

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 - Einfluss auf Funktionen des retinalen Pigmentepithels**

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

vorgelegt von

**Anna Sophie Brinkmann**

aus Zeven

Kiel 2022

1. Berichtstatterin:

Prof. Dr. Alexa Karina Klettner

2. Berichtstatterin:

PD Dr. Vicki Wätzig

Tag der mündlichen Prüfung: 31.05.2023

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 06.03.2023

Gezeichnet: Prof. Dr. Alexa Karina Klettner

(Vorsitzende der Prüfungskommission)

## **Meinen Eltern**

# INHALTSVERZEICHNIS

---

	Seite
<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>I</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>III</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>III</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>IV</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Aufbau des Augapfels .....	1
1.1.1 Die Retina .....	1
1.2 Funktionen des Photorezeptor/RPE/Bruch-Membran/Choroidea-Komplexes .....	2
1.2.1 Die Choroidea .....	3
1.2.2 Die Bruch-Membran .....	3
1.2.3 Das Retinale Pigmentepithel (RPE) .....	3
1.3 Die altersabhängige Makuladegeneration (AMD) .....	7
1.3.1 Stadien der AMD .....	8
1.3.2 Pathogenese der AMD .....	8
1.3.3 Therapie der feuchten AMD .....	14
1.3.4 Geografische Atrophie nach Langzeitbehandlung mit VEGF-Inhibitoren .....	16
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit .....	16
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>18</b>
2.1 Material .....	18
2.1.1 Antikörper .....	18
2.1.2 Chemikalien .....	18
2.1.3 Geräte und Verbrauchsgegenstände .....	19
2.1.4 Sonstige Materialien .....	20
2.1.5 Zusammensetzung von Puffern und Lösungen .....	21
2.1.6 Verwendete Software .....	22
2.2 Methoden .....	22
2.2.1 Zellkultur .....	22
2.2.2 Präparation von primären RPE Zellen aus Schweineaugen .....	22
2.2.3 Versuchsaufbau und Stimulation .....	23
2.2.4 Gewinnung der Überstände .....	23
2.2.5 TGF- $\beta$ 1 ELISA .....	23

2.2.6	Phagozytoseassay.....	24
2.2.7	In-vitro Wundheilung .....	26
2.2.8	RPE65 Expression im Western Blot .....	27
2.2.9	Statistik.....	29
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>30</b>
3.1	TGF- $\beta$ 1 Sekretion.....	30
3.2	Phagozytose von Photorezeptoraußensegmenten.....	31
3.3	Wundheilung.....	34
3.4	Expression von RPE65.....	42
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>46</b>
4.1	Diskussion der Methoden .....	47
4.1.1	Die Zellkultur .....	48
4.1.2	Die Stimulation mit VEGF-Inhibitoren und Entzündungsmediatoren .....	49
4.2	Diskussion der Ergebnisse .....	50
4.2.1	TGF- $\beta$ 1 Sekretion.....	50
4.2.2	Phagozytose von Photorezeptoraußensegmenten.....	51
4.2.3	Wundheilung .....	54
4.2.4	RPE65 Expression .....	56
4.3	Fazit .....	58
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>61</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>Publikationen .....</b>	<b>72</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>73</b>
<b>9</b>	<b>Erklärung zum selbständigen Verfassen der Arbeit.....</b>	<b>74</b>

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

---

Abbildung 1: Funktionen des RPE.....	7
Abbildung 2: TGF- $\beta$ 1 Sekretion unter Entzündungsmediatoren und VEGF-Inhibitoren .....	30
Abbildung 3: Phagozytose unter Anti-VEGF Therapie.....	31
Abbildung 4: Phagozytose unter Entzündungsmediatoren.....	32
Abbildung 5: Phagozytose unter Entzündungsmediatoren in Kombination mit Aflibercept.....	33
Abbildung 6: Phagozytose unter Entzündungsmediatoren in Kombination mit Bevacizumab .....	34
Abbildung 7: Wundheilung unter dem Einfluss von VEGF-Inhibitoren .....	35
Abbildung 8: Wundheilung unter dem Einfluss von LPS .....	36
Abbildung 9: Wundheilung unter dem Einfluss von Poly I:C.....	36
Abbildung 10: Wundheilung unter dem Einfluss von TNF $\alpha$ .....	37
Abbildung 11: Wundheilung unter dem Einfluss von Aflibercept in Kombination mit LPS .....	38
Abbildung 12: Wundheilung unter dem Einfluss von Aflibercept in Kombination mit Poly I:C. ....	38
Abbildung 13: Wundheilung unter dem Einfluss von Aflibercept in Kombination mit TNF $\alpha$ .....	39
Abbildung 14: Wundheilung unter dem Einfluss von Bevacizumab in Kombination mit LPS .....	40
Abbildung 15: Wundheilung unter dem Einfluss von Bevacizumab in Kombination mit Poly I:C.....	40
Abbildung 16: Wundheilung unter dem Einfluss von Bevacizumab in Kombination mit TNF $\alpha$ .....	41
Abbildung 17: RPE65 Expression unter VEGF-Inhibitoren .....	42
Abbildung 18: RPE65 Expression unter LPS und VEGF-Inhibitoren.....	43
Abbildung 19: RPE65 Expression unter Poly I:C und VEGF-Inhibitoren .....	44
Abbildung 20: RPE65 Expression unter TNF $\alpha$ und VEGF-Inhibitoren.....	45

