Aus der Klinik für Ophthalmologie

(Direktor Prof. Dr. J. Roider)

im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Anti-VEGF Therapie unter Entzündungsparametern – Auswirkungen auf Zellvitalität und Zytokinsekretion im retinalen Pigmentepithel

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Katrin Josefine Winkelmann

aus Haltern

Kiel 2020

1. Berichterstatterin:	Prof. Dr. Alexa Karina Klettner
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Ralph Lucius
Tag der mündlichen Prüfung:	21.04.2021
zum Druck genehmigt, Kiel den	02.02.2021
gezeichnet:	Prof. Dr. Alexa Karina Klettner (Vorsitzende der Prüfungskommission)

Meiner Familie

The more I study nature, the more I stand amazed at the work of the Creator.

Louis Pasteur (1822-1895)

Inhaltsverzeichnis

Seite

INHALTSVERZEICHNIS I

ABBILDUNGSVERZEICHNIS III

TABELLENVERZEICHNIS IV

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS V

I EINLEITUNG 1

I.1 DIE ANATOMIE DER RETINA 1

I.2 DAS RETINALE PIGMENTEPITHEL (RPE) 3

I.2.1 Aufgaben des Retinalen Pigmentepithels 4

I.2.1.1 Blut-Retina-Schranke 4

I.2.1.2 Transportfunktion und Versorgung der Photorezeptoren 4

I.2.1.3 Visueller Zyklus - Phagozytose und Recycling der Rezeptoraußensegmente 4

I.2.1.4 Schutz vor oxidativem Stress 5

I.2.1.5 Sekretion von Wachstumsfaktoren 5

I.3 AUFRECHTERHALTUNG DES IMMUNPRIVILEGS UND REGULATION VON ENTZÜNDUNG 5

I.4 DIE ALTERSABHÄNGIGE MAKULADEGENERATION – AMD 7

I.4.1 Formen der AMD 7

I.4.2 Pathogenese der AMD 8

I.4.3 Anti-VEGF Therapie 11

I.4.4 Geographische Atrophie unter Anti-VEGF Therapie? 12

I.5 INFLAMMATORISCHE STIMULATION DURCH ENTZÜNDUNGSMEDIATOREN 13

I.6 AMD-RELEVANTE ZYTOKINE 14

I.7 ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT 16

II MATERIAL UND METHODEN 18

II.1 MATERIAL 18

II.1.1 Geräte und Instrumente 18

II.1.2 Verbrauchsmaterialien 19

II.1.3 Chemikalien 19

II.1.4 Zellkulturmedien und Reagenzien 20

II.1.5 Zusammensetzung von Puffer und Lösungen 20

II.1.6 ELISA Kits 20

II.1.7 Medikamente und Inhibitoren 21

II.1.8 Software 21

II.2 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN 22
II.2.1 RPE Zellen in der Zellkultur 22
II.2.1.1 Präparation von primären porcinen RPE Zellen aus Schweineaugen und ihre Kultivierung 22
II.2.1.2 Stimulation der porcinen RPE Zellen 23
II.2.2 Bestimmung der Zellvitalität mittels MTT- Toxizitätsassay 25
II.3 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODE 26
II.3.1 Gewinnung von Zellkulturüberständen 26
II.3.2 Bestimmung der Zytokinausschüttung mittels ELISA 26
II.4 STATISTIK 28

III ERGEBNISSE 28

III.1 RPE ZELLVITALITÄT UNTER ENTZÜNDUNGSMEDIATOREN UND VEGF-INHIBITOREN 29
III.1.1 Zellvitalität unter alleiniger Stimulation mit Entzündungsmediatoren 29
III.1.2 Kurz- und mittelfristige Effekte der Kombination von VEGF-Inhibitoren und Entzündungsmediatoren auf die Zellvitalität 30
III.1.3 Langfristige Effekte der Kombination von VEGF-Inhibitoren und Entzündungsmediatoren auf die Zellvitalität 34
III.2 ZYTOKINAUSSCHÜTTUNG DES RPE UNTER ENTZÜNDUNGSMEDIATOREN UND VEGF-INHIBITOREN 38
III.2.1 IL-1β Zytokinsekretion unter Entzündungsparametern 38
III.2.1.1 IL-1β Sekretion unter Behandlung mit VEGF-Inhibitoren 39
III.2.2 IL-6 Zytokinsekretion unter Entzündungsparametern 41
III.2.2.1 IL-6 Sekretion unter Behandlung mit VEGF-Inhibitoren 42
III.2.3 IL-8 Zytokinsekretion unter Entzündungsparametern 46
III.2.3.1 IL-8 Sekretion unter Behandlung mit VEGF-Inhibitoren 46
III.2.4 TNFα Zytokinsekretion unter Entzündungsparametern 50
III.2.4.1 TNFα Sekretion unter Behandlung mit VEGF-Inhibitoren 51

IV DISKUSSION 54

IV.1 TOXIZITÄT DER ANTI-VEGF THERAPIE 56
IV.2 ZYTOKINSEKRETION DES RPE 60
IV.3 KRITIK AN DER METHODIK 65
IV.4 FAZIT 66

V ZUSAMMENFASSUNG 67

VI LITERATURVERZEICHNIS 69

VII ANHANG 82

VIII PUBLIKATIONEN 98

IX DANKSAGUNG 99

X ERKLÄRUNG 100

Abbildungsverzeichnis

		Seite
Abbildung 1:	Ultrastruktur der Photorezeptorzelle und die Lagebeziehung zu den Retinaschichten	**1**
Abbildung 2:	Zusammenfassung der Funktionen des retinalen Pigmentepithels	**3**
Abbildung 3:	molekularbiologisches Konzept der AMD-Entstehung	**9**
Abbildung 4:	Pipettierschema einer 12-*well*-Platte	**24**
Abbildung 5:	Ablauf des MTT- Toxizitätsassay	**25**
Abbildung 6:	Skizze von der Funktionsweise des *Sandwich*-ELISAs	**27**
Abbildung 7:	Vitalität unter Entzündungsmediatoren	**29**
Abbildung 8:	Kurz- und mittelfristige Vitalität unter Poly I:C und VEGF-Inhibitoren	**31**
Abbildung 9:	Kurz- und mittelfristige Vitalität unter LPS und VEGF-Inhibitoren	**32**
Abbildung 10:	Kurz- und mittelfristige Vitalität unter TNFα und VEGF-Inhibitoren	**33**
Abbildung 11:	Vitalität in der Langzeitstimulation unter Poly I:C und VEGF-Inhibitoren	**35**
Abbildung 12:	Vitalität in der Langzeitstimulation unter LPS und VEGF-Inhibitoren	**36**
Abbildung 13:	Vitalität in der Langzeitstimulation unter TNFα und VEGF-Inhibitoren	**37**
Abbildung 14:	IL-1β Sekretion unter Entzündungsmediatoren	**39**
Abbildung 15:	IL-1β Sekretion unter Poly I:C und VEGF-Inhibitoren	**40**
Abbildung 16:	IL-1β Sekretion unter Entzündungsmediatoren und VEGF-Inhibitoren	**41**
Abbildung 17:	IL-6 Sekretion unter Entzündungsmediatoren	**42**
Abbildung 18:	IL-6 Sekretion unter Poly I:C und VEGF-Inhibitoren	**43**
Abbildung 19:	IL-6 Sekretion unter LPS und VEGF-Inhibitoren	**44**
Abbildung 20:	IL-6 Sekretion unter TNFα und VEGF-Inhibitoren	**45**
Abbildung 21:	IL-8 Sekretion unter Entzündungsmediatoren	**46**
Abbildung 22:	IL-8 Sekretion unter Entzündungsmediatoren und VEGF-Inhibitoren	**47**
Abbildung 23:	IL-8 Sekretion unter LPS und VEGF-Inhibitoren	**48**
Abbildung 24:	IL-8 Sekretion unter TNFα und VEGF-Inhibitoren	**49**
Abbildung 25:	TNFα Sekretion unter Entzündungsmediatoren	**51**
Abbildung 26:	TNFα Sekretion unter Entzündungsmediatoren und VEGF-Inhibitoren	**52**

Tabellenverzeichnis

		Seite
Tabelle 1:	Verwendete Geräte und Instrumente	**18**
Tabelle 2:	Verwendete Verbrauchsmaterialien	**19**
Tabelle 3:	Verwendete Chemikalien	**19**
Tabelle 4:	Verwendete Zellkulturmedien und -reagenzien	**20**
Tabelle 5:	Verwendete Puffer und Lösungen und ihre Zusammensetzung	**20**
Tabelle 6:	Verwendete ELISA Kits	**20**
Tabelle 7:	Verwendete Medikamente und Inhibitoren	**21**
Tabelle 8:	Verwendete Software	**21**
Tabelle 9:	Kurzfristige Vitalität unter Poly I:C und VEGF-Inhibitoren	**82**
Tabelle 10:	Mittelfristige Vitalität unter Poly I:C und VEGF-Inhibitoren	**82**
Tabelle 11:	Langfristige Vitalität unter Poly I:C und VEGF-Inhibitoren	**83**
Tabelle 12:	Kurzfristige Vitalität unter LPS und VEGF-Inhibitoren	**83**
Tabelle 13:	Mittelfristige Vitalität unter LPS und VEGF-Inhibitoren	**84**
Tabelle 14:	Langfristige Vitalität unter LPS und VEGF-Inhibitoren	**84**
Tabelle 15:	Kurzfristige Vitalität unter TNFα und VEGF-Inhibitoren	**85**
Tabelle 16:	Mittelfristige Vitalität unter TNFα und VEGF-Inhibitoren	**85**
Tabelle 17:	Langfristige Vitalität unter TNFα und VEGF-Inhibitoren	**86**
Tabelle 18:	IL-1β Sekretion unter Poly I:C und VEGF-Inhibitoren	**87**
Tabelle 19:	IL-1β Sekretion unter LPS und VEGF-Inhibitoren	**88**
Tabelle 20:	IL-1β Sekretion unter TNFα und VEGF-Inhibitoren	**89**
Tabelle 21:	IL-6 Sekretion unter Poly I:C und VEGF-Inhibitoren	**90**
Tabelle 22:	IL-6 Sekretion unter LPS und VEGF-Inhibitoren	**91**
Tabelle 23:	IL-6 Sekretion unter TNFα und VEGF-Inhibitoren	**92**
Tabelle 24:	IL-8 Sekretion unter Poly I:C und VEGF-Inhibitoren	**93**
Tabelle 25:	IL-8 Sekretion unter LPS und VEGF-Inhibitoren	**94**
Tabelle 26:	IL-8 Sekretion unter TNFα und VEGF-Inhibitoren	**95**
Tabelle 27:	TNFα-Sekretion unter Poly I:C und VEGF-Inhibitoren	**96**
Tabelle 28:	TNFα-Sekretion unter LPS und VEGF-Inhibitoren	**97**

Abkürzungsverzeichnis

A. dest.	Aqua destillata
Abb.	Abbildung
Afli	Aflibercept
AMD	Altersabhängige Makuladegeneration
Beva	Bevacizumab
BrM	Bruch-Membran
bzw.	beziehungsweise
CNV	Choroidale Neovaskularisation
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DNA	*Deoxyribonucleic Acid*
dsRNA	Doppelstrang-RNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*
FCS	Fetales Kälberserum
GA	Geographische Atrophie
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MTT	Methyl thiazolyl tetrazolium
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Versuchswiederholungen
NaCl	Natriumchlorid
nAMD	neovaskuläre AMD
NFkB	*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
n.s.	nicht signifikant
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PEDF	*Pigment Epithelium Derived Factor*
PGF	Plazenta-Wachstumsfaktor

Poly I:C	Polyinosin-Polycytidylsäure
PR	Photorezeptorzelle
RNA	*Ribonucleic acid*
ROS	*Reactive Oxygen Species*, Reaktive Sauerstoffspezies
RPE	Retinales Pigmentepithel
siRNA	*small interfering* RNA
SA	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNFα	Tumornekrosefaktor alpha
U/Min	Umdrehungen pro Minute
VEGF	*Vascular Endothelial Growth Factor*
z.B.	zum Beispiel
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

I Einleitung

I.1 Die Anatomie der Retina

Der sensorische Apparat, die Retina (Netzhaut), liegt im hinteren Abschnitt des Augapfels (Bulbus oculi) und wird auch als innere Augenhaut bezeichnet. Sie ist in der Lage die einfallenden Lichtimpulse in neuronale Reaktionen zu transferieren, die an das Gehirn weitergeleitet werden. Histologisch lässt die Retina sich in 10 Schichten einteilen, von denen 9 Schichten zur neurosensorischen Retina zählen, die apikal an den Glaskörper grenzt. Die basal gelegene zehnte Schicht ist das Retinale Pigmentepithel (RPE), auf dessen zentrale Bedeutung in Abschnitt I.1.1. näher eingegangen wird. Über die basalen Einstülpungen des RPE hat die Retina direkten Kontakt mit dem angrenzenden Kompartiment, der Bruch-Membran und der darunter liegenden Choroidea (Aderhaut) (Abb. 1). Auf die äußerste Schicht der Retina, das RPE, folgt nach apikal die Photorezeptorschicht, die äußere Grenzschicht, die äußere Körnerschicht, die äußere plexiforme Schicht, die innere Körnerschicht, die innere plexiforme Schicht, die Ganglienzellschicht, die Nervenfaserschicht und die innere Grenzschicht (Abb. 1b).

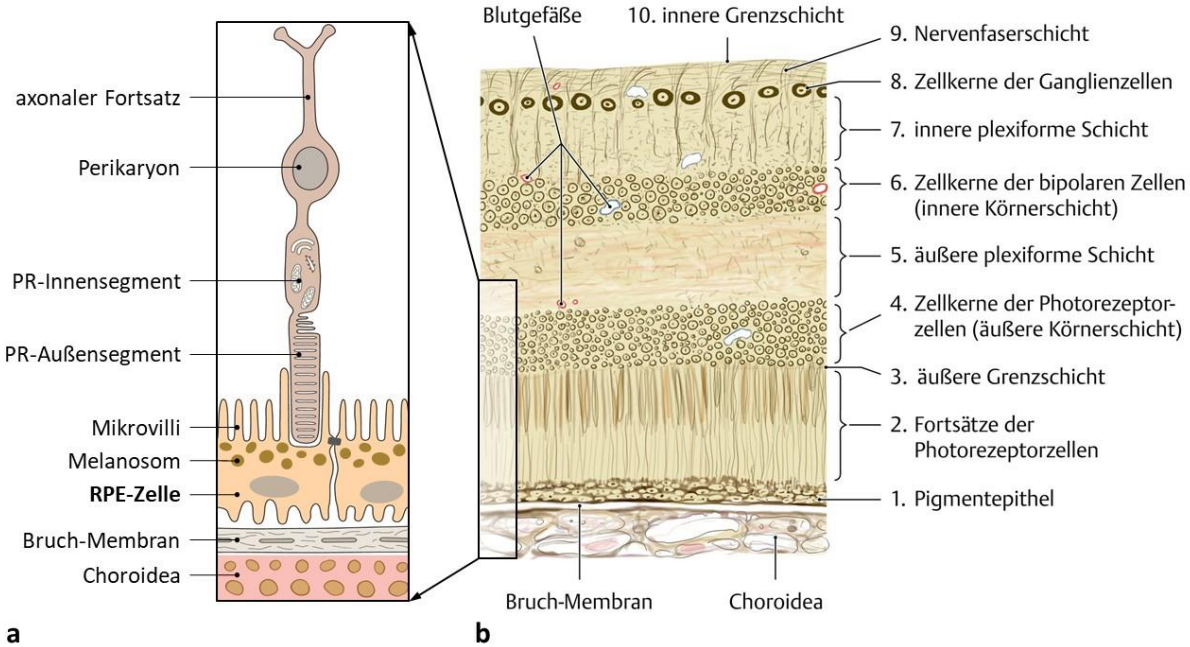


Abbildung 1: Ultrastruktur der Photorezeptorzelle und die Lagebeziehung zu den Retinaschichten. Dargestellt ist der schematische Aufbau (a) einer Photorezeptorzelle (PR), deren Außensegmentspitze manschettenartig von den retinalen Pigmentepithel-Zellen (RPE) umfasst wird. Basal folgt der funktionelle Komplex aus Pigmentepithel, Bruch-Membran und Choroidea. Die PR-Zelle wird in ihrer Lage zu den Retinaschichten (b) abgebildet, die aus der ersten Schicht, dem RPE, und den neun Schichten der neurosensorischen Retina besteht (zusammengesetzt aus: (a) Kellner und Wachtlin 2008 und (b) Schünke et al. 2015)

In Abbildung 1 ist (a) der schematische Aufbau der Photorezeptorzellen (PR) (Kellner et al. 2008) sowie deren Lagebeziehung zu den (b) Retinaschichten (Schünke et al. 2015) dargestellt. Die Photorezeptoren bestehen aus einem kurzen axonalen Fortsatz, dem Perikaryon, das der äußeren plexiformen Schicht zuzuordnen ist. Das Perikaryon befindet sich in der äußeren Körnerschicht. Außerdem bestehen die Photorezeptoren aus einem lichtempfindlichen Fortsatz in der Photorezeptorschicht, dessen Spitze manschettenartig von den retinalen Pigmentepithelzellen (RPE) umfasst wird. Die sensorischen Fortsätze bestehen aus dem Innensegment, welches das metabolische Zentrum der Zelle darstellt und dem lichtempfindlichen Außensegment, das das in Biomembranen eingebaute Sehpigment Rhodopsin enthält. An diesen sensorischen Fortsätzen geschieht die Phototransduktion. Die Außensegmente werden permanent erneuert, indem Pakete von Membranstapeln an der Spitze der Außensegmente abgeworfen werden, um vom RPE phagozytiert und abgebaut zu werden (Lüllmann-Rauch und Asan 2019). Für die Funktionsfähigkeit der Photorezeptorzellen sind ein hohes Maß an Sauerstoff, Glukose und Schutzmechanismen vor destruktiven Einflüssen entscheidend (Bhutto und Lutty 2012; Klettner 2015a). Es werden zwei Typen der Photorezeptorzellen unterschieden. Dabei handelt es sich zum einem um Stäbchenzellen, die über eine hohe Lichtempfindlichkeit verfügen und für das Dämmerungssehen zuständig sind und zum anderen um die Zapfenzellen. Sie dienen vor allem dem Farbsehen bei Tag und verfügen über eine geringere Lichtempfindlichkeit. Die farbeempfindlichen Zapfen sind am meisten in der Macula lutea (gelber Fleck) vorzufinden, einem Bereich von 3 mm Durchmesser, der für das präzise Sehen verantwortlich ist. In diesem Bereich befindet sich die Fovea centralis (Sehgrube), eine trichterförmige Vertiefung der Retina, die den Ort des schärfsten Sehens darstellt. In der Fovea befinden sich fast ausschließlich Zapfen und es liegt ein 1:1 Verhältnis der Photorezeptoren zu den nachgeschalteten Neuronen vor, was eine hohe Sehschärfe ermöglicht. Die Vertiefung kommt dadurch zustande, dass in der Fovea die apikal von den Photorezeptoren liegenden Retinaschichten an den Trichterrand verlagert sind und es somit nicht zu Lichtstreuung durch die darüber liegenden Schichten kommt. So erfolgt hier die Versorgung der Photorezeptoren komplett über die Choroidea (Aderhaut) und nicht aus dem retinalen Kapillarnetz der A. centralis retinae, wobei die Diffusion durch die Bruch-Membran (BrM) und das RPE erfolgen muss (Lüllmann-Rauch und Asan 2019). In der übrigen peripher gelegenen Retina ist die Choroidea etwa zu 90% und die retinalen Gefäße etwa zu

10% für die Versorgung der Photorezeptoren mit Nährstoffen und Sauerstoff verantwortlich (Wangsa-Wirawan und Linsenmeier 2003; Klettner 2015b).

I.2 Das Retinale Pigmentepithel (RPE)

Die Retinale Pigmentepithelschicht stellt den äußersten Anteil der zehnschichtigen Retina dar und vermittelt vor allem den Stoffaustausch zwischen der Choroidea und den Photorezeptoren. Sie interagiert direkt mit den Außensegmenten indem es diese manschettenartig über lange Mikrovilli umfasst. Basaolateral haftet sie der Bruch-Membran (BrM) fest an und ist hier in tiefe Falten geworfen (Strauss 2005). Das RPE ist ein einschichtig kubisches Epithel aus hexagonalen Zellen. Diese sind durch Haftkomplexe mit Zell-Zell-Verbindungen (*tight junctions*) miteinander verbunden und bilden mit dem Endothel der retinalen Blutgefäße die Blut-Retina-Schranke. Die Zellen enthalten im Gegensatz zum basalen unpigmetierten Anteil, der den Zellkern trägt, im anterioren Bereich zahlreiche Melanosomen im Zytoplasma. Das Pigment Melanin verhindert Lichtreflexe, was die Photorezeptoren vor Streulicht schützt und somit zur Sehschärfe beiträgt (Lüllmann-Rauch und Asan 2019). Außerdem verfügt es über eine Vielzahl von Funktionen, die zur Aufrechterhaltung des Sehvorgangs unerlässlich sind und im Weiteren genauer ausgeführt werden. In Abbildung 2 sind diese Funktionen schematisch dargestellt. Dabei wird deutlich, dass ein Untergang des RPE nicht mit einer langfristig fortwährenden Photorezeptorfunktion vereinbar ist (Strauss 2005; Bhutto und Lutty 2012; Klettner 2015a).

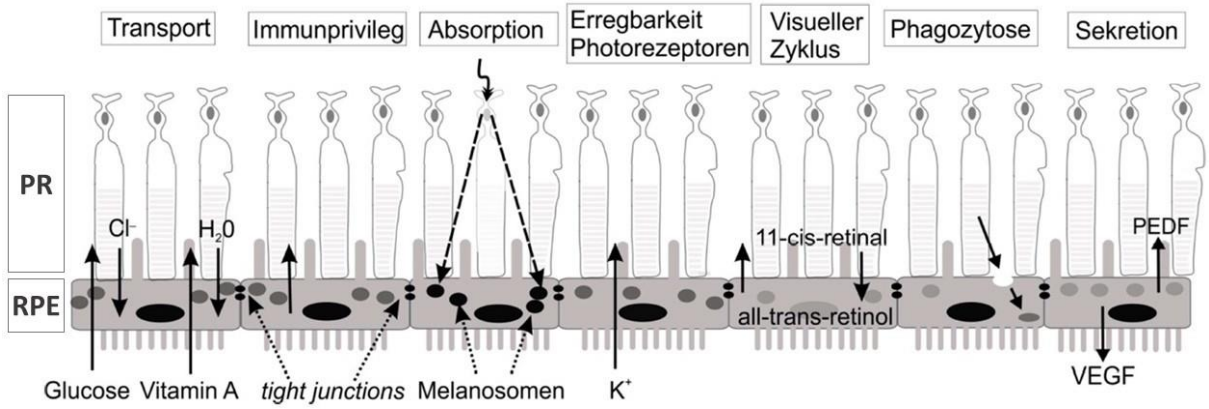


Abbildung 2: Zusammenfassung der Funktionen des retinalen Pigmentepithels. Dargestellt ist das einschichtig kubische retinale Pigmentepithel (RPE), das eine Vielzahl von Funktionen erfüllt, die für das Überleben der Photorezeptoren (PR) und die Aufrechterhaltung ihrer Funktion von zentraler Bedeutung sind. PEDF = *Pigment Epithelium Derived Factor*; VEGF = *Vascular Endothelial Growth Factor* (nach Richert 2017 und Strauss 2005).

I.2.1 Aufgaben des Retinalen Pigmentepithels (RPE)

I.2.1.1 Blut-Retina-Schranke

Wie unter I.2 beschrieben, bilden die RPE Zellen mit dem Endothel der retinalen Blutgefäße die Korrelate der Blut-Retina-Schranke. Sie dient in erster Linie der Neuroretina als Schutzbarriere und schirmt die Photorezeptoren vom Blutkreislauf und damit vor möglichen Schadstoffen ab. So trägt die Blut-Retina-Schranke auch zur Aufrechterhaltung des Immunprivilegs bei, was unter I.3 näher erläutert wird (Klettner 2015b). Da die Photorezeptoren durch die Barriere keinen Kontakt zum Blutgefäßsystem haben, müssen alle Metabolite das RPE passieren, was eine weitere wichtige Funktion des RPE darstellt (Strauss 2005).

I.2.1.2 Transportfunktion und Versorgung der Photorezeptoren

Das RPE gewährleistet einen beständigen transzellulären Transport von Sauerstoff und anderen Nährstoffen und dient den Photorezeptoren als unverzichtbares Transportorgan. Zum einem transportiert das RPE Elektrolyte, Wasser und metabolische Endprodukte der PR vom subretinalen Raum zur Aderhaut (basolaterale Seite). In die andere Richtung werden Glukose und andere Nährstoffe wie Vitamin A (all-trans-Retinol) vom Blut zu den Photorezeptoren (apikale Seite) transportiert (Strauss 2005). Die ständige Eliminierung von Wasser aus dem subretinalen Raum erzeugt außerdem Adhäsionskräfte, die in enger struktureller Wechselwirkung mit dem Stützgewebe der Neuroretina stehen (To und Hodson 1998; Léveillard et al. 2019; Sinha et al. 2020).

I.2.1.3 Visueller Zyklus - Phagozytose und Recycling der Rezeptoraußensegmente

Das RPE ist des Weiteren für die Phagozytose der Photorezeptor-Außensegmente verantwortlich, die permanent von den Rezeptorspitzen abgeworfen werden. Das all-trans-retinal wird durch das RPE einem Recyclingprozess zugeführt, während die übrigen phagozytierten Membranpakete abgebaut und über Exozytose an die Choroidea abgegeben werden (Flannery et al. 1990). Der Großteil des 11-cis-Retinals wird während des Sehzyklus zwischen RPE und Photorezeptoren ausgetauscht, in dem all-trans-Retinal vom RPE aufgenommen, zu 11-cis-Retinal isomerisiert und an die Photorezeptoren abgegeben wird, wo

es erneut die Phototransduktionskaskade initiieren kann (Strauss 2005). Durch das RPE kann der visuelle Zyklus ungestört ablaufen und die Photorezeptoren bleiben konstant erregbar (Shin et al. 2018).

I.2.1.4 Schutz vor oxidativem Stress

Durch die starke UV-Einstrahlung, die hohe metabolische Aktivität und einen hohen Sauerstoffgehalt sind die Zellen der Retina einem hohen oxidativem Stress ausgesetzt. Die RPE Zellen verfügen daher über einige protektive Mechanismen, wie z.B. das eingelagerte Melanin, detoxifizierende Systeme, Autophagie oder die Sekretion von Wachstumsfaktoren, wie VEGF, um sich gegen Schäden durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zu schützen (Klettner 2012; Mitter et al. 2014; Zhang et al. 2020).

I.2.1.5 Sekretion von Wachstumsfaktoren

Ein weiterer protektiver Faktor für die Neuroretina ist die Produktion und Ausschüttung zahlreicher Wachstumsfaktoren durch das RPE. Sie dienen der Aufrechterhaltung der Integrität des funktionellen Komplexes aus RPE, BrM und Aderhaut. Zu ihnen zählen beispielsweise *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) (Adamis et al. 1993), sein natürlichen Gegenspieler der *Pigment Epithelium Derived Factor* (PEDF) (Tombran-Tink et al. 1995) und der *Transforming Growth Factor beta* (TGF-ß) (Lee et al. 1999).

I.3 Aufrechterhaltung des Immunprivilegs und Regulation von Entzündung

Das Auge ist im Allgemeinen ein immunprivilegierter Raum, indem die erworbene Immunantwort aktiv unterdrückt wird, während das angeborene Immunsystem das Gewebe schützt. Hierbei spiel das RPE eine Schlüsselrolle, indem es verschiedene immunregulatorische Funktionen übernimmt (Zamiri et al. 2007; Klettner 2015b). Das RPE schirmt die Photorezeptoren in Form der Blut-Retina-Schranke vom Blutkreislauf ab, was zum Schutz vor möglicherweise schädlichen Bestandteilen, wie Krankheitserregern oder immunreaktiven Zellen aus dem Blut, wie z.B. T-Zellen oder Makrophagen, dient. Es verhindert zudem die Aktivierung des Komplementsystems sowie der T-Zellen und Makrophagen (Niederkorn 2006; Zamiri et al. 2007) und kann proapoptotische Liganden wie z.B. den Fas-Liganden exprimieren, der die T-Zellapoptose einleiten kann (Jørgensen et al. 1998). Dadurch entsteht das

Immunprivileg der Netzhaut (Klettner 2015a). Das RPE fördert ein immunsupprimiertes Milieu, da eine Aktivierung des Immunsystems und mögliche Entzündungsprozesse zu einer irreversiblen Schädigung der Photorezeptoren sowie einer Trübung und Narbenbildungen und damit einhergehend einer Sehstärkenverschlechterung führen können (Kim et al. 2002; Streilein et al. 2002).

Zusätzlich übt das RPE eine Wächterfunktion aus und reguliert Entzündung. So konnte in einem in vivo Mausmodell gezeigt werden, dass eine akute systemische virale Infektion zu lokalen Veränderungen der Genexpression im RPE bezogen auf eine Aktivierung des Komplementsystems und die Rekrutierung inflammatorischer Zellen führte (Faber et al. 2019). Die Regulation von Entzündung erfolgt dabei unter anderem über Toll-like-Rezeptoren (TLR). TLR gehören zu den Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*) und sind eine wichtige Komponente des angeboren Immunsystems (Kumar et al. 2004; Kaarniranta und Salminen 2009). Zellen erkennen über sie pathogen-assoziierte molekulare Muster und aktivieren und modulieren daraufhin Immunreaktionen. Es ist bekannt, dass das RPE unter anderem TLR-3 und -4 exprimiert (Alexopoulou et al. 2001; Kumar et al. 2004; Klettner et al. 2013b; Mulfaul et al. 2018). Über TLR-3 und 4 werden pathogene Gefahrenquellen detektiert. TLR-3 bindet beispielsweise pathogene Doppelstrang-RNA (dsRNA) und stellt dadurch einen wichtigen Rezeptor für die Detektion viraler Infektionen dar, denn viele RNA Viren tragen ihr Genom in Form einer dsRNA und produzieren diese während ihrer Replikation. Bindet der TLR-3 virale dsRNA führt dies zu einer antiviralen Genexpression der Zelle (Doyle et al. 2003; Ebihara et al. 2007). Allerdings ist TLR-3 nicht spezifisch für eine virale Infektion, sondern kann auch mRNA nekrotischer Zellen binden und daraufhin eine Immunantwort initiieren (Karikó et al. 2004). Der vom RPE exprimierte TLR-4 bindet andere exogene und endogene pathogene Substanzen. Zu den exogenen Substanzen zählt das Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS), welches ein Bestandteil der äußeren Zellmembran gramnegativer Bakterien ist. Bindet LPS an den TLR-4 Rezeptor folgt eine transmembranöse Signaltransduktion, welche zu einer proinflammatorischen Genexpression führt (Elner et al. 2005). Weiter konnte gezeigt werden, dass Teile des Komplementsystems die TLR-4 Expression induzieren können (Zhu et al. 2015). Diese Beobachtung unterstreicht die komplexen Aufgaben der TLR in Bezug auf die Wächterfunktion des RPE.

Ein weiteres Korrelat der Wächterfunktion stellt die Bindung des TNFα und die darauffolgende Zellantwort des RPE dar. TNFα ist ein Hauptregulator der RPE Zellaktivität indem es die Zelladhäsion, -migration, -proliferation und die Chemotaxis beeinflusst (Burke 1989; Jin et al. 2000; Yang et al. 2007). Auf die Wächterfunktion und die Regulation von Entzündung durch das RPE wird in Kapitel I.5 und I.6 im Zusammenhang mit der Pathogenese der AMD ausführlicher eingegangen.

I.4 Die altersabhängige Makuladegeneration – AMD

Die altersabhängige Makuladegeneration (AMD) ist in ihrer Spätform die häufigste Erblindungsursache älterer Menschen in der westlichen Welt (Schrader 2006; Bourne et al. 2018). Etwa 4,5 Mio. Menschen sind in Deutschland betroffen (Knauer und Pfeiffer 2006). Nach Katarakt und Glaukom ist die AMD die weltweit dritthäufigste Ursache für Erblindung (Wolfram et al. 2019) und es wird im Jahr 2040 schätzungsweise 288 Millionen Erkrankte geben (Wong et al. 2014). Bis heute wurde die komplexe Pathologie der fortschreitenden degenerativen Erkrankung noch nicht vollständig verstanden (siehe I.4.2). Eine Rolle spielen jedoch die physiologischen Alterungsprozesse, die durch andere krankheitsauslösende Faktoren wie die Dysregulation von Entzündungs- oder Immunreaktionen und andere dysbalancierte Prozesse verstärkt werden und in eine AMD umschlagen können (Xu et al. 2009). So gibt es eine Vielzahl von Faktoren, deren Zusammenspiel zu pathologischen Veränderungen im Bereich der Choroidea, BrM und des RPE sowie der neurosensorischen Netzhaut führen. Dadurch kommt es in der Spätform der AMD zu einem zentralen Visusverlust, da die für präzises Sehen verantwortliche Makula betroffen ist.

I.4.1 Formen der AMD

Im Allgemeinen wird klinisch zwischen einer Frühform der AMD sowie zwei Spätformen, der geographischen Atrophie und der exsudativen (feuchten) AMD, unterschieden (Ammar et al. 2020). Etwa 85-90% der Patienten sind von der frühen nicht-exsudativen (trockenen) Form der AMD betroffen, die zu Beginn symptomlos verlaufen kann und mit einem langsam fortschreitenden Sehverlust einhergeht. Sie ist durch das Auftreten von „weichen“ Drusen (> 63 µm) als auch Veränderungen des RPE in Form von Atrophie gekennzeichnet (Schuman et al. 2009). Diese Veränderungen können durch die Spiegelung des Augenhintergrundes

(Funduskopie) diagnostiziert werden (Davis et al. 2005). Kleine „harte“ Drusen (< 63 µm) zählen noch zum normalen Alterungsprozess (Ferris et al. 2013). Im Verlauf kann es zu einem Übergang der trockenen AMD in die Spätform kommen (Cascella et al. 2014). Denn im Zuge der Atrophie des Pigmentepithels folgt auch eine Degeneration der Choroidea und der Photorezeptoren. Bei einer flächigen Ausbreitung wird diese Pathologie als geographische Atrophie (GA) bezeichnet (Bhutto und Lutty 2012). Auf die GA wird in Kapitel I.4.4. im Zusammenhang mit der Anti-VEGF Therapie ausführlicher eingegangen. Des Weiteren kann es zum Übergang einer trockenen AMD in eine exsudative (feuchte) AMD kommen. Diese macht zwar nur etwa 10-15 % der betroffenen Patienten aus, verursacht aber den größeren Anteil der Erblindungen durch die AMD (Bhutto und Lutty 2012; Nguyen et al. 2013). Bei der exsudativen (feuchten) Form kommt es zu Veränderungen im Bereich der Choriocapillaris, die zu Netzhautödemen führen. Gefäßaussprossungen der Aderhaut proliferieren unkontrolliert, sowohl unter dem RPE als auch zwischen dem RPE und der sensorischen Netzhaut (Ferris et al. 2013). Diesen pathologischen Prozess bezeichnet man als choroidale Neovaskularisationen (CNV), bei dessen Entstehung die Überexpression des proangiogenen *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) eine entscheidende Rolle spielt (Spilsbury et al. 2000; Miller et al. 2013). Durch Ödeme und Blutungen kann es im Rahmen dessen auch zur plötzlichen Visusminderung oder akut auftretenden Metamorphopsien (verzerrtes Sehen) kommen (Garcia-Layana et al. 2017). Klinisch kommt es zu einer zentralen Visusverschlechterung, die bei der feuchten AMD durch die CNV und deren destruktiven Charakter deutlich schneller als bei der trockenen AMD fortschreiten kann und unbehandelt zur Erblindung führt (Bhutto und Lutty 2012).

I.4.2 Pathogenese der AMD

Bei der Entstehung der Erkrankung, speziell in der trockenen und atrophischen AMD, scheint der Verlust der RPE Funktion und die Degeneration der RPE Zellen eine große Rolle zu spielen, was eine mangelnde Versorgung und den Untergang der Photorezeptoren nach sich zieht (Bhutto und Lutty 2012; Fleckenstein et al. 2018; Inana et al. 2018). Warum es bei der AMD zur Degeneration des RPE kommt, konnte noch nicht abschließend geklärt werden. Die Pathogenese der AMD ist multifaktoriell. Zu den Hauptfaktoren in der Entstehung zählen Alterungsprozesse, genetische Prädispositionen, oxidativer Stress sowie Lebenstil- und Umweltfaktoren, wie hyperkalorische Ernährung oder Rauchen (Hyman und Neborsky 2002;

Myers et al. 2014; Nowak 2014; Fritsche et al. 2016; Datta et al. 2017). Weitere Risikofaktoren sind Bluthochdruck, Arteriosklerose, AMD in der Familienanamnese, hoher Body-Mass-Index, fettreiche Ernährung, geringe Aufnahme von Antioxidantien und Zink, frühere Kataraktoperationen, Vorgeschichte von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, höheres Plasmafibrinogen und Diabetes (Hyman und Neborsky 2002; Guymer und Chong 2006; Chakravarthy et al. 2010).

Es wird vermutet, dass Inflammation eine hohe Relevanz in der Entwicklung der AMD hat, im Besonderen langwierige Inflammation (Xu et al. 2009; Kauppinen et al. 2016; Datta et al. 2017). Um die komplexen Bezüge der molekularbiologischen Prozesse in der AMD-Pathogenese zu veranschaulichen, wurde ein Konzept vorgeschlagen, das auf vier Säulen basiert, die miteinander interagieren (Richert 2017). Zu diesen vier zählen Veränderungen im Lipidstoffwechsel, oxidativer Stress, Inflammation und die Angiogenese (Abb. 3).

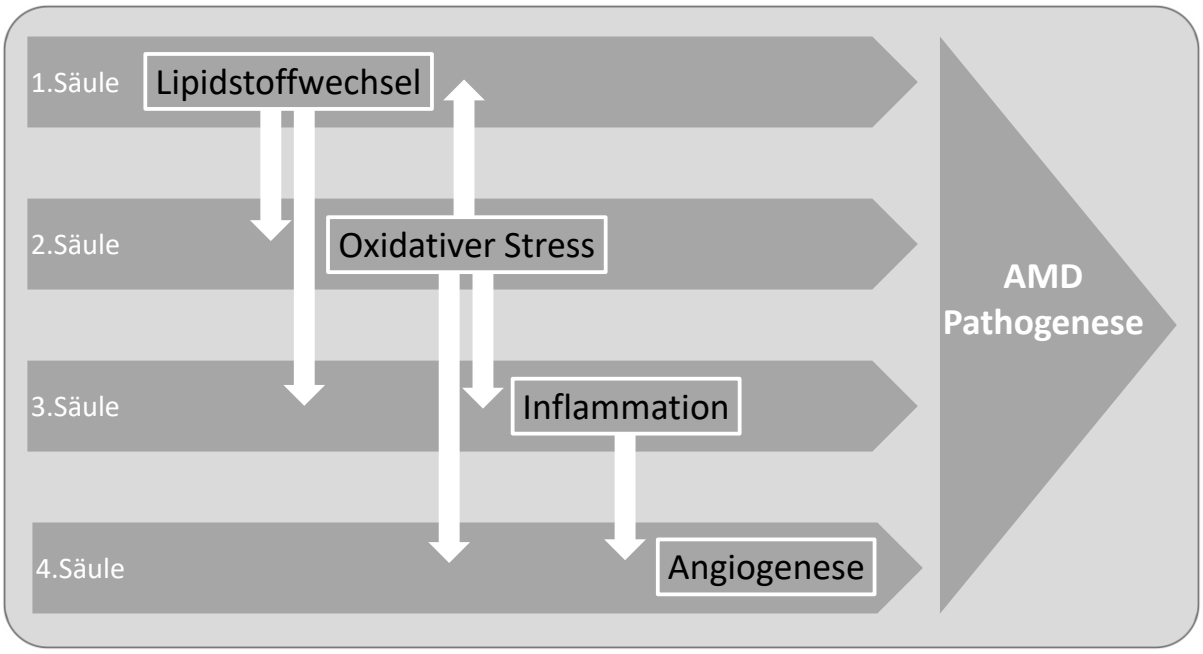


Abbildung 3: Molekularbiologisches Konzept der AMD-Entstehung. Nach aktuellen Erkenntnissen setzt sich die AMD-Pathogenese aus vier Säulen zusammen. Zu diesen Säulen zählen Veränderungen im Lipidstoffwechsel, oxidativer Stress, inflammatorische Prozesse und eine Induktion der Angiogenese speziell bei der exsudativen Form der AMD. Bei der multifaktoriell bedingten Erkrankung interagieren diese Säulen miteinander. So führt ein gestörter Lipidstoffwechsel zu verstärktem oxidativen Stress und Inflammation. Der oxidative Stress wiederum beeinflusst den Lipidstoffwechsel, die Inflammation und die Angiogenese bei der feuchten AMD. Die dritte Säule, die Inflammation führt ebenfalls bei der feuchten AMD zur Induktion der Angiogenese (nach Richert 2017).

