 3, 24105 Kiel, Germany
e-mail: aklettner@auge.uni-kiel.de

R. Mentlein · R. Lucius
Department of Anatomy, University of Kiel, Kiel, Germany

the secretion of various cytokines [14]. Moreover, the RPE can be activated to secrete pro-inflammatory cytokines and, as such, may contribute to ocular inflammation [15, 16].

The RPE can interact with other cell types of the innate immune system; this has been especially shown for monocytes. While cell-cell interaction may have dramatic effects on the function of RPE as well as monocytes [15, 17], a direct interaction is an unusual situation as these cell types are generally not in close proximity. Only pathological alterations such as AMD, proliferative vitreoretinopathy, or uveitis may result in direct cellular contacts [18–20]. Mostly the RPE regulates monocyte cell function without cell-cell contact via soluble factors which may be an important interaction especially when danger signals are detected by the RPE [21].

A danger-associated pattern recognition receptor is the toll-like receptor-3 (TLR3). TLR3 recognizes double stranded RNA [22, 23] that is found at some stage of the replication cycle in most viruses but can also be found as a consequence of cell death. This has recently been shown for RPE cells and has been suggested to be involved in the development of geographic atrophy (GA), the late stage of dry AMD [24]. The pathophysiological origin of GA is the deterioration of the RPE followed by a secondary deterioration of the choroid and photoreceptors [25]. Activation of TLR3 has been described as a possible factor in GA RPE deterioration where the toxicity of TLR3 activation and a correlation between TLR3 polymorphisms and protection against development of GA was shown [26]. While the correlation of TLR3 polymorphisms and GA is controversially discussed [27, 28], TLR3-mediated toxicity in the RPE might be of further interest as a factor in GA progression. However, RPE cells do not only react to TLR3 activation by cell death. They express TLR3 receptors and react to its activation by secreting various cytokines such as the monocyte chemo-attractant protein (MCP)-1, Interleukin-6 (IL-6), IL-8, Interferon- β (IFN- β) or vascular endothelial growth factor (VEGF) [29–31]. In a previous study we confirmed the expression of TLR3 on porcine RPE cells as used in this study [31].

In this study we wished to evaluate the influence of RPE cells with and without TLR3 activation on monocytes in order to investigate a possible influence of stimulated RPE cells on the monocyte phenotype. We assessed the migratory response, FasL expression, and the expression of IL-10, IL-6, IL-1 β , cyclooxygenase (Cox) 2, inducible nitric oxide synthase (iNOS) and tumor necrosis factor (TNF) α .

In our study we found that the RPE induces FasL expression and the reduction of Cox2 and iNOS expression indicating an anti-angiogenic phenotype in monocytes. Under TLR3 activation, reduction of Cox2 expression is lost.

Material and methods

Cell culture

RPE cells

Porcine RPE cells were prepared as previously described [32]. In brief, eyes obtained from the local abattoir were cleaned of adjacent tissue and immersed briefly in antiseptic solution. The anterior part of the eye was removed as well as the lens, vitreous and retina. Each eye cup was incubated with trypsin at 37 °C; trypsin solution was removed and substituted with trypsin-EDTA to detach the cells. RPE cells were gently pipetted off the choroid, collected in media and washed. Cells were cultivated in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; PAA, Cölbe, Germany) supplemented with penicillin/streptomycin (1%, PAA), HEPES (25 mM, PAA), sodium-pyruvate (110 mg/ml, PAA) and 10% fetal calf serum (Linaris GmbH, Wertheim-Bettingen, Germany). The best morphological characteristics are found in porcine RPE cells in passage 1–4 that have been confluent for less than 4 weeks [33]. In order to avoid de-differentiation due to a cell culture aging phenomena, all experiments were conducted with confluent cells of passage 2; these cells display a characteristic cobble-stone morphology and are still pigmented.

Monocytes

Porcine monocytes were prepared as previously published [34]. In brief, peripheral mononuclear cells (PBMCs) from blood of freshly slaughtered pigs were obtained by Ficoll-gradient centrifugation. PBMCs were applied to cell culture flasks (Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland) previously treated with porcine serum and non-adherent cells were removed by swaying and tapping. The medium was discarded and the treatment repeated until no detaching cells could be found via light microscopy. Cells were incubated in a monocyte medium overnight. The vitality of the cells was tested via a trypan blue exclusion assay in a Neubauer cell chamber and the monocyte purity was detected by CD14 expression using flow cytometry (see below).

Treatment of cells

RPE cells secrete a variety of factors that may influence their cellular environment. In order to obtain the physiologically relevant RPE-derived mediators after TLR3 activation, RPE cells were treated with different concentrations of Poly I:C (1 μ g/ml, 10 μ g/ml) in serum-free DMEM supplemented with 1% penicillin/streptomycin and non-essential amino acids for 24 hours. We have previously shown that porcine RPE cells

express TLR3 and that these concentrations activate TLR3 in porcine RPE cells, as shown by IFN- β secretion [31]. The medium was collected, centrifuged and filtered through a 0.4 μ m pore filter and the filtered supernatant was applied to the monocytes on the 2nd day of the culture. For this, the medium of the monocytes was discarded and either the supernatant of the RPE or serum free DMEM supplemented with 1% penicillin/streptomycin and non-essential amino acids with the appropriate concentration of Poly I:C was added to the cells. The cells were incubated and processed for further experimentation after 4 days.