## TABELLENVERZEICHNIS

---

Tabelle 1: verwendete Antikörper .....	18
Tabelle 2: verwendete Chemikalien.....	18
Tabelle 3: verwendete Geräte und Verbrauchsgegenstände .....	19
Tabelle 4: sonstige verwendete Materialien.....	20
Tabelle 5: verwendete Puffer und Lösungen .....	21
Tabelle 6: verwendete Software .....	22
Tabelle 7: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für die SDS-PAGE.....	28

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

Abb.	Abbildung
Afli	Aflibercept
AGE	<i>Advanced Glycation Endproducts</i>
AMD	altersabhängige Makuladegeneration
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ARPE-19	<i>Adult Retinal Pigment Epithelial Cell Line-19</i>
Beva	Bevacizumab
bFGF	<i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>
BLamD	<i>Basal Laminar Deposit</i>
BLinD	<i>Basal Linear Deposit</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
CATT	<i>Comparison of Age-related Macular Degeneration Treatment Trails</i>
cm	Zentimeter
CNV	Choroideale Neovaskularisation
d	<i>days</i> , Tage
DAMP	<i>damage</i> -assoziierte Molekulare Muster
DAPI	Fluoromount-G™ mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure
ECL	<i>enhanced Chemiluminescent</i>
EDTA	Ethylendinitriltetraessigsäure
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
et al.	<i>et alii</i> , und andere
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
h	<i>hours</i> , Stunden

HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl) -1-piperatiny] -ethansulfonat
HRP	<i>horseradish Peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
Il	Interleukin
inkl.	inklusive
IVAN	<i>Inhibition of VEGF in Age-related choroidal Neovascularisation</i>
kDA	Kilodalton
Ko	Kontrolle
LPS	Lipopolysaccharide
M	Mol
mA	Milliampere
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNA	<i>messenger Ribonuclein Acid</i> , Boten-Ribonukleinsäure
N	Normalität
NaCl	Natriumchlorid
nAMD	neovaskuläre altersabhängige Makuladegeneration
NEA	Nicht essenzielle Aminosäuren
NF-κB	<i>Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B Cells</i>
nm	Nanometer
NP-40	Nonidet® P40 Substitute
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	Pathogen-assoziierte Molekulare Muster
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PEDF	<i>Pigment Epithelium-Derived Factor</i>
PFA	Paraformaldehyd
pg	Pikogramm
Poly I:C	Polyinosinsäure:Polycytidylsäure

PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAGE	Rezeptor für <i>Advanced Glycation Endproducts</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> , Reaktive Sauerstoffspezies
RPE	Retinales Pigmentepithel
RPE65	RPE-spezifisches Protein 65-kDA
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
s.u.	siehe unten
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Natriumchloridlösung
TBST	Tris-Tween gepufferte Natriumchloridlösung
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- $\beta$	<i>Transforming Growth Factor beta</i>
TLR	<i>Toll-Like-Rezeptor</i>
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
U/Minute	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
vgl.	vergleiche
w	<i>weeks</i> , Wochen
z.B.	zum Beispiel
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer

# 1 EINLEITUNG

---

## 1.1 Aufbau des Augapfels

Der größte Teil der Sinneseindrücke wird mit den Augen wahrgenommen. Der Augapfel besteht am hinteren Augenpol aus der außen liegenden Lederhaut (Sklera), der Aderhaut (Choroidea) und der innen liegenden Netzhaut (Retina). Die Sklera schafft eine stabile, schützende Form und ist Ansatzpunkt für die äußeren Augenmuskeln. Aus dem Kapillarnetz der Choroidea (Choriokapillaris) werden die äußeren Schichten der Retina versorgt. Die Basallamina der Choriokapillaris bildet wiederum die äußerste Schicht der Bruch-Membran, die 2 - 4 µm dick ist und aus Extrazellulärmatrix besteht. Die weiteren Schichten dieser Membran sind die äußere Kollagenschicht, elastische Fasern, die innere Kollagenschicht und die Basallamina des Retinalen Pigmentepithels (RPE) (Lüllmann-Rauch und Paulsen 2012; Schünke et al. 2012).