Zur ersten Säule zählen intra- und extrazelluläre Lipidablagerungen. Das RPE metabolisiert Lipoproteine, die aus den äußeren Segmenten des Photorezeptors, dem systemischen

Kreislauf und dem RPE stammen, welches auch selbst Lipoproteine synthetisiert (Miller 2016). Diese akkumulieren subretinal entlang der Bruch-Membran, führen zu einer Verdickung und letztendlich zu Drusen, die charakteristisch für die AMD sind und klinisch durch die Spiegelung des Augenhintergrunds (Funduskopie) diagnostiziert werden (Sarks 1980; Davis et al. 2005). Veränderungen der BrM haben direkten Einfluss auf die RPE-Funktion, die Adhäsion, Proliferation und Differenzierung (Bhutto und Lutty 2012). Eine Verdickung der Membran durch Drusenablagerungen führt zur Störung des transepithelialen Transports und somit zur Verschlechterung der Versorgung der Photorezeptoren mit Nährstoffen (Klettner 2015a). Die Verknüpfung der AMD Pathogenese mit diesen Störungen des Lipidstoffwechsels wird unter dem Namen *Oil-spill theory* diskutiert (Curcio 2018). Zusätzlich lagern sich unlösliche Stoffe, sogenannte Lipofuszine („Alterspigment“) innerhalb des RPE ab (Sarks et al. 1999). Dadurch wird die Fähigkeit vermindert, Molekülkomplexe zu verdauen was wiederum unter der Einwirkung von kurzwelligem Licht zu verstärktem oxidativem Stress führt (Wang et al. 2009; Klettner 2015a; Jones et al. 2017). Es wird angenommen, dass im RPE daraufhin inflammatorische Prozesse angeschoben werden, welche die dritte Säule in dem Konzept der AMD-Entstehung darstellen (Abb. 3) (Miller 2016).

Im Allgemeinen ist die Retina durch starke Lichteinstrahlung, eine hohe metabolische Aktivität und den hohen Sauerstoffpartialdruck einem erhöhten Maß an oxidativem Stress ausgesetzt, was die zweite Säule in der AMD-Pathogenese darstellt (Abb. 3). Darunter kommt es zu einem kumulativen Schaden durch Lipidperoxidationen, DNA-Schädigungen und Protein-schädigungen (Zhang et al. 2020). Auch wenn das RPE über einen Schutzmechanismus gegen oxidativen Stress verfügt, wie unter I.2.1.4 beschreiben, kommt es dennoch zur Funktionsminderung der Zellen, zum Zelltod und zur Degeneration von Gewebe (Klettner 2012; Klettner et al. 2013a; Abokyi et al. 2020). Dies beeinflusst die dritte Säule, die Inflammation und durch die Sekretion von Wachstumsfaktoren, wie VEGF, wiederum die vierte Säule, die Angiogenese.

Die dritte Säule der Theorie zur AMD-Pathologie beschreibt inflammatorische Prozesse (Abb. 3). Denn Entzündung scheint in allen Stadien der AMD von zentraler Bedeutung zu sein - nicht nur in ihrer Entwicklung, sondern auch im Verlauf des mittleren und des Spätstadiums. Die Ansammlung von zellulären Überresten, die von degenerierten RPE Zellen abgesondert werden und Lipoproteinen zwischen der RPE-Basallamina und der Bruch-Membran scheint zu

einer chronischen Entzündungsreaktion zu führen, die auf das RPE, die Choriocapillaris und die Bruch-Membran gerichtet ist und einen potenziellen Reiz zur Drusenbildung darstellt (Anderson et al. 2002; Miller 2016). Hierbei kommt es zur Ablagerung von Komplement-komponenten sowie zur Rekrutierung und Aktivierung von Entzündungszellen einschließlich zirkulierender Leukozyten, residenter Mikroglia und infiltrierender Makrophagen (Miller 2016).

Die vierte Säule der AMD-Pathogenese, die Angiogenese, wird durch eine pathologische Induktion der VEGF-Sekretion hervorgerufen und führt zu choroidalen Neovaskularisationen (CNV), welche das Hauptmerkmal der feuchten Form der AMD sind und sich durch unkontrollierte Gefäßaussprossungen auszeichnen. Wie in Abb. 3 dargestellt geschieht die Induktion der Angiogenese durch die drei anderen Säulen der AMD-Pathogenese. Sowohl die Aktivierung inflammatorischer Prozesse als auch oxidativer Stress und Sauerstoffmangel als Folge der Lipidablagerungen steigern die pathologische VEGF-Sekretion (Abb. 3) (Klettner 2015a).

I.4.3 Anti-VEGF Therapie

Da ein spezieller Auslöser der AMD noch nicht bekannt ist, sondern eine komplexe multifaktorielle Pathogenese angenommen wird, gestaltet sich die Suche nach einer kausalen Therapie schwierig. Für die trockene AMD und die geographische Atrophie gibt es zur Zeit noch keine zugelassene oder wirksame Therapiemöglichkeit (Holz et al. 2014; Jones et al. 2017). Für die im Rahmen der feuchten oder auch neovaskulären AMD (nAMD) auftretenden choroidalen Neovaskularisationen wird seit mehr als einem Jahrzehnt die intravitreal applizierte Anti-VEGF Therapie eingesetzt, denn VEGF reguliert die Angiogenese und induziert nachweislich die CNV (Okamoto et al. 1998; Tong et al. 2006; Schmidt-Erfurth et al. 2014; Jones et al. 2017; Finger et al. 2020). Die Einführung der Anti-VEGF Therapie führte zu einer effektiven und signifikanten Senkung der Erblindungsrate und einer Verminderung des Sehverlustes durch die feuchte AMD, in dem es die Bildung der CNV verlangsamt oder verhindert (Okamoto et al. 1998; Tong et al. 2006; Bloch et al. 2012; Maguire et al. 2016; Finger et al. 2020). Allerdings werden durch die Therapie bereits vorhandene pathologische Veränderungen nicht vollständig zurückgebildet und bei vielen Patienten bleibt ein optimales Therapieansprechen aus (Miller et al. 2013). Dazu kommt, dass die Anti-VEGF Substanzen

kostenintensiv regelmäßig und oftmals über viele Jahre intravitreal, also direkt in den Glaskörper, gespritzt werden müssen. Zurzeit werden in der Klinik hauptsächlich drei verschiedene VEGF-Antagonisten eingesetzt: das Antikörperfragment Ranibizumab (Lucentis®), das Fusionsprotein Aflibercept (Eylea®) und der humanisierte vollständige Antikörper Bevacizumab (Avastin®) (Klettner 2015a; DOG et al. 2020). Diese Substanzen weisen eine unterschiedliche Affinität zu VEGF und verschiedene molekulare Eigenschaften auf (Klettner 2014). Daher ist es wichtig, die Substanzen einzeln zu testen und miteinander zu vergleichen. Nicht zuletzt, um herauszufinden, ob eine der Substanzen die Ausbildung einer geographischen Atrophie befördert (siehe Kapitel I.4.4). In der vorliegenden Studie wurden Aflibercept und Bevacizumab verwendet. Aflibercept ist seit 2012 für die Therapie der nAMD zugelassen (F.D.A 2011; Mehta et al. 2018) und weist eine ähnliche Wirksamkeit wie Ranibizumab auf (Heier et al. 2012; Schmidt-Erfurth et al. 2014). Es bindet VEGF-A, VEGF-B und den Plazenta-Wachstumsfaktor (PGF) (Dixon et al. 2009; Jones et al. 2017) und wird nach initial drei monatlichen Ladungsdosen, im weiteren Verlauf mit einem zweimonatigen Therapieintervall intravitreal verabreicht (DOG 2020). Bevacizumab wird *off-Label* bei der nAMD eingesetzt und bindet als vollständiger Antikörper an VEGF-A (Klettner und Roider 2009; Klettner 2015a). Bevacizumab wurde in zwei großen klinischen Studien, der CATT-Studie in den USA (*Comparison of AMD treatment trials*) und der IVAN-Studie in Großbritannien (*Inhibition of VEGF in age-related chroidal neovascularisation*) direkt mit Ranibizumab verglichen und zeigte eine Wirksamkeit vergleichbar mit Ranibizumab (CATT Research Group et al. 2011; Martin et al. 2012; Chakravarthy et al. 2013; Maguire et al. 2016).

I.4.4 Geographische Atrophie unter Anti-VEGF Therapie?

Die geographische Atrophie beinhaltet eine fortschreitende Degeneration des RPE, der Choriokapillaren und der Photorezeptoren (Lim et al. 2012; Zarbin 2016). Es wurde beobachtet, dass nach Langzeit-Anti-VEGF Behandlung klinische Befunde mit irreversibler geographischer Atrophie erhoben wurden (Grunwald et al. 2014; Bhisitkul et al. 2015; Sadda et al. 2020). Besonders traten diese bei kontinuierlicher monatlicher Behandlung auf (Chakravarthy et al. 2013; Grunwald et al. 2014). Allerdings ist nicht geklärt, ob diese Veränderungen aufgrund der Anti-VEGF Behandlung oder trotz der Behandlung auftreten (Abdelfattah et al. 2016). Der zunehmende Verlust von RPE Zellen und damit die Entwicklung

einer geographischen Atrophie könnte mit der Anti-VEGF Langzeitbehandlung in Zusammenhang stehen. Um diese Kausalität zu prüfen, muss die Interaktion der VEGF-Antagonisten mit dem RPE beleuchtet werden, da die im Fokus der Behandlung stehenden CNV sich direkt unterhalb des RPE befinden und mit diesem interagieren (McLeod et al. 2009). Zudem ist das RPE einerseits an der Pharmakokinetik der Antagonisten beteiligt, andererseits ist es wahrscheinlich, dass die VEGF-Inhibitoren selbst Einfluss auf das RPE ausüben (Klettner 2014).

I.5 Inflammatorische Stimulation durch Entzündungsmediatoren

Das RPE besitzt, wie in Kapitel I.3 genauer erläutert wurde, eine Wächterfunktion, indem es pathogene Stimuli detektiert und darauf reagiert. Diese Gefahrendetektion erfolgt unter anderem über TLR. Ihre Aktivierung könnte zu einer proinflammatorischen Zytokinausschüttung und degenerativen Veränderungen des RPE führen (Ebihara et al. 2007; Klettner et al. 2013b; Klettner et al. 2014b; Klettner 2015b). Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Aktivierung von TLR zu einer reduzierten Barrierefunktion des RPE führen kann (Terheyden et al. 2020). TLR-3 und -4 Aktivierung wurden bereits mit der Entstehung der AMD in Verbindung gebracht (Kutty et al. 2016). Dabei werden nicht nur virale (TLR-3) oder bakterielle (TLR-4) Infektionen den Aktivatoren der TLR zugeordnet, sondern auch zelluläre Bestandteile, welche durch die degenerativen Prozesse unter der AMD entstehen könnten. Dazu zählt z.B. mRNA nekrotischer Zellen (Karikó et al. 2004).

Eine TLR-3 Aktivierung kann RPE Zellen in die Apoptose führen und wird mit der Entwicklung einer GA in Verbindung gebracht (Klettner et al. 2013b). Bei Untersuchungen in Bezug auf mögliche therapeutische Effekte einer *small interfering* RNA (siRNA) gegen die AMD wurde herausgefunden, dass die siRNA Signalgebung über TLR-3 abläuft (Kleinman et al. 2008). Polymorphismen der TLR werden mit der Pathogenese der AMD in Verbindung gebracht (Edwards et al. 2008). So scheinen verschiedene genetische Varianten des TLR-3 die Entwicklung der GA zu befördern (Yang et al. 2008). Es konnte weiter gezeigt werden, dass TLR-4 eine Rolle bei der Verarbeitung äußerer Photorezeptorsegmente spielt und TLR-4 Polymorphismen mit der Krankheitsschwere der AMD assoziiert sind (Kindzelskii et al. 2004; Ling und Xiong 2019). Auch wurde beobachtet, dass eine TLR-4 Aktivierung über den Transkriptionsfaktor *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NFkB) zu

einer VEGF-Ausschüttung führen kann, welche eine Schlüsselrolle in der AMD Pathogenese spielt (Chen et al. 2016).

Außerdem wird das Zytokin Tumornekrosefaktor alpha (TNFα) für die Pathogenese der AMD verantwortlich gemacht. Es konnte gezeigt werden, dass TNFα zu einer VEGF-Ausschüttung des RPE und damit der Entwicklung von CNV führen kann (Oh et al. 1999; Nagineni et al. 2012; Wang et al. 2016). Außerdem konnte eine Störung der Blut-Retina-Schranke über Veränderungen des RPE durch TNFα, welches von Mikroglia sezerniert wurde, beobachtet werden (Jo et al. 2019). Die Rolle von TNFα wird im nächsten Kapitel unter I.6. im Zusammenhang mit AMD-relevanten Zytokinen weiter ausgeführt.

Zusammengefasst könnten TLR-3 und -4 und TNFα Kernelemente in der Pathophysiologie der AMD sein. Um die Rolle von TLR und TNFα in der Pathogenese der AMD besser zu definieren, sind weitere Versuchsreihen erforderlich. Deshalb wurde in dieser Studie der Einfluss einer TLR-Aktivierung über die Stimulation mit dem TLR-3 Agonisten Polyinosin-Polycytidylsäure (Poly I:C) (Alexopoulou et al. 2001) und dem TLR-4 Agonisten Lipopolysaccharid (LPS) (Chow et al. 1999) sowie der Einfluss einer Stimulation mit TNFα auf die Zellvitalität und die Zytokinsekretion des RPE untersucht.

I.6 AMD-relevante Zytokine

Um die Auswirkungen einer Therapie mit VEGF-Inhibitoren unter inflammatorischer Stimulation zu erforschen, ist es wichtig die daraus resultierende Zytokinsekretion der RPE Zellen zu erfassen. Daher wurde in dieser Arbeit untersucht, wie sich die Zytokine IL-1β, IL-6, IL-8 und TNFα unter den genannten Voraussetzungen verhalten.

Durch die Evaluation der sezernierten Zytokine könnte abgeleitet werden, ob das RPE versucht die Entzündung zu unterdrücken, oder sie weiter befördert. Sollte das RPE protektive Zytokine ausschütten, könnte dies einen Versuch darstellen, die Retina vor pathogenen Einflüssen zu schützen. Außerdem könnten über die Zytokinsekretion je nach Stimulation die Signalwege des RPE weiter erforscht und ggf. eine potenzielle zielgerichtete therapeutische Intervention daraus abgeleitet werden.

TNFα ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches in vitro und in vivo mit der Pathogenese der AMD in Verbindung gebracht werden konnte (Theodossiadis et al. 2009; Kutty et al. 2016).

Es konnte gezeigt werden, dass TNFα in Mausmodellen für AMD erhöht ist (Huang et al. 2017) und mit der choroidalen Neovaskularisierung in Laser-induzierten CNV Modellen in Zusammenhang steht (Lichtlen et al. 2010). Zusätzlich wurde beschrieben, dass beispielsweise Komplementfaktoren die TNFα Proteinexpression im RPE steigern können (Lueck et al. 2015). IL-6 wird mit altersbedingten Erkrankungen in Verbindung gebracht und weist eine starke chronisch inflammatorische Komponente auf (Maggio et al. 2006). Im Zusammenhang mit der AMD konnte IL-6 als systemischer Biomarker für die Krankheitsaktivität und prädiktiv für die Krankheitsprogression bei geographischer Atrophie als Folge der AMD identifiziert werden (Krogh Nielsen et al. 2019). Zusätzlich wurden erhöhte IL-6 Level im Kammerwasser von Patienten mit feuchter AMD im Vergleich zu Patienten mit Katarakt festgestellt (Jonas et al. 2012; Mimura et al. 2019). Es ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches als Antwort auf inflammatorische Reize vom RPE ausgeschüttet werden kann (Elner et al. 1992). So führte eine kurzzeitige Stimulation mit LPS oder Poly I:C zu einer IL-6 Ausschüttung (Kumar et al. 2004; Wörnle et al. 2011; Paeng et al. 2015b). Weiter steht es unter dem Verdacht autokrin zur Degeneration des RPE beizutragen (Leung et al. 2009). Im Gegensatz dazu konnten auch neuroprotektive und neuroregenerative Eigenschaften des IL-6 in Bezug auf die Retina nachgewiesen werden (Sappington et al. 2006; Leibinger et al. 2013). Es ist daher von besonderem Interesse die IL-6 Ausschüttung im Kontext eines proinflammatorischen Milieus zu verstehen, um die schädlichen und protektiven Reaktionen des RPE auf Entzündungsreize im Rahmen der AMD tiefer zu verstehen.

Die Betrachtung von IL-8 ist ebenfalls von besonderem Interesse, da IL-8 für die Angiogenese verantwortlich gemacht wird (Ghasemi et al. 2011), im Kammerwasser von Patienten mit exsudativer AMD erhöht nachgewiesen werden konnte (Jonas et al. 2012; Mimura et al. 2019) und verschiedene Polymorphismen des IL-8 als Risikofaktoren für die AMD betrachtet werden (Goverdhan et al. 2008). Zudem konnten erhöhte IL-8 Sekretionen des RPE nach Stimulation mit LPS beobachtet werden. Die RPE Degeneration unter LPS scheint dabei über IL-8 vermittelt zu werden (Leung et al. 2009).

Es konnte gezeigt werden, dass IL-1ß insbesondere in vorgeschädigtem Gewebe neuro-degenerativ wirken kann, besonders bei einer langfristigen Exposition (Viviani 2004). Mit Hilfe von in vitro Studien mit RPE Zellen konnte gezeigt werden, dass IL-1β nach einer kurzfristigen Stimulation (zwei Stunden) vermehrt exprimiert wurde (Brosig et al. 2015). Vor diesem

Hintergrund ist es interessant zu untersuchen, welche Effekte eine langfristige inflammatorische Stimulation auf die IL-1β Sekretion des RPE hat.

I.7 Zielsetzung dieser Arbeit

In bisherigen Studien wurden fast ausschließlich kurzfristige Wechselwirkungen des RPE unter Inflammation untersucht. Die Inkubationszeiten dieser Studien überschreiten selten 24 oder 48 Stunden (z. B. An et al. 2008; Wörnle et al. 2011; Klettner et al. 2013b; Brosig et al. 2015; Koinzer et al. 2015; Paeng et al. 2015a; Chen M et al. 2016; Beckel et al. 2018)

Allerdings scheint vor allem eine langfristige Entzündung für die AMD verantwortlich zu sein (Xu et al. 2009; Kauppinen et al. 2016). In dieser Studie wurde daher die Auswirkung einer Stimulation mit zwei proinflammatorischen Stimuli untersucht, die unterschiedliche TLR (Poly I:C - TLR-3, LPS - TLR-4) aktivieren und mit einem proinflammatorischen Zytokin, TNFα. Dabei wurden kurzfristige (24 Stunden), mittelfristige (sieben Tage) und langfristige (vier Wochen) Effekte beobachtet. Dadurch sollen modellhaft die langwierigen entzündlichen Prozesse, wie sie in der Pathogenese der AMD vorkommen, in einer in vitro Zellkultur abgebildet werden. Dabei wurde ein Fokus auf die langfristige proinflammatorische Stimulation des RPE und die darunter zu verzeichnende Dynamik der Zellvitalität und der Zytokinausschüttung im Zeitverlauf gelegt. Auch vier Wochen spiegeln nur sehr bedingt die in vivo-Situation einer chronischen Netzhautentzündung wider, unterscheiden sich jedoch deutlich von einer akuten, kurzfristigen Reaktion des RPE. Erst durch zuverlässige Ergebnisse aus modellhaften in vitro Zellkulturstudien kann in weiteren Schritten die erhoffte Übertragung auf den Menschen gewagt werden. Weiter ist die Erforschung der Anti-VEGF Therapie unter Entzündungsmediatoren in vitro immer noch von großer Bedeutung, da trotz initialer Erfolge eine kontinuierliche klinische Behandlung der exsudativen AMD mit VEGF-Antagonisten zu atrophischen Veränderungen im RPE führen kann. Aus dieser Beobachtung ergab sich die der vorliegenden Studie zu Grunde liegende Hypothese, dass eine inflammatorische Aktivierung des RPE einen Einfluss auf die Interaktion zwischen RPE und VEGF-Antagonist hat. Sollte diese Hypothese bestätigt werden und ein Funktionsverlust und eine Degeneration des RPE festgestellt werden, würde dies darauf hinweisen, dass eine antiinflammatorische Behandlung den degenerativen Veränderungen entgegenwirken könnte. Durch eine solche antiinflammatorische Therapie könnte ein längerfristiger

Behandlungserfolg der Anti-VEGF Therapie in Aussicht gestellt werden. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden die RPE Zellen daher in einem zweiten Schritt mit Bevacizumab und Aflibercept unter dem oben genannten entzündlichen Milieu stimuliert und die Zellvitalität und Zytokinsekretion untersucht.

Die Erforschung der Auswirkungen inflammatorischer Prozesse auf das RPE im Zusammenwirken mit einer Anti-VEGF Therapie ist die Grundlage eines differenzierten pathophysiologischen Verständnisses der AMD und den daraus folgenden zielgerichteten Therapieansätzen. Das Ziel dieser Arbeit war daher, nach andauernder Inflammation mittels Poly I:C, LPS und TNFα Stimulation a) den Zelltod und b) die Sekretion der Zytokine IL-1β, IL-6, IL-8 und TNFα zu untersuchen. Ebenso sollten die Auswirkungen auf das Zellüberleben und die Sekretion der genannten Zytokine unter einer Stimulation mit den VEGF-Inhibitoren Aflibercept und Bevacizumab und deren Kombination mit den genannten pro-inflammatorischen Stimulanzien beobachtet werden.

II Material und Methoden

II.1 Material

II.1.1 Geräte und Instrumente

Tabelle 1: Verwendete Geräte und Instrumente.

Geräte/ Instrumente	Firma/ Firmensitz
Anatomische Pinzette	Bausch & Lomb GmbH, Berlin, D
Autoklav, Varioklav	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D
Brutschrank, CO2 Inkubator	Labotec, Göttingen, D
Eismaschine AF80	Scotsman, Milan, I
Feinwaage	Sartorius analytic, Göttingen, D
Gefrierschränke	
-20° C-Schrank	Liebherr, Kirchdorf, D
-80° C-Schrank	Sanyo, Moriguchi, J
Mikroskope	
Binokular, Stemi SV6	Carl Zeiss AG, Jena, D
Inverses Lichtmikroskop, Axiovert 100	Carl Zeiss AG, Jena, D
Mikrotiterplatten-Photometer ELx800	Biostep, Jahnsdorf, D
Mischgeräte	
Rollenmischgerät, RM5 Nr. 348	Karl Hecht GmbH, Sondheim, D
Wippschüttler	VWR, Pennsylvania, USA
Parafilm	Bemis Company, Oshkosh, USA
Pipetten	
Einkanalpipetten: 2,5 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, D
Mehrkanalpipette: 100 µl	Eppendorf, Hamburg, D
Pipettierhilfe, Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, D
Saugpumpe, Vacusafe comfort	Integra Bioscience AG, Zizers, CHE
Scheren	
Federschere	Karl Storz, Tuttlingen, D
Schere 545A	Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, D
Sterilbänke	
Antair BSK	Sternkopf, Lübeck, D
Safe 2020	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D
Vortexer, VortexGenie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA

Geräte/ Instrumente	Firma/ Firmensitz
Waschautomat ELx50	BioTek Winooski, VT, USA
Wasserbad 1086	GFL, Burgwedel, D
Zentrifugen	
Servall ST40	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D
Centrifuge 5414	Eppendorf AG, Hamburg, D
Kühlzentrifuge, Heraeus Fresco 17	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D

II.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterialien	Firma/ Firmensitz
Einmalpasteurpipetten 1 ml, 5 ml	Roth, Karlsruhe, D
Pipettenspitzen, 10 -1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht, D
Rasierklinge T585	Plano GmbH, Wetzlar, D
Reaktionsgefäße, 1-2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
Serologische Pipetten, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Th. Geyer, Berlin, D
Zellkultur Testplatten, 12-*well*, 24-*well*, 96-*well*	Th. Geyer Berlin, D
Zentrifugenröhrchen, 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D

II.1.3 Chemikalien

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien.

Chemikalien	Firma/ Firmensitz
Aqua destillata (A. dest.), Ampuwa®	Fresenius Kabi, Bad Homburg, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	ATCC, Manassas, USA
Ethylendinitriltetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt, D
Isopropanol	Sigma, Aldrich, D
Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT), Pulver	Sigma, Steinheim, D
Natriumchlorid (NaCl) 0,9%, flüssig	Fresenius, Bad Homburg, D
PBS, Puffersubstanz Dulbecco's	Serva, Heidelberg, D

II.1.4 Zellkulturmedien und Reagenzien

Tabelle 4: Verwendete Zellkulturmedien und -reagenzien.

Zellkulturmedien und -reagenzien	Firma/ Firmensitz
Fötales Kälberserum (FCS)	Linaris, Wertheim-Bettingen, D
HEPES, 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperatinyl]-ethansulfonat (HEPES-Puffer)	Biochrom, Berlin, D
HyClone™ Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM)	Biochrom, Berlin, D
Nicht essentielle Aminosäuren, (NEA)	Biochrom, Berlin, D
Penicillin/Streptomycin, Pe/St	Biochrom, Berlin, D
Sodium Pyruvat	Biochrom, Berlin, D
Trypsin	PAN Biotech, Aidenbach, D
Trypsin/EDTA	PAN Biotech, Aidenbach, D

II.1.5 Zusammensetzung von Puffer und Lösungen

Tabelle 5: Verwendete Puffer und Lösungen und ihre Zusammensetzung.

Puffer und Lösungen	Konzentration/ Material
Zellkulturmedium	500 ml DMEM high Glucose + Phenolrot 10 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin 100 mM Sodium Pyruvat 1 M HEPES 1 % nicht essentielle Aminosäuren (NEA)
MTT- Gebrauchslösung	0,005 g MTT Pulver 10 ml DMEM ohne Phenolrot
Trypsin-EDTA	0,05 g Trypsin 0,1 g EDTA 100 ml PBS
PBS, Puffersubstanz Dulbecco's	4,8 g PBS in 500 ml Aqua dest.

II.1.6 ELISA Kits

Tabelle 6: Verwendete ELISA Kits.

ELISA Kits	Firma/ Firmensitz
IL-1-beta Porcine Quantikine® ELISA Kit	R&D Systems, Minneapolis, USA
IL-6 Porcine Quantikine® ELISA Kit	R&D Systems, Minneapolis, USA
IL-8 Porcine Quantikine® ELISA Kit	R&D Systems, Minneapolis, USA
TNF-alpha Porcine Quantikine® ELISA Kit	R&D Systems, Minneapolis, USA

II.1.7 Medikamente und Inhibitoren

Tabelle 7: Verwendete Medikamente und Inhibitoren.

Medikamente und Inhibitoren	Firma/ Firmensitz
Aflibercept, Eylea ® 40 mg/ml	Bayer AG, Leverkusen, D
Betaisodona ®	Munipharma GmbH, Limburg, D
Bevacizumab, Avastin ® 25 mg/ml	Novartis, Basel, CH
Lipopolysaccharid (LPS) aus E.Coli	Sigma, Aldrich, D
Polyinosin-Polycytidylsäure Natriumsalz (Poly I:C)	Tocris Bioscience, Bristol, UK
Tumornekrosefaktor alpha (TNFα)	R&D Systems, Minneapolis, USA

II.1.8 Software

Tabelle 8: Verwendete Software.

Software	Firma/ Firmensitz
Gen 5	Biotek GmbH, Jahnsdorf, D
Total Lab TL 100	Biosystematica, Mountain Hall, GB
MS Excel 2007	Microsoft, Redmond, Washington, USA

II.2 Zellbiologische Methoden

Die Durchführung der zellbiologischen Arbeiten erfolgte an einer Sterilbank. Hierbei wurde mit sterilen, autoklavierten oder äußerlich desinfizierten Arbeitsmaterialien gearbeitet.

II.2.1 RPE Zellen in der Zellkultur

II.2.1.1 Präparation von primären porcinen RPE Zellen aus Schweineaugen und ihre Kultivierung

Für die Herstellung des porcinen Retinalen Pigmentepithels wurden Schweineaugen von regionalen Schlachtereinen bezogen, die nach einer bereits etablierten Methode präpariert wurden (Wiencke et al. 2003; Klettner und Roider 2008). Es wurden sowohl 12-*well*-Platten als auch 24-*well*-Platten zur Anzucht verwendet. Pro 12-*well*-Platte wurden zwölf Schweineaugen präpariert. Auf der 24-*well*-Platte stellte jede Hälfte eine Zellpopulation mit je 12-*wells* für einen Versuch dar, für die jeweils sieben Augen separat präpariert wurden. Es wurde darauf geachtet, dass diese innerhalb von vier Stunden post mortem präpariert und die Kühlkette währenddessen nicht unterbrochen wurde.

Zunächst wurden die Schweinebulbi von anhängenden Geweberesten mittels einer Schere befreit und zur äußeren Desinfektion für 5 Minuten in eine auf Eis gekühlte antiseptische und 1:3 verdünnte Lösung, bestehend aus 33 %-iger Betaisodonalösung und Natriumchlorid (NaCl) gegeben. Anschließend wurden sie in sterilem NaCl bis zur weiteren Verarbeitung unter der Sterilbank aufbewahrt. Unter der Sterilbank wurde nun das anteriore Segment der Bulbi mithilfe einer Rasierklinge eröffnet und zirkulär abgetrennt. Ebenso wurden die Linse und der Glaskörper mit einer Pinzette entnommen. Um die Retina restlos zu entfernen, wurde die verbleibende Augenschale mit 37 °C warmer phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) befüllt, die Retina mit einer Pinzette abgelöst und mithilfe einer Federschere am Nervus opticus abgetrennt. Anschließend wurde das PBS entnommen, 0,25 % Trypsin in die Bulbi gefüllt und für 10 Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation und Entfernung des Trypsins wurden die Bulbi mit 37 °C warmem 0,25 % Trypsin/ Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) befüllt und für weitere 45 Minuten inkubiert. Die nun angelösten RPE Zellen wurden mit einer Eppendorfpipette von der Aderhaut gespült und in

einem 50 ml Zentrifugenröhrchen mit 37 °C warmen Medium vermischt, was zu einer Inaktivierung des Trypsin/ EDTA führte. Im Anschluss wurden die Zellen für 7 Minuten bei Raumtemperatur und 900 U/min abzentrifugiert. Das resultierende Zellpellet wurde nach dem Absaugen des überstehenden Mediums mit 1 ml 37 °C warmem Medium resuspendiert, mit 35 ml Medium aufgefüllt und erneut für 7 Minuten bei 900 U/min zentrifugiert. Erneut wurde das überstehende Medium abgesaugt, das Zellpellet mit 1 ml Medium resuspendiert und nun mit 11 ml Medium aufgefüllt, sodass danach je 1 ml der Zellsuspension pro *well* zügig auf der 12-*well*-Platte ausgesät wurde. Die Zelldichte betrug 300.000 Zellen pro *well.* Für den MTT-Assay wurden 24-*well*-Platten verwendet, wobei die Zellsuspension nur mit 5 ml Medium aufgefüllt und pro *well* nur 0,5 ml Zellsuspension mit einer Dichte von 150.000 Zellen pro *well* ausgesät wurde. Nach der Aussaat wurden die RPE Zellen zunächst zwei Wochen regulär kultiviert, bevor sie in einen Versuch aufgenommen wurden. Die Inkubation der Zellen fand bei einer Temperatur von 37 °C und einer wasserdampfgesättigten und mit 5 % CO^2-angereicherten Atmosphäre statt. Zur Kultivierung wurde DMEM-Zellkulturmedium verwendet, welches zweimal pro Woche gewechselt wurde. Des Weiteren wurden die Zellkulturplatten einmal pro Woche unter dem Mikroskop betrachtet und auf eine konfluente Zellschicht hin überprüft.

II.2.1.2 Stimulation der porcinen RPE Zellen

Nach Erreichen einer Konfluenz nach frühestens zwei Wochen regulärer Kultivierung wurde begonnen, die porcinen RPE Zellen zu stimulieren. Das Pipettierschema kann Abbildung 4 entnommen werden. Hierfür wurde zunächst das alte Zellkulturmedium abgesaugt und mit jeweils 1 ml pro *well* (12-*well*-Platte) oder 0,5 ml pro *well* (24-*well*-Platte) Zellkulturmedium aufgefüllt. Anschließend wurden die proinflammatorischen Agonisten Poly I:C (1, 10, 100 µg/ml), LPS (0.1, 1, 10 µg/ml) oder TNFα (12.5, 25, 50 ng/ml) und die Medikamente Aflibercept und Bevacizumab verabreicht. Die Konzentration der Medikamente betrug 250 µg/ml. Bei den Behandlungszeiträumen von sieben Tagen und vier Wochen wurde dieser Stimulationsvorgang in einem regelmäßigen Rhythmus alle drei bis vier Tage wiederholt.

Die Experimente wurden mit drei verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. Es wurden jeweils drei bis fünf Wiederholungsexperimente für die Behandlungszeiträume 24 Stunden,

sieben Tage und vier Wochen durchgeführt, die sich in der Konzentration der pro-inflammatorischen Agonisten, Poly I:C, LPS und TNFα unterschieden:

1) geringste Konzentration: Poly I:C 1 µg/ml; LPS 0.1 µg/ml; TNFα 12.5 ng/ml
2) mittlere Konzentration: Poly I:C 10 µg/ml; LPS 1 µg/ml; TNFα 25 ng/ml
3) höchste Konzentration: Poly I:C 100 µg/ml; LPS 10 µg/ml; TNFα 50 ng/ml

Im Anschluss an den Behandlungszeitraum wurden die Überstände für die ELISA Untersuchungen gewonnen (siehe Kapitel II.3.1) und mit den RPE-Zell-Platten der MTT-Assay durchgeführt (siehe Kapitel II.2.2).

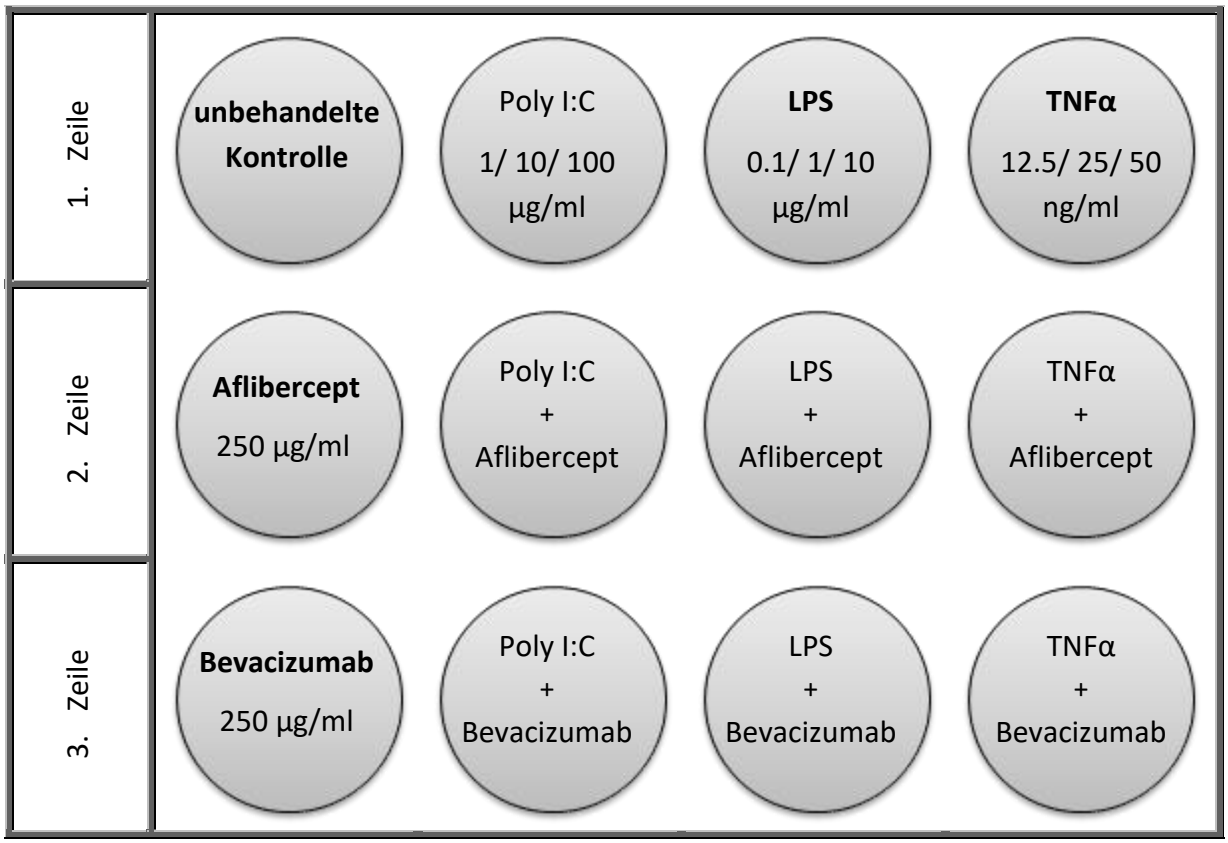


Abbildung 4: Pipettierschema einer 12-*well*-Platte. Die unbehandelte Kontrolle oben links wurde mit reinem Zellkulturmedium befüllt. Die weiteren zwei *wells* in der linken Spalte wurden nur mit Aflibercept (250 µg/ml) oder Bevacizumab (250 µg/ml) behandelt. Die drei *wells* der ersten Zeile wurden ausschließlich mit den drei Entzündungsmediatoren Poly I:C (1, 10, 100 µg/ml) LPS (0.1, 1, 10 µg/ml) oder TNFα (12.5, 25, 50 ng/ml) stimuliert. Die Platten wurden je Versuch entweder mit der geringsten (Poly I:C 1 µg/ml, LPS 0.1 µg/ml und TNFα 12.5 ng/ml), mittleren (Poly I:C 10 µg/ml, LPS 1 µg/ml und TNFα 25 ng/ml) oder höchsten (Poly I:C 100 µg/ml, LPS 10 µg/ml und TNFα 50 ng/ml) Konzentration behandelt. Die gleiche Konzentration der in der ersten Zeile verwendeten Entzündungsmediatoren wurde auch für die Kombination mit Aflibercept (250 µg/ml) in der zweiten Zeile oder Bevacizumab (250 µg/ml) in der dritten Zeile verwendet.