Cell lysis

In order to investigate the expression of TLR3 in RPE cells after Poly I:C stimulation, cells were incubated for 24 hours with 1 μ g/ml or 10 μ g/ml Poly I:C and the cells were harvested and lysed as previously described [32]. In brief, the cells were scraped off in PBS, centrifuged and the pellet was resuspended in DLB-buffer (Tris pH 7.4, 10 mM, 1% SDS, protease inhibitor, phosphatase inhibitor). Samples were heated at 95° for 5 min, sonicated by ultrasound and centrifuged. The protein concentration of the supernatant was determined using the BioRad protein assay with bovine serum albumin (BSA) as a standard.

Western Blot

Western blotting was conducted as described elsewhere with modification [32]. In brief, whole cell lysate was separated under reducing conditions on a 12% SDS polyacrylamide gel and transferred onto PVDF membranes, blocked in 4% skim milk in Tris-buffered saline with 0.1% Tween (TTBS) for 1 hour at room temperature and incubated over night at 4° with a primary TLR3 antibody (eBioscience, Frankfurt, Germany) or β -actin (Cell Signaling Technology, Frankfurt, Germany). On the next day the blot was washed with TTBS and incubated with a peroxidase-conjugated anti-mouse or anti-rabbit secondary antibody (Cell Signaling Technology) for 30 min at room temperature. After the final wash the blot was developed with an Immobilon chemiluminescence reagent (Millipore) and the signal was detected with an MF-ChemiBis 1.6 (Biostep, Jahnsdorf, Germany).

Flow cytometry

Flow cytometry was employed to evaluate the expression of CD14 and FasL. For this, monocytes were collected, washed, counted and 10^5 cells were resuspended in 1% BSA in PBS with the appropriate antibody or isotype control (CD14 antibody MY4-FITC

(Beckman Coulter Inc., Brea, USA) [35]; MsIgG2b-FITC (Beckman Coulter Inc., Brea, USA); FasL-PE (Acris, Herford, Germany); IgG1-PE (AbD SeroTec, Oxford, UK)). All antibodies used react with porcine proteins. Cell suspension was thoroughly mixed, incubated for 30 min in the dark at room temperature, washed, resuspended in 1% BSA in PBS and applied to a Cytomics FC 500 (Beckman Coulter Inc., Brea, USA) flow cytometer.

Migration Assay

For the evaluation of monocyte migration a Chemotaxis chamber (NeuroProbe Inc, Gaithersburg, USA) with a 5 μ m pore polycarbon filter (NeuroProbe Inc.) was used. The RPE were treated and the supernatant was collected as described above. The wells of the lower part of the Chemotaxis chamber were filled with the respective supernatant in six replicates and a monocyte solution (2.5×10^6 monocytes/ml) in serum-free DMEM supplemented with 1% penicillin/streptomycin and non-essential amino acids were added to the upper well. The chamber was incubated at 37 °C. After 20 hours, the filter was collected and non-migrated cells were removed using a wiper blade (Neuro Probe Inc.). The migrated cells were fixed in methanol and stained with hematoxylin (Merck, Darmstadt, Germany). The filter was positioned on a glass slide, scanned and the optical density of the migration spots was determined using the PCBAS2.0 program.

Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

Total RNA was isolated by a TRIZOL reagent (Life Technologies) as previously described [36]. One μ g of total RNA was converted into cDNA with the high-capacity cDNA reverse transcription kit as previously described [37]. The expression of IL-6, IL-1 β , IL-10, Cox2 and iNOS was evaluated in Real Time PCR using porcine-specific TaqMan Gene expression arrays (Life Technologies, Darmstadt, Germany; TNF α : Ss 03391318_g1; IL-6: Ss 03384604_u1; IL-1 β : Ss 03393804_m1; iNOS: Ss03374608_u1; Cox2: Ss03394695_g1; IL10: Ss03382372_u1). Target gene expression was normalized on the expression values of 18S rRNA (Hs999999_01s1) and fold change values were calculated using the comparative Ct method [38].

Statistics

All experiments were repeated independently three to seven times. Significance was evaluated using an unpaired student's t-test, and a p value of 0.05 or less was considered significant. Statistics were evaluated in STATISTICA 7.1 and Microsoft Excel. Graphs are depicted as mean and standard deviation.

Results

TLR3 expression on RPE cells

TLR3 expression on RPE cells was investigated via Western blotting. Untreated RPE cells as well as RPE cells treated with 1 $\mu\text{g/ml}$ or 10 $\mu\text{g/ml}$ Poly I:C expressed TLR3 (Fig. 1).

Purity of collected monocytes (CD14 expression)

Monocyte purity was determined by CD14 expression. A mean purity of $93.49 \pm 2.39\%$ was achieved. A representative measurement is shown in Fig. 2.

FasL expression

When treated with an RPE supernatant monocytes induced significant FasL expression irrespective of Poly I:C treatment (Fig. 3a).