II.2.2 Bestimmung der Zellvitalität mittels MTT- Toxizitätsassay

Zur Untersuchung der Vitalität der RPE Zellen am Ende einer Behandlungsperiode wurde ein MTT (Methyl thiazolyl tetrazolium) - Assay durchgeführt (modifiziert nach Mosmann 1983; Riss et al. 2004). Bei dem Farbstoff MTT handelt es sich um ein gelbes Tetrazoliumsalz, welches von lebendigen, metabolisch aktiven Zellen aufgenommen und durch diese zu einem unlöslichen violetten Formazan reduziert wird. Um es photometrisch erfassen zu können ist es notwendig, die Formazankristalle durch Zugabe einer Solubilisierungslösung wie Dimethylsulfoxid (DMSO) aufzulösen. In avitalen Zellen kann der beschriebene Vorgang nicht ablaufen, wodurch kein Farbstoff umgewandelt und freigesetzt wird (Abb. 5). Somit spiegelt die resultierende Farbintensität den Anteil an vitalen Zellen im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle wider. Anschließend wird die Farbintensität des MTTs bei einer Wellenlänge von λ = 550 nm photometrisch gemessen.

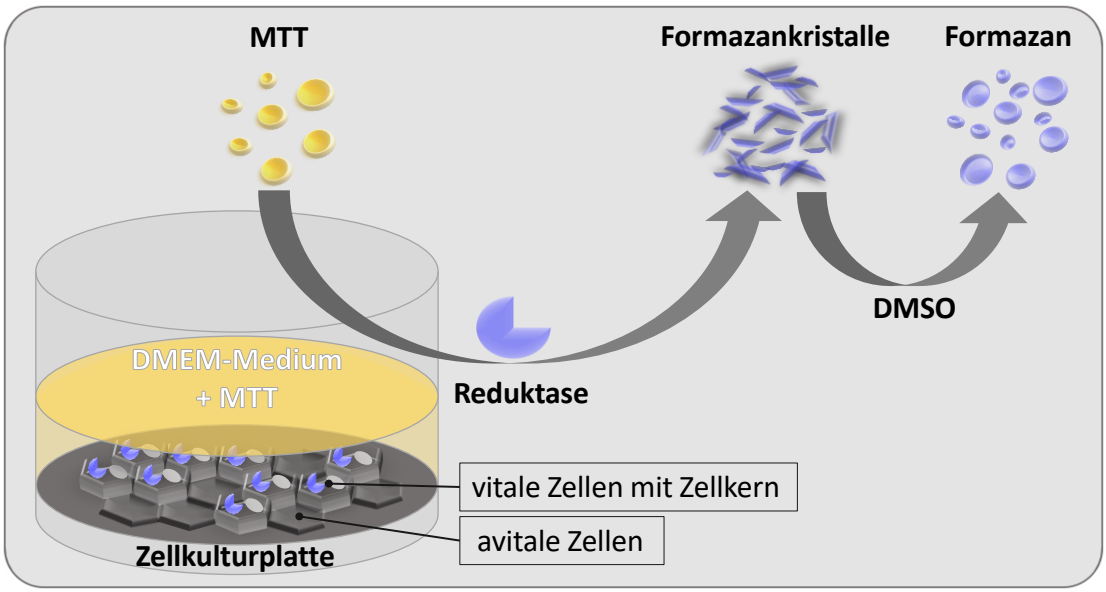


Abbildung 5: Ablauf des MTT- Toxizitätsassay. Vitale, metabolisch aktive Zellen reduzieren das gelbe Tetrazoliumsalz (MTT) zu unlösliche violette Formazankristalle. Durch Zugabe einer Solubilisierungslösung (DMSO), lösen sich diese Kristalle, sodass die Farbintensität photometrisch gemessen werden kann. In avitale Zellen findet dieser Vorgang nicht statt. MTT = Methyl thiazolyl tetrazolium, DMSO = Dimethylsulfoxid.

Nach der Behandlung für einen Tag, sieben Tage und vier Wochen wurden zunächst die Überstände wie in Kapitel II.3.1. beschrieben entnommen. Zum ansetzten der MTT-Gebrauchslösung wurden 0,005 g MTT in 10 ml DMEM ohne Phenolrot gelöst und auf 37 ° C

erwärmt. Die Zellen wurden zweimal mit warmen PBS gewaschen, 250 µl pro *well* der warmen MTT- Gebrauchslösung (0,5 mg/ml) hinzugegeben und für zwei Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Um im Anschluss den Farbstoff freizusetzen wurden 250 µl pro *well* DMSO zu den Zellen gegeben und für 5 min bei Raumtemperatur (RT) auf den Schüttler gestellt, damit sich das DMSO gleichmäßig verteilt. Nun wurden auf einer 96-*well*-Platte 100 µl pro *well* reines DMSO vorgelegt und 50 µl der Probenüberstände als Doppelwert pipettiert. Anschließend wurden die Proben bei einer Wellenlänge von λ = 550 nm gegen 150 µl reines DMSO als Leerwert photometrisch mit dem Mikrotiterplatten-Photometer ELx800 gemessen.

II.3 Proteinbiochemische Methode

II.3.1 Gewinnung von Zellkulturüberständen

Für die quantitative Bestimmung der ausgeschütteten Zytokine der RPE Zellen mittels ELISA wurden nach der erfolgten Stimulation nach einem Tag, sieben Tagen und vier Wochen die Überstände entnommen und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Unmittelbar nach der Entnahme wurden die gewonnenen Überstände für 5 min bei 4000 U/min und 4 °C zentrifugiert und anschließend die von Zellresten geklärten Überstände in neue 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Überstände bei -20 °C oder -80 °C im Gefrierschrank gelagert.

II.3.2 Bestimmung der Zytokinausschüttung mittels ELISA

Um in den Mediumüberständen der RPE Zellen Proteine spezifisch nachweisen und quantifizieren zu können, wurde die Methode des *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) verwendet, der auf der Antigen-Antikörper Bindungsaffinität basiert (Engvall und Perlmann 1971; Van Weemen und Schuurs 1971; Rehm und Letzel 2010).

Im Allgemeinen zeichnet sich der *Sandwich*-ELISA dadurch aus, dass das gesuchte Antigen, zwischen zwei Antikörpern liegt (Abb. 6). Bei dieser Methode werden 96-*well*-Platten verwendet. Die Vertiefungen der Platte sind mit einem spezifischen, immobilisierten Antikörper beschichtet, welcher über eine hohe Bindungsaffinität zum gewünschten Zielprotein verfügt. Nachdem diese primären Antikörper an ein Epitop des gesuchten Antigens gebunden haben, wird ein weiterer sekundärer Antikörper hinzugegeben. Dieser sekundäre

Antikörper bindet an ein weiteres Epitop des bereits gebundenen Zielproteins, sodass das Zielprotein sich nun zwischen Erst- und Zweitantikörper befindet (*Sandwich*-ELISA). An den Sekundärantikörper ist eine Meerrettichperoxidase (HRP - *horseradish peroxidase*) gekoppelt, die das hinzugegebene Substrat Tetramethylbenzidin (TMB), in ein unlösliches blaues Endprodukt umsetzt. Diese Reaktion wird durch Zugabe einer *Stopp-Solution* beendet, indem sie das blaue Endprodukt der Peroxidase in einen stabilen gelben Farbkomplex umwandelt (Abb. 6). Dieser Farbkomplex kann bei einer Wellenlänge von $\lambda = 450$ nm photometrisch bestimmt werden. Die gemessene Farbintensität verhält sich dabei proportional zur Quantität des Zielproteins.

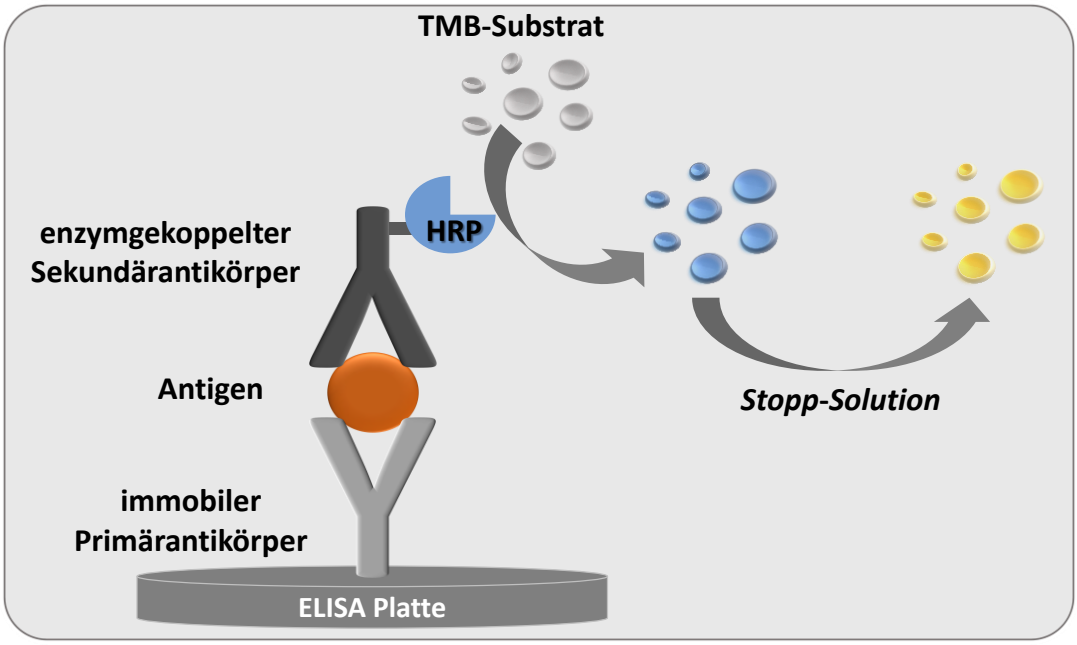


Abbildung 6: Skizze von der Funktionsweise des *Sandwich*-ELISAs. Das entsprechend gesuchte Antigen (IL-1β, IL-6, IL-8 oder TNFα) befindet sich nach Zugabe des Sekundärantikörpers zwischen Erst- und Zweitantikörper (*Sandwich-ELISA*). Die gekoppelte Peroxidase (HRP) reagiert mit dem TMB-Substrat zu einem blauen Farbkomplex, der sich nach Zugabe der *Stopp-Solution* in einen gelben umwandelt. HRP = Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*), TMB-Substrat = Tetramethylbenzidin.

In der vorliegenden Arbeit wurden für die Bestimmung der IL-1β, IL-6, IL-8 und der TNFα Konzentrationen die Quantikine® ELISA Kit der Firma R&D Systems verwendet, die in Tabelle 6 aufgeführt sind. Die im ELISA-Kit mitgelieferten Lösungen sowie die ELISA-Platte im verschlossenen Zustand wurden bis zu ihrer Verwendung maximal einen Monat bei 4 °C gelagert. Je nach Herstellervorgabe wurden die aus der Zellkultur gewonnenen Überstände

und Standards in den ELISA eingesetzt. Zur Konzentrationsbestimmung wurde je nach Herstellerangaben eine doppelte Standard-Verdünnungsreihe hergestellt. Nach dem Auftauen der Proben bei Raumtemperatur wurden diese in die 96-*wells* der ELISA-Platte pipettiert und auf einem Wippschüttler platziert, sodass das Zielprotein während einer zweistündigen Inkubationszeit auf der Trägeroberfläche gebunden werden konnte. Im Anschluss wurden die *wells* der ELISA-Platte in dem Waschautomaten ELx50 mit Waschpuffer gespült, um die ungebundenen Probenbestandteile zu entfernen. Daraufhin wurde der sekundäre Antikörper hinzugefügt und für weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Wippschüttler inkubiert. Nach einem erneuten Waschvorgang erfolgte die Substitution des Substrats Tetramethylbenzidin (TMB). Während einer 30 minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur und unter lichtgeschützten Bedingungen, fand eine Farbumschlagsreaktion statt, die in einem letzten Schritt mittels der *Stopp-Solution* (Salzsäure < 5%) beendet wurde. Dieser Farbumschlag wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 450\,\text{nm}$ mithilfe des Mikrotiterplatten-Photometers ELx800 bestimmt. Die Auswertung jeder Probe erfolgte mit Hilfe der vom Software-Programm Gen5 automatisch generierten Standardkurve.

II.4 Statistik

Alle aufgeführten Versuche wurden drei- bis fünfmal unabhängig voneinander wiederholt. Statistische Analysen wurden mit dem *Student's* T-Test in Excel (Microsoft) durchgeführt. Die Berechnung erfolgte jeweils, wenn nicht anders gekennzeichnet, gegen die unbehandelten Kontrollen. Werte von $p \leq 0{,}05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet. Die dargestellten Balkendiagramme enthalten die Mittelwerte und Standardabweichungen.

III Ergebnisse

III.1 RPE Zellvitalität unter Entzündungsmediatoren und VEGF-Inhibitoren

Primäre porcine RPE Zellen wurden mit drei verschiedenen Konzentrationen von Poly I:C (1, 10, 100 µg/ml), LPS (0.1, 1, 10 µg/ml) oder TNFα (12.5, 25, 50 ng/ml) sowie mit den Medikamenten Aflibercept (250 µg/ml) oder Bevacizumab (250 µg/ml) für 24 Stunden, sieben Tage und vier Wochen behandelt. Der Einfluss der Behandlung auf die Zellvitalität wurde am Ende einer Behandlungsperiode mit dem MTT (Methyl thiazolyl tetrazolium) - Assay untersucht. Die Signifikanz wurde mit dem *Student's*-T-Test bewertet.

III.1.1 Zellvitalität unter alleiniger Stimulation mit Entzündungsmediatoren

Poly I:C induzierte nach 24 Stunden keine signifikante Abnahme der Lebensfähigkeit. Jedoch kam es bei den Stimulationskonzentrationen 1 und 100 µg/ml nach sieben Tagen und bei 10 und 100 µg/ml nach vier Wochen zu einem signifikanten Verlust der Zellvitalität. Der stärkste Effekt wurde nach Stimulation mit 100 µg/ml über vier Wochen beobachtet (Abb. 7 a, Tab. 9 - 11).

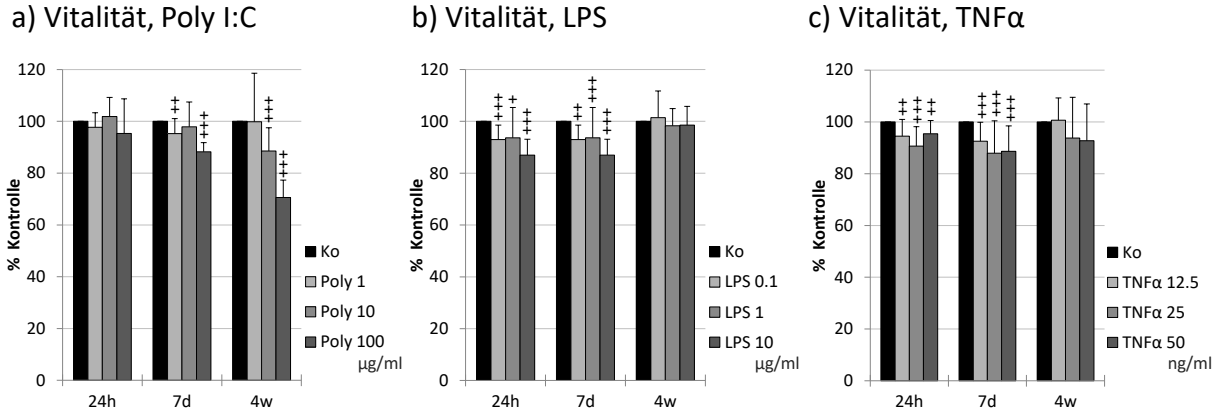


Abbildung 7: Vitalität unter Entzündungsmediatoren. Dargestellt ist das Zellüberleben von primären RPE Zellen nach der Stimulation mit (a) Poly I:C (1, 10, 100 µg/ml; n = 7), (b) LPS (0.1, 1, 10 µg/ml; n = 7) oder (c) TNFα (12.5, 25, 50 ng/ml; n = 7) für 24 Stunden, sieben Tage oder vier Wochen. Poly I:C reduziert die Vitalität signifikant nach sieben Tagen (1 und 100 µg/ml) und vier Wochen (10 und 100 µg/ml), während LPS und TNFα das Zellüberleben nach 24 Stunden und sieben Tagen bei allen getesteten Konzentrationen reduzieren. Die Signifikanz wurde mit dem *Student's* T-Test berechnet. Signifikanzen gegen die unbehandelte Kontrolle wurden gekennzeichnet mit: +++ = $p < 0.001$, ++ = $p < 0.01$, + = $p < 0.05$. Poly/ Poly I:C = Polyinosin-Polycytidylsäure, LPS = Lipopolysaccharid, TNFα = Tumornekrosefaktor alpha, Ko = Kontrolle, h = Stunden, d = Tage, w = Wochen, n = Anzahl der Versuchswiederholungen (Klettner et al. 2020).

Die LPS-Behandlung führte bei allen getesteten Konzentrationen nach 24 Stunden und sieben Tagen, jedoch nicht nach vier Wochen zu einer signifikanten Abnahme des Zellüberlebens (Abb. 7 b, Tab. 12-14).

In ähnlicher Weise verringerte TNFα die Lebensfähigkeit bei allen Konzentrationen nach 24 Stunden und sieben Tagen. Nur bei einer Konzentration von 50 ng/ml kam es auch nach vier Wochen zu einer signifikanten Reduktion der Vitalität der Zellen (Abb. 7 c, Tab. 15-17).

Zusammengefasst reduzierte Poly I:C die Vitalität signifikant nach sieben Tagen (1 und 100 µg/ml) und vier Wochen (10 und 100 µg/ml), während LPS und TNFα das Zellüberleben nach 24 Stunden und sieben Tagen bei allen getesteten Konzentrationen reduzierte.

III.1.2 Kurz- und mittelfristige Effekte der Kombination von VEGF-Inhibitoren und Entzündungsmediatoren auf die Zellvitalität

Zusätzlich wurden die RPE Zellen mit den VEGF-Inhibitoren Aflibercept (250 µg/ml) und Bevacizumab (250 µg/ml) einzeln sowie in Kombination mit den inflammatorischen Agonisten in drei verschiedenen Konzentrationen von Poly I:C (1, 10, 100 µg/ml), LPS (0.1, 1, 10 µg/ml) oder TNFα (12.5, 25, 50 ng/ml) für 24 Stunden, sieben Tage oder vier Wochen behandelt. Die Ergebnisse der Langzeitbehandlung von vier Wochen werden im Kapitel III.1.3. beschreiben.

Eine alleinige Behandlung mit Aflibercept und Bevacizumab führte zu jedem getesteten Zeitpunkt zu einer signifikanten Minderung der Zellvitalität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 8, Tab. 9-10).

Die Kombination von Aflibercept mit 1 µg/ml Poly I:C ergab nach 24 Stunden eine signifikante Reduktion der Zellvitalität sowohl im Vergleich zur Kontrolle als auch gegen Poly I:C gleicher Konzentration und tendenziell gegenüber Aflibercept allein. Nach sieben Tagen führte jede Konzentration von Poly I:C in der Kombination mit Aflibercept zu einem signifikanten Abfall des Zellüberlebens gegenüber der Kontrolle. Zusätzlich führte die Konzentration von 1 und 100 µg/ml Poly I:C in Kombination mit Aflibercept nach sieben Tagen auch zu einer signifikanten Abnahme gegenüber einer reinen Stimulation mit Poly I:C gleicher Konzentration oder Aflibercept allein (Abb. 8 a - b, Tab. 9 - 10).

Eine Kombination aus Bevacizumab und 1 µg/ml Poly I:C führte nach 24 Stunden ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der Zellvitalität gegenüber der Kontrolle, nicht aber gegenüber

Poly I:C gleicher Konzentration oder Bevacizumab allein. Nach sieben Tagen konnte für die Kombination von Bevacizumab mit 1 und 100 µg/ml Poly I:C ein signifikanter Abfall des Zellüberlebens im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Die Kombination mit Poly I:C 1 µg/ml zeigte dabei ebenfalls ein tendenzielles Absinken gegenüber der alleinigen Gabe von Poly I:C gleicher Konzentration, nicht aber gegenüber Bevacizumab. Für 100 µg/ml Poly I:C galt, dass es kombiniert nicht zu einem signifikanten Unterschied gegenüber Poly I:C gleicher Konzentration oder Bevacizumab allein kam (Abb. 8 a - b, Tab. 9 - 10).

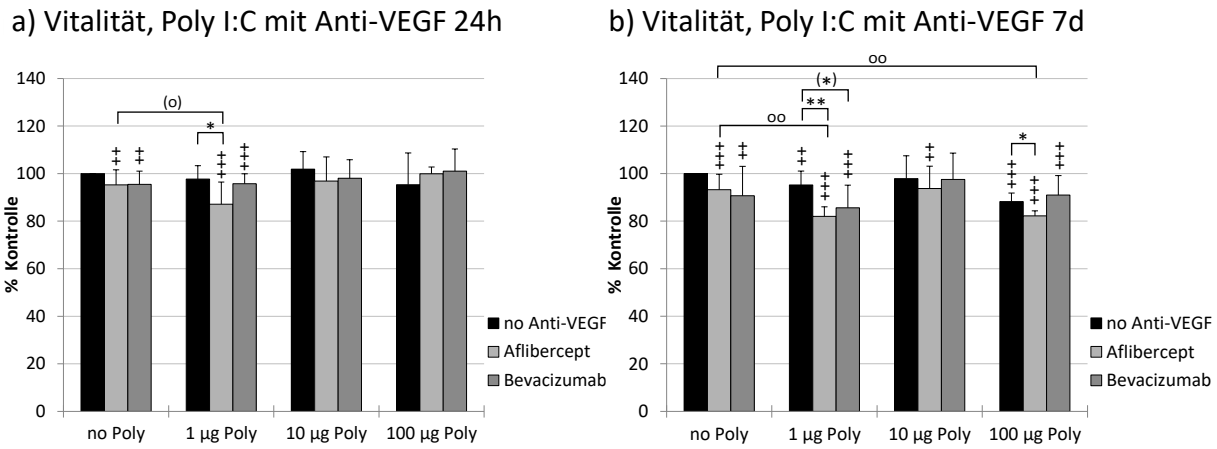


Abbildung 8: Kurz- und mittelfristige Vitalität unter Poly I:C und VEGF-Inhibitoren. Dargestellt ist das Zellüberleben von primären RPE Zellen nach der Stimulation mit Poly I:C (1, 10, 100 µg/ml) und Aflibercept (250 µg/ml) oder Bevacizumab (250 µg/ml) für 24 Stunden (n = 4) (a) oder sieben Tage (n = 4) (b). Aflibercept und Bevacizumab allein reduzieren die Vitalität nach 24 Stunden und sieben Tagen signifikant. Die Kombination von Aflibercept mit Poly I:C (1 µg/ml) nach 24 Stunden und (1 und 100 µg/ml) nach sieben Tagen hat signifikanten Einfluss und reduziert das Zellüberleben. Die Kombination von Bevacizumab mit Poly I:C (1 µg/ml) nach 24 Stunden und (100 µg/ml) nach sieben Tagen zeigt nur eine Toxizität im Vergleich zur Kontrolle. Bevacizumab mit Poly I:C (1 µg/ml) nach sieben Tagen vermindert das Zellüberleben gegen die Kontrolle und tendenziell gegenüber Bevacizumab allein. Die Signifikanz wurde mit dem *Student's* T-Test berechnet, +++ = $p < 0.001$, ++ = $p < 0.01$, + = $p < 0.05$ gegenüber der unbehandelten Kontrolle; ∗∗ = $p < 0.01$, ∗ = $p < 0.05$, (∗)= $p < 0.07$ gegenüber Poly I:C gleicher Konzentration; oo = $p < 0.01$, (o) = $p < 0.07$ gegenüber Anti-VEGF allein. Anti-VEGF = VEGF-Inhibitor (Aflibercept/ Bevacizumab), Poly/ Poly I:C = Polyinosin-Polycytidylsäure, h = Stunden, d = Tage, n = Anzahl der Versuchswiederholungen.

Die kombinierte Gabe von Aflibercept und LPS führte in jeder Konzentration nach 24 Stunden und sieben Tagen zu einem signifikanten Abfall des Zellüberlebens gegenüber der Kontrolle. Nach 24 Stunden zeigte sich für die Stimulationskombination aus Aflibercept und 0.1 sowie 10 µg/ml LPS in absoluten Werten eine verminderte Zellvitalität sowohl gegenüber LPS allein als auch Aflibercept allein. Jedoch war diese Abnahme nur im Vergleich zu Aflibercept signifikant,

nicht aber im Vergleich zu LPS gleicher Konzentration. Nach sieben Tagen zeigte sich ebenfalls dieser Effekt bei einer Stimulationskonzentration von 0.1 und 1 µg/ml LPS, denn die Kombinationsgabe reduzierte das Zellüberleben in absoluten Werten im Vergleich zu LPS und Aflibercept allein. Allerdings war die Abnahme der Vitalität wiederum nur gegen Aflibercept allein signifikant, nicht aber im Vergleich zu LPS gleicher Konzentration. Eine signifikante Abnahme durch die Kombination zeigte sich bei 1 und 10 µg/ml LPS nur gegenüber Aflibercept allein und bei der Konzentration von 0.1 µg/ml war ein Trend in Richtung einer verminderten Zellvitalität gegenüber Aflibercept allein erkennbar (Abb. 9 a - b, Tab. 12 - 13).

Die Behandlung mit Bevacizumab und LPS zusammen führte nach 24 Stunden und auch nach sieben Tagen in jeder Konzentration zu einer signifikanten Verminderung des Zellüberlebens gegenüber der Kontrolle. Sie fiel jedoch in absoluten Werten geringer als bei Aflibercept aus und war im Vergleich zu Bevacizumab und LPS gleicher Konzentration allein nicht signifikant (Abb. 9 a - b, Tab. 12 - 13).

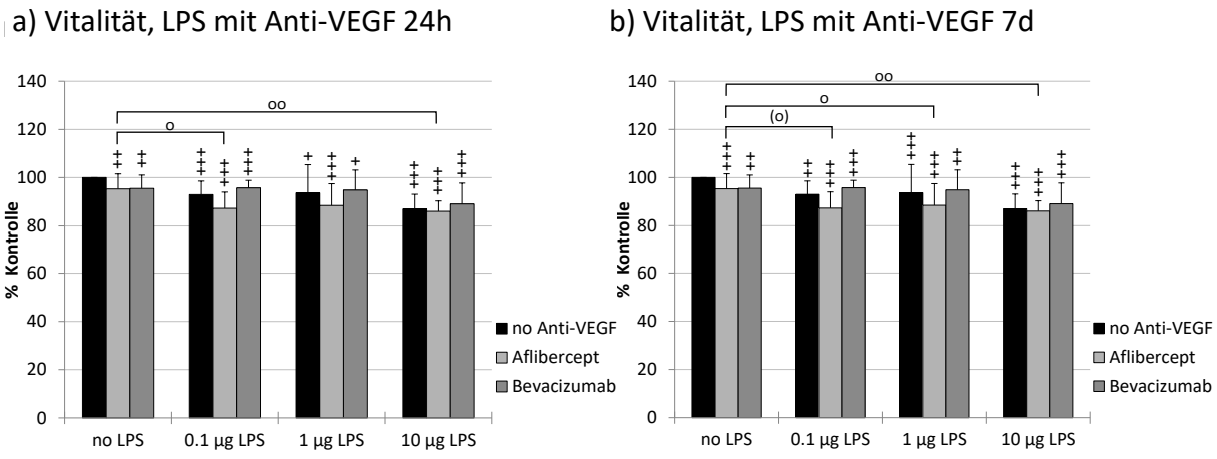


Abbildung 9: Kurz- und mittelfristige Vitalität unter LPS und VEGF-Inhibitoren. Dargestellt ist das Zellüberleben von primären RPE Zellen nach der Stimulation mit LPS (0.1, 1, 10 µg/ml) und Aflibercept (250 µg/ml) oder Bevacizumab (250 µg/ml) für 24 Stunden (n = 4) (a) oder sieben Tage (n = 4) (b). Aflibercept und Bevacizumab allein reduzieren die Vitalität nach 24 Stunden und sieben Tagen signifikant. Die Kombination von Aflibercept mit LPS (0.1 und 10 µg/ml) nach 24 Stunden und (0.1, 1 und 10 µg/ml) reduziert das Zellüberleben signifikant im Vergleich zur Korntolle und gegen Aflibercept allein. Aflibercept mit LPS (1 µg/ml) nach 24 Stunden vermindert das Zellüberleben gegen die Kontrolle. Die Kombination von Bevacizumab mit LPS (0.1, 1 und 10 µg/ml) nach 24 Stunden und (0.1, 1 und 10 µg/ml) nach sieben Tagen zeigt nur eine Toxizität im Vergleich zur Kontrolle. Die Signifikanz wurde mit dem *Student's* T-Test berechnet, +++ = $p < 0.001$, ++ = $p < 0.01$, + = $p < 0.05$ gegenüber der unbehandelten Kontrolle; oo = $p < 0.01$, o = $p < 0.05$, (o) = $p < 0.07$ gegenüber Anti-VEGF allein. Anti-VEGF = VEGF-Inhibitor (Aflibercept/ Bevacizumab), LPS = Lipopolysaccharid, h = Stunden, d = Tage, n = Anzahl der Versuchswiederholungen.

TNFα und Aflibercept kombiniert senkten unabhängig von der angewandten Stimulationskonzentration nach 24 Stunden und sieben Tagen signifikant das Zellüberleben gegenüber der Kontrolle, jedoch nicht im Vergleich zur reinen Stimulation mit TNFα gleicher Konzentration. Eine gemeinsame Stimulation von Aflibercept mit 25 ng/ml TNFα nach 24 Stunden als auch mit 12.5 ng/ml und 50 ng/ml TNFα nach sieben Tagen führte zusätzlich gegenüber einer ausschließlichen Stimulation mit Aflibercept zu einem signifikanten Zellvitalitätsverlust (Abb. 10 a - b, Tab. 15 - 16).

Die Kombination aus Bevacizumab und TNFα senkte bei einer Konzentration von 12.5 und 25 ng/ml nach 24 Stunden und nach sieben Tagen bei einer Konzentration von 12.5 und 50 ng/ml TNFα das Zellüberleben signifikant gegenüber der Kontrolle. Im Vergleich zu TNFα allein oder Bevacizumab kam es bei keiner Konzentration nach 24 Stunden oder sieben Tagen zu einem signifikanten Unterschied (Abb. 10 a - b, Tab. 15 - 16).

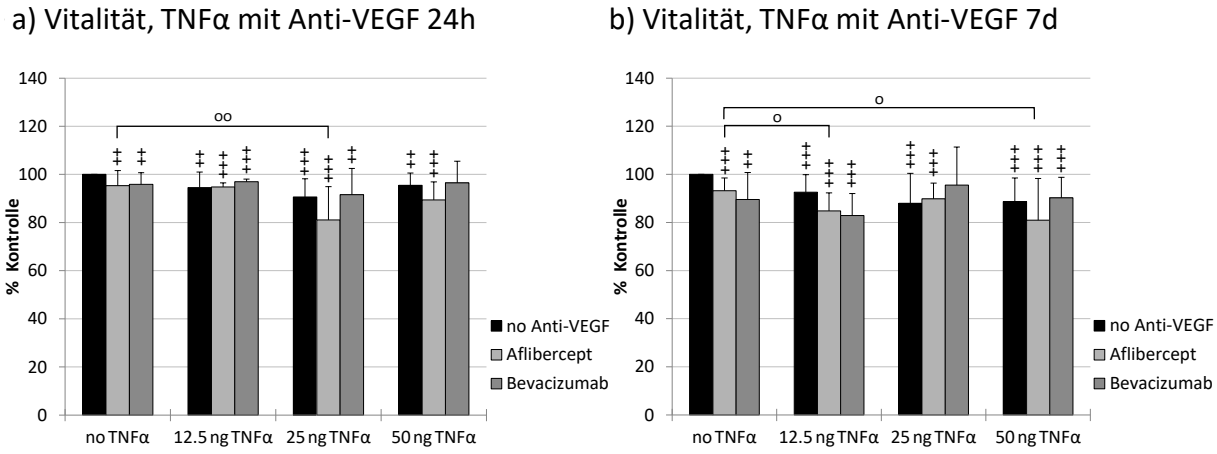


Abbildung 10: Kurz- und mittelfristige Vitalität unter TNFα und VEGF-Inhibitoren. Dargestellt ist das Zellüberleben von primären RPE Zellen nach der Stimulation mit TNFα (12.5, 25, 50 ng/ml) und Aflibercept (250 µg/ml) oder Bevacizumab (250 µg/ml) für 24 Stunden (n = 4) (a) oder sieben Tage (n = 4) (b). Aflibercept und Bevacizumab allein reduzierten die Vitalität nach 24 Stunden und sieben Tagen signifikant. Die Kombination von Aflibercept mit TNFα (25 ng/ml) nach 24 Stunden und (12.5 und 50 ng/ml) reduzierte das Zellüberleben signifikant im Vergleich zur Korntolle und gegen Aflibercept allein. Aflibercept mit TNFα (12.5 und 50 ng/ml) nach 24 Stunden und (25 ng/ml) nach sieben Tagen verminderte das Zellüberleben gegen die Kontrolle. Die Kombination von Bevacizumab mit TNFα (12.5 und 25 ng/ml) nach 24 Stunden und (12.5 und 50 ng/ml) nach sieben Tagen zeigte nur eine Toxizität im Vergleich zur Kontrolle. Die Signifikanz wurde mit dem *Student's* T-Test berechnet, +++ = $p < 0.001$, ++ = $p < 0.01$ gegenüber der unbehandelten Kontrolle; oo = $p < 0.01$, o = $p < 0.05$ gegenüber Anti-VEGF allein. Anti-VEGF = VEGF-Inhibitor (Aflibercept/ Bevacizumab), Tumornekrosefaktor alpha, h = Stunden, d = Tage, n = Anzahl der Versuchswiederholungen.

Für die kurz- und mittelfristigen Effekte auf die Vitalität lassen sich folgende Aussagen zusammenfassend festhalten:

Poly I:C reduzierte mittelfristig das Zellüberleben, Aflibercept ebenfalls und zusätzlich bei den beiden anderen Zeitpunkten. Die Kombination war nach 24 Stunden und 1 µg/ml Poly I:C sowie nach sieben Tagen bei 1 und 100 µg/ml gegenüber Aflibercept und Poly I:C in gleicher Konzentration allein toxisch.

Die kombinierte Gabe von Aflibercept und LPS verstärkt grundsätzlich kurz- und mittelfristig den Vitalitätsreduzierenden Effekt von LPS zwar nicht signifikant, aber erkennbar. Für Bevacizumab und LPS zusammen war der Effekt geringer als bei der Kombination mit Aflibercept.

III.1.3 Langfristige Effekte der Kombination von VEGF-Inhibitoren und Entzündungsmediatoren auf die Zellvitalität

Die RPE Zellen wurden für vier Wochen mit den VEGF-Inhibitoren Aflibercept (250 µg/ml) und Bevacizumab (250 µg/ml) einzeln sowie in Kombination mit den inflammatorischen Agonisten in drei verschiedenen Konzentrationen von Poly I:C (1, 10, 100 µg/ml), LPS (0.1, 1, 10 µg/ml) oder TNFα (12.5, 25, 50 ng/ml) behandelt.

Nach vier Wochen führte jede Konzentration von Poly I:C in der Kombination mit Aflibercept zu einem signifikanten Abfall des Zellüberlebens gegenüber der Kontrolle. Es ist klar zu erkennen, dass die gleichzeitige Gabe von 10 µg/ml Poly I:C in Kombination mit Aflibercept das Überleben der RPE Zellen auch im Vergleich zu einer reinen Stimulation mit Poly I:C gleicher Konzentration oder einer reinen Stimulation mit Aflibercept deutlich verminderte. Des Weiteren führte eine Konzentration von 100 µg/ml Poly I:C in Kombination mit Aflibercept im Vergleich zu einer alleinigen Stimulation mit Aflibercept zu einem signifikanten Abfall der Zellvitalität. Allerdings war dieser Effekt nicht gegenüber einer Stimulation mit 100 µg/ml Poly I:C allein zu beobachten (Abb. 11 a, Tab. 11).

In der Langzeitstimulation von vier Wochen zeigte sich für die Kombination von Bevacizumab und Poly I:C unabhängig von der Poly I:C Konzentration ein signifikanter Abfall des Zellüberlebens im Vergleich zur Kontrolle. Zusätzlich führte nach vier Wochen die Konzentration von 10 µg/ml Poly I:C in kombinierter Gabe mit Bevacizumab zu einer

signifikanten Abnahme der Vitalität gegenüber einer ausschließlichen Stimulation mit Bevacizumab, nicht aber gegenüber Poly I:C allein. Außerdem wurde unter einer Stimulation mit 100 µg/ml Poly I:C in Kombination mit Bevacizumab eine signifikante Erhöhung der Zellvitalität gegenüber einer ausschließlichen Stimulation mit 100 µg/ml Poly I:C beobachtet (Abb. 11 b, Tab. 11).

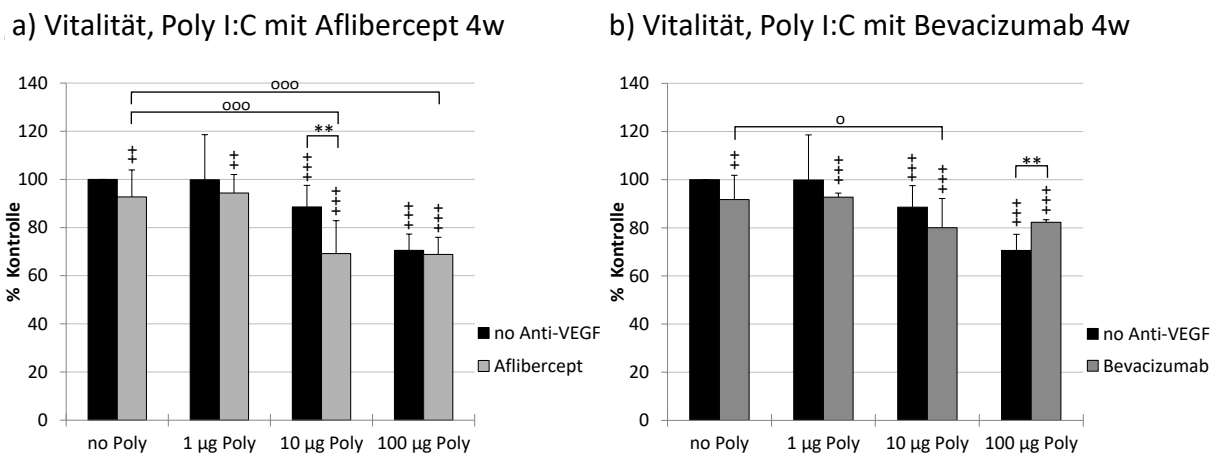


Abbildung 11: Vitalität in der Langzeitstimulation unter Poly I:C und VEGF-Inhibitoren. Dargestellt ist das Zellüberleben von primären RPE Zellen nach der Stimulation mit Poly I:C (1, 10, 100 µg/ml) und beiden Anti-VEGF-Therapeutika (a) Aflibercept (250 µg/ml; n = 4) oder (b) Bevacizumab (250 µg/ml; n = 4) für vier Wochen. Aflibercept und Bevacizumab allein reduzieren die Vitalität nach vier Wochen signifikant. Abbildung (a) zeigt den signifikant toxischen Einfluss der Kombination von Aflibercept mit 10 µg/ml Poly I:C gegenüber Aflibercept und Poly I:C allein nach vier Wochen. Die Verminderung der Vitalität durch die Stimulation mit Aflibercept und Poly I:C (100 µg/ml) ist signifikant gegenüber der Kontrolle und Aflibercept allein. Durch die Kombination von Aflibercept oder Bevacizumab mit Poly I:C (1 µg/ml) wir das Zellüberleben ausschließlich gegenüber der Kontrolle vermindert. Bevacizumab in Kombination mit Poly I:C (10 µg/ml) reduziert die Vitalität gegenüber der Kontrolle und Bevacizumab allein. Die Stimulation mit Poly I:C 100 µg/ml kombiniert mit Bevacizumab senkt zwar das Zellüberleben gegenüber der Kontrolle, aber erhöht es signifikant gegenüber der alleinigen Stimulation mit Poly I:C (100 µg/ml). Die Signifikanz wurde mit dem *Student's* T-Test berechnet, +++ = $p < 0.001$, ++ = $p < 0.01$, + = $p < 0.05$ gegenüber der unbehandelten Kontrolle; ∗∗ = $p < 0.01$ gegenüber Poly I:C gleicher Konzentration; ooo = $p < 0.001$, o = $p < 0.05$ gegenüber Anti-VEGF allein. Anti-VEGF = VEGF-Inhibitor (Aflibercept/ Bevacizumab), Poly/ Poly I:C = Polyinosin-Polycytidylsäure, w = Wochen, n = Anzahl der Versuchswiederholungen.

Nach vier Wochen beeinflusste die Kombination von Aflibercept mit 0.1 und 1 µg/ml LPS signifikant negativ das Zellüberleben gegenüber der Kontrolle. Die Kombination von Aflibercept und 1 µg /ml LPS ergab zusätzlich sowohl gegen die Kontrolle als auch jeweils gegenüber einer Stimulation mit Aflibercept oder 1 µg/ml LPS allein, eine signifikante Abnahme in Bezug auf das Zellüberleben (Abb. 12 a, Tab. 14). Nur die Kombination von Bevacizumab mit 1 µg/ml LPS verringerte nach vier Wochen Stimulation signifikant das

Zellüberleben, sowohl gegenüber der Kontrolle als auch gegenüber einer Stimulation mit 1 µg/ml LPS allein, nicht aber gegenüber einer reinen Stimulation mit Bevacizumab (Abb. 12 b, Tab. 14).

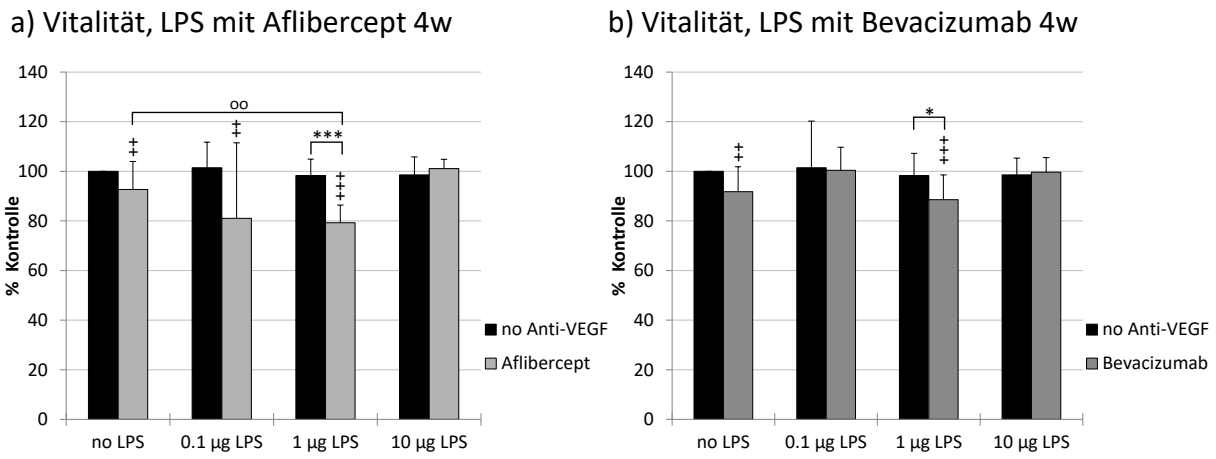


Abbildung 12: Vitalität in der Langzeitstimulation unter LPS und VEGF-Inhibitoren. Dargestellt ist das Zellüberleben von primären RPE Zellen nach der Stimulation mit LPS (0.1, 1, 10 µg/ml) und beiden Anti-VEGF-Therapeutika (a) Aflibercept (250 µg/ml; n = 4) oder (b) Bevacizumab (250 µg/ml; n = 4) für vier Wochen. Aflibercept und Bevacizumab allein reduzieren die Vitalität nach vier Wochen signifikant. Abbildung (a) zeigt den signifikant toxischen Einfluss der Kombination von Aflibercept mit 1 µg/ml LPS gegenüber Aflibercept und LPS allein nach vier Wochen. Die Verminderung der Vitalität durch die Stimulation mit Aflibercept und LPS (0.1 µg/ml) ist nur signifikant gegenüber der Kontrolle. Durch die Kombination von Bevacizumab mit LPS (1 µg/ml) reduziert die Vitalität gegenüber der Kontrolle und LPS allein, nicht aber gegenüber Bevacizumab allein, das ähnlich vermindert ist. Die Signifikanz wurde mit dem *Student's* T-Test berechnet, +++ = $p < 0.001$, ++ = $p < 0.01$ gegenüber der unbehandelten Kontrolle; $***$ = $p < 0.001$, $*$ = $p < 0.05$ gegenüber LPS gleicher Konzentration; oo = $p < 0.01$ gegenüber Anti-VEGF allein. Anti-VEGF = VEGF-Inhibitor (Aflibercept/ Bevacizumab), LPS = Lipopolysaccharid, w = Wochen, n = Anzahl der Versuchswiederholungen.

Unter der Behandlung mit Aflibercept und TNFα für vier Wochen zeigte sich nur für die Konzentration von 25 ng/ml, dass die Kombination sowohl gegenüber der Kontrolle als auch jeweils gegenüber einer Stimulation mit Aflibercept oder 25 ng/ml TNFα allein zu einem signifikanten Zellsterben führte (Abb. 12 a, Tab. 17).

Die vier Wochen Langzeitstimulation mit einer Konzentration von 25 und 50 ng/ml TNFα in Kombination mit Bevacizumab führte zu einem signifikant reduzierten Zellüberleben allein gegenüber der Kontrolle, nicht aber gegenüber TNFα allein oder Bevacizumab (Abb. 12 b, Tab. 17).

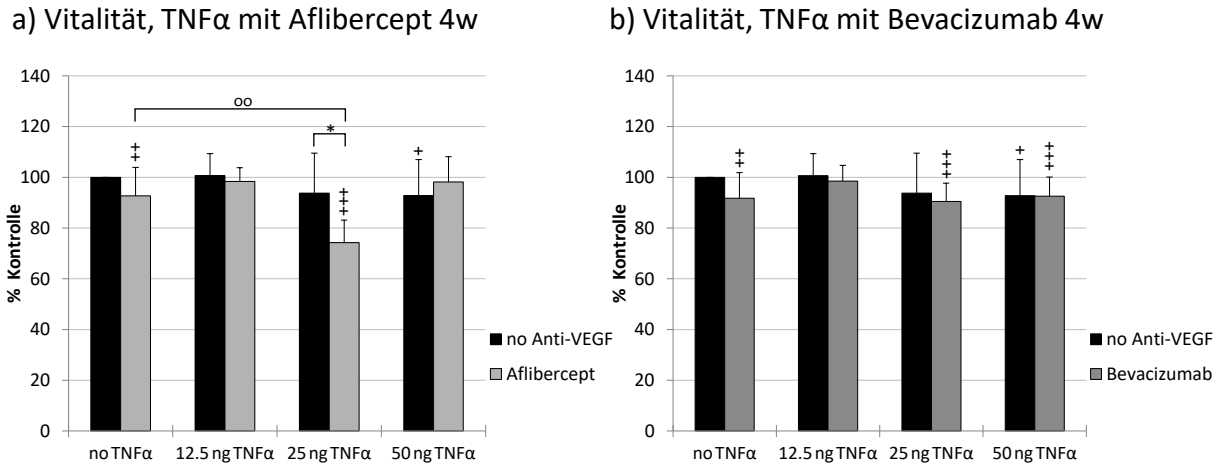


Abbildung 13: Vitalität in der Langzeitstimulation unter TNFα und VEGF-Inhibitoren. Dargestellt ist das Zellüberleben von primären RPE Zellen nach der Stimulation mit TNFα (12.5, 25, 50 ng/ml) und beiden Anti-VEGF-Therapeutika (a) Aflibercept (250 µg/ml; n = 4) oder (b) Bevacizumab (250 µg/ml; n = 4) für vier Wochen. Aflibercept und Bevacizumab allein reduzieren die Vitalität nach vier Wochen signifikant. Abbildung (a) zeigt den signifikant toxischen Einfluss der Kombination von Aflibercept mit 25 ng/ml TNFα gegenüber Aflibercept und TNFα allein nach vier Wochen. Die Verminderung der Vitalität durch die Stimulation mit Bevacizumab und TNFα (25 und 50 ng/ml) ist nur signifikant gegenüber der Kontrolle. Die Signifikanz wurde mit dem *Student's* T-Test berechnet, +++ = $p < 0.001$, ++ = $p < 0.01$, + = $p < 0.05$ gegenüber der unbehandelten Kontrolle; ∗ = $p < 0.05$ gegenüber TNFα gleicher Konzentration; oo = $p < 0.01$ gegenüber Anti-VEGF allein. Anti-VEGF = VEGF-Inhibitor (Aflibercept/ Bevacizumab), TNFα = Tumornekrosefaktor alpha, w = Wochen, n = Anzahl der Versuchswiederholungen.

Die langfristigen Effekte auf das Zellüberleben lassen sich unter folgenden Aussagen zusammenfassen: Aflibercept und Bevacizumab allein verminderten die Vitalität nach vier Wochen signifikant. Die Kombination von Aflibercept mit 10 µg/ml Poly I:C war gegenüber der Kontrolle, Aflibercept und Poly I:C allein nach vier Wochen signifikant toxisch. Bevacizumab in Kombination mit Poly I:C (10 µg/ml) reduzierte hingegen die Vitalität nur gegenüber der Kontrolle und Bevacizumab allein. Die Stimulation mit Poly I:C (100 µg/ml) kombiniert mit Bevacizumab senkt zwar das Zellüberleben gegenüber der Kontrolle, aber erhöht es signifikant gegenüber der alleinigen Stimulation mit Poly I:C (100 µg/ml), was auf einen protektiven Effekt hinweist.

Der Einfluss der Kombination von Aflibercept mit 1 µg/ml LPS gegenüber Aflibercept und LPS allein zeigte toxische Wirkung nach vier Wochen. Hingegen reduzierte die Kombination von Bevacizumab mit LPS (1 µg/ml) die Vitalität nur gegenüber der Kontrolle und LPS allein, nicht aber gegenüber Bevacizumab allein, das ähnlich vermindert ist.

Weiter hatte die Kombination von Aflibercept mit 25 ng/ml TNFα gegenüber Aflibercept und TNFα allein nach vier Wochen toxischen Einfluss. Andererseits war die Verminderung der Vitalität durch die Stimulation mit Bevacizumab und TNFα (25 und 50 ng/ml) nur signifikant gegenüber der Kontrolle. Abschließend kann festgehalten werden, dass die Bevacizumab-kombinationen grundsätzlich weniger toxisch als die Afliberceptkombinationen wirken.

III.2 Zytokinausschüttung des RPE unter Entzündungsmediatoren und VEGF-Inhibitoren

Im nachfolgenden Abschnitt werden die Ergebnisse zur Induktion der inflammatorischen Zytokine IL-1β, IL-6, IL-8 und TNFα nach der Behandlung der primären porcinen RPE Zellen mit der jeweils mittleren Konzentration der Entzündungsmediatoren Poly I:C (10 µg/ml), LPS (1 µg/ml) und TNFα (25 ng/ml) sowie der Medikamente Aflibercept (250 µg/ml) oder Bevacizumab (250 µg/ml) für 24 Stunden, sieben Tage und vier Wochen aufgeführt. Der Einfluss der Behandlung auf die Sekretion von IL-1β, IL-6, IL-8 und TNFα wurde mittels ELISA untersucht.

III.2.1 IL-1β Zytokinsekretion unter Entzündungsparametern

Unstimulierte primäre RPE Zellen sezernierten zu jedem Zeitpunkt nur sehr geringe Mengen IL-1β. Im Gegensatz dazu erhöhte die Behandlung mit Poly I:C die IL-1β Ausschüttung nach 24 Stunden bei einer Konzentration von 10 µg/ml im Vergleich zur Kontrolle tendenziell und bei 100 µg/ml signifikant. Abgesehen davon beeinflusste die Behandlung mit Poly I:C unabhängig von der Konzentration und der Behandlungsdauer die Sekretion von IL-1β nicht signifikant (Abb. 14 a, Tab. 18).

LPS bewirkte lediglich nach 24 Stunden eine signifikante Erhöhung der IL-1β Sekretion unter der Stimulation mit 0.1 und 1 µg/ml gegenüber der unbehandelten Kontrolle, jedoch nicht bei anderen Konzentrationen und Zeitpunkten (Abb. 14 b, Tab. 19).

Eine Stimulation mit TNFα hatte unabhängig von der Konzentration und der Behandlungsdauer keinen Einfluss auf die Sekretion von IL-1β im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 14 c, Tab. 20).

a) IL-1ß Sekretion, Poly I:C b) IL-1ß Sekretion, LPS c) IL-1ß Sekretion, TNFα

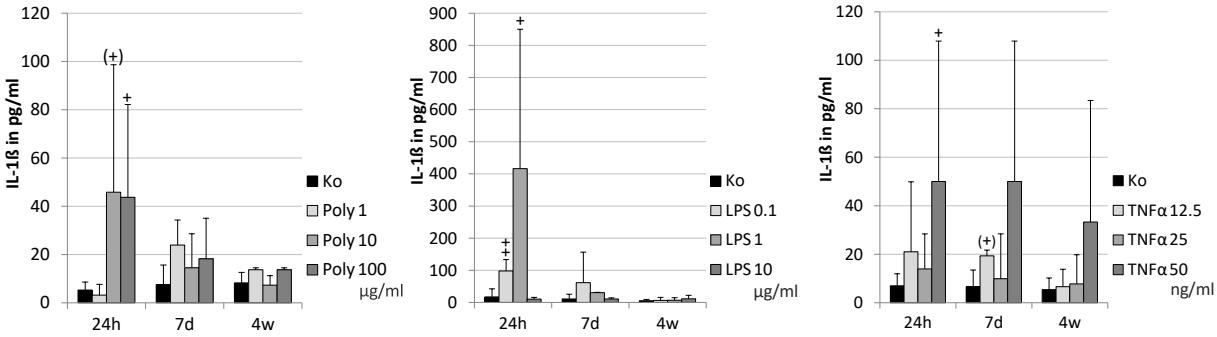


Abbildung 14: IL-1β Sekretion unter Entzündungsmediatoren. Dargestellt ist die Sekretion von IL-1β von primären RPE Zellen nach der Stimulation mit Poly I:C (1, 10, 100 µg/ml; n ≤ 2) (a), LPS (0.1, 1, 10 µg/ml; n ≤ 2) (b) oder TNFα (12.5, 25, 50 ng/ml; n ≤ 2) (c) für 24 Stunden, sieben Tage oder vier Wochen. LPS (1 µg/ml) und Poly I:C (10, 100 µg/ml) induzierten eine signifikante IL-1β Sekretion nach 24 Stunden. Die Signifikanz wurde mit dem *Student's* T-Test berechnet, +++ = $p < 0.001$, ++ = $p < 0.01$, + = $p < 0.05$, (+) = $p < 0.07$. Poly/ Poly I:C = Polyinosin-Polycytidylsäure, LPS = Lipopolysaccharid, TNFα = Tumornekrosefaktor alpha, Ko = Kontrolle, h = Stunden, d = Tage, w = Wochen, n = Anzahl der Versuchswiederholungen (Klettner et al. 2020).

III.2.1.1 IL-1β Sekretion unter Behandlung mit VEGF-Inhibitoren

Die alleinige Behandlung mit Aflibercept und Bevacizumab führte zu keinem getesteten Zeitpunkt zu einer signifikanten Veränderung der IL-1β Ausschüttung (Abb. 15 - 17, Tab. 18 - 20).

Durch die Kombination von Poly I:C (10 µg/ml) mit Aflibercept sezernierten die Zellen nur nach 24 Stunden signifikant mehr IL-1β sowohl gegenüber der unbehandelten Kontrolle als auch gegenüber einer Stimulation mit Aflibercept allein, nicht aber gegenüber Poly I:C allein gleicher Konzentration. Allgemein wurde nach 24 Stunden die höchste Ausschüttung von IL-1β beobachtet (Abb. 15, Tab. 18).

Poly I:C (10 µg/ml) kombiniert mit Bevacizumab führte einzig nach 24 Stunden zu einer signifikanten Steigerung der IL-1β Sekretion sowohl gegenüber der unbehandelten Kontrolle als auch einer ausschließlichen Bevacizumab-Stimulation, nicht aber gegenüber Poly I:C allein. Insgesamt war die Sekretion von IL-1β auch nach 24 Stunden am höchsten (Abb. 15 a, Tab. 18).

a) IL-1β Sekretion, Poly I:C mit Anti-VEGF

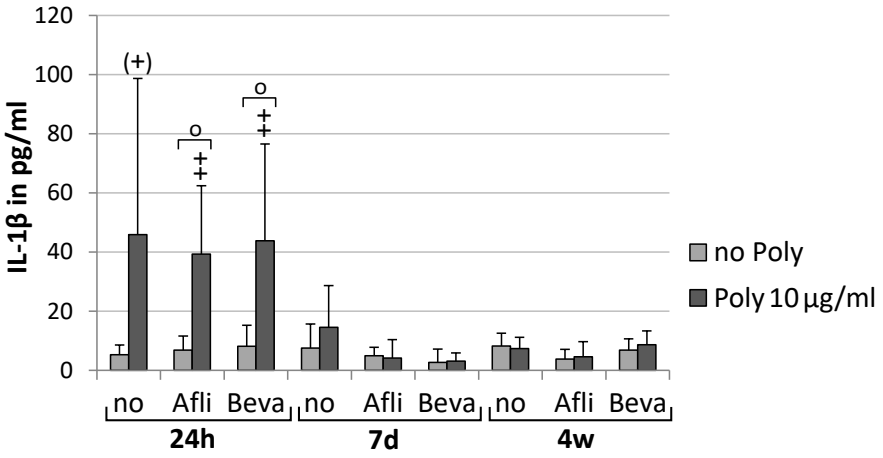


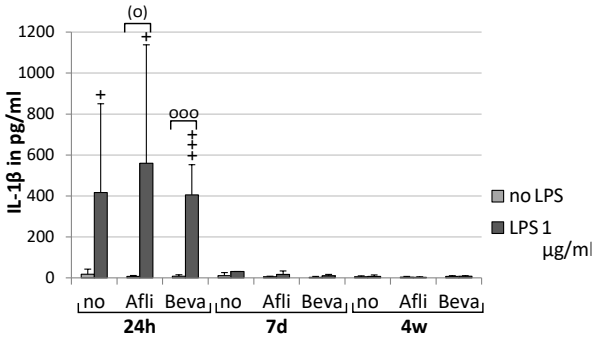
Abbildung 15: IL-1β Sekretion unter Poly I:C und VEGF-Inhibitoren. Dargestellt ist die Sekretion von IL-1β von primären RPE Zellen nach der Stimulation mit Poly I:C (1, 10, 100 µg/ml) (a) und Aflibercept (250 µg/ml) oder Bevacizumab (250 µg/ml) für 24 Stunden (n = 5), sieben Tage (n = 3) oder vier Wochen (n = 3). Poly I:C induziert IL-1β nur in den ersten 24 h. Die Kombination mit Aflibercept oder Bevacizumab hat keinen signifikanten Einfluss. Die Signifikanz wurde mit dem *Student's* T-Test berechnet, ++ = $p < 0.01$, (+) = $p < 0.07$. Poly/ Poly I:C = Polyinosin-Polycytidylsäure, no = ohne VEGF-Inhibitoren, Afli = Aflibercept, Beva = Bevacizumab, h = Stunden, d = Tage, w = Wochen, n = Anzahl der Versuchswiederholungen.

Bei der gemeinsamen Stimulation von LPS (1 µg/ml) mit Aflibercept kam es ebenfalls lediglich nach 24 Stunden zu einer signifikanten Erhöhung der IL-1β Sekretion sowohl gegenüber der Kontrolle als auch tendenziell gegenüber den mit Aflibercept allein stimulierten Zellen, nicht aber gegenüber LPS allein gleicher Konzentration. In absoluten Zahlen war die LPS Zytokininduktion jedoch wesentlich stärker als die unter Poly I:C oder TNFα. Wieder erreichte die Sekretion nach 24 Stunden ihren Höhepunkt (Abb. 16 b, Tab. 19).

Die Verknüpfung von LPS (1 µg/ml) mit Bevacizumab ergab nach 24 Stunden einen signifikanten Anstieg der IL-1β Sekretion sowohl gegenüber der Kontrolle als auch gegenüber einer alleinigen Bevacizumab-Stimulation, nicht aber gegenüber LPS allein gleicher Konzentration. Auch in diesem Fall war die größte Ausschüttung nach 24 Stunden zu verzeichnen (Abb. 16 b, Tab. 19).

Die Kombinationsgabe von TNFα (25 ng/ml) mit Aflibercept oder Bevacizumab resultierte zu keinem Zeitpunkt weder im Vergleich zur Kontrolle noch gegenüber einer ausschließlichen Stimulation mit einem der VEGF-Inhibitoren oder TNFα in einer signifikanten Veränderung der IL 1β Sekretion (Abb. 16 c, Tab. 20).

b) IL-1β Sekretion, LPS mit Anti-VEGF



c) IL-1β Sekretion, TNFα mit Anti-VEGF

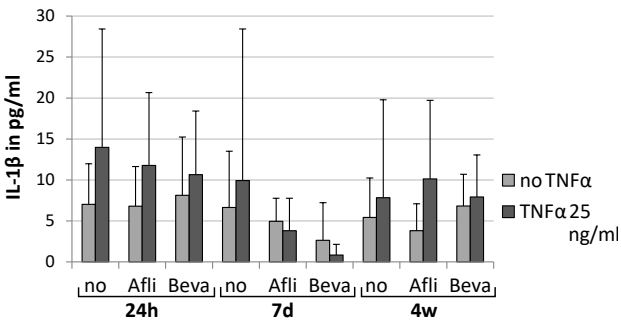


Abbildung 16: IL-1β Sekretion unter Entzündungsmediatoren und VEGF-Inhibitoren. Dargestellt ist die Sekretion von IL-1β von primären RPE Zellen nach der Stimulation mit LPS (0.1, 1, 10 µg/ml) (b) oder TNFα (12.5, 25, 50 ng/ml) (c) und Aflibercept (250 µg/ml) oder Bevacizumab (250 µg/ml) für 24 Stunden (n = 5), sieben Tage (n = 3) oder vier Wochen (n = 3). LPS (1 µg/ml) induziert signifikant eine IL-1β Ausschüttung nach 24 Stunden. TNFα hingegen induziert zu keinem Zeitpunkt eine IL-1β Sekretion. Die Kombination von den VEGF-Inhibitoren und LPS oder TNFα hat keinen Einfluss auf die Sekretion. Die Signifikanz wurde mit dem *Student's* T-Test berechnet, +++ = $p < 0.001$, + = $p < 0.05$ gegenüber der unbehandelten Kontrolle; ooo = $p < 0.001$, (o) = $p < 0.07$ gegenüber VEGF-Inhibitoren (Aflibercept/ Bevacizumab) allein. LPS = Lipopolysaccharid, TNFα = Tumornekrosefaktor alpha, no = ohne VEGF-Inhibitoren, Afli = Aflibercept, Beva = Bevacizumab, h = Stunden, d = Tage, w = Wochen, n = Anzahl der Versuchswiederholungen.

Bezogen auf die Zytokinausschüttung von IL-1β lässt sich zusammenfassen, dass Aflibercept und Bevacizumab weder allein noch in Kombination mit Entzündungsmediatoren die IL-1β Sekretion signifikant veränderten. LPS induzierte nach 24 Stunden signifikant am stärksten IL-1β, Poly I:C hingegen zwar signifikant, allerdings nur gering. Die TNFα Stimulation hatte keinen signifikanten Effekt auf die IL-1β Ausschüttung.

III.2.2 IL-6 Zytokinsekretion unter Entzündungsparametern

Unbehandelte primäre RPE Zellen sezernierten wenig IL-6. Die Behandlung mit Poly I:C (1, 10, 100 µg/ml) erhöhte die IL-6 Ausschüttung hingegen zu allen Zeitpunkten und bei allen drei Konzentrationen signifikant (Abb. 17 a, Tab. 21).

LPS (0.1, 1, 10 µg/ml) induzierte ebenfalls eine signifikante Erhöhung bei allen drei Konzentrationen nach 24 Stunden und vier Wochen, wohingegen nach sieben Tagen nur 10 µg/ml LPS einen signifikanten und 1 µg/ml einen tendenziellen Anstieg zeigten. Die Ausschüttung fiel allerdings nach vier Wochen geringer aus als zu den anderen Zeitpunkten (Abb. 17 b, Tab. 22).

TNFα (12.5, 25, 50 ng/ml) sorgte nach 24 Stunden und sieben Tagen unabhängig von der Stimulationskonzentration für eine signifikante Erhöhung der IL-6 Ausschüttung. Nach vier Wochen konnte nur für die Stimulations-konzentrationen 25 und 50 ng/ml, nicht aber für 12.5 ng/ml TNFα, ein signifikanter Anstieg der IL-6 Sekretion im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden (Abb. 17 c. Tab. 23).

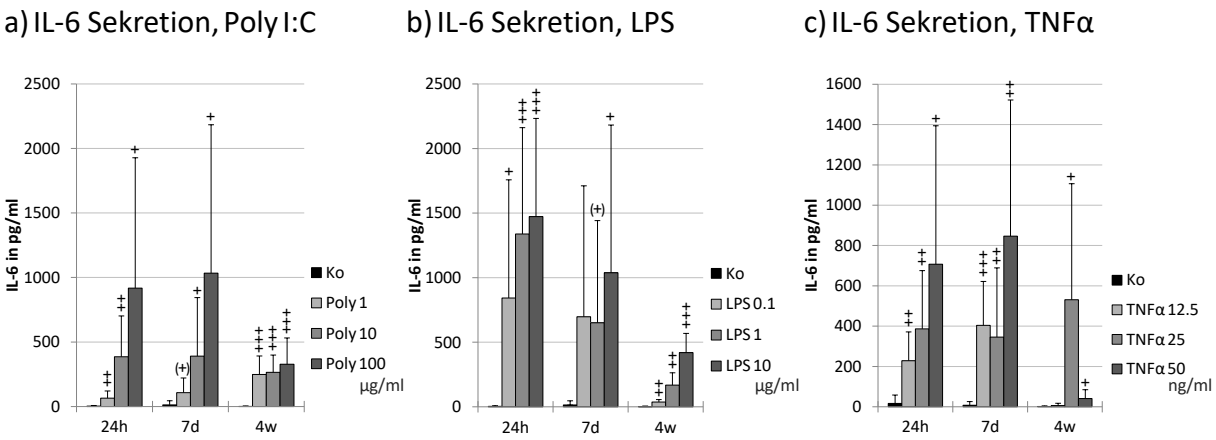


Abbildung 17: IL-6 Sekretion unter Entzündungsmediatoren. Dargestellt ist die Sekretion von IL-6 von primären RPE Zellen nach der Stimulation mit Poly I:C (1, 10, 100 µg/ml; n ≤ 3) (a), LPS (0.1, 1, 10 µg/ml; n ≤ 3) (b) oder TNFα (12.5, 25, 50 ng/ml; n ≤ 3) (c) für 24 Stunden, sieben Tage oder vier Wochen. Unbehandelte primäre RPE Zellen sezernierten kein IL-6. Poly I:C und LPS induzieren durch jede Konzentration und zu allen Zeitpunkten eine signifikante IL-6 Ausschüttung. TNFα induzierte durch alle Konzentrationen eine signifikante Sekretion von IL-6 nach 24 Stunden und sieben Tagen, hingegen nach vier Wochen nur TNFα (25 und 50 ng/ml) eine Ausschüttung induzierten, wobei die Sekretion bei 50 ng/ml geringer war. Die Signifikanz wurde mit dem *Student's* T-Test berechnet, +++ = $p < 0.001$, ++ = $p < 0.01$, + = $p < 0.05$, (+) = $p < 0.07$. Poly/ Poly I:C = Polyinosin-Polycytidylsäure, LPS = Lipopolysaccharid, TNFα = Tumornekrosefaktor alpha, Ko = Kontrolle, h = Stunden, d = Tage, w = Wochen, n = Anzahl der Versuchswiederholungen (Klettner et al. 2020).

III.2.2.1 IL-6 Sekretion unter Behandlung mit VEGF-Inhibitoren

Eine alleinige Behandlung mit Aflibercept und Bevacizumab führte zu keinem getesteten Zeitpunkt zu einem signifikanten Anstieg von IL-6 gegenüber der unbehandelten Kontrolle (Abb. 18 - 20, Tab. 21 - 23).

Durch die Kombination von Poly I:C (10 µg/ml) mit Aflibercept kam es zu allen Zeitpunkten zu einem Anstieg, der nach 24 Stunden signifikant gegenüber der Kontrolle aber nicht gegenüber der reinen Stimulation mit Poly I:C oder Aflibercept allein war. Der IL-6 Anstieg nach vier Wochen war ebenfalls signifikant gegenüber der Kontrolle und zusätzlich auch gegenüber

einer ausschließlichen Stimulation mit Aflibercept, nicht aber gegenüber Poly I:C gleicher Konzentration (Abb. 18, Tab. 21). Die Ausschüttung war nach 24 Stunden am höchsten.

Als Folge der Kombination von Poly I:C (10 µg/ml) mit Bevacizumab kam es zu allen Zeitpunkten zu einem signifikanten Anstieg der IL-6 Sekretion lediglich gegenüber der Kontrolle, nicht aber gegenüber Poly I:C gleicher Konzentration oder Bevacizumab allein. Die Ausschüttung nach 24 Stunden war am höchsten. Ausgenommen die Stimulation nach vier Wochen zeigte zudem einen signifikanten Anstieg der IL-6 Sekretion gegenüber einer reinen Stimulation mit Bevacizumab allein (Abb. 18, Tab. 21).

a) IL-6 Sekretion, Poly I:C mit Anti-VEGF

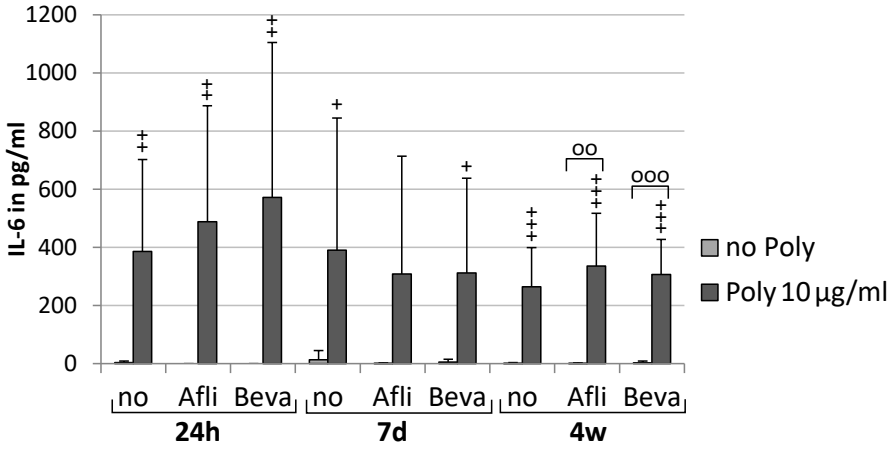


Abbildung 18: IL-6 Sekretion unter Poly I:C und VEGF-Inhibitoren. Dargestellt ist die Sekretion von IL-6 von primären RPE Zellen nach der Stimulation mit Poly I:C (10 µg/ml) und Aflibercept (250 µg/ml) oder Bevacizumab (250 µg/ml) für 24 Stunden (n = 3), sieben Tage (n = 4) oder vier Wochen (n = 5). 10 µg/ml Poly I:C induzierte zu allen Zeitpunkten eine IL-6 Sekretion. Da Aflibercept oder Bevacizumab zu keinem Zeitpunkt zu einer erhöhten IL-6 Ausschüttung führten, ist die signifikante Erhöhung der Kombination von VEGF-Inhibitoren mit Poly I:C (10 µg/ml) auf die Stimulation mit Poly I:C zurückzuführen und hatte keinen signifikanten Einfluss. Die Signifikanz wurde mit dem *Student's* T-Test berechnet, +++ = $p < 0.001$, ++ = $p < 0.01$, + = $p < 0.05$ gegenüber der unbehandelten Kontrolle; ooo = $p < 0.001$, oo = $p < 0.01$ gegenüber VEGF-Inhibitoren (Aflibercept/ Bevacizumab) allein. Poly/ Poly I:C = Polyinosin-Polycytidylsäure, no = ohne VEGF-Inhibitoren, Afli = Aflibercept, Beva = Bevacizumab, h = Stunden, d = Tage, w = Wochen, n = Anzahl der Versuchswiederholungen.

Im Zusammenhang mit der Kombination von LPS (1 µg/ml) mit Aflibercept kam es ebenfalls zu allen Zeitpunkten zu einem signifikanten Anstieg sowohl gegenüber der Kontrolle als auch gegenüber der Stimulation mit Aflibercept allein, nicht aber gegenüber LPS allein. Die IL-6 Ausschüttung war nach 24 Stunden am höchsten (Abb. 19, Tab. 22).

Eine Kombination von LPS (1 µg/ml) mit Bevacizumab ergab ebenfalls zu allen Zeitpunkten einen signifikanten Anstieg der IL-6 Sekretion gegenüber der Kontrolle mit einem Sekretionsmaximum nach 24 Stunden. Die LPS-Stimulation kombiniert mit Bevacizumab bewirkte außerdem nach 24 Stunden einen signifikanten und nach sieben Tagen einen tendenziellen Anstieg im Vergleich zu einer ausschließlichen Bevacizumab-Stimulation, nicht aber gegenüber LPS allein (Abb. 19, Tab. 22).

b) IL-6 Sekretion, LPS mit Anti-VEGF

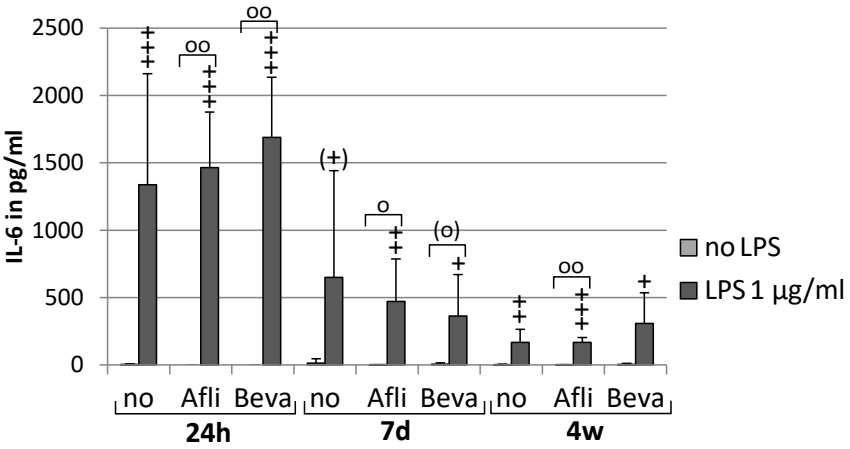


Abbildung 19: IL-6 Sekretion unter LPS und VEGF-Inhibitoren. Dargestellt ist die Sekretion von IL-6 von primären RPE Zellen nach der Stimulation mit LPS (1 µg/ml) und Aflibercept (250 µg/ml) oder Bevacizumab (250 µg/ml) für 24 Stunden (n = 3), sieben Tage (n = 4) oder vier Wochen (n = 3). 1 µg/ml LPS induzierte zu allen Zeitpunkten eine IL-6 Sekretion. Da Aflibercept oder Bevacizumab zu keinem Zeitpunkt zu einer erhöhten IL-6 Ausschüttung führten, ist die signifikante Erhöhung der Kombination von VEGF-Inhibitoren mit LPS (1 µg/ml) auf die Stimulation mit LPS zurückzuführen und hatte keinen signifikanten Einfluss. Die Signifikanz wurde mit dem *Student's* T-Test berechnet, +++ = $p < 0.001$, ++ = $p < 0.01$, + = $p < 0.05$, (+) = $p < 0.07$ gegenüber der unbehandelten Kontrolle; oo = $p < 0.01$, o = $p < 0.05$, (o) = $p < 0.07$ gegenüber VEGF-Inhibitoren (Aflibercept/ Bevacizumab) allein. LPS = Lipopolysaccharid, no = ohne VEGF-Inhibitoren, Afli = Aflibercept, Beva = Bevacizumab, h = Stunden, d = Tage, w = Wochen, n = Anzahl der Versuchswiederholungen.

Die Kombinationsstimulation von TNFα (25 ng/ml) mit Aflibercept resultierte zu allen Zeitpunkten in einem signifikanten Anstieg der IL-6 Konzentration gegenüber der Kontrolle, wobei die maximale Ausschüttung nach vier Wochen beobachtet wurde. Das gemeinsame Stimulieren unter TNFα und Aflibercept führte außerdem nach vier Wochen zu einem signifikanten Anstieg gegenüber dem Stimulieren der Zellen mit Aflibercept allein, nicht aber im Vergleich zu TNFα allein. Nach 24 Stunden und sieben Tagen zeigte sich ein tendenzieller

Anstieg der IL-6 Sekretion nach Kombinationsbehandlung gegenüber einer Behandlung nur mit Aflibercept, nicht aber gegenüber TNFα allein (Abb. 20, Tab. 23).

TNFα (25 ng/ml) kombiniert mit Bevacizumab hatte nach 24 Stunden und vier Wochen einen signifikanten Anstieg der IL-6 Sekretion gegenüber der Kontrolle zur Folge, der ebenfalls signifikant gegenüber der Stimulation mit Bevacizumab allein war, nicht aber gegenüber TNFα allein. Auch in diesem Fall war die Sekretion nach vier Wochen am höchsten. Nach sieben Tagen zeigte sich ein tendenzieller Anstieg der IL-6 Sekretion nach Kombinationsbehandlung gegenüber der Kontrolle, aber nicht gegenüber einer Behandlung nur mit Bevacizumab oder TNFα allein (Abb. 20, Tab. 23).

c) IL-6 Sekretion, TNFα mit Anti-VEGF

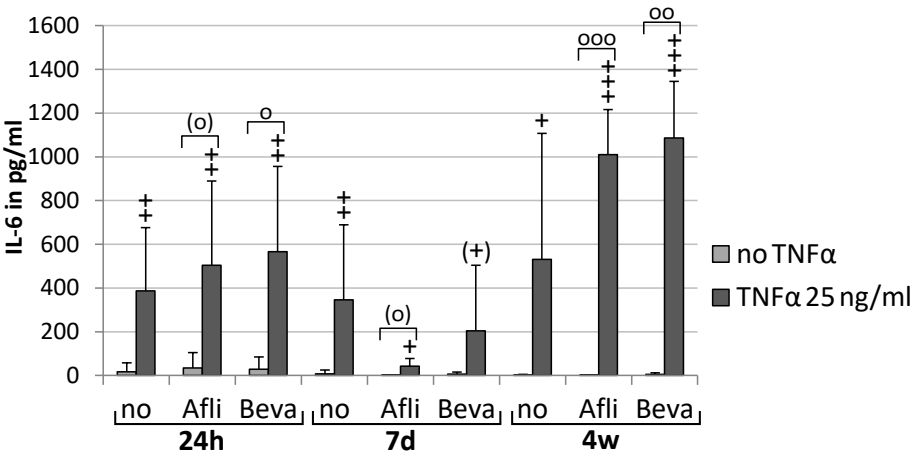


Abbildung 20: IL-6 Sekretion unter TNFα und VEGF-Inhibitoren. Dargestellt ist die Sekretion von IL-6 von primären RPE Zellen nach der Stimulation mit TNFα (25 ng/ml) und Aflibercept (250 µg/ml) oder Bevacizumab (250 µg/ml) für 24 Stunden (n = 4), sieben Tage (n = 4) oder vier Wochen (n = 3). 25 ng/ml TNFα induzierte zu allen Zeitpunkten eine IL-6 Sekretion. Da Aflibercept oder Bevacizumab zu keinem Zeitpunkt zu einer signifikant erhöhten IL-6 Ausschüttung führten, ist die signifikante Erhöhung der Kombination von VEGF-Inhibitoren mit TNFα (25 ng/ml) auf die Stimulation mit TNFα zurückzuführen und hatte keinen signifikanten Einfluss. Die Signifikanz wurde mit dem *Student's* T-Test berechnet, +++ = $p < 0.001$, ++ = $p < 0.01$, + = $p < 0.05$, (+) = $p < 0.07$ gegenüber der unbehandelten Kontrolle; ooo = $p < 0.001$, oo = $p < 0.01$, o = $p < 0.05$, (o) = $p < 0.07$ gegenüber VEGF-Inhibitoren (Aflibercept/ Bevacizumab) allein. TNFα = Tumornekrosefaktor alpha, no = ohne VEGF-Inhibitoren, Afli = Aflibercept, Beva = Bevacizumab, h = Stunden, d = Tage, w = Wochen, n = Anzahl der Versuchswiederholungen.