Migration

When treated with an RPE supernatant monocytes display a tendency to migrate that reaches significance when the RPE was treated with 1 $\mu\text{g/ml}$ Poly I:C. Control is set as 100% migration (Fig. 3b).

Cytokine expression

The expression of IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF α , Cox2 and iNOS was evaluated in qRT-PCR experiments. The untreated control was set as 1.

The RPE supernatant did not influence the expression of TNF α , irrespective of TLR3 activation (Fig. 4a).

Untreated RPE supernatant did not influence the expression of IL-1 β in monocytes. However, RPE treated with 1 $\mu\text{g/ml}$ Poly I:C significantly reduced IL-1 β expression compared to monocyte treatment with 1 $\mu\text{g/ml}$ Poly I:C (Fig. 4b).

The RPE supernatant did not influence the expression of IL-6, irrespective of TLR3 activation (Fig. 4c).

TLR3 expression in RPE

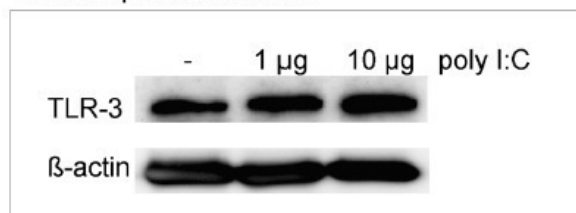
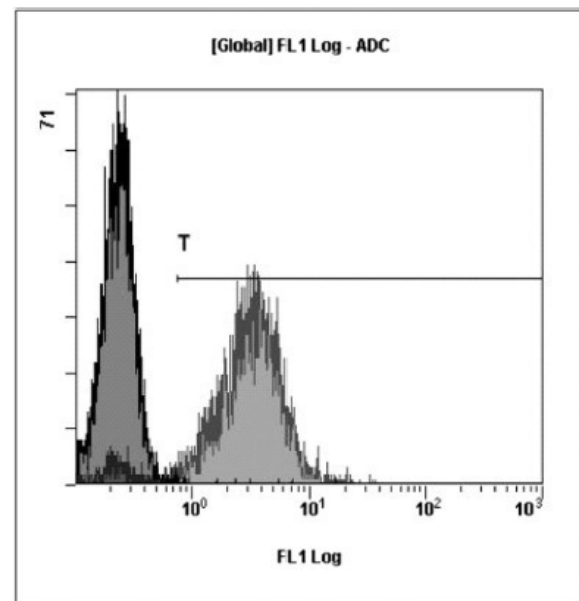


Fig. 1 TLR3 expression in RPE cells. RPE cells were treated 24 hours with 1 $\mu\text{g/ml}$ or 10 $\mu\text{g/ml}$ Poly I:C and the expression of TLR3 was investigated in a Western blot. Both untreated and Poly I:C-treated RPE cells displayed TLR3 expression. β -actin was used as a control. An exemplary blot is shown



■ CD14 antibody: 92,31% positive
■ Negative control: 0,32% positive

Fig. 2 CD14 expression. Freshly prepared monocytes were assessed for their CD14 expression via flow cytometry. An IgG2b-isotype control was used as a negative control. An exemplary cytometric measurement is shown

The RPE supernatant did not influence the expression of IL-10, irrespective of TLR3 activation (Fig. 4d).

iNOS expression was significantly reduced by the RPE supernatant without a Poly I:C challenge and when RPE have been pretreated with 10 $\mu\text{g/ml}$ Poly I:C (Fig. 4e).

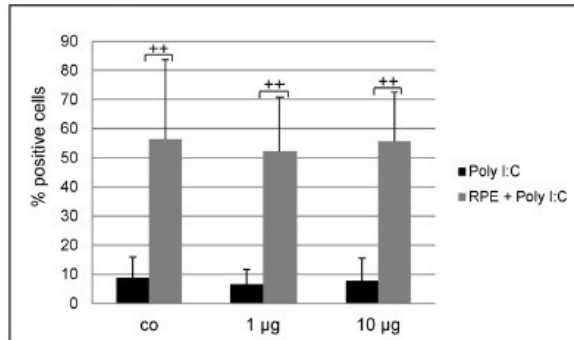
Cox2 expression was significantly reduced by the RPE supernatant without Poly I:C treatment (Fig. 4f).

Discussion

In our study we investigated the effect of RPE cells with or without previous TLR3 activation on the phenotype of monocytes, which may be of importance in regard to possible pathological aspects in retinal diseases, especially AMD. TLR3 is generally considered a sentinel for viral infections but perhaps also for detection of RNA of necrotic cells, hence detecting tissue degeneration [22, 24]. We were able to confirm the expression of TLR3 on RPE cells and showed that TLR3 was also expressed on RPE cells when stimulated with Poly I:C [31].