Zusammengefasst induzierte die Stimulation mit LPS und Poly I:C nach 24 Stunden am stärksten die IL-6 Ausschüttung, mit TNFα hingegen nach vier Wochen. Für die alleinige Stimulation mit Aflibercept und Bevacizumab können als Hauptaussagen zusammengefasst

werden, dass es zu keiner signifikanten Beeinflussung der IL-6 Zytokinausschüttung kam. Außerdem führte die Kombination mit Entzündungsmediatoren ebenfalls zu keiner signifikanten Veränderung gegenüber einer Stimulation mit einem Entzündungsmediator allein und der Anti-VEGF Therapie allein.

III.2.3 IL-8 Zytokinsekretion unter Entzündungsparametern

Unbehandelte primäre RPE Zellen sezernierten nachweisbare Mengen IL-8. Poly I: C induzierte allerdings zu allen Zeitpunkten und bei allen getesteten Konzentrationen eine signifikant erhöhte Sekretion von IL-8 im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 21 a, Tab. 24). In ähnlicher Weise induzierte LPS die Sekretion von IL-8 zu allen Zeitpunkten und in allen Konzentrationen (Abb. 21 b, Tab. 25). Auch TNFα erhöhte die IL-8 Ausschüttung zu allen Zeitpunkten und allen Konzentrationen signifikant gegenüber der unbehandelten Kontrolle (Abb. 21 c, Tab. 26).

a) IL-8 Sekretion, Poly I:C b) IL-8 Sekretion, LPS c) IL-8 Sekretion, TNFα

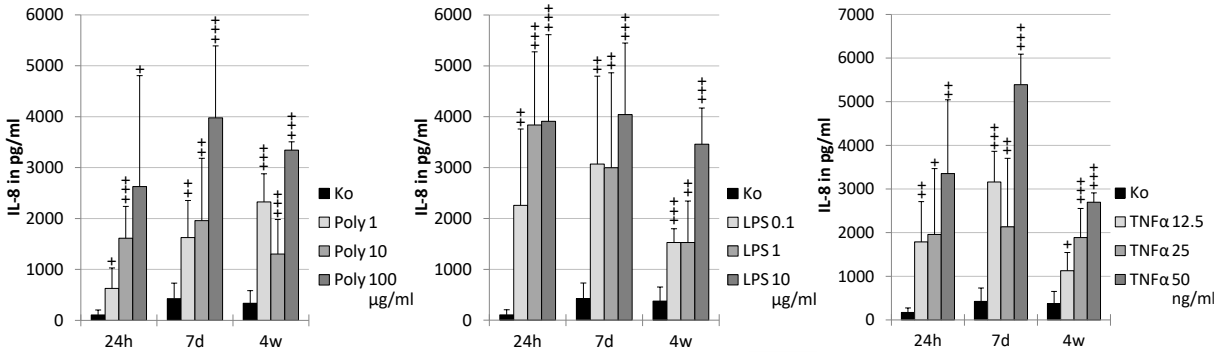


Abbildung 21: IL-8 Sekretion unter Entzündungsmediatoren. Dargestellt ist die Sekretion von IL-8 von primären RPE Zellen nach der Stimulation mit Poly I:C (1, 10, 100 µg/ml; n ≤ 3) (a), LPS (0.1, 1, 10 µg/ml; n ≤ 3) (b) oder TNFα (12.5, 25, 50 ng/ml; n ≤ 3) (c) für 24 Stunden, sieben Tage oder vier Wochen. Unbehandelte RPE Zellen sezernieren eine nachweisbare Menge an IL-8. Alle Entzündungsmediatoren induzierten zu jedem getesteten Zeitpunkt eine signifikante IL-8 Sekretion gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Die Signifikanz wurde mit dem *Student's* T-Test berechnet, +++ = $p < 0.001$, ++ = $p < 0.01$, + = $p < 0.05$. Poly/ Poly I:C = Polyinosin-Polycytidylsäure, LPS = Lipopolysaccharid, TNFα = Tumornekrosefaktor alpha, Ko = Kontrolle, h = Stunden, d = Tage, w = Wochen, n = Anzahl der Versuchswiederholungen (Klettner et al. 2020).

III.2.3.1 IL-8 Sekretion unter Behandlung mit VEGF-Inhibitoren

Die alleinige Behandlung mit Aflibercept und Bevacizumab führte zu keinem getesteten Zeitpunkt zu einem signifikanten Unterschied der IL-8 Sekretion gegenüber der Kontrolle (Abb. 22 - 24, Tab. 24 - 26).

Im Vergleich der Stimulationskombination aus Poly I:C (10 µg/ml) und Aflibercept zur Kontrolle, kam es nach 24 Stunden und sieben Tagen zu einem signifikanten Anstieg der IL-8 Sekretion, wobei die Ausschüttung nach 24 Stunden am höchsten war und nach sieben Tagen und vier Wochen abnahm. Die Stimulation unter Poly I:C mit Aflibercept führte nach 24 Stunden und sieben Tagen ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg gegenüber einer Aflibercept-Stimulation allein, nicht aber gegenüber Poly I:C allein gleicher Konzentration. Nach vier Wochen kam es zwar auch zu einer Erhöhung der IL-8 Sekretion, die allerdings unterhalb des Signifikanzniveaus blieb (Abb. 22, Tab. 24).

a) IL-8 Sekretion, Poly I:C mit Anti-VEGF

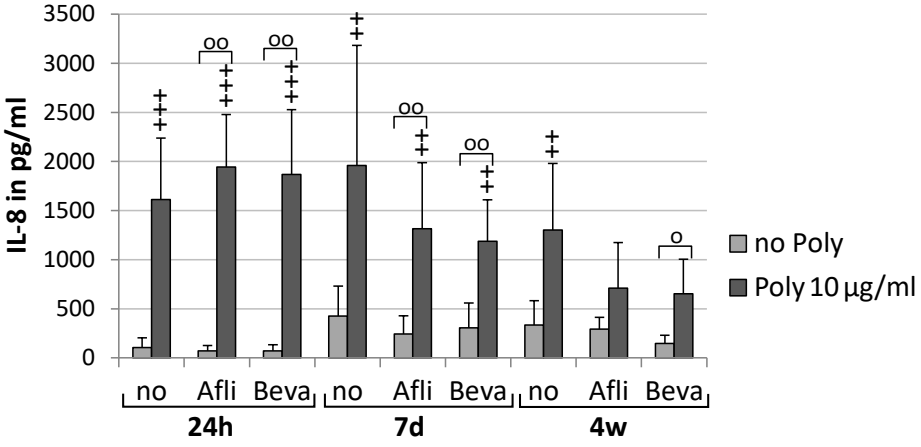


Abbildung 22: IL-8 Sekretion unter Entzündungsmediatoren und VEGF-Inhibitoren. Dargestellt ist die Sekretion von IL-8 von primären RPE Zellen nach der Stimulation mit Poly I:C (10 µg/ml) und Aflibercept (250 µg/ml) oder Bevacizumab (250 µg/ml) für 24 Stunden (n = 3), sieben Tage (n = 5) oder vier Wochen (n = 5). 10 µg/ml Poly I:C induzierte zu allen Zeitpunkten eine IL-8 Sekretion. Da Aflibercept oder Bevacizumab zu keinem Zeitpunkt zu einer erhöhten IL-8 Ausschüttung führten, ist die signifikante Erhöhung der Kombination von VEGF-Inhibitoren mit Poly I:C (10 µg/ml) nach 24 Stunden und sieben Tagen auf die Stimulation mit Poly I:C zurückzuführen und hatte keinen signifikanten Einfluss. Die Signifikanz wurde mit dem *Student's* T-Test berechnet, +++ = $p < 0.001$, ++ = $p < 0.01$ gegenüber der unbehandelten Kontrolle; oo = $p < 0.01$, o = $p < 0.05$ gegenüber VEGF-Inhibitoren (Aflibercept/ Bevacizumab) allein. Poly/ Poly I:C = Polyinosin-Polycytidylsäure, no = ohne VEGF-Inhibitoren, Afli = Aflibercept, Beva = Bevacizumab, h = Stunden, d = Tage, w = Wochen, n = Anzahl der Versuchswiederholungen.

Durch die gemeinsame Stimulation von Poly I:C (10 µg/ml) mit Bevacizumab wurde nach 24 Stunden und sieben Tagen ein signifikanter Anstieg der IL-8 Sekretion gegenüber der Kontrolle induziert, wobei die Ausschüttung ebenfalls nach 24 Stunden am höchsten war und nach sieben Tagen und vier Wochen abnahm. Dies war ebenfalls signifikant gegenüber

Bevacizumab allein, nicht aber gegenüber Poly I:C allein gleicher Konzentration. Nach vier Wochen kam es zwar auch zu einem Anstieg der IL-8 Ausschüttung, diese war allerdings nicht gegen die unbehandelte Kontrolle oder Poly I:C gleicher Konzentration allein signifikant, sondern nur gegen eine reine Bevacizumab–Stimulation (Abb. 22, Tab. 24).

LPS (1 µg/ml) in Kombination mit Aflibercept bewirkte zu allen Zeitpunkten einen signifikanten Anstieg der IL-8 Sezernierung gegenüber der Kontrolle und einer alleinigen Aflibercept Stimulation, nicht aber gegenüber LPS allein gleicher Konzentration, wobei die Ausschüttung nach 24 Stunden den höchsten Wert aufwies und nach vier Wochen um mehr als die Hälfte geringer war (Abb. 23, Tab. 25).

b) IL-8 Sekretion, LPS mit Anti-VEGF

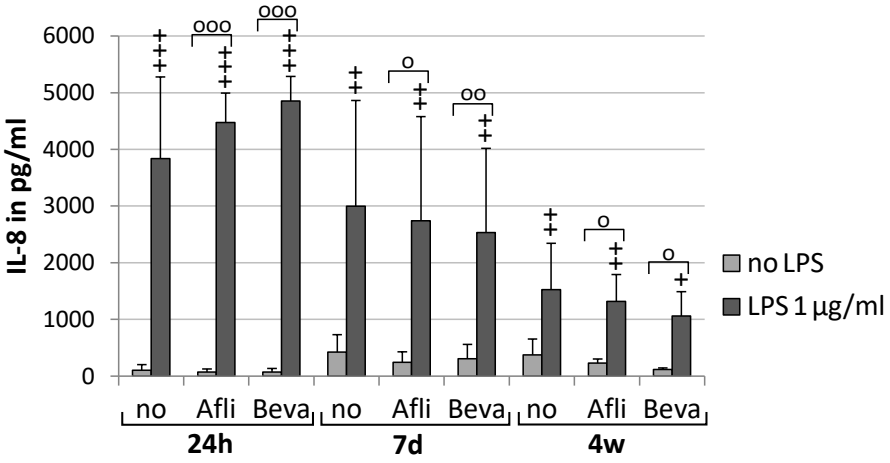


Abbildung 23: IL-8 Sekretion unter LPS und VEGF-Inhibitoren. Dargestellt ist die Sekretion von IL-8 von primären RPE Zellen nach der Stimulation mit LPS (1 µg/ml) und Aflibercept (250 µg/ml) oder Bevacizumab (250 µg/ml) für 24 Stunden (n = 3), sieben Tage (n = 5) oder vier Wochen (n = 3). 1 µg/ml LPS induzierte zu allen Zeitpunkten eine IL-8 Sekretion. Da Aflibercept oder Bevacizumab zu keinem Zeitpunkt zu einer erhöhten IL-8 Ausschüttung führten, ist die signifikante Erhöhung der Kombination von VEGF-Inhibitoren mit LPS (1 µg/ml) auf die Stimulation mit LPS zurückzuführen und hatte keinen signifikanten Einfluss. Die Signifikanz wurde mit dem *Student's* T-Test berechnet, +++ = $p < 0.001$, ++ = $p < 0.01$, + = $p < 0.05$ gegenüber der unbehandelten Kontrolle; ooo = $p < 0.001$, oo = $p < 0.01$, o = $p < 0.05$ gegenüber VEGF-Inhibitoren (Aflibercept/ Bevacizumab) allein. LPS = Lipopolysaccharid, no = ohne VEGF-Inhibitoren, Afli = Aflibercept, Beva = Bevacizumab, h = Stunden, d = Tage, w = Wochen, n = Anzahl der Versuchswiederholungen.

Eine kombinierte Gabe von LPS (1 µg/ml) mit Bevacizumab ergab zu allen Zeitpunkten einen signifikanten Anstieg der IL-8 Sekretion gegenüber der Kontrolle und den mit Bevacizumab allein stimulierten Zellen, nicht aber gegenüber LPS allein gleicher Konzentration. Die

Ausschüttung erreichte dabei nach 24 Stunden ihren Höhepunkt. Nach vier Wochen war die Sekretion nur halb so groß. (Abb. 23, Tab. 25).

Eine Aktivierung der Zellen durch TNFα (25 ng/ml) und Aflibercept führte nach 24 Stunden zu einem signifikanten Anstieg der IL-8 Sekretion gegenüber der Kontrolle. Es zeigte sich zudem ein tendenzieller Anstieg gegenüber einer Aflibercept-Stimulation allein. Gegenüber der alleinigen Stimulation mit TNFα war der Anstieg der IL-8 Sekretion durch die Stimulation mit der Kombination in absoluten leicht geringer, jedoch nicht signifikant vermindert. Die gleiche Dynamik ließ sich ebenfalls nach sieben Tagen beobachten. Gegenüber der unbehandelten Kontrolle als auch Aflibercept allein waren die Kombination nach 24 Stunden und sieben Tagen nicht signifikant erhöht. Nach vier Wochen kam es hingegen zu einem signifikanten Anstieg der IL-8 Sekretion unter der Kombination sowohl gegenüber der unbehandelten Kontrolle als auch gegenüber Aflibercept und TNFα allein. Die Ausschüttung war nach vier Wochen am höchsten (Abb. 24, Tab. 26).

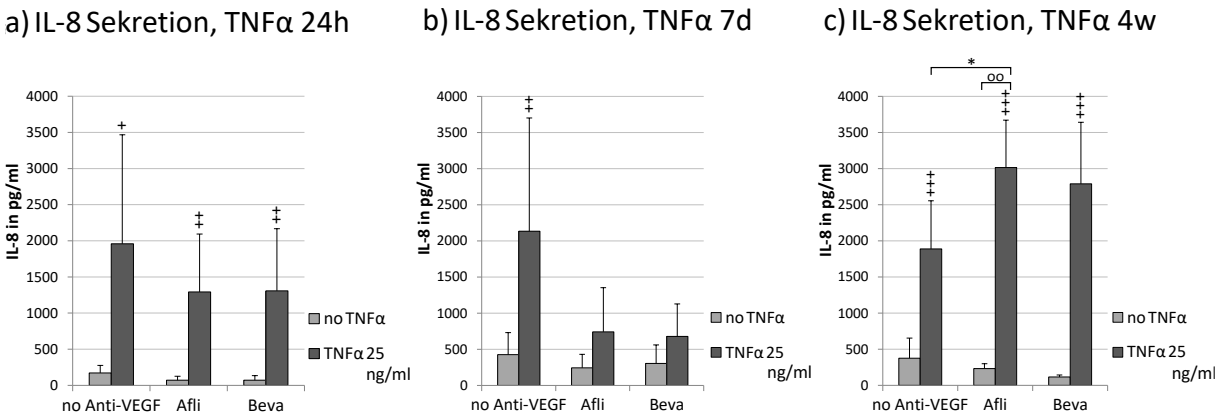


Abbildung 24: IL-8 Sekretion unter TNFα und VEGF-Inhibitoren. Dargestellt ist die Sekretion von IL-8 von primären RPE Zellen nach der Stimulation mit TNFα (25 ng/ml) und Aflibercept (250 µg/ml) oder Bevacizumab (250 µg/ml) für 24 Stunden (n = 3) (a), sieben Tage (n = 5) (b) oder vier Wochen (n = 3) (c). 25 ng/ml TNFα induzierte zu allen Zeitpunkten eine IL-8 Sekretion. Die Stimulation mit Aflibercept oder Bevacizumab führte zu keinem Zeitpunkt zu einer signifikant erhöhten IL-8 Ausschüttung gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Die Kombination von TNFα (25 ng/ml) mit den VEGF-Inhibitoren führte nach 24 Stunden zu einer signifikanten Erhöhung nur gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Nach sieben Tagen war die IL-8 Ausschüttung der Kombinationen nicht signifikant erhöht. Nach vier Wochen hatte die Kombination von TNFα mit Aflibercept einen signifikanten Einfluss, da der IL-8 Anstieg sowohl gegenüber der unbehandelten Kontrolle als auch gegenüber Aflibercept und TNFα allein war. Dagegen führte die Kombination von TNFα und Bevacizumab nach vier Wochen nur zu einem signifikanten Anstieg gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Die Signifikanz wurde mit dem *Student's* T-Test berechnet, +++ = $p < 0.001$, ++ = $p < 0.01$, + = $p < 0.05$ gegenüber der unbehandelten Kontrolle; ∗ = $p < 0.05$ gegenüber TNFα gleicher Konzentration; oo = $p < 0.01$ gegenüber VEGF-Inhibitoren (Aflibercept/ Bevacizumab) allein. TNFα = Tumornekrosefaktor alpha, no = ohne VEGF-Inhibitoren, Afli = Aflibercept, Beva = Bevacizumab, h = Stunden, d = Tage, w = Wochen, n = Anzahl der Versuchswiederholungen.

Durch die Kombination von TNFα (25 ng/ml) mit Bevacizumab kam es nach 24 Stunden zu einem signifikanten Anstieg der IL-8 Sekretion gegenüber der Kontrolle. Mit TNFα und Bevacizumab in Kombination stimulierte Zellen sezernierten nach 24 Stunden tendenziell mehr IL-8 als nur mit Bevacizumab allein behandelte Zellen. Gegenüber TNFα allein kam es jedoch zu einer verminderten IL-8 Ausschüttung, die allerdings nicht signifikant war. Nach sieben Tagen war die IL-8 Ausschüttung unter der Kombination eher gering und es kam zu keinem signifikanten Anstieg gegenüber der unbehandelten Kontrolle oder Bevacizumab allein, sondern einer tendenziellen Minderung der Ausschüttung unter der Kombination aus TNFα und Bevacizumab gegenüber der Stimulation mit 25 ng/ml TNFα allein. Mit TNFα und Bevacizumab in Kombination stimulierte Zellen sezernierten nach vier Wochen signifikant mehr IL-8 als nur mit Bevacizumab allein behandelte Zellen oder die unbehandelte Kontrolle. Gegenüber TNFα allein gleicher Konzentration kam es zwar zu einem Anstieg, dieser blieb jedoch unterhalb des Signifikanzniveaus. Die nach vier Wochen sezernierte Menge an IL-8 war die von allen Zeitpunkten am höchsten gemessene (Abb. 24, Tab. 26).

Insgesamt lässt sich zusammenfügen, dass Poly I:C, LPS und TNFα zu allen Zeitpunkten und bei allen getesteten Konzentrationen zu einer signifikant erhöhten Sekretion von IL-8 im Vergleich zur Kontrolle führte. Bezogen auf die Behandlung mit Aflibercept und Bevacizumab allein zeigte sich zu keinem getesteten Zeitpunkt eine Veränderung gegenüber der Kontrolle. Die Kombination aus Entzündungsmediator und Anti-VEGF Therapie führte grundsätzlich nicht zu einer signifikanten Veränderung gegenüber der Anti-VEGF Therapie und dem Entzündungsmediator, außer bei der mittleren Konzentration unter Langzeitstimulation von TNFα kombiniert mit Aflibercept.

III.2.4 TNFα Zytokinsekretion unter Entzündungsparametern

Die Sekretion von TNFα wurde mit Poly I:C und LPS getestet. Für nicht stimulierte primäre RPE Zellen konnte keine TNFα Sekretion festgestellt werden. Eine signifikant erhöhte TNFα-Sekretion zeigte sich nach 24 Stunden nach einer Stimulation mit 10 µg/ml Poly I:C. Nach vier Wochen konnte für die gleiche Konzentration ein ansteigender Trend im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden (Abb. 25, Tab. 27). 0.1 und 10 µg/ml LPS induzierte nach 24 Stunden einen signifikanten Anstieg von TNFα im Vergleich zur Kontrolle. Hingegen konnte

weder nach sieben Tagen noch nach vier Wochen eine signifikante Veränderung im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden (Abb. 25, Tab. 28).

a) TNFα Sekretion, Poly I:C b) TNFα Sekretion, LPS

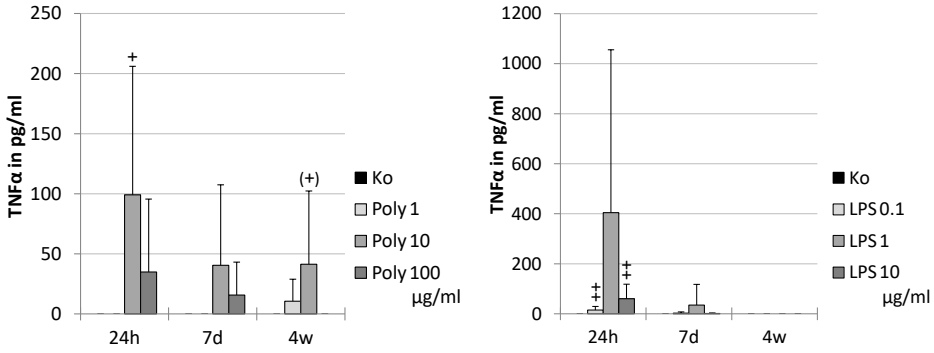


Abbildung 25: TNFα Sekretion unter Entzündungsmediatoren. Dargestellt ist die TNFα Sekretion von primären RPE Zellen nach der Stimulation mit Poly I:C (1, 10, 100 µg/ml; n ≤ 3) (a) oder LPS (0.1, 1, 10 µg/ml; n ≤ 3) (b) für 24 Stunden, sieben Tage oder vier Wochen. Unbehandelte RPE Zellen sezernieren zu keinem Zeitpunkt TNFα. Poly I:C (10 µg/ml) erhöhte die TNFα-Sekretion nach 24 Stunden signifikant und nach vier Wochen tendenziell. LPS induzierte nur nach 24 Stunden eine TNFα-Sekretion. Dabei war unter der Stimulation mit LPS (0.1 und 10 µg/ml) ein signifikanter Anstieg zu beobachten. Die Signifikanz wurde mit dem *Student's* T-Test berechnet, ++ = $p < 0.01$, + = $p < 0.05$, (+) = $p < 0.07$. Poly/ Poly I:C = Polyinosin-Polycytidylsäure, LPS = Lipopolysaccharid, Ko = Kontrolle, h = Stunden, d = Tage, w = Wochen, n = Anzahl der Versuchswiederholungen.

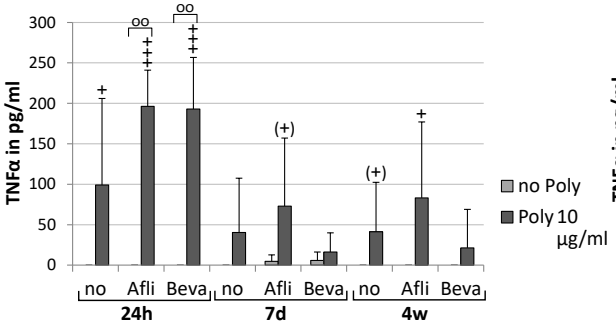
III.2.4.1 TNFα Sekretion unter Behandlung mit VEGF-Inhibitoren:

Die alleinige Behandlung mit Aflibercept oder Bevacizumab führte zu keinem getesteten Zeitpunkt zu einer signifikanten Veränderung der TNFα Ausschüttung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 25 - 26, Tab. 27 - 28).

Im Gegensatz dazu kam es durch die Kombination von Poly I:C (10 µg/ml) mit Aflibercept nach 24 Stunden zu einem signifikanten Anstieg sowohl gegenüber der unbehandelten Kontrolle als auch gegenüber einer ausschließlichen Stimulation mit Aflibercept. In absoluten Werten war die TNFα Sekretion nach 24 Stunden am höchsten. Nach sieben Tagen schütteten die Zellen tendenziell und nach vier Wochen signifikant mehr TNFα im Vergleich zur Kontrolle aus, was aber beides aufgrund der hohen Standardabweichung als nicht relevant zu bewerten ist (Abb. 26 a, Tab. 27).

Durch die Kombination von Poly I:C (10 µg/ml) mit Bevacizumab kam es nur nach 24 Stunden zu einem signifikanten Anstieg sowohl gegenüber der unbehandelten Kontrolle als auch gegenüber einer Bevacizumab-Stimulation allein. Die Ausschüttung von TNFα erreichte nach 24 Stunden insgesamt das höchste Niveau (Abb. 26 a, Tab. 27).

a) TNFα Sekretion, Poly I:C mit Anti-VEGF



b) TNFα Sekretion, LPS mit Anti-VEGF

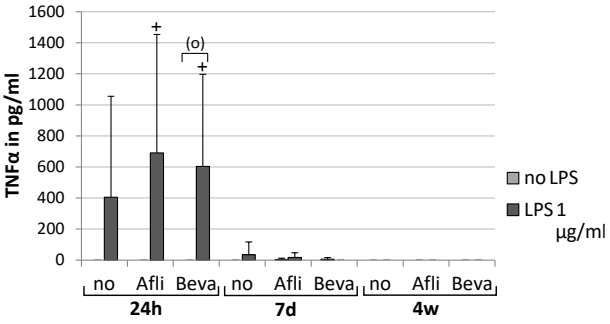


Abbildung 26: TNFα Sekretion unter Entzündungsmediatoren und VEGF-Inhibitoren. Dargestellt ist die Sekretion von TNFα von primären RPE Zellen nach der Stimulation mit Poly I:C (1, 10, 100 µg/ml) (a) oder LPS (0.1, 1, 10 µg/ml) (b) und Aflibercept (250 µg/ml) für 24 Stunden (n = 3), sieben Tage (n = 3) oder vier Wochen (n = 5) oder Bevacizumab (250 µg/ml) für 24 Stunden (n = 5), sieben Tage (n = 3) oder vier Wochen (n = 3). Abbildung (a): Aflibercept oder Bevacizumab führten zu keinem Zeitpunkt zu einer erhöhten TNFα Ausschüttung. Nur nach 24 Stunden zeigt sich eine signifikante Erhöhung der Kombination von VEGF-Inhibitoren mit Poly I:C (10 µg/ml), die allerdings nicht signifikant gegen Poly I:C allein erhöht ist und damit auf keinen signifikanten Einfluss der Kombination auf die TNFα Sekretion schließen lässt. Abbildung (b): LPS induziert TNFα nur in den ersten 24 Stunden. Da Aflibercept oder Bevacizumab zu keinem Zeitpunkt zu einer erhöhten TNFα Ausschüttung führten, ist die signifikante Erhöhung der Kombination von VEGF-Inhibitoren mit LPS (1 µg/ml) auf die Stimulation mit LPS zurückzuführen und hatte keinen signifikanten Einfluss. Die Signifikanz wurde mit dem *Student's* T-Test berechnet, +++ = $p < 0.001$, + = $p < 0.05$, (+) = $p < 0.07$ gegenüber der unbehandelten Kontrolle; oo = $p < 0.01$, (o) = $p < 0.07$ gegenüber VEGF-Inhibitoren (Aflibercept/ Bevacizumab) allein. Poly/ Poly I:C = Polyinosin-Polycytidylsäure, LPS = Lipopolysaccharid, TNFα = Tumornekrosefaktor alpha, no = ohne VEGF-Inhibitoren, Afli = Aflibercept, Beva = Bevacizumab, h = Stunden, d = Tage, w = Wochen, n = Anzahl der Versuchswiederholungen.

Auch die Kombination von LPS (1 µg/ml) mit Aflibercept sorgte nach 24 Stunden für einem signifikanten Anstieg der TNFα Sekretion gegenüber der Kontrolle. Ebenfalls war die Ausschüttung nach 24 Stunden in absoluten Werten am höchsten. Nach sieben Tagen wurden hingegen nur sehr geringe Mengen nachgewiesen und nach vier Wochen war kein TNFα nachweißbar (Abb. 26 b, Tab. 28).

Die kombinierte Gabe von LPS (1 µg/ml) mit Bevacizumab ergab lediglich nach 24 Stunden eine signifikante Vermehrung der TNFα Sekretion sowohl gegenüber der Kontrolle als auch

tendenziell gegenüber der alleinigen Stimulation mit Bevacizumab. Der höchste Wert wurde auch in diesem Fall nach 24 Stunden erreicht (Abb. 26 b, Tab. 28).

Zusammenfassend führte die Stimulation mit LPS und Poly I:C kurzfristig nach 24 Stunden, nicht aber nach sieben Tagen und vier Wochen, zu einer signifikanten Veränderung der TNFα Sekretion gegenüber der Kontrolle. In Bezug auf die Stimulation mit den Anti-VEGF Substanzen allein zeigte sich kein signifikanter Effekt im Vergleich zur Kontrolle. Die Kombinationen aus VEGF-Inhibitor und Entzündungsmediator ergaben zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Veränderung der TNFα Sekretion im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit dem jeweiligen Entzündungsmediator und dem jeweiligen VEGF-Inhibitor allein.

IV Diskussion

Ein Begriff, der prägend für die Pathogenese der AMD ist, lautet „*Inflammaging*“ (Franceschi und Campisi 2014). Dieser Neologismus beschreibt das Zusammentreffen von Altern und Entzündung. Dabei wird im Gegensatz zu einer akuten heißen Entzündungsreaktion eine beim Altern entstehende chronisch geringgradige Entzündung diskutiert, welche auch als Parainflammation betitelt wird (Chen und Xu 2015). Diese Form der Entzündung könnte den RPE Zellen und somit der gesamten Retina schaden (Chen et al. 2019). Im Zentrum der Betrachtung scheint dabei keine systemische Immundysregulation oder überschießende Immunreaktion, sondern eine lokale Dysbalance zu stehen. Allerdings kann Entzündung nicht als homogener Zustand des RPE bzw. der gesamten Retina verstanden werden. Ganz im Gegenteil hängen die diversen Entzündungsreaktionen vom Entzündungsreiz ab. In dieser Studie wurden die Inflammationsstimuli für eine TLR-3 (Poly I:C), eine TLR-4 (LPS) und eine TNFα induzierte Entzündung untersucht. Alle drei Stimuli sind proinflammatorisch. Die Antworten des RPE unterscheiden sich jedoch je nach Substanz, Konzentration und Zeitraum der Stimulation. Diese Unterschiede lassen sich wahrscheinlich darauf zurückführen, dass je nach Stimulus verschiedene Signalwege mit ihren jeweiligen Kaskaden aktiviert werden. Die Registrierung pathogener Substanzen erfolgt durch Bindung an TLR-3 (Poly I:C) und -4 (LPS), bzw. über die TNF-Rezeptoren (TNFα). Über die Bindung von Poly I:C an den TLR-3 registriert das RPE eine virale Infektion. Durch die Aktivierung des TLR-4 über LPS wird hingegen eine bakterielle Infektion detektiert. Allerdings sind TLR-3 (und -4) nicht spezifisch für eine virale oder bakterielle Infektion. Beispielsweise kann auch *messenger*-RNA (mRNA) nekrotischer Zellen über TLR-3 gebunden werden und daraufhin eine Immunantwort initiiert werden (Karikó et al. 2004). Auch TLR-4 wird als allgemeiner Wächter einer Gewebeschädigung diskutiert (Mollen et al. 2006). Im Hinblick auf die unter der AMD beobachteten degenerativen Prozesse, könnten daher endogene Bestandteile geschädigter Zellen die TLR aktivieren und zu einer proinflammatorischen Immunantwort führen.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die jeweiligen Stimuli unterschiedliche Anforderungen an das RPE stellen und ein unterschiedliches Gefahrenpotential aufzeigen. Das lässt sich von der gezeigten differenzierten Zytokinsekretion und der beobachteten Toxizität in dieser Arbeit ableiten. Diese Effekte sowie zusätzlich der Einfluss einer Anti-VEGF Therapie auf das RPE werden im Folgenden diskutiert. Besondere Beachtung verdienen dabei die in dieser Arbeit

erstmalig betrachteten Langzeiteffekte über vier Wochen Stimulation, welche eine präzisere Annäherung an die Inflammationsprozesse im Auge darstellen als kurzfristige Untersuchungen über Stunden oder wenige Tage.

Um Entzündung im Kontext der AMD zu verstehen, müssen die für die Entzündung verantwortlichen Stimuli identifiziert werden und ihr Einfluss auf die Toxizität des RPE untersucht werden. Für die in dieser Studie getesteten drei Substanzen konnte grundsätzlich gezeigt werden, dass jede der Substanzen prinzipiell toxisch für das RPE sein kann. Poly I:C zeigte für Mittel- und Langzeitstimulation (sieben Tage/ vier Wochen) eine signifikante Toxizität, während LPS und TNFα nur unter kurzzeitiger Stimulation (24 Stunden) toxisch wirkten. Langzeittoxizität wurde nicht beobachtet (LPS) oder nur in der höchsten Konzentration (TNFα 50 ng/ml). Auch wenn die Toxizität von LPS und TNFα fast ausschließlich kurzfristig signifikant war, könnte die Langzeitstimulation mit LPS und TNFα bedeutende Effekte in Bezug auf die Funktion des RPE haben. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Langzeitstimulation mit LPS oder TNFα zu einer starken Reduktion der RPE65 Expression führte. RPE65 ist ein für das RPE spezifisches Protein, das für den visuellen Zyklus, das Recyclen des Sehpigments von großer Bedeutung ist. Die TNFα Stimulation führte sogar zu einem kompletten Verlust der RPE65 Expression (Klettner et al. 2020). Eine andere Studie kam nach kurzzeitiger proinflammatorischer Stimulation des RPE ebenfalls zu dem Ergebnis, dass die mRNA von RPE65 vermindert vorlag (Kutty et al. 2016). Der Verlust des RPE65 Proteins könnte die Folge einer chronischen Inflammation des RPE sein. Sollte diese Beobachtung in vivo reproduziert werden können, könnte sie einen möglichen Signalweg darstellen, wie Inflammation die RPE Funktion stört und folglich die Photorezeptorfunktion beeinflusst, auch wenn das RPE selbst noch vital ist.

Langzeiteffekte bezogen auf die Poly I:C/ TLR-3 Aktivierung anhand von primären RPE Zellen wurden zuvor in der Literatur noch nicht untersucht. Allerdings konnte gezeigt werden, dass eine TLR-3 Aktivierung nach 24 Stunden in vitro (Klettner et al. 2013b) und in vivo in einem Mausmodell (Murakami et al. 2014) durch Poly I:C den RPE Zelltod induzieren kann. Die Beobachtung in dieser Arbeit, dass eine konzentrationsabhängige Langzeitstimulation mit Poly I:C das Zellüberleben signifikant verminderte, lässt darauf schließen, dass chronische virale Infektionen bzw. eine TLR-3 Aktivierung anderer Art über die Schädigung des RPE eine Bedeutung in der AMD Pathogenese haben könnten. Grundsätzlich könnte im Alter die

Immunabwehr- und Barrierefunktion des RPE geschwächt und somit anfälliger für virale Infektionen sein. In Anlehnung an den Begriff „*Inflammaging*“ könnte vor diesem Hintergrund auch von „*Infectaging*“ gesprochen werden.

Nach einer systemischen intraperitonealen LPS-Injektion in Mäusen konnte eine Anhäufung subretinaler Hyalozyten (eine Subpopulation residenter Makrophagen im Auge) beobachtet werden (Vagaja et al. 2012). Dies weist darauf hin, dass eine periphere bakterielle Infektion Auswirkungen auf die Retina haben kann. Bezogen auf die Effekte von LPS/ TLR-4 Aktivierung auf das Zellüberleben von RPE Zellen ist wenig bekannt. Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse, dass LPS kurz- und mittelfristig toxisch auf das RPE wirkt, schließen eine bakterielle Genese der AMD nicht aus. Weitere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigten jedoch, dass der kurzfristige Zelluntergang unter LPS durch Wundheilung vom übrigen RPE wiederhergestellt werden kann (Klettner et al. 2020). Für eine bakterielle Pathogenese der AMD spricht eine Studie in der eine subretinale Injektion des Bakteriums Bacillus megaterium in einem nicht humanen Primatenmodell zu einer drusenartigen Pathologie führte, welche im Kontext der AMD ebenfalls beobachtet wird (Wen et al. 2018).

In Hinblick auf die Toxizität von TNFα konnte gezeigt werden, dass humane RPE Zellen kurzfristig (72 Stunden) resistent gegenüber einem durch TNFα induzierten Zelltod sind (Yang et al. 2004). Unsere Arbeitsgruppe bestätigte dieses Ergebnis und beobachtete auch über eine mittel- und langfristige Stimulation mit TNFα keine signifikanten toxischen Effekte (Klettner et al. 2020). Im Gegensatz dazu wurde in dieser Studie eine signifikante Abnahme des Zellüberlebens porciner primärer RPE Zellen unter kurzfristiger und mittelfristiger TNFα Stimulation beobachtet. Dieser Effekt war jedoch transient, sodass unter langfristiger Stimulation keine Toxizität nachweisbar war. Weitere Daten unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass die Wundheilung porciner RPE Zellen durch TNFα kaum beeinflusst wurde (Klettner et al. 2020). Daher könnte der kurz- und mittelfristige Zellverlust durch das übrige RPE kompensiert werden und ein langfristig bleibender Schaden durch TNFα vermieden werden.

IV.1 Toxizität der Anti-VEGF Therapie

Für die Toxizität einer Anti-VEGF Therapie mit Bevacizumab, Aflibercept oder Ranibizumab können uneindeutige Ergebnisse in der Literatur festgestellt werden. Toxische Effekte einer Anti-VEGF Therapie zeigten sich in einer retrospektiven Studie von 96 Augen. Dabei konnte

ein linear ansteigender RPE-Verlust unter der Anti-VEGF Therapie mit Aflibercept und Ranibizumab festgestellt werden (Wons et al. 2017). Hingegen konnte für ARPE-19 Zellen keine Toxizität bezogen auf eine Therapie mit Aflibercept mit einer Konzentration bis 1 mg/ml über 24 Stunden festgestellt werden (Ammar et al. 2013). Passend dazu wurde ebenfalls für Aflibercept bis zu einer Konzentration von 2 mg/ml und einer Stimulation bis zu 72 Stunden keine verstärkte Toxizität von ARPE-19 Zellen beobachtet (Schnichels et al. 2013). Dieser Unterschied könnte teilweise dadurch zu erklären sein, dass ARPE-19 Zellen bedingt durch ihre Immortalisierung eine andere Zellphysiologie als primäre RPE Zellen aufweisen (May et al. 2012). Für humane RPE Zellen, welche aus pluripotenten Stammzellen generiert wurden und durch eine serielle Passagierung Altersmerkmale aufwiesen, zeigte sich weder unter Ranibizumab, Bevacizumab oder Aflibercept Therapie eine signifikante Zytotoxizität (Chae et al. 2018). In einer anderen Studie konnte in einem in vivo Mausmodell kein Zusammenhang zwischen Anti-VEGF Therapie und retinaler Atrophie festgestellt werden (Long et al. 2018).

Im Gegensatz zu diesen ambivalenten Ergebnissen konnte in dieser Arbeit ein eindeutig signifikanter toxischer Effekt von Aflibercept und Bevacizumab auf das RPE in einer Konzentration von 250 µg/ml zu allen Zeitpunkten beobachtet werden. Dieser Effekt ist statistisch signifikant. Es stellt sich die Frage, ob er auch als biologisch relevant angesehen werden kann, da sich eine Reduktion der Vitalität auf unter 95 % im Vergleich zur Kontrolle zeigte. Für die metabolisch hochaktiven Photorezeptoren könnte allerdings auch eine geringere Degeneration des RPE bereits gravierende Auswirkungen haben, da ihre Versorgung über das RPE gefährdet sein könnte. Dies gilt insbesondere für den Bereich der Makula, da hier die Dichte der Photorezeptoren und der metabolische Umsatz am höchsten sind. Unsere Arbeitsgruppe zeigte zwar in vorherigen Studien für Aflibercept unter einer Stimulation bis maximal sieben Tage keine Zytotoxizität (Klettner 2014). Es erfolgte allerdings nur eine einmalige Stimulation, welche außerdem entweder in höherer (500 µg/ml) oder in niedrigerer (125 µg/ml) Konzentration als in dieser Studie appliziert wurde. Auch für eine repetitive Gabe der drei VEGF-Inhibitoren über 12 Wochen konnte unsere AG keine Zytotoxizität nachweisen (Schottler et al. 2018). Allerdings wurde auch in diesem Fall nur die Hälfte der Dosis im Vergleich zu der vorliegenden Studie gegeben.

Bei der Erforschung der Fragestellung, ob eine Anti-VEGF Therapie sich schädlich auf die Retina auswirkt, ist in den letzten Jahren die geographische Atrophie in den Fokus geraten. So

konnten Grunwald et al. eine Behandlung mit Ranibizumab als Risikofaktor für die Entstehung einer GA identifizieren (Grunwald et al. 2014). Allerdings wurde diese Schlussfolgerung kritisiert, da hypopigmentierte Zonen in der Funduskopie als GA gewertet wurden, ohne sie durch eine OCT zu bestätigen. Weiter wurde bemängelt, dass von einer Korrelation (vermehrtes Auftreten von hypopigmentierten Zonen unter Anti-VEGF Therapie) nicht auf eine Kausalität geschlossen werden könne (Campochiaro 2019). Obwohl klinische Beweise fehlen, ist es pathophysiologisch durchaus begründbar, warum eine Anti-VEGF Therapie zu einer GA führen könnte. Es wurde nämlich beobachtet, dass mit zunehmenden CNV die normale Choriocapillaris abnimmt. Wenn durch die Anti-VEGF Therapie nun auch diese CNV supprimiert werden, könnte die letzte verbleibende Blutversorgung der äußeren Netzhaut eliminiert werden und sekundäre atrophische Folgen nach sich ziehen. Schließlich hat VEGF neurotrophe Wirkungen und eine Blockierung dieser könnte eine Atrophie beschleunigen (Miller 2016). Zwar konnte gezeigt werden, dass das RPE nach laserinduzierter Degeneration im Stande ist, sich zu regenerieren (Vessey et al. 2018). Ob diese Regeneration jedoch ausreicht, um die diskutierten pathologischen Effekte einer Anti-VEGF Therapie zu kompensieren, ist allerdings fraglich. Ein weiterer pathologischer Effekt der Anti-VEGF Therapie ist die beobachtete Reduktion der choriokapillären Fenestrierung, welche mit Zirkulationsstörungen einhergehen könnte (Peters et al. 2007). Außerdem wurde eine Abnahme der Phagozytoseleistung primärer porciner RPE Zellen unter Bevacizumab- oder Afliberceptbehandlung und dadurch eine verminderte Photorezeptoraufnahme und vermindertes Recycling festgestellt, was wiederum eine Atrophie der Retina antreiben könnte (Klettner et al. 2010; Klettner et al. 2014a).

Zusammenfassend erscheint die Datenlage zur Anti-VEGF Therapie bezogen auf die Toxizität und schließlich die GA widersprüchlich. Dieser Widerspruch könnte durch zusätzliche fakultativ vorliegende Faktoren erklärt werden, welche in Kombination mit der Anti-VEGF Therapie zum RPE Schaden führen könnten. Solch einen fakultativen Faktor könnte die Inflammation darstellen, da sie in der AMD-Pathogenese als eine Ursache erwogen wird (Xu et al. 2009; Miller 2016). Im Folgenden wird daher diskutiert, welche Auswirkungen eine Anti-VEGF Therapie in Kombination mit Entzündung oder anderen Faktoren auf das RPE hat.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Kombination einer Entzündung mit Anti-VEGF Therapie toxisch für das RPE sein kann. Die Kombination von Aflibercept mit LPS in niedriger

und mittlerer Konzentration führte unter langfristiger Stimulation zu einem signifikant verminderten Zellüberleben gegenüber der Kontrolle und gegenüber einer Stimulation mit LPS allein. Die Kombination von Bevacizumab mit LPS in mittlerer Konzentration zeigte den gleichen Effekt. Eine Anti-VEGF Therapie scheint also die LPS-induzierte Toxizität zu verstärken. Jedoch war dieser Effekt nur bei der Aflibercept-Kombination auch gegenüber einer reinen Stimulation mit Aflibercept signifikant. Hingegen zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Bevacizumabkombination im Vergleich zur reinen Stimulation mit Bevacizumab. Der beobachtete Effekt der Kombinationsgabe könnte also bei Bevacizumab, auf die reine Bevacizumab-Toxizität zurückzuführen sein. Obwohl für die Anti-VEGF Therapie bisher keine eindeutige Aussage getroffen werden konnte, ob die Therapie allein toxisch ist, kann demnach für die langfristige Kombination aus TLR-4 Aktivierung und Anti-VEGF Therapie für Aflibercept ein deutlich toxischer Effekt nachgewiesen werden.

Dieser toxische Effekt konnte für Aflibercept nicht nur in Bezug auf eine Stimulations-kombination mit LPS, sondern auch für Poly I:C, und TNFα gezeigt werden. In der mittleren Konzentration bei vier Wochen Stimulation führte die Kombination mit jeder der drei Stimulanzien zu einem verminderten Zellüberleben im Vergleich zur Kontrolle, zu einer reinen Stimulation mit Aflibercept und zu einer alleinigen proinflammatorischen Stimulation. Diese Beobachtung war nicht nur statistisch signifikant, sondern kann auch als biologisch relevant eingestuft werden, da das Zellüberleben auf unter 80 % im Vergleich zur Kontrolle vermindert war. Somit scheint die Kombination der Aflibercepttherapie mit einer TLR-3 oder TLR-4, oder TNFα Aktivierung das Langzeitzellüberleben zu vermindern. Bevacizumab wies keine so deutliche Toxizität unter der Kombinationstherapie auf. Beispielsweise wurde keine signifikante Verminderung des Zellüberlebens unter Langzeitstimulation bei Kombination von Bevacizumab mit TNFα im Vergleich zur reinen Stimulation mit TNFα beobachtet. Sollten sich diese Effekte in vivo bestätigen, sollte eine Priorisierung der Therapie mit Bevacizumab vor Aflibercept erwogen werden.

Diese Beobachtungen könnten generell dafürsprechen, dass die Therapie als „*first hit*“ (erster Schlag) bei Vorliegen eines zweiten Faktors im Sinne eines „*second hit*“ (zweiten Schlags) zu einem verminderten Zellüberleben führen kann. Eine virale oder bakterielle Infektion (TLR-3/-4 Aktivierung über Poly I:C/ LPS), eine degenerative Gewebsverletzung (TLR-3/-4 Aktivierung über nekrotische Zellbestandteile) oder eine immunologische Inflammation

(TNFα) könnten den „*second hit*“ darstellen. Selbst wenn eine reine Therapie mit Anti-VEGF Inhibitoren keine direkt toxischen Effekte auf das RPE haben sollte, scheint sie direkt oder indirekt dazu beizutragen, dass ein „*second hit*“ begünstigt wird. Dafür spricht beispielsweise, dass die Behandlung von humanen RPE Zellen mit Ranibizumab und Bevacizumab zu einem signifikanten Absinken der RPE-Proliferation führte (Parisi et al. 2019). Diese herabgesetzte Proliferation könnte die Kompensationsmechanismen des RPE so einschränken, dass eine Infektion oder Entzündung nicht mehr aufgefangen wird und zu nachhaltigen Schäden im RPE führt. Zusätzlich konnte eine Verminderung der Wundheilung unter Aflibercepttherapie beobachtet werden (Klettner et al. 2014a). Die Wundheilung könnte ebenfalls einen Kompensationsmechanismus des RPE gegen Infektion und Entzündung darstellen, welcher unter Anti-VEGF Therapie eingeschränkt wird. Diese Zusammenhänge sollten in weiteren Studien überprüft und die zu Grunde liegenden Pathomechanismen weiter erforscht werden.

IV.2 Zytokinsekretion des RPE

Ein tieferes Verständnis der RPE Zellantwort auf Entzündung im alternden Auge und in der AMD könnte langfristig dabei helfen, neue Ziele für eine antiinflammatorische Therapie zu identifizieren. Es wurde beobachtet, dass ARPE-19 Zellen, die mit oxidierten äußeren Photorezeptorsegmenten stimuliert wurden, einen Phänotyp entwickelten, der einige Altersmerkmale beinhaltete. Beispielsweise wurden die Zellen mehrkernig und wiesen eine Hochregulation altersassoziierter Gene auf (Lueck et al. 2012; Chen M et al. 2016; Rajapakse et al. 2017). Diese Zellen exprimierten höhere Level inflammatorischer Mediatoren wie IL-1β, IL 6, IL-8 und VEGF (Higgins et al. 2003; Lueck et al. 2012). In der vorliegenden Studie wurde über eine Langzeitstimulation primärer RPE Zellen eine chronische Entzündung näherungsweise simuliert und unter Entzündungsmediatoren und Anti-VEGF Therapie die Zytokinsekretion von IL-1β, IL-6, IL-8 und TNFα gemessen. Grundsätzlich wurde dabei festgestellt, dass die induzierte Zytokinsekretion sich je nach Stimulationszeitraum unterscheidet. Das weist allgemein darauf hin, dass sich eine chronische Entzündung anders auf das RPE auswirkt als eine akute. Diese Beobachtung impliziert weitreichende Konsequenzen für weitere Experimente, da bisher fast ausschließlich in der Literatur kurzzeitige Stimulationen durchgeführt wurden. In Zukunft sollte zwischen einer kurzfristigen und einer langfristigen Entzündungsstimulation unterschieden werden, um die Effekte der Inflammation auf das RPE

zu beobachten. In vorherigen Studien wurde beschrieben, dass eine kurzfristige proinflammatorische Stimulation die Zytokinsekretion des RPE induzieren kann (Kumar et al. 2004; Wörnle et al. 2011; Brosig et al. 2015; Paeng et al. 2015b; Tao et al. 2016). In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals zusätzlich untersucht, ob eine Langzeitstimulation zu einer veränderten Zytokinausschüttung beiträgt.

Für IL-6 zeigte sich, dass alle proinflammatorischen Stimuli es zu jedem getesteten Zeitpunkt induzierten. Poly I:C induzierte eine konzentrationsabhängige IL-6 Sekretion nach 24 Stunden und sieben Tagen. Nach vier Wochen induzierten alle Poly I:C Konzentrationen IL-6 im gleichen Umfang. Ähnlich dazu konnte der stärkste Effekt auf die IL-6 Sekretion nach LPS oder TNFα Stimulation nach 24 Stunden oder sieben Tagen gesehen werden, während nach vier Wochen die IL-6 Induktion schwächer, aber immer noch signifikant ausfiel. Eine Erhöhung der IL-6 Ausschüttung durch Poly I:C oder LPS nach einer kurzzeitigen Stimulation von RPE Zellen wurde bereits zuvor gezeigt (Kumar et al. 2004; Wörnle et al. 2011; Paeng et al. 2015b).

IL-6 konnte als systemischer Biomarker für die Krankheitsaktivität und prädiktiv für die Krankheitsprogression bei geographischer Atrophie als Folge der AMD identifiziert werden (Krogh Nielsen et al. 2019). Allerdings konnte bisher nicht identifiziert werden, welche Zellen für die systemische IL-6 Erhöhung verantwortlich sind. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Stimulation von Mikrogliazellen mit Überständen von mit Poly I:C stimulierten RPE Zellen zu einer verstärkten IL-6 Zytokinantwort der Mikrogliazellen führte (Klettner et al. 2014b). Zusammen mit der in dieser Studie beobachteten Erhöhung der IL-6 Ausschüttung des RPE nach proinflammatorischer Stimulation weisen diese Beobachtungen auf die zelluläre Quelle des systemisch erhöhten IL-6 hin. Das RPE könnte im Zusammenspiel mit benachbarten Zellen wie beispielsweise den Mikroglia die lokale Quelle für das systemisch erhöhte IL-6 im Kontext der GA im Rahmen der AMD sein.

Im Zusammenhang mit der Anti-VEGF Therapie konnte in der vorliegenden Studie eine signifikante Verminderung der IL-6 Sekretion nach sieben Tagen Stimulationsdauer mit TNFα und Aflibercept und eine tendenzielle mit TNFα und Bevacizumab beobachtet werden. Nach vier Wochen war hingegen ein sichtbarer Anstieg zu beobachten, der aber nicht signifikant war. Diese Beobachtungen könnten darauf hinweisen, dass die IL-6 Zytokinausschüttung mittelfristig durch eine Anti-VEGF Therapie verringert wird, sich jedoch unter langfristiger Applikation aufhebt und sich eher eine gegenteilig verstärkte Zytokindynamik einstellt.

Die IL-8 Sekretion war zu allen Zeitpunkten bei allen Stimuli erhöht, ohne dass eine klare Konzentrations- oder Zeitabhängigkeit zu erkennen war. Diese Beobachtung ist von großer Bedeutung, da sie eine konstant hohe IL-8 Konzentration impliziert, wenn das RPE durch einen proinflammatorischen Stimulus angeregt wird. In vorherigen Untersuchungen konnten akute IL-8 Erhöhungen nach proinflammatorischen Stimuli gezeigt werden (Kumar et al. 2004; Elner et al. 2005; Ebihara et al. 2007; Wörnle et al. 2011; Paeng et al. 2015b). Auf systemischer Ebene konnte bei AMD Patienten keine Erhöhung des IL-8 im Blutplasma festgestellt werden (Krogh Nielsen et al. 2019). Das weist darauf hin, dass IL-8 zunächst vor allem autokrin und parakrin lokal in der Umgebung des RPE wirkt. Bei AMD Patienten im Endstadium, welche eine GA nachwiesen, zeigten sich hingegen deutlich erhöhte systemische IL-8 Serumlevel (Krogh Nielsen et al. 2019). Daraus lässt sich schließen, dass es unter der Entwicklung der GA zu einem veränderten Inflammationsprofil kommt und IL-8 vermehrt in den systemischen Kreislauf abgegeben wird.

Im Gegensatz zu IL-8 wurde IL-1β durch inflammatorische Stimuli kaum induziert. Die einzige signifikante Erhöhung zeigte sich bei 1 µg/ml LPS und höheren Konzentrationen von Poly I:C nach 24 Stunden, was einer akuten Reaktion entspricht. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit Ergebnissen einer anderen Studie, bei der die stärkste Zellantwort nach zwei Stunden Stimulation beobachtet wurde (Brosig et al. 2015).

Im Kontrast zu IL-6 und IL-8 (und ähnlich zu IL-1β) wurde TNFα nur unter kurzfristiger Stimulation mit Poly I:C und LPS induziert, ohne einen mittel- oder langfristigen Effekt. Diese Beobachtung stimmt mit vorherigen Studien überein (Wörnle et al. 2011; Brosig et al. 2015). Nicht nur Kurz- oder Langzeitstimulation mit Entzündungsmediatoren führt zu einer abweichenden TNFα Zytokinsekretion, sondern auch der Differenzierungsstatus des RPE scheint eine Rolle zu spielen. In diesem Zusammenhang wurde beobachtet, dass TNFα bei polarisierten RPE Zellen zu einer VEGF Abnahme führte, bei nicht polarisierten hingegen zu einer VEGF Induktion. Dabei diskutierten die Autoren, dass nicht polarisierte bzw. unphysiologische RPE-Zell-Phänotypen für die Neovaskularisierung verantwortlich sein könnten (Terasaki et al. 2013).

Zusammengefasst kann eine differenzierte proinflammatorische Antwort des RPE beobachtet werden, die langfristig hauptsächlich von IL-8 und IL-6 und weniger von IL-1β und TNFα geprägt wird und unterschiedliche Effekte je nach Stimulus zeigt. IL-1β und TNFα werden als

neurotoxisch angesehen, insbesondere bei chronischer Exposition und für vorgeschädigtes Gewebe (Viviani 2004). IL-1β wurde langfristig mit einem RPE-, Choroid- und Photorezeptor-Verlust in Verbindung gebracht (Zhou et al. 2016) und TNFα kann retinale Zellen in die Apoptose führen, ausgenommen des RPE selbst (Yang et al. 2004; Joussen et al. 2009). Diese schädlichen Auswirkungen auf retinale Zellen durch die vom RPE sezernierten Zytokine IL-1β und TNFα nach kurzfristiger proinflammatorischer Stimulation könnten ein Kollateralschaden sein, während das RPE über diese Zytokine eine antiinflammatorische Zytokinsekretion der Mikroglia induziert. Denn es konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von Mikroglia mit den Überständen von entzündlich stimulierten RPE Zellen zu einer antiinflammatorischen Zytokinantwort der Mikroglia führten (Dietrich et al. 2020).

Langfristig scheint das RPE hingegen für die Retina eher eine protektive Zytokinsekretion über IL-6 auszuführen. Diese Schlussfolgerung lässt sich daraus ableiten, dass IL-6 neuroprotektive und neuroregenerative Eigenschaften zugesprochen werden. So zeigte IL-6 positive Effekte bezogen auf die Regeneration des N. opticus (Leibinger et al. 2013) und auf neuronale Retinazellen (Fischer et al. 2015). In einem Modell für Netzhautablösung konnten protektive Effekte des IL-6 auf die Photorezeptoren festgestellt werden (Chong et al. 2008) und in einem Glaukommodell schützte IL-6 retinale Ganglienzellen (Sappington et al. 2006). Daher könnte die erhöhte IL-6 Ausschüttung einen Versuch des RPE darstellen, die neuroretinalen Zellen bei Vorliegen eines entzündlichen Milieus zu schützen.

Die langfristige IL-8 Induktion unter proinflammatorischen Stimuli könnte an der Pathogenese der (exsudativen) AMD beteiligt sein, da IL-8 als angiogen betrachtet wird (Ghasemi et al. 2011) und im Kammerwasser von Patienten mit exsudativer AMD erhöht nachgewiesen werden konnte (Jonas et al. 2012). Zusätzlich werden bestimmte IL-8 Polymorphismen als Risikofaktoren für die AMD diskutiert (Goverdhan et al. 2008). In Bezug auf die Kombination aus Aflibercept und Entzündungsmediation konnte in dieser Arbeit bei der mittleren Stimulationsdosis TNFα über vier Wochen eine signifikante Erhöhung der IL-8 Sekretion im Vergleich zu einer Stimulation mit TNFα allein oder Aflibercept allein festgestellt werden. Nicht nur TNFα allein, sondern in einem noch höheren Maße die Kombination aus TNFα und Aflibercept scheint also langfristig einen steigernden Effekt auf die IL-8 Ausschüttung zu haben. Somit könnte ein Zusammenhang zwischen der oben gezeigten signifikanten Toxizität unter langfristiger Stimulation mit Aflibercept und TNFα über IL-8 hergestellt werden.

Zusammen mit der Beobachtung, dass unter GA die systemischen IL-8 und TNF-Rezeptor2 Werte erhöht sind (Krogh Nielsen et al. 2019), könnte weiter geschlussfolgert werden, dass eine Afliberceptherapie bei gleichzeitigem Vorliegen einer TNFα ausgelösten Entzündung über IL-8 zu einer toxischen Schädigung des RPE mit resultierender GA führen kann. Passend dazu wurde in einem Fallbericht für eine Patientin mit feuchter AMD im Endstadium eine Sehverbesserung und ein anatomischer Rückgang der AMD unter einer subkutanen Anti-TNFα Therapie (Adalimumab) beobachtet. Die Therapie wurde zur Behandlung eines ebenfalls vorliegenden Morbus Crohn eingesetzt (Fernández-Vega et al. 2016). In einer weiteren Studie mit drei Patienten, welche eine Anti-VEGF Therapie bekommen hatten, führte eine intravitreal applizierte Anti-TNFα Therapie zu einer Sehverbesserung (Theodossiadis et al. 2009). Die Blockade des TNFα könnte über eine verminderte IL-8 Sekretion die feuchte AMD in Remission führen. Unter noch genauer zu prüfenden Voraussetzungen könnte eine antiinflammatorische Therapie als unterstützende Behandlung unter Anti-VEGF Therapie oder als Therapieoption bei refraktärer Anti-VEGF Therapie zumindest für Aflibercept bei der feuchten AMD von Bedeutung sein. Weiter weisen die Beobachtungen darauf hin, dass Aflibercept im Gegensatz zu Bevacizumab im Zusammenhang mit Entzündung toxischer wirkt und die Pathogenese der AMD über IL-8 steigert. Sollten diese Beobachtungen sich in vivo bestätigen könnte Bevacizumab gegenüber Aflibercept bei Vorliegen einer Entzündung im Auge bevorzugt verwendet werden.

Abgesehen von diesem und dem weiter oben genannten Ergebnis bezogen auf IL-6 kam es ansonsten bei keiner der weiteren Kombinationen aus Entzündungsmediator und Anti-VEGF Therapie zu einer signifikanten Veränderung der Zytokinausschüttung, die nicht auf die Stimulation mit den Entzündungsmediatoren zurückzuführen ist. Daher scheint der beobachtete Effekt spezifisch für das Zusammenspiel aus Aflibercept und TNFα zu gelten.

Um die Antwort des RPE auf Entzündungsmediatoren und zusätzlich die Kombination mit Anti-VEGF Substanzen weiter zu verstehen sollten in Zukunft weitere Zytokine und Kommunikationswege des RPE mit benachbarten Zellen untersucht werden. Das Zusammenspiel von TNFα und IL-8 sollte dabei genauer überprüft werden. In dieser Arbeit wurde der Schwerpunkt auf die proinflammatorischen Zytokine gesetzt. Eine Betrachtung der antiinflammatorischen Zytokinantwort des RPE beispielsweise durch IL-10 sollte ebenfalls zur weiteren Differenzierung erfolgen (Couper et al. 2008).

IV.3 Kritik an der Methodik

Im Hinblick auf die Methodik dieser Studie ergeben sich vereinzelt limitierende Faktoren zur Aussagekraft der Untersuchungen.

In dieser Arbeit wurde mit primären porcinen RPE Zellen gearbeitet. Die Übertragung der Ergebnisse von Experimenten mit Schweineaugen auf menschliche Augen ist nur begrenzt möglich. Allerdings haben Schweine eine hohe genetische Ähnlichkeit zum Menschen (Archibald et al. 2010) und insbesondere Schweineaugen sind mit menschlichen Augen anatomisch vergleichbar. Dies gilt auch für die Retina (Klettner und Dithmar 2020). So hat die Retina des Schweins eine der menschlichen Retina sehr ähnliche Gefäß- und Photorezeptorverteilung (Guduric-Fuchs et al. 2009). Im Gegensatz dazu weisen die Augen von Nagetieren wie Mäusen eine geringere Ähnlichkeit mit dem menschlichen Auge auf. Z.B. besitzen Mäuse keine Makula (Ramkumar et al. 2010). Schweine sind tagaktiv, Mäuse hingegen nachtaktiv und die Größe des Schweineauges ist mit dem menschlichen vergleichbar (Sanchez et al. 2011). Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen stammten von genetisch heterogenen Schweinen, die in einer nicht sterilen Umgebung aufgezogen wurden. Daher könnte die Standardabweichung höher ausfallen als bei herkömmlichen Zellreihen. Zugleich spiegeln die Bedingungen, unter denen die Schweine aufwachsen, die menschlichen Umweltfaktoren genauer wider. Es bleibt zu erwähnen, dass die Augen junger Schweine und nicht alter Schweine verwendet wurden, weshalb ein Vergleich zur altersbedingten Pathophysiologie der AMD nur bedingt durchgeführt werden kann.

Theoretisch würden Primaten ein noch besseres Modell für das menschliche Auge liefern. Praktisch ist ihre Verwendung zu Forschungszwecken jedoch ethisch fragwürdig und ökonomisch sehr teuer (Middleton 2010; Pennesi et al. 2012; Jones et al. 2017).

Eine weitere Limitation dieser Arbeit besteht in der kontinuierlichen direkten Stimulation der RPE Zellen mit den VEGF-Inhibitoren. Diese spiegelt nur bedingt die klinische Injektion der VEGF-Inhibitoren in den Glaskörper wider. Eine ein- bis zweimal im Monat oder bei Bedarf angewendete klinische Injektion in den Glaskörper kann nicht mit einer konstanten zweimal wöchentlichen Stimulation der RPE Zellen gleichgesetzt werden. Welche Konzentrationen tatsächlich im RPE erreicht werden und welchen Schwankungen diese Konzentrationen nach monatlicher Injektion unterliegen, kann nur schwer beurteilt werden. Das für diese Studie

angewendete Stimulationsmodell stellt allerdings eine valide Annäherung an die realen Prozesse dar.

IV.4 Fazit

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit die Hypothese, dass chronische Entzündung für die Pathophysiologie der AMD von Bedeutung ist, erhärtet, da das Zellüberleben des RPE unter langfristiger Entzündungsstimulation signifikant vermindert wurde. Dabei scheinen TLR-3, TLR-4 und TNFα Schlüsselkomponenten darzustellen. Weiter zeigt diese Arbeit, dass eine langzeitige Kombination von Anti-VEGF Therapie und Inflammation, wie sie modellhaft eine Behandlung der AMD im fortgeschrittenen Stadium widerspiegelt, durchaus negative Effekte auf die RPE Zellen haben kann und je nach Stimulus eine differenzierte Zytokinsekretion des RPE hervorrufen kann. Die Zytokinantwort des RPE variiert zudem je nach kurz- oder langfristiger Stimulation mit Entzündungsmediatoren. Zukünftige Experimente sollten daher zusätzlich zu kurzfristigen auch langfristige Stimulationen miteinbeziehen.

V Zusammenfassung

Die altersabhängige Makuladegeneration ist die häufigste Ursache für Erblindung in den westlichen Industrieländern beim älteren Menschen. Durch degenerative Veränderungen, genetische Prädispositionen, Umwelteinflüsse und Entzündungsreaktionen kommt es einerseits zu einem Untergang des Retinalen Pigmentepithels (RPE), was eine Degeneration der Photorezeptoren in der Retina zur Folge hat. Andererseits kommt es im Rahmen der feuchten AMD zu choroidalen Neovaskularisationen (CNV). Dies zeigt sich klinisch in einer zentralen Sehverschlechterung und führt unbehandelt zur Erblindung. Die medikamentöse Therapie der CNV besteht in der intravitrealen Injektion der *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) -Inhibitoren Aflibercept und Bevacizumab. Um die Assoziation der Pathogenese der AMD mit Entzündungsreaktionen des RPE näher zu untersuchen, wurden in dieser in vitro Studie die Effekte einer Langzeitstimulation mit dem Toll-like-Rezeptor (TLR)-3 Agonisten Polyinosin-Polycytidylsäure (Poly I:C), dem TLR-4 Agonisten Lipopolysaccharid (LPS) und dem proinflammatorischen Zytokin Tumornekrosefaktor alpha (TNFα) auf die Vitalität und die Sekretion der Zytokine IL-1β, IL-6, IL-8 und TNFα primär porciner RPE Zellen untersucht. Zusätzlich wurde überprüft welchen Einfluss die Anti-VEGF Therapie mit Aflibercept oder Bevacizumab allein und in Kombination mit den Entzündungsmediatoren auf die Vitalität und die Zytokinsekretion des RPE hat.

Für die in dieser Studie getesteten proinflammatorischen Substanzen konnte grundsätzlich gezeigt werden, dass jede der drei Substanzen je nach Behandlungszeitraum und -konzentration toxisch für das RPE sein kann. TNFα und LPS verminderten nach einer kurzzeitigen (24 Stunden) und mittelfristigen (sieben Tage) Stimulation das Zellüberleben signifikant. Poly I:C verringerte stattdessen das Zellüberleben nach Mittel- und Langzeit-stimulation (vier Wochen). Die Stimulation mit Aflibercept und Bevacizumab führte zu allen Zeitpunkten zu einer signifikanten Abnahme des Zellüberlebens. Die Kombination von Aflibercept mit Poly I:C, LPS oder TNFα führte unter langfristiger Stimulation zu einem signifikant verminderten Zellüberleben gegenüber der Kontrolle und gegenüber einer Stimulation mit der jeweiligen proinflammatorischen Substanz und Aflibercept allein. Somit scheint die langfristige Kombination der Aflibercepttherapie mit einer viralen oder bakteriellen Infektion (TLR-3/-4 Aktivierung über Poly I:C/LPS), einer degenerativen Gewebsverletzung (TLR-3/-4 Aktivierung über nekrotische Zellbestandteile) oder einer

immunologischen Inflammation (TNFα), das Zellüberleben des RPE zu reduzieren. In Bezug auf die Zytokinsekretion konnte eine differenzierte proinflammatorische Antwort des RPE beobachtet werden, die langfristig hauptsächlich von IL-8 und IL-6 und weniger von IL-1β und TNFα geprägt wird und unterschiedliche Effekte je nach Stimulus zeigt. In Bezug auf die Kombination von Aflibercept und der mittleren Stimulationsdosis TNFα konnte über vier Wochen eine signifikante Erhöhung der IL-8 Sekretion im Vergleich zu einer Stimulation mit TNFα oder Aflibercept allein festgestellt werden. Unter noch genauer zu prüfenden Voraussetzungen könnte daher eine antiinflammatorische Therapie als unterstützende Behandlung unter Anti-VEGF Therapie in der Behandlung der feuchten AMD von Interesse sein.

VI Literaturverzeichnis

Abdelfattah NS, Zhang H, Boyer DS, Sadda SR (2016): Progression of macular atrophy in patients with neovascular age-related macular degeneration undergoing antivascular endothelial growth factor therapy. Retina 36, 1843–1850

Abokyi S, To C-H, Lam TT, Tse DY (2020): Central Role of Oxidative Stress in Age-Related Macular Degeneration: Evidence from a Review of the Molecular Mechanisms and Animal Models. Oxid Med Cell Longev 2020, vol. 2020, Article ID 7901270, 19 pages

Adamis AP, Shima DT, Yeo KT, Yeo TK, Brown LF, Berse B, D'Amore PA, Folkman J (1993): Synthesis and secretion of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human retinal pigment epithelial cells. Biochem Biophys Res Commun 193, 631–638

Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA (2001): Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. Nature 413, 732–738

Ammar DA, Mandava N, Kahook MY (2013): The effects of aflibercept on the viability and metabolism of ocular cells in vitro. Retina Phila Pa 33, 1056–1061

Ammar MJ, Hsu J, Chiang A, Ho AC, Regillo CD (2020): Age-related macular degeneration therapy: a review. Curr Opin Ophthalmol 31, 215–221

An E, Gordish-Dressman H, Hathout Y (2008): Effect of TNF-alpha on human ARPE-19-secreted proteins. Mol Vis 14, 2292–2303

Anderson DH, Mullins RF, Hageman GS, Johnson LV (2002): A role for local inflammation in the formation of drusen in the aging eye. Am J Ophthalmol 134, 411–431

Archibald AL, Bolund L, Churcher C, Fredholm M, Groenen MA, Harlizius B, Lee K-T, Milan D, Rogers J, Rothschild MF, et al. (2010): Pig genome sequence - analysis and publication strategy. BMC Genomics 11, Article number: 438

Beckel JM, Gómez NM, Lu W, Campagno KE, Nabet B, Albalawi F, Lim JC, Boesze-Battaglia K, Mitchell CH (2018): Stimulation of TLR3 triggers release of lysosomal ATP in astrocytes and epithelial cells that requires TRPML1 channels. Sci Rep 8, 2045-2322

Bhisitkul RB, Mendes TS, Rofagha S, Enanoria W, Boyer DS, Sadda SR, Zhang K (2015): Macular Atrophy Progression and 7-Year Vision Outcomes in Subjects From the ANCHOR, MARINA, and HORIZON Studies: the SEVEN-UP Study∗. Am J Ophthalmol 159, 915-924

Bhutto I, Lutty G (2012): Understanding age-related macular degeneration (AMD): Relationships between the photoreceptor/retinal pigment epithelium/Bruch's membrane/choriocapillaris complex. Mol Aspects Med 33, 295–317

Bloch SB, Larsen M, Munch IC (2012): Incidence of legal blindness from age-related macular degeneration in denmark: year 2000 to 2010. Am J Ophthalmol 153, 209-213

Bourne RRA, Jonas JB, Bron AM, Cicinelli MV, Das A, Flaxman SR, Friedman DS, Keeffe JE, Kempen JH, Leasher J, et al. (2018): Prevalence and causes of vision loss in high-income countries and in Eastern and Central Europe in 2015: magnitude, temporal trends and projections. Br J Ophthalmol 102, 575–585

Brosig A, Kuhrt H, Wiedemann P, Kohen L, Bringmann A, Hollborn M (2015): Gene expression regulation in retinal pigment epithelial cells induced by viral RNA and viral/bacterial DNA. *Molecular vision*, *21*, 1000–1016

Burke JM (1989): Stimulation of DNA synthesis in human and bovine RPE by peptide growth factors: The response to TNF-α and EGF is dependent upon culture density. Curr Eye Res 8, 1279–1286

Campochiaro PA (2019): Low risk to retina from sustained suppression of VEGF. J Clin Invest 129, 3029–3031

Cascella R, Ragazzo M, Strafella C, Missiroli F, Borgiani P, Angelucci F, Marsella LT, Cusumano A, Novelli G, Ricci F, Giardina E (2014): Age-Related Macular Degeneration: Insights into Inflammatory Genes. J Ophthalmol 2014, 1–9

CATT Research Group, Martin DF, Maguire MG, Guishuang Ying, Grunwald JE, Fine SL, Jaffe GJ (2011): Ranibizumab and Bevacizumab for Neovascular Age-Related Macular Degeneration. N Engl J Med 364, 1897–1908

Chae JB, Rho CR, Shin JA, Lyu J, Kang S (2018): Effects of Ranibizumab, Bevacizumab, and Aflibercept on Senescent Retinal Pigment Epithelial Cells. Korean J Ophthalmol KJO 32, 328–338

Chakravarthy U, Wong TY, Fletcher A, Piault E, Evans C, Zlateva G, Buggage R, Pleil A, Mitchell P (2010): Clinical risk factors for age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. BMC Ophthalmol 10, Article number: 31

Chakravarthy U, Harding SP, Rogers CA, Downes SM, Lotery AJ, Culliford LA, Reeves BC, IVAN study investigators (2013): Alternative treatments to inhibit VEGF in age-related choroidal neovascularisation: 2-year findings of the IVAN randomised controlled trial. Lancet Lond Engl 382, 1258–1267

Chen L, Bai Y, Zhao M, Jiang Y (2016): TLR4 inhibitor attenuates amyloid-β-induced angiogenic and inflammatory factors in ARPE-19 cells: Implications for age-related macular degeneration. Mol Med Rep 13, 3249–3256

Chen M, Xu H (2015): Parainflammation, chronic inflammation, and age-related macular degeneration. J Leukoc Biol 98, 713–725

Chen M, Rajapakse D, Fraczek M, Luo C, Forrester JV, Xu H (2016): Retinal pigment epithelial cell multinucleation in the aging eye - a mechanism to repair damage and maintain homoeostasis. Aging Cell 15, 436–445

Chen M, Luo C, Zhao J, Devarajan G, Xu H (2019): Immune regulation in the aging retina. Prog Retin Eye Res 69, 159–172

Chong DY, Boehlke CS, Zheng Q-D, Zhang L, Han Y, Zacks DN (2008): Interleukin-6 as a photoreceptor neuroprotectant in an experimental model of retinal detachment. Invest Ophthalmol Vis Sci 49, 3193–3200

Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WJ, Gusovsky F (1999): Toll-like Receptor-4 Mediates Lipopolysaccharide-induced Signal Transduction. J Biol Chem 274, 10689–10692

Couper KN, Blount DG, Riley EM (2008): IL-10: the master regulator of immunity to infection. J Immunol Baltim Md 1950 180, 5771–5777

Curcio CA (2018): Soft Drusen in Age-Related Macular Degeneration: Biology and Targeting Via the Oil Spill Strategies. Investig Opthalmology Vis Sci *59* (4), AMD160–AMD181

Datta S, Cano M, Ebrahimi K, Wang L, Handa JT (2017): The impact of oxidative stress and inflammation on RPE degeneration in non-neovascular AMD. Prog Retin Eye Res 60, 201–218

Davis MD, Gangnon RE, Lee L-Y, Hubbard LD, Klein BEK, Klein R, Ferris FL, Bressler SB, Milton RC, Age-Related Eye Disease Study Group (2005): The Age-Related Eye Disease Study severity scale for age-related macular degeneration: AREDS Report No. 17. Arch Ophthalmol Chic Ill 1960 123, 1484–1498

Dietrich L, Lucius R, Roider J, Klettner A (2020): Interaction of inflammatorily activated retinal pigment epithelium with retinal microglia and neuronal cells. Exp Eye Res 199, Article number: 108167

Dixon JA, Oliver SCN, Olson JL, Mandava N (2009): VEGF Trap-Eye for the treatment of neovascular age-related macular degeneration. Expert Opin Investig Drugs 18, 1573–1580

DOG, Retinologische Gesellschaft, BVA (2020): Stellungnahme der Deutschen Gesellschaft für Ophthalmologie (DOG), der Retinologischen Gesellschaft und dem Berufsverband Deutscher Augenärzte (BVA) zur Anti-VEGF-Therapie bei der neovaskulären altersabhängigen Makuladegeneration.