We found that the RPE robustly induced FasL expression in monocytes irrespective of TLR3 activation. While quiescent monocytes do not express FasL, they can be induced to do so by the appropriate stimuli [2, 39, 40]. The expression of FasL is part of the anti-angiogenic regulation in the retina [41,

a) FasL Expression



b) Migration

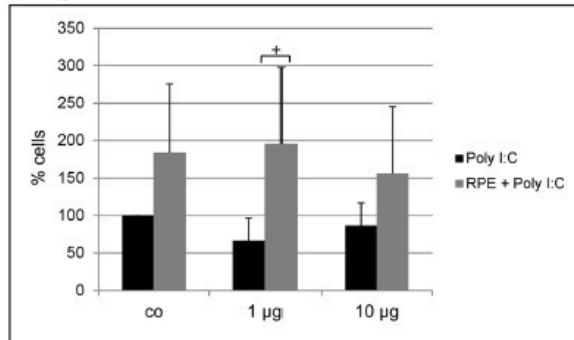


Fig. 3 FasL expression and migration monocytes were treated with 0, 1 or 10 µg/ml Poly I:C or with a supernatant of RPE cells treated for 24 hours with 0, 1 or 10 µg/ml Poly I:C. (a) FasL expression was detected via flow cytometry. The IgG1-PE isotype acted as negative control. FasL expression is significantly induced by an RPE supernatant, irrespective of Poly I:C stimulation. (b) Migration was assessed using a Boyden chamber. RPE supernatant seems to induce migration in monocytes which reaches significance when RPE cells were incubated with 1 µg/ml Poly I:C. The control was set as 100% and error bars depict standard deviation. Statistical significance was evaluated with a student's t-test: + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$

42] and the expression of FasL in monocytes results in a reduction of choroidal neovascularization that is mediated by FasL-induced cell death [2]. Our data show that an RPE supernatant generally upregulates FasL expression in monocytes which may be an active feature in order to uphold the anti-angiogenic micro environment of the retina. Additionally, FasL is an important factor in upholding the immune privilege of the eye [3] and limits the inflammatory response of viral infections [43]. In a recent article the connection between monocyte FasL expression with immune privilege and anti-angiogenesis is discussed, which stresses the importance of FasL expression by monocytes in the resistance of AMD development. In their article the authors postulate that in aged monocytes, the IL-10 expression increases, which induces a pro-angiogenic phenotype in monocytes [11]. In this context our data suggest that RPE cells may take an active part in upholding the anti-inflammatory and anti-angiogenic

phenotype of monocytes by inducing FasL independent of induction of pro-inflammatory or pro-angiogenic cytokines. The direct interaction of monocytes and RPE has been described to induce RPE cell death [44] that may be induced by FasL, as expressed by monocytes when stimulated by RPE cells. However, RPE cells are rather resistant to FasL-induced cell death unless specific pro-inflammatory cytokines, such as TNF α or IFN γ , are present in the microenvironment of the cells [45]. The induction of TNF α or IFN γ as a result of TLR3 activation has not been described so far for RPE cells and we did not find an induction of TNF α in the monocytes which may indicate that the microenvironment of the RPE cells is not promoting RPE cell death.

In our study a moderate stimulation of RPE cells with Poly I:C induced a significant migration of monocytes. The RPE secretes chemokines that are chemotactic for monocytes [46] and TLR3 activation has previously been shown to induce MCP-1 secretion by RPE cells [30], which corresponds well to the data we present. An induction of migration may result in a cell-cell contact of RPE cells with monocytes as RPE cells are able to bind to monocytes. Such an interaction may result in the secretion of even more MCP-1 that in turn may attract more monocytes [15, 47]. As MCP-1-activated monocytes increase apoptosis in RPE cells [48] and cell-cell contact has been previously shown to induce RPE cell death [44] an enhanced migratory response may result in enhanced RPE apoptosis. However, the migratory response induced by TLR3 activation was not very profound in our study and, as such, may not result in an overly prominent cell-cell contact.

We did not find an increase in IL-10 expression that was described for a murine monocyte cell line treated with RPE supernatant from murine eyecups [7]. In our study we worked with a porcine model and both the RPE and the monocytes were the primary cells, which may be an explanation for the contrast to published data, especially when considering the genetically diverse origin of the monocytes. As IL-10 expression in monocytes is discussed to be pro-angiogenic and has been described to be involved in the development of CNV [2] the lack of its upregulation by the RPE may be an indication that RPE cells avoid inducing a pro-angiogenic phenotype consistent with the necessity to preserve retinal function.

RPE cells reduce iNOS expression in monocytes. Moreover, iNOS expression in monocytes is strongly reduced by RPE cells in which TLR3 had previously been stimulated. iNOS has been shown to be an important factor in VEGF-mediated choroidal neovascularization [49, 50]. Similar to our findings concerning FasL, this suggests that the RPE may be inducing an anti-angiogenic phenotype in monocytes to protect the function of the retina. Additionally, unchallenged RPE cells reduced the expression of Cox2. Cox2 is also implicated in participating in VEGF-mediated choroidal neovascularization [51]. In

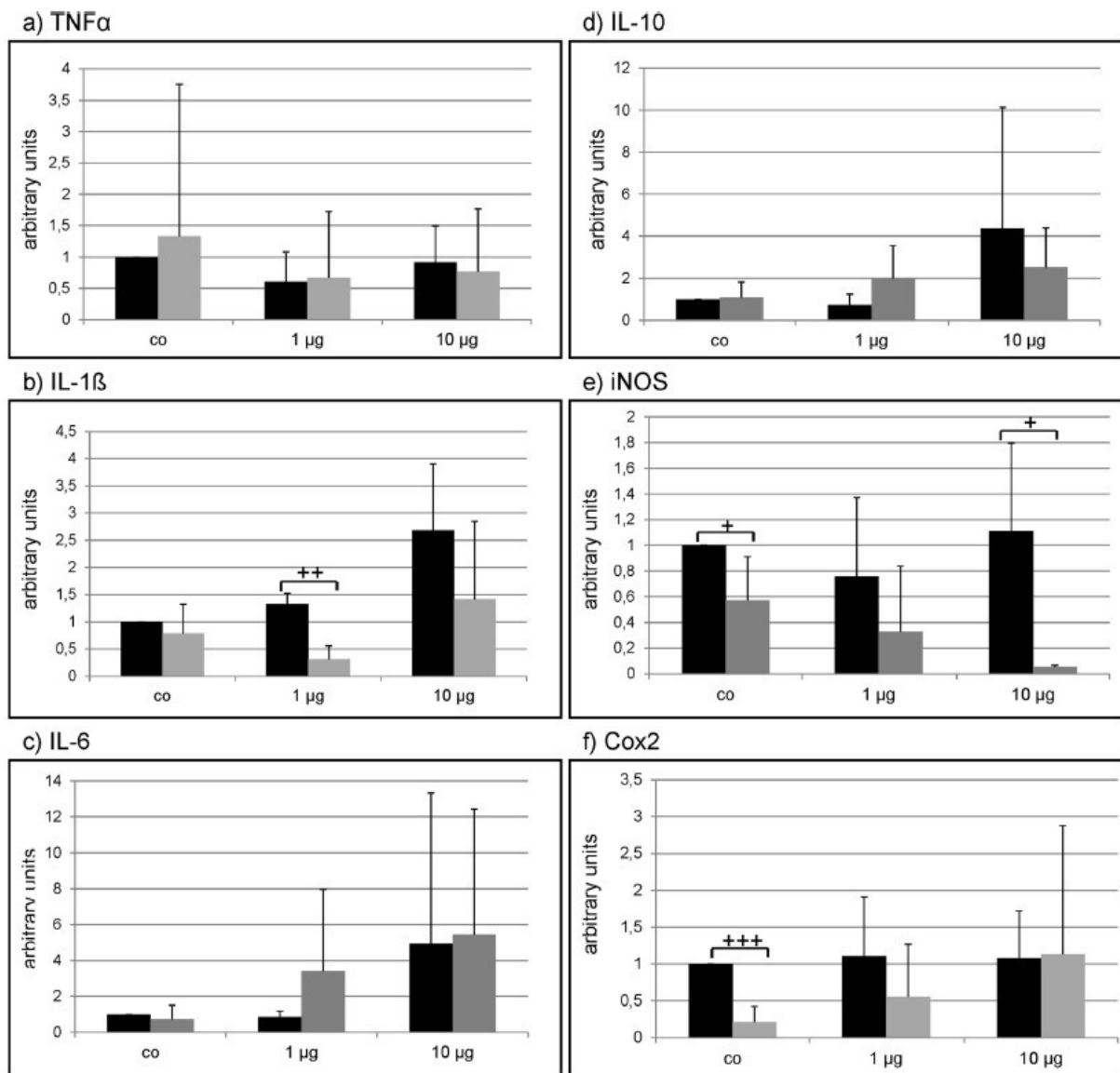


Fig. 4 Cytokine expression. Monocytes were treated with 0, 1 or 10 μg/ml Poly I:C or with an RPE supernatant, treated for 24 h with 0, 1 or 10 μg/ml Poly I:C. Cytokine expression of TNFα (a), IL-1β (b), IL-6 (c), IL-10 (d), iNOS (e) and Cox2 (f) was investigated with Real-Time PCR. No effect on TNFα, IL-6, or IL-10 could be found. IL-1β

expression was reduced by the RPE when challenged with 1 μg/ml Poly I:C. Both iNOS and Cox2 expression was reduced by the RPE supernatant. The reduction of Cox2 was lost under TLR3 stimulation. Error bars depict standard deviation. Significance was evaluated via a student's t-test: + $p < 0.05$

contrast to the expression of FasL or iNOS the reduction of Cox2 is lost under TLR3 stimulation.

No upregulation of pro-inflammatory cytokines such as IL-1β, IL-6, or TNFα by RPE cells could be found in this study, clearly indicating that TLR3 activation of RPE cells does not result in a pro-inflammatory phenotype in monocytes. Indeed, the expression of IL-1β is reduced by RPE cells treated with 1 μg/ml Poly I:C. This indicates a differential effect of activated RPE cells on microglia and blood-derived monocytes [52].