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

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

Edwards AO, Chen D, Fridley BL, James KM, Wu Y, Abecasis G, Swaroop A, Othman M, Branham K, Iyengar SK, et al. (2008): Toll-like Receptor Polymorphisms and Age-Related Macular Degeneration. Investig Opthalmology & Vis Sci 49 (4), 1652-1659

Elner SG, Petty HR, Elner VM, Yoshida A, Bian Z-M, Yang D, Kindzelskii AL (2005): TLR4 Mediates Human Retinal Pigment Epithelial Endotoxin Binding and Cytokine Expression. Investig Opthalmology & Vis Sci 46, 4627-4633

Elner VM, Scales W, Elner SG, Danforth J, Kunkel SL, Strieter RM (1992): Interleukin-6 (IL-6) gene expression and secretion by cytokine-stimulated human retinal pigment epithelial cells. Exp Eye Res 54, 361–368

Engvall E, Perlmann P (1971): Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochemistry 8, 871–874

Faber C, Juel HB, Jensen BAH, Christensen JP, Prause JU, Thomsen AR, Nissen MH (2019): Chemokine Expression in Murine RPE/Choroid in Response to Systemic Viral Infection and Elevated Levels of Circulating Interferon-γ. Invest Ophthalmol Vis Sci 60, 192–201

F.D.A USF and DA. https://www.prnewswire.com/news-releases/fda-approves-eylea-for-eye-disorder-in-older-people-134147948.html; Zugriff am 11.09.2020

Fernández-Vega B, Fernández-Vega Á, Rangel CM, Nicieza J, Villota-Deleu E, Vega JA, Sanchez-Avila RM (2016): Blockade of Tumor Necrosis Factor-Alpha: A Role for Adalimumab in Neovascular Age-Related Macular Degeneration Refractory to Anti-Angiogenesis Therapy. Case Rep Ophthalmol 7, 154–162

Ferris FL, Wilkinson CP, Bird A, Chakravarthy U, Chew E, Csaky K, Sadda SR (2013): Clinical Classification of Age-related Macular Degeneration. Ophthalmology 120, 844–851

Finger RP, Daien V, Eldem BM, Talks JS, Korobelnik J-F, Mitchell P, Sakamoto T, Wong TY, Pantiri K, Carrasco J (2020): Anti-vascular endothelial growth factor in neovascular age-related macular degeneration – a systematic review of the impact of anti-VEGF on patient outcomes and healthcare systems. BMC Ophthalmol 20, Article number: 294

Fischer AJ, Zelinka C, Milani-Nejad N (2015): Reactive retinal microglia, neuronal survival and the formation of retinal folds and detachments. Glia 63, 313–327

Flannery JG, O'Day W, Pfeffer BA, Horwitz J, Bok D (1990): Uptake, processing and release of retinoids by cultured human retinal pigment epithelium. Exp Eye Res 51, 717–728

Fleckenstein M, Mitchell P, Freund KB, Sadda S, Holz FG, Brittain C, Henry EC, Ferrara D (2018): The Progression of Geographic Atrophy Secondary to Age-Related Macular Degeneration. Ophthalmology 125, 369–390

Franceschi C, Campisi J (2014): Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 69 Suppl 1, S4-9

Fritsche LG, Igl W, Bailey JNC, Grassmann F, Sengupta S, Bragg-Gresham JL, Burdon KP, Hebbring SJ, Wen C, Gorski M, et al. (2016): A large genome-wide association study of age-related macular degeneration highlights contributions of rare and common variants. Nat Genet 48, 134–143

Garcia-Layana A, Cabrera-López F, García-Arumí J, Arias-Barquet L, Ruiz-Moreno JM (2017): Early and intermediate age-related macular degeneration: update and clinical review. Clin Interv Aging Volume 12, 1579–1587

Ghasemi H, Ghazanfari T, Yaraee R, Faghihzadeh S, Hassan ZM (2011): Roles of IL-8 in Ocular Inflammations: A Review. Ocul Immunol Inflamm 19, 401–412

Goverdhan SV, Ennis S, Hannan SR, Madhusudhana KC, Cree AJ, Luff AJ, Lotery AJ (2008): Interleukin-8 promoter polymorphism -251A/T is a risk factor for age-related macular degeneration. Br J Ophthalmol 92, 537–540

Grunwald JE, Daniel E, Huang J, Ying G, Maguire MG, Toth CA, Jaffe GJ, Fine SL, Blodi B, Klein ML, et al. (2014): Risk of Geographic Atrophy in the Comparison of Age-related Macular Degeneration Treatments Trials. Ophthalmology 121, 150–161

Guduric-Fuchs J, Ringland LJ, Gu P, Dellett M, Archer DB, Cogliati T (2009): Immunohistochemical study of pig retinal development. Mol Vis 15, 1915–1928

Guymer RH, Chong EW (2006): Modifiable risk factors for age-related macular degeneration. Med J Aust 184, 455–458

Heier JS, Brown DM, Chong V, Korobelnik J-F, Kaiser PK, Nguyen QD, Kirchhof B, Ho A, Ogura Y, Yancopoulos GD, et al. (2012): Intravitreal Aflibercept (VEGF Trap-Eye) in Wet Age-related Macular Degeneration. Ophthalmology 119, 2537–2548

Higgins GT, Wang JH, Dockery P, Cleary PE, Redmond HP (2003): Induction of angiogenic cytokine expression in cultured RPE by ingestion of oxidized photoreceptor outer segments. Invest Ophthalmol Vis Sci 44, 1775–1782

Holz FG, Strauss EC, Schmitz-Valckenberg S, van Lookeren Campagne M (2014): Geographic Atrophy. Ophthalmology 121, 1079–1091

Huang H, Liu Y, Wang L, Li W (2017): Age-related macular degeneration phenotypes are associated with increased tumor necrosis-alpha and subretinal immune cells in aged Cxcr5 knockout mice. PLoS ONE vol. 12(3), e0173716

Hyman L, Neborsky R (2002): Risk factors for age-related macular degeneration: an update: Curr Opin Ophthalmol 13, 171–175

Inana G, Murat C, An W, Yao X, Harris IR, Cao J (2018): RPE phagocytic function declines in age-related macular degeneration and is rescued by human umbilical tissue derived cells. J Transl Med 16, Article number: 63

Jin M, He S, Wörpel V, Ryan SJ, Hinton DR (2000): Promotion of adhesion and migration of RPE cells to provisional extracellular matrices by TNF-alpha. Invest Ophthalmol Vis Sci 41, 4324–4332

Jo DH, Yun J-H, Cho CS, Kim Jin Hyoung, Kim Jeong Hun, Cho C-H (2019): Interaction between microglia and retinal pigment epithelial cells determines the integrity of outer blood-retinal barrier in diabetic retinopathy. Glia 67, 321–331

Jonas JB, Tao Y, Neumaier M, Findeisen P (2012): Cytokine concentration in aqueous humour of eyes with exudative age-related macular degeneration. Acta Ophthalmol (Copenh) 90, e381–e388

Jones MK, Lu B, Girman S, Wang S (2017): Cell-based therapeutic strategies for replacement and preservation in retinal degenerative diseases. Prog Retin Eye Res 58, 1–27

Jørgensen A, Wiencke AK, la Cour M, Kaestel CG, Madsen HO, Hamann S, Lui GM, Scherfig E, Prause JU, Svejgaard A, et al. (1998): Human retinal pigment epithelial cell-induced apoptosis in activated T cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 39, 1590–1599

Joussen AM, Doehmen S, Le ML, Koizumi K, Radetzky S, Krohne TU, Poulaki V, Semkova I, Kociok N (2009): TNF-alpha mediated apoptosis plays an important role in the development of early diabetic retinopathy and long-term histopathological alterations. Mol Vis 15, 1418–1428

Kaarniranta K, Salminen A (2009): Age-related macular degeneration: activation of innate immunity system via pattern recognition receptors. J Mol Med 87, 117–123

Karikó K, Ni H, Capodici J, Lamphier M, Weissman D (2004): mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. J Biol Chem 279, 12542–12550

Kauppinen A, Paterno JJ, Blasiak J, Salminen A, Kaarniranta K (2016): Inflammation and its role in age-related macular degeneration. Cell Mol Life Sci 73, 1765–1786

Kellner U, Wachtlin J, Bopp S, Coupland SE, Feltgen N, Fiebig BS, Foerster MH, Garhöfer G, Gelisken F, Hehr U, et al.: Retina. 2008. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York 2008

Kim SY, Sadda S, Pearlman J, Humayun MS, de JUAN EJ, Melia BM, Green WR (2002): Morphometric analysis of the macula in eyes with disciform age-related macular degeneration. RETINA 22, 471–477

Kindzelskii AL, Elner VM, Elner SG, Yang D, Hughes BA, Petty HR (2004): Toll-like receptor 4 (TLR4) of retinal pigment epithelial cells participates in transmembrane signaling in response to photoreceptor outer segments. J Gen Physiol 124, 139–149

Kleinman ME, Yamada K, Takeda A, Chandrasekaran V, Nozaki M, Baffi JZ, Albuquerque RJC, Yamasaki S, Itaya M, Pan Y, et al. (2008): Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3. Nature 452, 591–597

Klettner A (2012): Oxidative stress induced cellular signaling in RPE cells. Frontiers in bioscience (Scholar edition), 4, 392–411

Klettner A (2014): VEGF-A and its inhibitors in age-related macular degeneration – pharmacokinetic differences and their retinal and systemic implications. Journal of Biochemical and Pharmacological Research. 2. 8-20

Klettner A (2015a): Age-related macular degeneration - biology and treatment. Med Monatsschr Pharm 38, 258–264

Klettner A (2015b): The Retinal pigment epithelium in the immunregulation of the retina. Hogarth Ed 31-52

Klettner A, Roider J (2008): Comparison of Bevacizumab, Ranibizumab, and Pegaptanib In Vitro: Efficiency and Possible Additional Pathways. Investig Opthalmology & Vis Sci 49(10), 4523–4527

Klettner A, Roider J (2009): Treating Age-Related Macular Degeneration – Interaction of VEGF-Antagonists with their Target. Mini-Rev Med Chem 9, 1127–1135

Klettner A, Möhle F, Roider J (2010): Intracellular bevacizumab reduces phagocytotic uptake in RPE cells. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 248, 819–824

Klettner A, Kauppinen A, Blasiak J, Roider J, Salminen A, Kaarniranta K (2013a): Cellular and molecular mechanisms of age-related macular degeneration: From impaired autophagy to neovascularization. Int J Biochem Cell Biol 45, 1457–1467

Klettner A, Koinzer S, Meyer T, Roider J (2013b): 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 (Copenh) 91, e211–e218

Klettner A, Tahmaz N, Dithmer M, Richert E, Roider J (2014a): Effects of aflibercept on primary RPE cells: toxicity, wound healing, uptake and phagocytosis. Br J Ophthalmol 98, 1448–1452

Klettner A, Hamann T, Schlüter K, Lucius R, Roider J (2014b): Retinal pigment epithelium cells alter the pro-inflammatory response of retinal microglia to TLR-3 stimulation. Acta Ophthalmol (Copenh) 92, 621–629

Klettner A, Brinkmann A, Winkelmann K, Käckenmeister T, Hildebrandt J, Roider J (2020): Effect of long-term inflammation on viability and function of RPE cells. Experimental eye research vol. 200, Article number: 108214

Klettner AK, Dithmar S (Hrsg.): Retinal Pigment Epithelium in Health and Disease. Springer International Publishing 2020

Knauer C, Pfeiffer N (2006): Erblindung in Deutschland – heute und 2030. Ophthalmol 103, 735–741

Koinzer S, Reinecke K, Herdegen T, Roider J, Klettner A (2015): Oxidative Stress Induces Biphasic ERK1/2 Activation in the RPE with Distinct Effects on Cell Survival at Early and Late Activation. Curr Eye Res 40, 853–857

Krogh Nielsen M, Subhi Y, Molbech CR, Falk MK, Nissen MH, Sørensen TL (2019): Systemic Levels of Interleukin-6 Correlate With Progression Rate of Geographic Atrophy Secondary to Age-Related Macular Degeneration. Invest Ophthalmol Vis Sci 60, 202–208

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

Kutty RK, Samuel W, Boyce K, Cherukuri A, Duncan T, Jaworski C, Nagineni CN, Redmond TM (2016): Proinflammatory cytokines decrease the expression of genes critical for RPE function. Molecular vision, vol. 22, 1156–1168

Lee SC, Seong GJ, Kim SH, Kwon OW (1999): Synthesized TGF-beta s in RPE regulates cellular proliferation. Korean J Ophthalmol KJO 13, 16–24

Leibinger M, Müller A, Gobrecht P, Diekmann H, Andreadaki A, Fischer D (2013): Interleukin-6 contributes to CNS axon regeneration upon inflammatory stimulation. Cell Death Dis 4, 609–609

Leung KW, Barnstable CJ, Tombran-Tink J (2009): Bacterial endotoxin activates retinal pigment epithelial cells and induces their degeneration through IL-6 and IL-8 autocrine signaling. Mol Immunol 46, 1374–1386

Léveillard T, Philp NJ, Sennlaub F (2019): Is Retinal Metabolic Dysfunction at the Center of the Pathogenesis of Age-related Macular Degeneration? Int J Mol Sci vol. 20(3), 762

Lichtlen P, Lam TT, Nork TM, Streit T, Urech DM (2010): Relative Contribution of VEGF and TNF-α in the Cynomolgus Laser-Induced CNV Model: Comparing the Efficacy of Bevacizumab, Adalimumab, and ESBA105. Investig Opthalmology & Vis Sci *51*(9), 4738–4745

Lim LS, Mitchell P, Seddon JM, Holz FG, Wong TY (2012): Age-related macular degeneration. The Lancet 379, 1728–1738

Ling Y, Xiong F (2019): Associations of TLR4 gene polymorphisms with the risk of age-related macular degeneration in a Chinese Han population. Medicine (Baltimore) vol. 98(19)

Long D, Kanan Y, Shen J, Hackett SF, Liu Y, Hafiz Z, Khan M, Lu L, Campochiaro PA (2018): VEGF/VEGFR2 blockade does not cause retinal atrophy in AMD-relevant models. JCI Insight vol. 3(10)

Lueck K, Hennig M, Lommatzsch A, Pauleikhoff D, Wasmuth S (2012): Complement and UV-irradiated photoreceptor outer segments increase the cytokine secretion by retinal pigment epithelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 53, 1406–1413

Lueck K, Busch M, Moss SE, Greenwood J, Kasper M, Lommatzsch A, Pauleikhoff D, Wasmuth S (2015): Complement Stimulates Retinal Pigment Epithelial Cells to Undergo Pro-Inflammatory Changes. Ophthalmic Res 54, 195–203

Lüllmann-Rauch R, Asan E: Taschenlehrbuch Histologie. 6.; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2019

Maggio M, Guralnik JM, Longo DL, Ferrucci L (2006): Interleukin-6 in aging and chronic disease: a magnificent pathway. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 61, 575–584

Maguire MG, Martin DF, Ying G, Jaffe GJ, Daniel E, Grunwald JE, Toth CA, Ferris FL, Fine SL (2016): Five-Year Outcomes with Anti–Vascular Endothelial Growth Factor Treatment of Neovascular Age-Related Macular Degeneration. Ophthalmology 123, 1751–1761

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

May T, Hauser H, Wirth D (2012): Funktionale Zelllinien durch neue Immortalisierungsprotokolle: Zellsysteme. BIOspektrum 18, 390–393

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

Mehta H, Tufail A, Daien V, Lee AY, Nguyen V, Ozturk M, Barthelmes D, Gillies MC (2018): Real-world outcomes in patients with neovascular age-related macular degeneration treated with intravitreal vascular endothelial growth factor inhibitors. Prog Retin Eye Res 65, 127–146

Middleton S (2010): Porcine Ophthalmology. Vet Clin North Am Food Anim Pract 26, 557–572

Miller JW (2016): Beyond VEGF—The Weisenfeld Lecture. Investig Opthalmology & Vis Sci vol. 57, 6911-6918

Miller JW, Le Couter J, Strauss EC, Ferrara N (2013): Vascular Endothelial Growth Factor A in Intraocular Vascular Disease. Ophthalmology 120, 106–114

Mimura T, Funatsu H, Noma H, Shimura M, Kamei Y, Yoshida M, Kondo A, Watanabe E, Mizota A (2019): Aqueous Humor Levels of Cytokines in Patients with Age-Related Macular Degeneration. Ophthalmol J Int Ophtalmol Int J Ophthalmol Z Augenheilkd 241, 81–89

Mitter SK, Song C, Qi X, Mao H, Rao H, Akin D, Lewin A, Grant M, Dunn W, Ding J, et al. (2014): Dysregulated autophagy in the RPE is associated with increased susceptibility to oxidative stress and AMD. Autophagy 10, 1989–2005

Mollen KP, Anand RJ, Tsung A, Prince JM, Levy RM, Billiar TR (2006): Emerging paradigm: toll-like receptor 4-sentinel for the detection of tissue damage. Shock Augusta Ga 26, 430–437

Mosmann T (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 65, 55–63

Mulfaul K, Rhatigan M, Doyle S: Toll-Like Receptors and Age-Related Macular Degeneration. In: Ash JD, Anderson RE, LaVail MM, Bowes Rickman C, Hollyfield JG, Grimm C (Hrsg.): Retinal Degenerative Diseases (Advances in Experimental Medicine and Biology). Band 1074; Springer International Publishing, Cham 2018, 19–28

Murakami Y, Matsumoto H, Roh M, Giani A, Kataoka K, Morizane Y, Kayama M, Thanos A, Nakatake S, Notomi S, et al. (2014): Programmed necrosis, not apoptosis, is a key mediator of cell loss and DAMP-mediated inflammation in dsRNA-induced retinal degeneration. Cell Death Differ 21, 270–277

Myers CE, Klein BEK, Gangnon R, Sivakumaran TA, Iyengar SK, Klein R (2014): Cigarette Smoking and the Natural History of Age-Related Macular Degeneration. Ophthalmology 121, 1949–1955

Nagineni CN, Kommineni VK, William A, Detrick B, Hooks JJ (2012): Regulation of VEGF expression in human retinal cells by cytokines: Implications for the role of inflammation in age-related macular degeneration. J Cell Physiol 227, 116–126

Nguyen DH, Luo J, Zhang K, Zhang M (2013): Current Therapeutic Approaches in Neovascular Age-related Macular Degeneration. Discov Med 15, 343–348

Niederkorn JY (2006): See no evil, hear no evil, do no evil: the lessons of immune privilege. Nat Immunol 7, 354–359

Nowak JZ (2014): AMD--the retinal disease with an unprecised etiopathogenesis: in search of effective therapeutics. Acta Pol Pharm 71, 900–916

Oh H, Takagi H, Takagi C, Suzuma K, Otani A, Ishida K, Matsumura M, Ogura Y, Honda Y (1999): The potential angiogenic role of macrophages in the formation of choroidal neovascular membranes. Invest Ophthalmol Vis Sci 40, 1891–1898

Okamoto N, Tobe T, Hackett SF, Ozaki H, Vinores MA, La Rochelle W, Zack DJ, Campochiaro PA (1998): Transgenic mice with increased expression of vascular endothelial growth factor in the retina: a new model of intraretinal and subretinal neovascularization. The American journal of pathology, 151(1), 281–291

Paeng SH, Jung W-K, Park WS, Lee D-S, Kim G-Y, Choi YH, Seo S-K, Jang WH, Choi JS, Lee Y-M, et al. (2015a): Caffeic acid phenethyl ester reduces the secretion of vascular endothelial growth factor through the inhibition of the ROS, PI3K and HIF-1α signaling pathways in human retinal pigment epithelial cells under hypoxic conditions. Int J Mol Med 35, 1419–1426

Paeng SH, Park WS, Jung W-K, Lee D-S, Kim G-Y, Choi YH, Seo S-K, Jang WH, Choi JS, Lee Y-M, et al. (2015b): YCG063 inhibits Pseudomonas aeruginosa LPS-induced inflammation in human retinal pigment epithelial cells through the TLR2-mediated AKT/NF-κB pathway and ROS-independent pathways. Int J Mol Med 36, 808–816

Parisi L, Fuhrer R, Zinkernagel M, Enzmann V (2019): Ranibizumab and Bevacizumab but Not Aflibercept Inhibit Proliferation of Primary Human Retinal Pigment Epithelium in vitro. Ophthalmol J Int Ophtalmol Int J Ophthalmol Z Augenheilkd 241, 137–142

Pennesi ME, Neuringer M, Courtney RJ (2012): Animal models of age related macular degeneration. Mol Aspects Med 33, 487–509

Peters S, Heiduschka P, Julien S, Ziemssen F, Fietz H, Bartz-Schmidt KU, Schraermeyer U (2007): Ultrastructural Findings in the Primate Eye After Intravitreal Injection of Bevacizumab. Am J Ophthalmol 143, 995-1002

Rajapakse D, Curtis T, Chen M, Xu H (2017): Zinc Protects Oxidative Stress-Induced RPE Death by Reducing Mitochondrial Damage and Preventing Lysosome Rupture. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, vol. 2017, Article ID 6926485, 12 pages

Ramkumar HL, Zhang J, Chan C-C (2010): Retinal ultrastructure of murine models of dry age-related macular degeneration (AMD). Prog Retin Eye Res 29, 169–190

Rehm H, Letzel T: Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics (Der Experimentator). 6. Aufl; Spektrum, Akad. Verl, Heidelberg 2010

Richert E (2017): Wirkung schonender Laserverfahren auf den Komplex aus retinalem Pigmentepithel, Bruch´scher Membran und Choroidea - mögliche Therapieoption der frühen altersabhängigen Makuladegeneration, unv. Diss. Biowissenschaften, CAU Kiel

Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, Minor L: Cell Viability Assays. In: Sittampalam GS, Grossman A, Brimacombe K, Arkin M, Auld D, Austin CP, Baell J, Bejcek B, Caaveiro JMM, Chung TDY, et al. (Hrsg.): Assay Guidance Manual. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, Bethesda (MD) 2004

Sadda SR, Guymer R, Monés JM, Tufail A, Jaffe GJ (2020): Anti–Vascular Endothelial Growth Factor Use and Atrophy in Neovascular Age-Related Macular Degeneration. Ophthalmology 127, 648–659

Sanchez I, Martin R, Ussa F, Fernandez-Bueno I (2011): The parameters of the porcine eyeball. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol 249, 475–482

Sappington RM, Chan M, Calkins DJ (2006): Interleukin-6 Protects Retinal Ganglion Cells from Pressure-Induced Death. Investig Opthalmology Vis Sci 47, 2932-2942

Sarks SH (1980): Drusen and Their Relationship to Senile Macular Degeneration. Aust J Opthalmology 8, 117–130

Sarks SH, Arnold JJ, Killingsworth MC, Sarks JP (1999): Early drusen formation in the normal and aging eye and their relation to age related maculopathy: a clinicopathological study. Br J Ophthalmol 83, 358–368

Schmidt-Erfurth U, Chong V, Loewenstein A, Larsen M, Souied E, Schlingemann R, Eldem B, Monés J, Richard G, Bandello F (2014): Guidelines for the management of neovascular age-related macular degeneration by the European Society of Retina Specialists (EURETINA). The British journal of ophthalmology, 98(9), 1144–1167

Schnichels S, Hagemann U, Januschowski K, Hofmann J, Bartz-Schmidt K-U, Szurman P, Spitzer MS, Aisenbrey S (2013): Comparative toxicity and proliferation testing of aflibercept, bevacizumab and ranibizumab on different ocular cells. Br J Ophthalmol 97, 917–923

Schottler J, Randoll N, Lucius R, Caliebe A, Roider J, Klettner A (2018): Long-term treatment with anti-VEGF does not induce cell aging in primary retinal pigment epithelium. Exp Eye Res 171, 1–11

Schrader WF (2006): Altersbedingte Makuladegeneration: Sozioökonomische Zeitbombe in der alternden Gesellschaft. Ophthalmol 103, 742–748

Schuman SG, Koreishi AF, Farsiu S, Jung S, Izatt JA, Toth CA (2009): Photoreceptor Layer Thinning over Drusen in Eyes with Age-Related Macular Degeneration Imaged In Vivo with Spectral-Domain Optical Coherence Tomography. Ophthalmology 116, 488-496

Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker KH: 5.14 Netzhaut (Retina). In: Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker KH (Hrsg.): Prometheus LernAtlas - Kopf, Hals und Neuroanatomie. 4. Auflage; Georg Thieme Verlag 2015

Shin Y, Moiseyev G, Petrukhin K, Cioffi CL, Muthuraman P, Takahashi Y, Ma J-X (2018): A novel RPE65 inhibitor CU239 suppresses visual cycle and prevents retinal degeneration. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis 1864, 2420–2429

Sinha T, Naash MI, Al-Ubaidi MR (2020): The Symbiotic Relationship between the Neural Retina and Retinal Pigment Epithelium Is Supported by Utilizing Differential Metabolic Pathways. iScience 23, 101004

Spilsbury K, Garrett KL, Shen WY, Constable IJ, Rakoczy PE (2000): Overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the retinal pigment epithelium leads to the development of choroidal neovascularization. Am J Pathol 157, 135–144

Strauss O (2005): The Retinal Pigment Epithelium in Visual Function. Physiol Rev 85, 845–881

Streilein JW, Ma N, Wenkel H, Fong Ng T, Zamiri P (2002): Immunobiology and privilege of neuronal retina and pigment epithelium transplants. Vision Res 42, 487–495

Tao L, Qiu Y, Fu X, Lin R, Lei C, Wang J, Lei B (2016): Angiotensin-converting enzyme 2 activator diminazene aceturate prevents lipopolysaccharide-induced inflammation by inhibiting MAPK and NF-κB pathways in human retinal pigment epithelium. Journal of Neuroinflammation vol. 13, Article number: 35

Terasaki H, Kase S, Shirasawa M, Otsuka H, Hisatomi T, Sonoda S, Ishida S, Ishibashi T, Sakamoto T (2013): TNF-α decreases VEGF secretion in highly polarized RPE cells but increases it in non-polarized RPE cells related to crosstalk between JNK and NF-κB pathways. PloS One 8, e69994

Terheyden L, Roider J, Klettner A (2020): Basolateral activation with TLR agonists induces polarized cytokine release and reduces barrier function in RPE in vitro. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology*, *259*(2), 413–424

Theodossiadis PG, Liarakos VS, Sfikakis PP, Vergados IA, Theodossiadis GP (2009): Intravitreal administration of the anti-tumor necrosis factor agent infliximab for neovascular age-related macular degeneration. Am J Ophthalmol 147, 825–830, 830

To CH, Hodson SA (1998): The glucose transport in retinal pigment epithelium is via passive facilitated diffusion. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 121, 441–444

Tombran-Tink J, Shivaram SM, Chader GJ, Johnson LV, Bok D (1995): Expression, secretion, and age-related downregulation of pigment epithelium-derived factor, a serpin with neurotrophic activity. J Neurosci Off J Soc Neurosci 15, 4992–5003

Tong J-P, Chan W-M, Liu DTL, Lai TYY, Choy K-W, Pang C-P, Lam DSC (2006): Aqueous Humor Levels of Vascular Endothelial Growth Factor and Pigment Epithelium–Derived Factor in Polypoidal Choroidal Vasculopathy and Choroidal Neovascularization. Am J Ophthalmol 141, 456–462

Vagaja NN, Chinnery HR, Binz N, Kezic JM, Rakoczy EP, McMenamin PG (2012): Changes in murine hyalocytes are valuable early indicators of ocular disease. Invest Ophthalmol Vis Sci 53, 1445–1451

Van Weemen BK, Schuurs AHWM (1971): Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. FEBS Lett 15, 232–236

Vessey KA, Ho T, Jobling AI, Mills SA, Tran MX, Brandli A, Lam J, Guymer RH, Fletcher EL (2018): Nanosecond Laser Treatment for Age-Related Macular Degeneration Does Not Induce Focal Vision Loss or New Vessel Growth in the Retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 59, 731–745

Viviani B (2004): Cytokines role in neurodegenerative events. Toxicol Lett 149, 85–89

Wang AL, Lukas TJ, Yuan M, Du N, Tso MO, Neufeld AH (2009): Autophagy, exosomes and drusen formation in age-related macular degeneration. Autophagy 5, 563–564

Wang H, Han X, Wittchen ES, Hartnett ME (2016): TNF-α mediates choroidal neovascularization by upregulating VEGF expression in RPE through ROS-dependent β-catenin activation. Mol Vis 22, 116–128

Wangsa-Wirawan ND, Linsenmeier (2003): Retinal Oxygen: Fundamental and Clinical Aspects. Arch Ophthalmol 121, 547-557

Wen X, Hu X, Miao L, Ge X, Deng Y, Bible PW, Wei L (2018): Epigenetics, microbiota, and intraocular inflammation: New paradigms of immune regulation in the eye. Prog Retin Eye Res 64, 84–95

Wiencke AK, Kiilgaard JF, Nicolini J, Bundgaard M, Röpke C, La Cour M (2003): Growth of cultured porcine retinal pigment epithelial cells: A CTA O PHTHALMOLOGICA S CANDINAVICA 2003. Acta Ophthalmol Scand 81, 170–176

Wolfram C, K. Schuster A, M. Elflein H, Nickels S, Schulz A, S. Wild P, E. Beutel M, Blettner M, Münzel T, J. Lackner K, Pfeiffer N (2019): The Prevalence of Visual Impairment in the Adult Population. Dtsch Ärztebl Int 116, 289–295

Wong WL, Su X, Li X, Cheung CMG, Klein R, Cheng C-Y, Wong TY (2014): Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. Lancet Glob Health 2, e106–e116

Wons J, Wirth MA, Graf N, Becker MD, Michels S (2017): Comparison of Progression Rate of Retinal Pigment Epithelium Loss in Patients with Neovascular Age-Related Macular Degeneration Treated with Ranibizumab and Aflibercept. Journal of Ophthalmology, vol. 2017, Article ID 7432739, 8 pages

Wörnle M, Merkle M, Wolf A, Ribeiro A, Himmelein S, Kernt M, Kampik A, Eibl-Lindner KH (2011): Inhibition of TLR3-mediated proinflammatory effects by Alkylphosphocholines in human retinal pigment epithelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 52, 6536–6544

Xu H, Chen M, Forrester JV (2009): Para-inflammation in the aging retina. Prog Retin Eye Res 28, 348–368

Yang P, McKay BS, Allen JB, Jaffe GJ (2004): Effect of NF-κB Inhibition on TNF-α–Induced Apoptosis in Human RPE Cells. Investig Opthalmology Vis Sci 45, 2438-2446

Yang P, Peairs JJ, Tano R, Zhang N, Tyrell J, Jaffe GJ (2007): Caspase-8-mediated apoptosis in human RPE cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 48, 3341–3349

Yang Z, Stratton C, Francis PJ, Kleinman ME, Tan PL, Gibbs D, Tong Z, Chen H, Constantine R, Yang X, et al. (2008): Toll-like Receptor 3 and Geographic Atrophy in Age-Related Macular Degeneration. N Engl J Med 359, 1456–1463

Zamiri P, Sugita S, Streilein JW: Immunosuppressive Properties of the Pigmented Epithelial Cells and the Subretinal Space. In: Niederkorn JY, Kaplan HJ (Hrsg.): Chemical Immunology and Allergy. KARGER, Basel 2007, 86–93

Zarbin M (2016): Cell-Based Therapy for Degenerative Retinal Disease. Trends Mol Med 22, 115–134

Zhang M, Jiang N, Chu Y, Postnikova O, Varghese R, Horvath A, Cheema AK, Golestaneh N (2020): Dysregulated metabolic pathways in age-related macular degeneration. Scientific Reports vol. 10, Article number: 2464

Zhou TE, Rivera JC, Bhosle VK, Lahaie I, Shao Z, Tahiri H, Zhu T, Polosa A, Dorfman A, Beaudry-Richard A, et al. (2016): Choroidal Involution Is Associated with a Progressive Degeneration of the Outer Retinal Function in a Model of Retinopathy of Prematurity: Early Role for IL-1β. Am J Pathol 186, 3100–3116

Zhu Y, Dai B, Li Y, Peng H (2015): C5a and toll-like receptor 4 crosstalk in retinal pigment epithelial cells. Mol Vis 21, 1122–1129

VII Anhang

Tabelle 9: Kurzfristige Vitalität unter Poly I:C und VEGF-Inhibitoren.

Stimulation [µg/ml]	Dauer	MW [% Kontrolle]	SA	*Student's* T-Test (gegen Kontrolle)	*Student's* T-Test (gegen Poly I:C)	*Student's* T-Test (gegen Afli)	*Student's* T-Test (gegen Beva)
Kontrolle	**24h**	**100**	**0**				
Poly I:C (1)	24 h	97,725	5,587	n.s.			
Poly I:C (10)	24 h	101,872	7,361	n.s.			
Poly I:C (100)	24 h	95,356	13,359	n.s.			
Afli (250)	24 h	95,292	6,285	$p < 0.01$			
Poly I:C (1) + Afli	24 h	87,151	9,311	$p < 0.001$	$p < 0.05$	($p < 0.07$)	
Poly I:C (10) + Afli	24 h	96,853	10,177	n.s.	n.s.	n.s.	
Poly I:C (100) + Afli	24 h	99,911	2,884	n.s.	n.s.	n.s.	
Beva (250)	24 h	95,497	5,535	$p < 0.01$			
Poly I:C (1) + Beva	24 h	95,738	4,177	$p < 0.001$	n.s.		n.s.
Poly I:C (10) + Beva	24 h	98,019	7,847	n.s.	n.s.		n.s.
Poly I:C (100)+ Beva	24 h	101,053	9,309	n.s.	n.s.		n.s.

Vitalität der primären RPE Zellen nach Poly I:C-Behandlung in Kombination mit VEGF-Inhibitoren für 24 Stunden. Dargestellt sind Mittelwert, Standardabweichung und Signifikanzen. n.s. = nicht signifikant, MW = Mittelwert, SA = Standardabweichung, Poly I:C = Polyinosin-Polycytidylsäure, Afli = Aflibercept, Beva = Bevacizumab, h = Stunden.

Tabelle 10: Mittelfristige Vitalität unter Poly I:C und VEGF-Inhibitoren.

Stimulation [µg/ml]	Dauer	MW [% Kontrolle]	SA	*Student's* T-Test (gegen Kontrolle)	*Student's* T-Test (gegen Poly I:C)	*Student's* T-Test (gegen Afli)	*Student's* T-Test (gegen Beva)
Kontrolle	**7d**	**100**	**0**				
Poly I:C (1)	7d	95,235	5,851	$p < 0.01$			
Poly I:C (10)	7d	97,909	9,589	n.s.			
Poly I:C (100)	7d	88,223	3,565	$p < 0.001$			
Afli (250)	7d	93,227	6,486	$p < 0.001$			
Poly I:C (1) + Afli	7d	82,002	4,042	$p < 0.001$	$p < 0.01$	$p < 0.01$	
Poly I:C (10) + Afli	7d	93,758	9,326	$p < 0.01$	n.s.	n.s.	
Poly I:C (100) + Afli	7d	82,231	2,104	$p < 0.001$	$p < 0.05$	$p < 0.01$	
Beva (250)	7d	90,687	12,370	$p < 0.01$			
Poly I:C (1) + Beva	7d	85,625	9,504	$p < 0.001$	($p < 0.07$)		n.s.
Poly I:C (10) + Beva	7d	97,522	11,080	n.s.	n.s.		n.s.
Poly I:C (100)+ Beva	7d	90,947	8,225	$p < 0.001$	n.s.		n.s.

Vitalität der primären RPE Zellen nach Poly I:C-Behandlung in Kombination mit VEGF-Inhibitoren für sieben Tagen. Dargestellt sind Mittelwert, Standardabweichung und Signifikanzen. n.s. = nicht signifikant, MW = Mittelwert, SA = Standardabweichung, Poly I:C = Polyinosin-Polycytidylsäure, Afli = Aflibercept, Beva = Bevacizumab, d = Tage.

Tabelle 11: Langfristige Vitalität unter Poly I:C und VEGF-Inhibitoren.

Stimulation [µg/ml]	Dauer	MW [% Kontrolle]	SA	*Student's* T-Test (gegen Kontrolle)	*Student's* T-Test (gegen Poly I:C)	*Student's* T-Test (gegen Afli)	*Student's* T-Test (gegen Beva)
Kontrolle	**4w**	**100**	**0**				
Poly I:C (1)	4w	99,851	18,762	n.s.			
Poly I:C (10)	4w	88,573	8,968	$p < 0.001$			
Poly I:C (100)	4w	70,567	6,727	$p < 0.001$			
Afli (250)	4w	92,701	11,233	$p < 0.01$			
Poly I:C (1) + Afli	4w	94,320	7,676	$p < 0.01$	n.s.	n.s.	
Poly I:C (10) + Afli	4w	69,194	13,682	$p < 0.001$	$p < 0.01$	$p < 0.001$	
Poly I:C (100) + Afli	4w	68,816	7,143	$p < 0.001$	n.s.	$p < 0.001$	
Beva (250)	4w	91,756	10,073	$p < 0.01$			
Poly I:C (1) + Beva	4w	92,756	1,685	$p < 0.001$	n.s.		n.s.
Poly I:C (10) + Beva	4w	80,018	12,113	$p < 0.001$	n.s.		$p < 0.05$
Poly I:C (100)+ Beva	4w	82,290	1,054	$p < 0.001$	$p < 0.01$		n.s.

Vitalität der primären RPE Zellen nach Poly I:C-Behandlung in Kombination mit VEGF-Inhibitoren für vier Wochen. Dargestellt sind Mittelwert, Standardabweichung und Signifikanzen. n.s. = nicht signifikant, MW = Mittelwert, SA = Standardabweichung, Poly I:C = Polyinosin-Polycytidylsäure, Afli = Aflibercept, Beva = Bevacizumab, w = Wochen.

Tabelle 12: Kurzfristige Vitalität unter LPS und VEGF-Inhibitoren.

Stimulation [µg/ml]	Dauer	MW [% Kontrolle]	SA	*Student's* T-Test (gegen Kontrolle)	*Student's* T-Test (gegen LPS)	*Student's* T-Test (gegen Afli)	*Student's* T-Test (gegen Beva)
Kontrolle	**24h**	**100**	**0**				
LPS (0.1)	24 h	92,989	5,577	$p < 0.001$			
LPS (1)	24 h	93,673	11,712	$p < 0.05$			
LPS (10)	24 h	86,997	6,108	$p < 0.001$			
Afli (250)	24 h	95,292	6,285	$p < 0.01$			
LPS (0.1) + Afli	24 h	87,282	6,741	$p < 0.001$	n.s.	$p < 0.05$	
LPS (1) + Afli	24 h	88,431	9,022	$p < 0.001$	n.s.	n.s.	
LPS (10) + Afli	24 h	86,049	4,274	$p < 0.001$	n.s.	$p < 0.01$	
Beva (250)	24 h	95,497	5,535	$p < 0.01$			
LPS (0.1) + Beva	24 h	95,701	3,126	$p < 0.001$	n.s.		n.s.
LPS (1) + Beva	24 h	94,835	8,309	$p < 0.05$	n.s.		n.s.
LPS (10)+ Beva	24 h	89,054	8,653	$p < 0.001$	n.s.		n.s.

Vitalität der primären RPE Zellen nach LPS-Behandlung in Kombination mit VEGF-Inhibitoren für 24 Stunden. Dargestellt sind Mittelwert, Standardabweichung und Signifikanzen. n.s. = nicht signifikant, MW = Mittelwert, SA = Standardabweichung, LPS = Lipopolysaccharid, Afli = Aflibercept, Beva = Bevacizumab, h = Stunden.

Tabelle 13: Mittelfristige Vitalität unter LPS und VEGF-Inhibitoren.

Stimulation [µg/ml]	Dauer	MW [% Kontrolle]	SA	*Student's* T-Test (gegen Kontrolle)	*Student's* T-Test (gegen LPS)	*Student's* T-Test (gegen Afli)	*Student's* T-Test (gegen Beva)
Kontrolle	**7d**	**100**	**0**				
LPS (0.1)	7d	92,925	9,764	$p < 0.01$			
LPS (1)	7d	91,056	10,159	$p < 0.001$			
LPS (10)	7d	84,902	4,701	$p < 0.001$			
Afli (250)	7d	93,227	6,486	$p < 0.001$			
LPS (0.1) + Afli	7d	84,785	8,868	$p < 0.001$	n.s.	($p < 0.07$)	
LPS (1) + Afli	7d	83,430	8,018	$p < 0.001$	n.s.	$p < 0.05$	
LPS (10) + Afli	7d	78,523	7,716	$p < 0.001$	n.s.	$p < 0.01$	
Beva (250)	7d	90,400	12,031	$p < 0.01$			
LPS (0.1) + Beva	7d	85,081	4,801	$p < 0.001$	n.s.		n.s.
LPS (1) + Beva	7d	91,281	10,607	$p < 0.01$	n.s.		n.s.
LPS (10)+ Beva	7d	82,403	5,474	$p < 0.001$	n.s.		n.s.