The usage of porcine cells in a study concerning possible pathophysiological mechanisms of a human disease is not as common as the use of other models (e.g., murine cells). However, of the non-primate animals the porcine eye can be considered very similar to the human eye regarding anatomy and physiology. Morphology, size, perfusion and the retinal organisation is very similar to humans as both have 10 layers and are of comparable thickness [53–55]. Moreover, in immunological aspects the pig can be considered to be very close

to humans, e.g., regarding IgG homology [56] or the presence and features of retinal microglia, which is very similar between humans and pigs and very different from rats or mice [31, 57].

Another issue that needs to be addressed concerning our presented data is the rather high standard deviation seen in the RT-PCR results. The cells used for these experiments are not derived from a cell line or pooled from a collection of specimens but reflect individual, genetically diverse pigs that were raised in non-sterile, normal farming conditions. As the results indicate, data reflecting real life conditions were obtained.

In summary, RPE cells induce an anti-angiogenic phenotype in monocytes by inducing FasL expression and reduction of iNOS and Cox2. Even under TLR3 activation, as during viral attack or in necrotic tissue degeneration, RPE cells uphold the anti-angiogenic phenotype, still inducing FasL and reducing iNOS.

Acknowledgments This project was supported by the German Ophthalmological Society. Data of this study has been presented at the ARVO meeting 2013. No conflict of interest exists regarding this study. Independently of this study, AK has received research funding and lecture fees and has acted as a consultant for Novartis Pharma.

References

- Espinosa-Heidmann DG, Suner IJ, Hernandez EP, Monroy D, Csaky KG, Cousins SW (2003) Macrophage depletion diminishes lesion size and severity in experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:3586–3592
- Apte RS, Richter J, Herndon J, Ferguson TA (2006) Macrophages inhibit neovascularization in a murine model of age-related macular degeneration. *PLoS Med* 3:e310
- Ferguson TA, Griffith TS (2006) A vision of cell death: Fas ligand and immune privilege 10 years later. *Immunol Rev* 213:228–238
- Kelly J, Ali Khan A, Yin J, Ferguson TA, Apte RS (2007) Senescence regulates macrophage activation and angiogenic fate at sites of tissue injury in mice. *J Clin Invest* 117:3421–3426
- Strauss O (2005) The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev* 85:845–881
- Detrick B, Hooks JJ (2010) Immune regulation in the retina. *Immunol Res* 47:153–161
- Zamiri P, Masli S, Kitaichi N, Taylor AW, Streilein JW (2005) Thrombospondin plays a vital role in the immune privilege of the eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46:908–919
- Sugita S, Futagami Y, Smith SB, Naggar H, Mochizuki M (2006) Retinal and ciliary body pigment epithelium suppress activation of T lymphocytes via transforming growth factor beta. *Exp Eye Res* 83:1459–1471
- Vega JL, Saban D, Carrier Y, Masli S, Weiner HL (2010) Retinal pigment epithelial cells induce foxp3(+) regulatory T cells via membrane-bound TGF- β . *Ocul Immunol Inflamm* 18:459–469
- Gregerson DS, Heuss ND, Lew KL, McPherson SW, Ferrington DA (2007) Interaction of retinal pigmented epithelial cells and CD4 T cells leads to T-cell anergy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48:4654–4663
- Ferguson TA, Apte RS (2008) Angiogenesis in eye disease: immunity gained or immunity lost? *Semin Immunopathol* 30:111–119
- Jorgensen 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. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:1590–1599
- Huemer HP, Larcher C, Kirchebner W, Klingenschmid J, Göttinger W, Irschick EU (1996) Susceptibility of human retinal epithelial cells to different viruses. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 234:177–185
- Kaamiranta K, Salminen A (2009) Age-related macular degeneration: activation of innate immunity system via pattern recognition receptors. *J Mol Med* 87:117–123
- Bian ZM, Elner SG, Yoshida A, Elner VM (2003) Human RPE-monocyte co-culture induces chemokine gene expression through activation of MAPK and NIK cascade. *Exp Eye Res* 76:573–583
- Elner VM, Strieter RM, Elner SG, Baggiolini M, Lindley I, Kunkel SL (1990) Neutrophil chemotactic factor (IL-8) gene expression by cytokine-treated retinal pigment epithelial cells. *Am J Pathol* 136:745–750
- Elner SG, Yoshida A, Bian ZM, Kindezeliskii AL, Petty HR, Elner VM (2003) Human RPE cell apoptosis induced by activated monocytes is mediated by caspase-3 activation. *Trans Am Ophthalmol Soc* 101:77–92
- 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. *Br J Ophthalmol* 94:918–925
- Jerdan JA, Pepose JS, Michels RG, Hayashi H, de Bustros S, Sebag M, Glaser BM (1989) Proliferative vitreoretinopathy membranes. An immunohistochemical study. *Ophthalmology* 96:801–810
- Yang P, de Vos AF, Kijlstra A (1997) Macrophages and MHC class II positive cells in the choroid during endotoxin induced uveitis. *Br J Ophthalmol* 81:396–401
- Lau CH, Taylor AW (2009) The immune privileged retina mediates an alternative activation of J774A.1 cells. *Ocul Immunol Inflamm* 17:380–389
- Matsumoto M, Kikkawa S, Kohase M, Miyake K, Seya T (2002) Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signalling. *Biochem Biophys Res Commun* 293:1364–1369
- Doyle SE, O'Connell R, Vaidya SA, Chow EK, Yee K, Cheng G (2003) Toll-like receptor 3 mediates a more potent antiviral response than Toll-like receptor 4. *J Immunol* 170:3565–3571
- Kleinman ME, Kaneko H, Cho WG, Dridi S, Fowler BJ, Blandford AD, Albuquerque RJ, Hirano Y, Terasaki H, Kondo M, Fujita T, Ambati BK, Tarallo V, Gelfand BD, Bogdanovich S, Baffi JZ, Ambati J (2012) Short-interfering RNAs induce retinal degeneration via TLR3 and IRF3. *Mol Ther* 20:101–108
- McLeod DS, Grebe R, Bhutto I, Merges C, Baba T, Lutty GA (2009) Relationship between RPE and choriocapillaris in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50:4982–4991
- Yang Z, Stratton C, Francis PJ, Kleinman ME, Tan PL, Gibbs D, Tong Z, Chen H, Constantine R, Yang X, Zeng J, Davey L, Ma X, Hau VS, Wang C, Harmon J, Buehler J, Pearson E, Patel S, Kaminoh Y, Watkins S, Luo L, Zabriskie NA, Bernstein PS, Cho W, Schwager A, Hinton DR, Klein ML, Hamon SC, Simmons E, Yu B, Campochiaro B, Sunness JS, Campochiaro P, Jorde L, Parmigiani G, Zack DJ, Katsanis N, Ambati J, Zhang K (2008) Toll-like receptor 3 and geographic atrophy in age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 359:1456–1463
- Cho Y, Wang JJ, Chew E, Ferris FL, Mitchell P, Chan CC, Tuo J (2009) Toll-like receptor polymorphisms and age-related macular degeneration: replication in three case-control samples. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50:5614–5618
- Zhou P, Fan L, Yu KD, Zhao MW, Li XX (2011) Toll-like receptor 3 C1234T may protect against geographic atrophy through decreased dsRNA binding capacity. *FASEB J* 25:3489–3495