Vitalität der primären RPE Zellen nach LPS-Behandlung in Kombination mit VEGF-Inhibitoren für sieben Tagen. Dargestellt sind Mittelwert, Standardabweichung und Signifikanzen. n.s. = nicht signifikant, MW = Mittelwert, SA = Standardabweichung, LPS = Lipopolysaccharid, Afli = Aflibercept, Beva = Bevacizumab, d = Tage.

Tabelle 14: Langfristige Vitalität unter LPS und VEGF-Inhibitoren.

Stimulation [µg/ml]	Dauer	MW [% Kontrolle]	SA	*Student's* T-Test (gegen Kontrolle)	*Student's* T-Test (gegen LPS)	*Student's* T-Test (gegen Afli)	*Student's* T-Test (gegen Beva)
Kontrolle	**4w**	**100**	**0**				
LPS (0.1)	4w	101,447	10,295	n.s.			
LPS (1)	4w	98,298	6,622	n.s.			
LPS (10)	4w	98,569	7,239	n.s.			
Afli (250)	4w	92,701	11,233	$p < 0.05$			
LPS (0.1) + Afli	4w	81,052	30,434	$p < 0.01$	n.s.	n.s.	
LPS (1) + Afli	4w	79,250	7,109	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.05$	
LPS (10) + Afli	4w	101,114	3,712	n.s.	n.s.	n.s.	
Beva (250)	4w	91,756	10,073	$p < 0.01$			
LPS (0.1) + Beva	4w	100,403	9,312	n.s.	n.s.		n.s.
LPS (1) + Beva	4w	88,591	9,976	$p < 0.001$	$p < 0.05$		n.s.
LPS (10)+ Beva	4w	99,633	5,925	n.s.	n.s.		n.s.

Vitalität der primären RPE Zellen nach LPS-Behandlung in Kombination mit VEGF-Inhibitoren für vier Wochen. Dargestellt sind Mittelwert, Standardabweichung und Signifikanzen. n.s. = nicht signifikant, MW = Mittelwert, SA = Standardabweichung, LPS = Lipopolysaccharid, Afli = Aflibercept, Beva = Bevacizumab, w = Wochen.

Tabelle 15: Kurzfristige Vitalität unter TNFα und VEGF-Inhibitoren.

Stimulation [/ml]	Dauer	MW [% Kontrolle]	SA	*Student's* T-Test (gegen Kontrolle)	*Student's* T-Test (gegen TNFα)	*Student's* T-Test (gegen Afli)	*Student's* T-Test (gegen Beva)
Kontrolle	**24h**	**100**	**0**				
TNFα (12.5 ng)	24 h	94,536	6,464	p < 0.01			
TNFα (25 ng)	24 h	90,651	7,515	p < 0.001			
TNFα (50 ng)	24 h	95,447	5,110	p < 0.01			
Afli (250 µg)	24 h	95,292	6,285	p < 0.01			
TNFα (12.5 ng) + Afli	24 h	94,751	1,731	p < 0.001	n.s.	n.s.	
TNFα (25 ng) + Afli	24 h	81,072	13,821	p < 0.001	n.s.	p < 0.01	
TNFα (50 ng) + Afli	24 h	89,379	7,492	p < 0.001	n.s.	n.s.	
Beva (250 µg)	24 h	96,516	5,258	p < 0.05			
TNFα (12.5 ng) + Beva	24 h	96,990	1,062	p < 0.001	n.s.		n.s.
TNFα (25 ng) + Beva	24 h	91,577	10,896	p < 0.01	n.s.		n.s.
TNFα (50 ng)+ Beva	24 h	96,481	8,970	n.s.	n.s.		n.s.

Vitalität der primären RPE Zellen nach TNFα-Behandlung in Kombination mit VEGF-Inhibitoren für 24 Stunden. Dargestellt sind Mittelwert, Standardabweichung und Signifikanzen. n.s. = nicht signifikant, MW = Mittelwert, SA = Standardabweichung, TNFα = Tumornekrosefaktor alpha, Afli = Aflibercept, Beva = Bevacizumab, h = Stunden.

Tabelle 16: Mittelfristige Vitalität unter TNFα und VEGF-Inhibitoren.

Stimulation [/ml]	Dauer	MW [% Kontrolle]	SA	*Student's* T-Test (gegen Kontrolle)	*Student's* T-Test (gegen TNFα)	*Student's* T-Test (gegen Afli)	*Student's* T-Test (gegen Beva)
Kontrolle	**7d**	**100**	**0**				
TNFα (12.5 ng)	7d	92,590	7,311	p < 0.001			
TNFα (25 ng)	7d	87,938	12,490	p < 0.001			
TNFα (50 ng)	7d	88,633	9,830	p < 0.001			
Afli (250 µg)	7d	93,227	6,486	p < 0.001			
TNFα (12.5 ng) + Afli	7d	84,811	7,505	p < 0.001	n.s.	p < 0.05	
TNFα (25 ng) + Afli	7d	89,796	6,595	p < 0.001	n.s.	n.s.	
TNFα (50 ng) + Afli	7d	80,983	17,307	p < 0.001	n.s.	p < 0.05	
Beva (250 µg)	7d	89,565	11,218	p < 0.001			
TNFα (12.5 ng) + Beva	7d	82,880	9,164	p < 0.001	n.s.		n.s.
TNFα (25 ng) + Beva	7d	95,507	15,872	n.s.	n.s.		n.s.
TNFα (50 ng)+ Beva	7d	90,219	8,521	p < 0.001	n.s.		n.s.

Vitalität der primären RPE Zellen nach TNFα-Behandlung in Kombination mit VEGF-Inhibitoren für sieben Tagen. Dargestellt sind Mittelwert, Standardabweichung und Signifikanzen. n.s. = nicht signifikant, MW = Mittelwert, SA = Standardabweichung, TNFα = Tumornekrosefaktor alpha, Afli = Aflibercept, Beva = Bevacizumab, d = Tage.

Tabelle 17: Langfristige Vitalität unter TNFα und VEGF-Inhibitoren.

Stimulation [/ml]	Dauer	MW [% Kontrolle]	SA	*Student's* T-Test (gegen Kontrolle)	*Student's* T-Test (gegen TNFα)	*Student's* T-Test (gegen Afli)	*Student's* T-Test (gegen Beva)
Kontrolle	**4w**	**100**	**0**				
TNFα (12.5 ng)	4w	100,658	8,655	n.s.			
TNFα (25 ng)	4w	93,755	15,773	n.s.			
TNFα (50 ng)	4w	92,765	14,220	$p < 0.05$			
Afli (250 µg)	4w	92,701	11,233	$p < 0.01$			
TNFα (12.5 ng) + Afli	4w	98,403	5,380	n.s.	n.s.	n.s.	
TNFα (25 ng) + Afli	4w	74,242	8,930	$p < 0.001$	$p < 0.05$	$p < 0.01$	
TNFα (50 ng) + Afli	4w	98,169	9,942	n.s.	n.s.	n.s.	
Beva (250 µg)	4w	91,756	10,073	$p < 0.01$			
TNFα (12.5 ng) + Beva	4w	98,482	6,273	n.s.	n.s.		n.s.
TNFα (25 ng) + Beva	4w	90,520	7,219	$p < 0.001$	n.s.		n.s.
TNFα (50 ng)+ Beva	4w	92,554	7,584	$p < 0.001$	n.s.		n.s.

Vitalität der primären RPE Zellen nach TNFα-Behandlung in Kombination mit VEGF-Inhibitoren für vier Wochen. Dargestellt sind Mittelwert, Standardabweichung und Signifikanzen. n.s. = nicht signifikant, MW = Mittelwert, SA = Standardabweichung, TNFα = Tumornekrosefaktor alpha, Afli = Aflibercept, Beva = Bevacizumab, w = Wochen.

Tabelle 18: IL-1β Sekretion unter Poly I:C und VEGF-Inhibitoren.

Stimulation [µg/ml]	Dauer	MW [pg/ml]	SA	*Student's* T-Test (gegen Kontrolle)	*Student's* T-Test (gegen Poly I:C)	*Student's* T-Test (gegen Afli)	*Student's* T-Test (gegen Beva)
Kontrolle	**24 h**	**5,236**	**3,327**				
Poly I:C (1)	24 h	3,170	4,482	n.s.			
Poly I:C (10)	24 h	45,848	52,827	$p < 0.07$			
Poly I:C (100)	24 h	43,716	38,444	$p < 0.05$			
Afli (250)	24 h	6,794	4,841	n.s.			
Poly I:C (10) + Afli	24 h	39,292	23,084	$p < 0.01$	n.s.	$p < 0.05$	
Beva (250)	24 h	8,133	7,115	n.s.			
Poly I:C (10) + Beva	24 h	43,827	32,696	$p < 0.01$	n.s.		$p < 0.05$
Kontrolle	**7d**	**7,550**	**8,110**				
Poly I:C (1)	7d	23,895	10,412	n.s.			
Poly I:C (10)	7d	14,505	14,116	n.s.			
Poly I:C (100)	7d	18,232	16,819	n.s.			
Afli (250)	7d	4,956	2,810	n.s.			
Poly I:C (10) + Afli	7d	4,173	6,189	n.s.	n.s.	n.s.	
Beva (250)	7d	2,644	4,580	n.s.			n.s.
Poly I:C (10) + Beva	7d	3,095	2,810	n.s.	n.s.		
Kontrolle	**4w**	**8,221**	**4,340**				
Poly I:C (1)	4w	13,701	0,801	n.s.			
Poly I:C (10)	4w	7,321	3,883	n.s.			
Poly I:C (100)	4w	13,701	0,801	n.s.			
Afli (250)	4w	3,800	3,291	n.s.			
Poly I:C (10) + Afli	4w	4,584	5,116	n.s.	n.s.	n.s.	
Beva (250)	4w	6,817	3,868	n.s.			
Poly I:C (10) + Beva	4w	8,678	4,648	n.s.	n.s.		n.s.

IL-1β Sekretion der primären RPE Zellen nach Poly I:C-Behandlung in Kombination mit VEGF-Inhibitoren für 24 Stunden, sieben Tage und vier Wochen. Dargestellt sind Mittelwert, Standardabweichung und Signifikanzen. n.s. = nicht signifikant. MW = Mittelwert, SA = Standardabweichung, Poly I:C = Polyinosin-Polycytidylsäure, Afli = Aflibercept, Beva = Bevacizumab, h = Stunden, d = Tage, w = Wochen.

Tabelle 19: IL-1β Sekretion unter LPS und VEGF-Inhibitoren.

Stimulation [µg/ml]	Dauer	MW [pg/ml]	SA	Student's T-Test (gegen Kontrolle)	Student's T-Test (gegen LPS)	Student's T-Test (gegen Afli)	Student's T-Test (gegen Beva)
Kontrolle	**24 h**	**17,372**	**24,855**				
LPS (0.1)	24 h	98,083	35,239	$p < 0.01$			
LPS (1)	24 h	416,337	433,946	$p < 0.05$			
LPS (10)	24 h	10,303	5,606	n.s.			
Afli (250)	24 h	6,794	4,841	n.s.			
LPS (1) + Afli	24 h	560,098	578,042	$p < 0.05$	n.s.	$p < 0.07$	
Beva (250)	24 h	8,133	7,115	n.s.			
LPS (1) + Beva	24 h	405,563	146,758	$p < 0.001$	n.s.		$p < 0.001$
Kontrolle	**7d**	**10,948**	**14,472**				
LPS (0.1)	7d	61,487	94,883	n.s.			
LPS (1)	7d	30,691	0,801	n.s.			
LPS (10)	7d	10,869	3,203	n.s.			
Afli (250)	7d	4,956	2,810	n.s.			
LPS (1) + Afli	7d	16,865	16,672	n.s.	n.s.	n.s.	
Beva (250)	7d	2,644	4,580	n.s.			
LPS (1) + Beva	7d	9,422	7,264	n.s.	$p < 0.05$		n.s.
Kontrolle	**4w**	**5,368**	**4,052**				
LPS (0.1)	4w	6,567	9,287	n.s.			
LPS (1)	4w	6,983	7,548	n.s.			
LPS (10)	4w	11,133	10,840	n.s.			
Afli (250)	4w	3,800	3,291	n.s.			
LPS (1) + Afli	4w	2,723	2,810	n.s.	n.s.	n.s.	
Beva (250)	4w	6,817	3,868	n.s.			
LPS (1) + Beva	4w	7,933	2,954	n.s.	n.s.		n.s.

IL-1β Sekretion der primären RPE Zellen nach LPS-Behandlung in Kombination mit VEGF-Inhibitoren für 24 Stunden, sieben Tage und vier Wochen. Dargestellt sind Mittelwert, Standardabweichung und Signifikanzen. n.s. = nicht signifikant. MW = Mittelwert, SA = Standardabweichung, LPS = Lipopolysaccharid, Afli = Aflibercept, Beva = Bevacizumab, h = Stunden, d = Tage, w = Wochen.

Tabelle 20: IL-1β Sekretion unter TNFα und VEGF-Inhibitoren.

Stimulation [/ml]	Dauer	MW [pg/ml]	SA	Student's T-Test (gegen Kontrolle)	Student's T-Test (gegen TNFα)	Student's T-Test (gegen Afli)	Student's T-Test (gegen Beva)
Kontrolle	**24 h**	**7,016**	**4,957**				
TNFα (12.5 ng)	24 h	21,063	28,833	n.s.			
TNFα (25 ng)	24 h	13,981	14,455	n.s.			
TNFα (50 ng)	24 h	49,981	57,906	$p < 0.05$			
Afli (250 µg)	24 h	6,794	4,841	n.s.			
TNFα (25 ng) + Afli	24 h	11,770	8,895	n.s.	n.s.	n.s.	
Beva (250 µg)	24 h	8,133	7,115	n.s.			
TNFα (25 ng) + Beva	24 h	10,657	7,749	n.s.	n.s.		n.s.
Kontrolle	**7d**	**6,644**	**6,853**				
TNFα (12.5 ng)	7d	19,364	2,403	$p < 0.07$			
TNFα (25 ng)	7d	9,923	18,512	n.s.			
TNFα (50 ng)	7d	49,981	57,906	n.s.			
Afli (250 µg)	7d	4,956	2,810	n.s.			
TNFα (25 ng) + Afli	7d	3,800	3,977	n.s.	n.s.	n.s.	
Beva (250 µg)	7d	2,644	4,580	n.s.			
TNFα (25 ng) + Beva	7d	0,823	1,325	n.s.	n.s.		n.s.
Kontrolle	**4w**	**5,431**	**4,816**				
TNFα (12.5 ng)	4w	6,656	7,181	n.s.			
TNFα (25 ng)	4w	7,824	11,957	n.s.			
TNFα (50 ng)	4w	33,320	50,092	n.s.			
Afli (250 µg)	4w	3,800	3,291	n.s.			
TNFα (25 ng) + Afli	4w	10,127	9,601	n.s.	n.s.	n.s.	
Beva (250 µg)	4w	6,817	3,868	n.s.			
TNFα (25) + Beva	4w	7,933	5,116	n.s.	n.s.		n.s.

IL-1β Sekretion der primären RPE Zellen nach TNFα-Behandlung in Kombination mit VEGF-Inhibitoren für 24 Stunden, sieben Tage und vier Wochen. Dargestellt sind Mittelwert, Standardabweichung und Signifikanzen. n.s. = nicht signifikant. MW = Mittelwert, SA = Standardabweichung, TNFα = Tumornekrosefaktor alpha, Afli = Aflibercept, Beva = Bevacizumab, h = Stunden, d = Tage, w = Wochen.

Tabelle 21: IL-6 Sekretion unter Poly I:C und VEGF-Inhibitoren.

Stimulation [µg/ml]	Dauer	MW [pg/ml]	SA	Student's T-Test (gegen Kontrolle)	Student's T-Test (gegen Poly I:C)	Student's T-Test (gegen Afli)	Student's T-Test (gegen Beva)
Kontrolle	**24 h**	**3,275**	**5,210**				
Poly I:C (1)	24 h	65,353	55,271	$p < 0.01$			
Poly I:C (10)	24 h	385,460	316,614	$p < 0.01$			
Poly I:C (100)	24 h	917,140	1010,522	$p < 0.05$			
Afli (250)	24 h	0	0	n.s.			
Poly I:C (10) + Afli	24 h	488,430	398,363	$p < 0.01$	n.s.	n.s.	
Beva (250)	24 h	0	0	n.s.			
Poly I:C (10) + Beva	24 h	571,872	532,685	$p < 0.01$	n.s.		n.s.
Kontrolle	**7d**	**12,808**	**32,182**				
Poly I:C (1)	7d	107,926	113,291	$p < 0.07$			
Poly I:C (10)	7d	390,624	453,803	$p < 0.05$			
Poly I:C (100)	7d	1033,368	1150,131	$p < 0.05$			
Afli (250)	7d	0,814	1,629	n.s.			
Poly I:C (10) + Afli	7d	308,683	404,946	n.s.	n.s.	n.s.	
Beva (250)	7d	5,095	10,190	n.s.			
Poly I:C (10) + Beva	7d	312,213	325,648	$p < 0.05$	n.s.		n.s.
Kontrolle	**4w**	**1,006**	**2,846**				
Poly I:C (1)	4w	248,429	142,856	$p < 0.001$			
Poly I:C (10)	4w	264,580	134,711	$p < 0.001$			
Poly I:C (100)	4w	327,858	203,623	$p < 0.001$			
Afli (250)	4w	0,651	1,457	n.s.			
Poly I:C (10) + Afli	4w	335,792	181,162	$p < 0.001$	n.s.	$p < 0.01$	
Beva (250)	4w	2,810	5,998	n.s.			
Poly I:C (10) + Beva	4w	306,349	120,770	$p < 0.001$	n.s.		$p < 0.001$

IL-6 Sekretion der primären RPE Zellen nach Poly I:C-Behandlung in Kombination mit VEGF-Inhibitoren für 24 Stunden, sieben Tage und vier Wochen. Dargestellt sind Mittelwert, Standardabweichung und Signifikanzen. n.s. = nicht signifikant. MW = Mittelwert, SA = Standardabweichung, Poly I:C = Polyinosin-Polycytidylsäure, Afli = Aflibercept, Beva = Bevacizumab, h = Stunden, d = Tage, w = Wochen.

Tabelle 22: IL-6 Sekretion unter LPS und VEGF-Inhibitoren.

Stimulation [µg/ml]	Dauer	MW [pg/ml]	SA	Student's T-Test (gegen Kontrolle)	Student's T-Test (gegen LPS)	Student's T-Test (gegen Afli)	Student's T-Test (gegen Beva)
Kontrolle	**24 h**	**3,658**	**5,06**				
LPS (0.1)	24 h	842,26	915,04	$p < 0.05$			
LPS (1)	24 h	1338,23	823,09	$p < 0.001$			
LPS (10)	24 h	1472,76	760,69	$p < 0.001$			
Afli (250)	24 h	0	0	n.s.			
LPS (1) + Afli	24 h	1465,39	411,24	$p < 0.001$	n.s.	$p < 0.01$	
Beva (250)	24 h	0	0	n.s.			
LPS (1) + Beva	24 h	1688,64	445,95	$p < 0.001$	n.s.		$p < 0.01$
Kontrolle	**7d**	**14,14**	**32,65**				
LPS (0.1)	7d	697,10	1013,55	n.s.			
LPS (1)	7d	649,89	791,50	$p < 0.07$			
LPS (10)	7d	1037,29	1144,49	$p < 0.05$			
Afli (250)	7d	0,81	1,62	n.s.			
LPS (1) + Afli	7d	470,65	316,61	$p < 0.01$	n.s.	$p < 0.05$	
Beva (250)	7d	5,09	10,19	n.s.	n.s.		
LPS (1) + Beva	7d	363,90	306,11	$p < 0.05$	n.s.		$p < 0.07$
Kontrolle	**4w**	**1,61**	**3,60**				
LPS (0.1)	4w	37,29	18,84	$p < 0.01$			
LPS (1)	4w	168,15	95,21	$p < 0.01$			
LPS (10)	4w	419,17	148,69	$p < 0.001$			
Afli (250)	4w	1,08	1,88	n.s.			
LPS (1) + Afli	4w	167,86	35,94	$p < 0.001$	n.s.	$p < 0.01$	
Beva (250)	4w	4,68	7,66	n.s.			
LPS (1) + Beva	4w	308,04	228,71	$p < 0.05$	n.s.		n.s.

IL-6 Sekretion der primären RPE Zellen nach LPS-Behandlung in Kombination mit VEGF-Inhibitoren für 24 Stunden, sieben Tage und vier Wochen. Dargestellt sind Mittelwert, Standardabweichung und Signifikanzen. n.s. = nicht signifikant. MW = Mittelwert, SA = Standardabweichung, LPS = Lipopolysaccharid, Afli = Aflibercept, Beva = Bevacizumab, h = Stunden, d = Tage, w = Wochen.

Tabelle 23: IL-6 Sekretion unter TNFα und VEGF-Inhibitoren.

Stimulation [/ml]	Dauer	MW [pg/ml]	SA	Student's T-Test (gegen Kontrolle)	Student's T-Test (gegen TNFα)	Student's T-Test (gegen Afli)	Student's T-Test (gegen Beva)
Kontrolle	**24 h**	**16,49**	**41,50**				
TNFα (12.5 ng)	24 h	228,20	143,27	p < 0.01			
TNFα (25 ng)	24 h	386,37	289,48	p < 0.01			
TNFα (50 ng)	24 h	707,22	687,11	p < 0.05			
Afli (250 µg)	24 h	34,84	69,69	n.s.			
TNFα (25 ng) + Afli	24 h	504,09	385,05	p < 0.01	n.s.	p < 0.07	
Beva (250 µg)	24 h	28,18	56,37	n.s.			
TNFα (25 ng) + Beva	24 h	566,32	389,55	p < 0.01	n.s.		p < 0.05
Kontrolle	**7d**	**7,59**	**17,90**				
TNFα (12.5 ng)	7d	404,16	218,01	p < 0.001			
TNFα (25 ng)	7d	345,41	343,73	p < 0.01			
TNFα (50 ng)	7d	846,43	675,28	p < 0.01			
Afli (250 µg)	7d	0,81	1,62	n.s.			
TNFα (25 ng) + Afli	7d	42,38	35,07	p < 0.05	n.s.	p < 0.07	
Beva (250 µg)	7d	6,19	9,66	n.s.			
TNFα (25 ng) + Beva	7d	204,15	300,25	p < 0.07	n.s.		n.s.
Kontrolle	**4w**	**1,34**	**3,28**				
TNFα (12.5 ng)	4w	6,33	10,97	n.s.			
TNFα (25 ng)	4w	530,72	576,26	p < 0.05			
TNFα (50 ng)	4w	40,85	43,89	p < 0.05			
Afli (250 µg)	4w	1,08	1,88	n.s.			
TNFα (25 ng) + Afli	4w	1009,85	206,87	p < 0.001	n.s.	p < 0.001	
Beva (250 µg)	4w	4,68	7,66	n.s.			
TNFα (25) + Beva	4w	1086,33	258,22	p < 0.001	n.s.		p < 0.01

IL-6 Sekretion der primären RPE Zellen nach TNFα-Behandlung in Kombination mit VEGF-Inhibitoren für 24 Stunden, sieben Tage und vier Wochen. Dargestellt sind Mittelwert, Standardabweichung und Signifikanzen. n.s. = nicht signifikant. MW = Mittelwert, SA = Standardabweichung, TNFα = Tumornekrosefaktor alpha, Afli = Aflibercept, Beva = Bevacizumab, h = Stunden, d = Tage, w = Wochen.

Tabelle 24: IL-8 Sekretion unter Poly I:C und VEGF-Inhibitoren.

Stimulation [µg/ml]	Dauer	MW [pg/ml]	SA	Student's T-Test (gegen Kontrolle)	Student's T-Test (gegen Poly I:C)	Student's T-Test (gegen Afli)	Student's T-Test (gegen Beva)
Kontrolle	**24 h**	104,597	99,390				
Poly I:C (1)	24 h	626,667	403,483	$p < 0.05$			
Poly I:C (10)	24 h	1612,758	624,377	$p < 0.001$			
Poly I:C (100)	24 h	2627,246	2179,101	$p < 0.05$			
Afli (250)	24 h	71,612	53,938	n.s.			
Poly I:C (10) + Afli	24 h	1942,162	535,170	$p < 0.001$	n.s.	$p < 0.01$	
Beva (250)	24 h	71,324	62,258	n.s.			
Poly I:C (10) + Beva	24 h	571,872	532,685	$p < 0.001$	n.s.		$p < 0.01$
Kontrolle	**7d**	**425,100**	**306,450**				
Poly I:C (1)	7d	1623,820	728,671	$p < 0.01$			
Poly I:C (10)	7d	1959,187	1222,104	$p < 0.01$			
Poly I:C (100)	7d	3976,342	1413,862	$p < 0.001$			
Afli (250)	7d	243,161	186,280	n.s.			
Poly I:C (10) + Afli	7d	1314,552	672,172	$p < 0.01$	n.s.	$p < 0.01$	
Beva (250)	7d	304,692	255,221	n.s.			
Poly I:C (10) + Beva	7d	1185,923	424,566	$p < 0.01$	n.s.		$p < 0.01$
Kontrolle	**4w**	334,179	248,141				
Poly I:C (1)	4w	2326,367	551,540	$p < 0.001$			
Poly I:C (10)	4w	1303,033	676,536	$p < 0.01$			
Poly I:C (100)	4w	3342,219	164,399	$p < 0.001$			
Afli (250)	4w	292,196	120,425	n.s.			
Poly I:C (10) + Afli	4w	709,525	465,491	n.s.	n.s.	n.s.	
Beva (250)	4w	145,735	85,375	n.s.			
Poly I:C (10) + Beva	4w	651,539	352,095	n.s.	n.s.		$p < 0.05$

IL-8 Sekretion der primären RPE Zellen nach Poly I:C-Behandlung in Kombination mit VEGF-Inhibitoren für 24 Stunden, sieben Tage und vier Wochen. Dargestellt sind Mittelwert, Standardabweichung und Signifikanzen. n.s. = nicht signifikant. MW = Mittelwert, SA = Standardabweichung, Poly I:C = Polyinosin-Polycytidylsäure, Afli = Aflibercept, Beva = Bevacizumab, h = Stunden, d = Tage, w = Wochen.

Tabelle 25: IL-8 Sekretion unter LPS und VEGF-Inhibitoren.

Stimulation [µg/ml]	Dauer	MW [pg/ml]	SA	Student's T-Test (gegen Kontrolle)	Student's T-Test (gegen LPS)	Student's T-Test (gegen Afli)	Student's T-Test (gegen Beva)
Kontrolle	**24 h**	104,597	99,390				
LPS (0.1)	24 h	2257,971	1499,607	$p < 0.01$			
LPS (1)	24 h	3836,665	1439,805	$p < 0.001$			
LPS (10)	24 h	3911,304	1701,880	$p < 0.001$			
Afli (250)	24 h	71,612	53,938	n.s.			
LPS (1) + Afli	24 h	4474,715	518,456	$p < 0.001$	n.s.	$p < 0.001$	
Beva (250)	24 h	71,324	62,258	n.s.			
LPS (1) + Beva	24 h	4852,919	431,831	$p < 0.001$	n.s.		$p < 0.001$
Kontrolle	**7d**	425,100	306,450				
LPS (0.1)	7d	3068,226	1728,842	$p < 0.01$			
LPS (1)	7d	2997,431	1865,344	$p < 0.01$			
LPS (10)	7d	4043,791	1405,647	$p < 0.001$			
Afli (250)	7d	243,161	186,280	n.s.			
LPS (1) + Afli	7d	2742,026	1837,557	$p < 0.01$	n.s.	$p < 0.05$	
Beva (250)	7d	304,692	255,221	n.s.			
LPS (1) + Beva	7d	2530,370	1489,550	$p < 0.01$	n.s.		$p < 0.01$
Kontrolle	**4w**	374,156	279,708				
LPS (0.1)	4w	1527,823	270,143	$p < 0.001$			
LPS (1)	4w	1527,875	814,114	$p < 0.01$			
LPS (10)	4w	3460,691	711,819	$p < 0.001$			
Afli (250)	4w	231,034	69,055	n.s.			
LPS (1) + Afli	4w	1319,608	472,161	$p < 0.01$	n.s.	$p < 0.05$	
Beva (250)	4w	114,740	27,688	n.s.			
LPS (1) + Beva	4w	1062,001	429,112	$p < 0.05$	n.s.		$p < 0.05$

IL-8 Sekretion der primären RPE Zellen nach LPS-Behandlung in Kombination mit VEGF-Inhibitoren für 24 Stunden, sieben Tage und vier Wochen. Dargestellt sind Mittelwert, Standardabweichung und Signifikanzen. n.s. = nicht signifikant. MW = Mittelwert, SA = Standardabweichung, LPS = Lipopolysaccharid, Afli = Aflibercept, Beva = Bevacizumab, h = Stunden, d = Tage, w = Wochen.

Tabelle 26: IL-8 Sekretion unter TNFα und VEGF-Inhibitoren.

Stimulation [/ml]	Dauer	MW [pg/ml]	SA	Student's T-Test (gegen Kontrolle)	Student's T-Test (gegen TNFα)	Student's T-Test (gegen Afli)	Student's T-Test (gegen Beva)
Kontrolle	**24 h**	**170,86**	**105,58**				
TNFα (12.5 ng)	24 h	1787,26	925,45	$p < 0.01$			
TNFα (25 ng)	24 h	1957,89	1510,65	$p < 0.05$			
TNFα (50 ng)	24 h	3353,26	1690,78	$p < 0.01$			
Afli (250 µg)	24 h	71,61	53,93	n.s.			
TNFα (25 ng) + Afli	24 h	1291,94	802,66	$p < 0.01$	n.s.	$p < 0.07$	
Beva (250 µg)	24 h	71,32	62,25	n.s.			
TNFα (25 ng) + Beva	24 h	1308,36	860,41	$p < 0.01$	n.s.		$p < 0.07$
Kontrolle	**7d**	**425,10**	**306,45**				
TNFα (12.5 ng)	7d	3162,54	699,91	$p < 0.001$			
TNFα (25 ng)	7d	2133,80	1567,52	$p < 0.01$			
TNFα (50 ng)	7d	5390,60	698,09	$p < 0.001$			
Afli (250 µg)	7d	243,16	186,28	n.s.			
TNFα (25 ng) + Afli	7d	740,22	611,88	n.s.	n.s.	n.s.	
Beva (250 µg)	7d	304,69	255,22	n.s.			
TNFα (25 ng) + Beva	7d	678,65	449,17	n.s.	$p < 0.07$		n.s.
Kontrolle	**4w**	**374,15**	**279,70**				
TNFα (12.5 ng)	4w	1127,23	419,31	$p < 0.05$			
TNFα (25 ng)	4w	1888,74	665,34	$p < 0.001$			
TNFα (50 ng)	4w	2696,89	214,49	$p < 0.001$			
Afli (250 µg)	4w	231,03	69,05	n.s.			
TNFα (25 ng) + Afli	4w	3014,62	657,08	$p < 0.001$	$p < 0.05$	$p < 0.01$	
Beva (250 µg)	4w	114,74	27,68	n.s.			
TNFα (25) + Beva	4w	2789,50	850,96	$p < 0.001$	n.s.		$p < 0.01$

IL-8 Sekretion der primären RPE Zellen nach TNFα-Behandlung in Kombination mit VEGF-Inhibitoren für 24 Stunden, sieben Tage und vier Wochen. Dargestellt sind Mittelwert, Standardabweichung und Signifikanzen. n.s. = nicht signifikant. MW = Mittelwert, SA = Standardabweichung, TNFα = Tumornekrosefaktor alpha, Afli = Aflibercept, Beva = Bevacizumab, h = Stunden, d = Tage, w = Wochen.

Tabelle 27: TNFα-Sekretion unter Poly I:C und VEGF-Inhibitoren.

Stimulation [µg/ml]	Dauer	MW [pg/ml]	SA	Student's T-Test (gegen Kontrolle)	Student's T-Test (gegen Poly I:C)	Student's T-Test (gegen Afli)	Student's T-Test (gegen Beva)
Kontrolle	**24 h**	0	0				
Poly I:C (1)	24 h	0	0				
Poly I:C (10)	24 h	99,100	106,998	$p < 0.05$			
Poly I:C (100)	24 h	34,991	60,607	n.s.			
Afli (250)	24 h	0	0	n.s.			
Poly I:C (10) + Afli	24 h	196,367	44,590	$p < 0.001$	n.s.	$p < 0.01$	
Beva (250)	24 h	0	0	n.s.			
Poly I:C (10) + Beva	24 h	193,029	63,660	$p < 0.001$	n.s.		$p < 0.01$
Kontrolle	**7d**	0	0				
Poly I:C (1)	7d	0	0				
Poly I:C (10)	7d	40,452	67,052	n.s.			
Poly I:C (100)	7d	15,766	27,307	n.s.			
Afli (250)	7d	4,621	8,004	n.s.			
Poly I:C (10) + Afli	7d	72,950	84,192	$p < 0.07$	n.s.	n.s.	
Beva (250)	7d	5,933	10,276	n.s.			
Poly I:C (10) + Beva	7d	16,299	23,719	n.s.	n.s.		n.s.
Kontrolle	**4w**	0	0				
Poly I:C (1)	4w	10,597	18,355	n.s.			
Poly I:C (10)	4w	41,351	61,045	$p < 0.07$			
Poly I:C (100)	4w	0	0	n.s.			
Afli (250)	4w	0	0	n.s.			
Poly I:C (10) + Afli	4w	83,184	93,890	$p < 0.05$	n.s.	n.s.	
Beva (250)	4w	0	0	n.s.			
Poly I:C (10) + Beva	4w	21,272	47,565	n.s.	n.s.		n.s.

TNFα-Sekretion der primären RPE Zellen nach Poly I:C-Behandlung in Kombination mit VEGF-Inhibitoren für 24 Stunden, sieben Tage und vier Wochen. Dargestellt sind Mittelwert, Standardabweichung und Signifikanzen. n.s. = nicht signifikant. MW = Mittelwert, SA = Standardabweichung, Poly I:C = Polyinosin-Polycytidylsäure, Afli = Aflibercept, Beva = Bevacizumab, h = Stunden, d = Tage, w = Wochen.

Tabelle 28: TNFα-Sekretion unter LPS und VEGF-Inhibitoren.

Stimulation [µg/ml]	Dauer	MW [pg/ml]	SA	Student's T-Test (gegen Kontrolle)	Student's T-Test (gegen LPS)	Student's T-Test (gegen Afli)	Student's T-Test (gegen Beva)
Kontrolle	**24 h**	**0**	**0**				
LPS (0.1)	24 h	14,916	14,280	$p < 0.01$			
LPS (1)	24 h	404,567	651,216	n.s.			
LPS (10)	24 h	60,012	58,102	$p < 0.01$			
Afli (250)	24 h	0	0				
LPS (1) + Afli	24 h	690,621	762,960	$p < 0.05$	n.s.	n.s.	
Beva (250)	24 h	0	0				
LPS (1) + Beva	24 h	603,964	593,167	$p < 0.05$	n.s.		$p < 0.07$
Kontrolle	**7d**	**0**	**0**				
LPS (0.1)	7d	2,742	4,749	n.s.			
LPS (1)	7d	34,737	82,604	n.s.			
LPS (10)	7d	1,295	2,242	n.s.			
Afli (250)	7d	4,621	8,004	n.s.			
LPS (1) + Afli	7d	17,175	29,748	n.s.	n.s.	n.s.	
Beva (250)	7d	5,933	10,276	n.s.			
LPS (1) + Beva	7d	0	0	n.s.	n.s.		n.s.
Kontrolle	**4w**	**0**	**0**				
LPS (0.1)	4w	0	0	n.s.			
LPS (1)	4w	0	0	n.s.			
LPS (10)	4w	0	0	n.s.			
Afli (250)	4w	0	0	n.s.			
LPS (1) + Afli	4w	0	0	n.s.	n.s.	n.s.	
Beva (250)	4w	0	0	n.s.			
LPS (1) + Beva	4w	0	0	n.s.	n.s.		n.s.

TNFα-Sekretion der primären RPE Zellen nach LPS-Behandlung in Kombination mit VEGF-Inhibitoren für 24 Stunden, sieben Tage und vier Wochen. Dargestellt sind Mittelwert, Standardabweichung und Signifikanzen. n.s. = nicht signifikant. MW = Mittelwert, SA = Standardabweichung, LPS = Lipopolysaccharid, Afli = Aflibercept, Beva = Bevacizumab, h = Stunden, d = Tage, w = Wochen.

VIII Publikationen

PUBLIKATION

Klettner A, Brinkmann A, **Winkelmann K**, Käckenmeister T, Hildebrandt J, Roider J (2020): Effect of long-term inflammation on viability and function of RPE cells.

Experimental eye research vol. 200, Article number: 108214

VORTRAG

Klettner A, **Winkelmann K**, Brinkmann A, Käckenmeister T, Roider J (2019): Effect of long-term inflammation on viability and function of RPE cells

Age-Related Macular Degeneration VII. International DOG-Symposium on AMD - Understanding Pathogenetic Mechanisms of Disease. 20.-21. September 2019, Baden-Baden

IX Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei meiner Doktormutter **Prof. Dr. Alexa Klettner** für ihr Vertrauen bei der Überlassung dieses Themas und ihre hervorragende, beständige und freundliche wissenschaftliche Betreuung.

Herrn **Prof. Johann Roider** danke ich für die Möglichkeit meine Dissertation an der Klinik für Ophthalmologie anfertigen zu können.

Besonders danken möchte ich **Andrea Hethke** für ihre fachkompetente Einarbeitung in die Laborwelt. Von ihrer gewissenhaften Arbeitsweise durfte ich viel lernen und sie war mir eine große Hilfe. Durch Ihre angenehme Art und vielseitige Unterstützung hat die Arbeit im Labor mir viel Freude bereitet. Ich danke den weiteren Labormitarbeitern **Monika Marquard** und **Serap Luick** für die Zusammenarbeit sowie **Kathinka-Gesine Winter** für ihre praktische Unterstützung.

Außerdem danke ich der gesamten **AG Klettner** für den wissenschaftlichen Austausch.

Großer Dank gilt **meinen Eltern,** die mir das Medizinstudium ermöglicht und mich immer unterstützt haben. Als hingebungsvolle Ärztin hat meine Mutter **Dr. med. Christiane Holtz** die Faszination für Medizin in mir geweckt, mich auf dem Weg dorthin motiviert und ist mir weiterhin ein Vorbild. Das besondere praktische Geschick und die Verwaltungsgabe meines Vaters **Jan-Bernd Holtz**, welche er mir schon in frühen Jahren beigebracht hat, waren mir eine große Hilfe, die Präparationen der RPE Zellen sorgfältig durchzuführen und diese Arbeit strukturiert und gewissenhaft anzufertigen.

Meinem besten Freund **Dr. med. Carsten Haasis** möchte ich danken, dass er mit mir gemeinsam dieses Studium gemeistert hat und mir so ein treuer Freund ist.

Zum Schluss möchte ich von Herzen meinem Ehemann **Ruben Winkelmann** für seine geduldige und liebevolle Unterstützung danken. Vielen Dank für jede gemeinsame Labor- und Schreibpause und jede Ermutigung in dieser Zeit.

X Erklärung

Hiermit versichere ich, Katrin Josefine Winkelmann, geb. Holtz, geboren am 15.11.1993 in Haltern, dass die vorliegende Dissertation nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist. Diese Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden. Ich habe keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet und die Arbeit selbstständig angefertigt. Ich erkläre hiermit, dass ich bis zum heutigen Tage weder an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel noch an einer anderen Hochschule ein Promotionsverfahren endgültig nicht bestanden habe oder mich in einem entsprechenden Verfahren befinde oder befunden habe. Die Arbeit hat weder ganz noch in Teilen einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen. Die eingereichte schriftliche Fassung der Arbeit entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium.

Augsburg, den

Katrin Josefine Winkelmann