29. Kumar MV, Nagineni CN, Chin MS, Hooks JJ, Detrick B (2004) Innate immunity in the retina: Toll-like receptor (TLR) signaling in human retina pigment epithelial cells. *J Neuroimmunol* 153:7–15
30. Ebihara N, Chen L, Tokura T, Ushio H, Iwatsu M, Murakami A (2007) Distinct functions between toll-like receptors 3 and 9 in retinal pigment epithelial cells. *Ophthalmic Res* 39:155–163
31. Klettner A, Koinzer S, Meyer T, Roeder J (2013) Toll-like receptor 3 activation in retinal pigment epithelium cells – Mitogen-activated protein kinase pathways of cell death and vascular endothelial growth factor secretion. *Acta Ophthalmol* 91:e211–e218
32. Klettner A, Roeder J (2008) Comparison of bevacizumab, ranibizumab, and pegaptanib: efficiency and possible additional pathways. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:4523–4527
33. Wiencke AK, Kilgaard JF, Nicolini J, Bundgaard M, Röpke C, la Cour M (2003) Growth of cultured porcine retinal pigment epithelial cells. *Acta Ophthalmol* 81:170–176
34. Berg C, Wilker S, Roeder J, Klettner A (2013) Isolation of porcine monocyte population: a simple and efficient method. *Vet Res Commun* 37:239–241
35. Ziegler-Heitbrock HW, Appl B, Käßlerlein E, Löffler T, Jahn-Henninger H, Gutensohn W, Nores JR, McCullough K, Passlick B, Labeta MO et al (1994) The Antibody MY4 Recognizes CD14 on Porcine Monocytes and Macrophages. *Scand J Immunol* 40:509–514
36. Klettner A, Baumgrass R, Zhang Y, Fischer G, Bürger E, Herdegen T, Mielke K (2001) The neuroprotective actions of FK506 binding protein ligands: neuronal survival is triggered by de novo RNA synthesis, but is independent of inhibition of JNK and Calcineurin. *Brain Res Mol Brain Res* 97:21–31
37. Tang S, Lucius R, Wenck H, Gallinat S, Weise JM (2013) UV-mediated downregulation of the endocytic collagen receptor, Endo 180, contributes to accumulation of extracellular collagen fragments in photoaged skin. *J Dermatol Sci* 70:42–48
38. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR an the 2^{(-Delta Delta C (T))} method. *Methods* 25:402–408
39. Liles WC, Kiener PA, Ledbetter JA, Aruffo A, Klebanoff SJ (1996) Differential expression of Fas (CD95) and Fas ligand on normal human phagocytes: implications for the regulation of apoptosis in neutrophils. *J Exp Med* 184:429–440
40. Brown SB, Savill J (1999) Phagocytosis triggers macrophage release of Fas ligand and induces apoptosis of bystander leukocytes. *J Immunol* 162:480–485
41. Kaplan HJ, Leibole MA, Tezel T, Ferguson TA (1999) Fas ligand (CD95 ligand) controls angiogenesis beneath the retina. *Nat Med* 5:292–297
42. Davis MH, Eubanks JP, Powers MR (2003) Increased retinal neovascularization in Fas ligand-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:3202–3210
43. Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA (1995) Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 270:1189–1192
44. Yoshida A, Elner SG, Bian ZM, Kindezelskii AL, Petty HR, Elner VM (2003) Activated monocytes induce human retinal pigment epithelial cell apoptosis through caspase-3 activation. *Lab Invest* 83:1117–1129
45. Esser P, Heimann K, Abts H, Fontana A, Weller M (1995) CD95 (Fas/APO-1) antibody-mediated apoptosis of human retinal pigment epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 213:1026–1034
46. Rosenbaum JT, O'Rourke L, Davies G, Wenger C, David L, Robertson JE (1987) Retinal pigment epithelial cells secrete substances that are chemotactic for monocytes. *Curr Eye Res* 6:793–800
47. Yoshida A, Elner SG, Bian ZM, Kunkel SL, Lukacs NW, Elner VM (2001) Thrombin regulates chemokine induction during human retinal pigment epithelial cell/monocyte interaction. *Am J Pathol* 159:1171–1180
48. Yang D, Elner SG, Chen X, Field MG, Petty HR, Elner VM (2011) MCP-1 activated monocytes induce apoptosis in human retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52:6026–6034
49. Ando A, Yang A, Nambu H, Campochiaro PA (2002) Blockade of nitric-oxide synthase reduces choroidal neovascularization. *Mol Pharmacol* 62:539–544
50. Ando A, Yang A, Mori K, Yamada H, Yamada E, Takahashi K, Saikia J, Kim M, Melia M, Fishman M, Huang P, Campochiaro PA (2002) Nitric oxide is proangiogenic in the retina and choroid. *J Cell Physiol* 191:116–124
51. Houssier M, Raoul W, Lavalette S, Keller N, Guillonnet X, Baragatti B, Jonet L, Jeanny JC, Behar-Cohen F, Coceani F, Scherman D, Lachapelle P, Ong H, Chemtob S, Sennlaub F (2008) CD36 deficiency leads to choroidal involution via COX2 down-regulation in rodents. *PLoS Med* 5:e39
52. Klettner A, Hamann T, Schlüter K, Lucius R, Roeder J (2014) Retinal pigment epithelium cells alter the pro-inflammatory response of retinal microglia to TLR-3 stimulation. *Acta Ophthalmol*. doi:10.1111/aos.12472
53. Lassota N (2008) Clinical and histological aspects of CNV formation: studies in an animal model. *Acta Ophthalmol* 86:1–24
54. Sanchez I, Martín R, Ussa F, Fernandez-Bueno I (2011) The parameters of the porcine eyeball. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 249:475–482
55. Middleton S (2010) Porcine Ophthalmology. *Vet Clin N Am Food Anim Pract* 26:557–572
56. Butler JE, Sun J, Wertz N, Sinkora M (2006) Antibody repertoire development in swine. *Dev Comp Immunol* 30:199–211
57. Yang P, Chen L, Zwart R, Kijlstra A (2002) Immune cells in the porcine retina: Distribution, characterization and morphological features. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:1488–1492

8.3 Lebenslauf

Name Christin Hettich, geb. Berg
Geburtsdatum 07. Juni 1987
Geburtsort Schwerin
Familienstand verheiratet
 1 Tochter, geb. 23.09.2013

Berufliche Laufbahn

Seit 03/2016 Ärztin im Jugendärztlichen Dienst des Kreises Rendsburg-Eckernförde

Akademische Laufbahn

10/2006 – 06/2015 Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
06/2015 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
08/2008 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr

10/2012 – 02/2013 Wahltertial Allgemeinmedizin - Praxis Dr. Ramm/Grunwald, Kiel
06/2012 – 10/2012 Tertial Innere Medizin - Westküstenklinikum Heide
02/2012 – 06/2012 Tertial Chirurgie - UKSH Campus Kiel

Famulaturen

10/2011 Praxis Radiologie, MVZ Prüner Gang Kiel
03/2011 Klinik für Ophthalmologie, UKSH Campus Kiel
10/2010 Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, UKSH Campus Kiel
09/2010 Praxis Innere Medizin – Diabetologie, Praxis Dabelstein/Just Kiel
03/2010 Frauenklinik, Helios Klinik Schwerin
09/2009 Klinik für Dermatologie, UKSH Campus Kiel

Studienbegleitendes Engagement

- 2006 - 2011** Mitglied der Fachschaft Medizin Kiel
- 2009 - 2011** Leitung der Hochschulgruppe Kiel der
SEG - Med (Studentische Einkaufsgemeinschaft Medizin)
- 2007 - 2010** Mitglied im Konvent der Medizinischen Fakultät

Schulische Laufbahn

- 2003 – 2006** Fachgymnasium der
Beruflichen Schule der Landeshauptstadt Schwerin
Fachrichtung Gesundheit und Soziales
- 1999 – 2003** Gymnasium in Dorf Mecklenburg
- 1997 – 1999** Realschule in Lübstorf
- 1993 – 1997** Grundschule in Lübstorf

Borgstedt, 09. Juni 2016