### 1.1.1 Die Retina

Das RPE ist der pigmentierte Teil der Retina (Stratum pigmentosum) und bildet die äußerste Schicht der Retina. Nach innen folgt das Stratum nervosum aus den Rezeptorzellen, Interneuronen und Ganglienzellen. Histologisch sind einzelne Bestandteile der drei Neuronen auf gleicher Höhe erkennbar und bilden folgende zehn Schichten: auf das RPE folgen die Fortsätze der Photorezeptoren, die äußere Grenzschicht, die äußere Körnerschicht (Zellkerne der Photorezeptoren), die äußere plexiforme Schicht, die innere Körnerschicht (Zellkerne der bipolaren Zellen), die innere plexiforme Schicht, die Zellkerne der Ganglienzellen, die Nervenfaserschicht und die innere Grenzschicht (Lüllmann-Rauch und Paulsen 2012; Schünke et al. 2012).

Das RPE liegt als einschichtiges, kubisches Epithel auf der Bruch-Membran (Lüllmann-Rauch und Paulsen 2012). Es hat einen hochgradig polarisierten Aufbau und übernimmt unterschiedliche Aufgaben je nachdem, ob es basal mit der Choroidea oder apikal mit der Neuroretina interagiert (Marmorstein 2001). Am apikalen Pol der Zellen befindet sich eine Vielzahl an Mikrovilli und Mikroplicae, die sich fingerartig um die Außensegmente der Photorezeptoren stülpen und eine große Fläche zum Stoffaustausch schaffen (Lüllmann-Rauch und Paulsen 2012; Schünke et al. 2012). Die Photorezeptoren sind die Sinneszellen, die als spezialisierte Neuronen, Lichtreize in Rezeptorpotenziale umwandeln können. Aus diesem Signal wird durch die neuronale Verschaltung das Sehen generiert (Bhutto und Lutty 2012). Es gibt zwei unterschiedliche Typen von Photorezeptoren, die sich in ihrer Funktion und Lokalisation in der Retina unterscheiden. Zum einen Stäbchen, die sehr

lichtempfindlich sind, so dass geringste Helligkeitsunterschiede wahrgenommen werden können (skotopisches Sehen, Dämmerungssehen). Zum anderen Zapfen, die dem Farb- und Helligkeitssehen dienen und weniger lichtempfindlich (Tageslicht, photopisches Sehen) und mit einer hohen räumlichen Auflösung verschaltet sind, weshalb sie überwiegend in der Fovea (s.u.) lokalisiert sind (Lüllmann-Rauch und Paulsen 2012; Schünke et al. 2012). Die Photorezeptoren bestehen aus einem kurzen axonalen Fortsatz, dem Perikaryon und einem lichtempfindlichen Fortsatz. Dieser besteht aus einem Außensegment, das das Sehpigment Rhodopsin (aus Opsin und Retinal) in eine Biomembran eingelagert enthält. In den Stäbchen liegt es in intrazellulären Membranscheiben als Stapel und in den Zapfen in Einfaltungen der Plasmamembran vor. Über ein kleines Zilium ist das Außensegment mit dem Innensegment verbunden, welches das metabolische Zentrum der Photorezeptoren ist (Bhutto und Luty 2012; Lüllmann-Rauch und Paulsen 2012). Die Blutversorgung der Retina erfolgt sowohl von innen aus der Zentralarterie (Ateria centralis retinae), die über den Sehnerv in das Auge eintritt und die innere Retinaschichten bis zu der inneren Körnerschicht versorgt, als auch von außen über Diffusion aus der Choriokapillaris, die die äußeren Schichten inklusive der Photorezeptoren versorgt (Lüllmann-Rauch und Paulsen 2012).

Bei dem Blick auf den Augenhintergrund fallen neben den Gefäßen die Papille als Austrittspunkt des Sehnervs auf sowie, etwa 4 mm temporal davon liegend, die Macula lutea („gelber Fleck“) (Lüllmann-Rauch und Paulsen 2012). Die Makula hat eine hohe interindividuelle Variabilität. Sie misst im Durchschnitt etwa 3 mm und ist direkt in der optischen Achse des Auges (Marshall 1987). In einer trichterförmigen Vertiefung befindet sich der Punkt des schärfsten Sehens, die Fovea centralis (1,5 mm). Die inneren Schichten der Retina sind in diesem Bereich an den Rand verlagert, was den Einfall von Streulicht vermindert. Zudem sind die Photorezeptoren 1:1 mit den Ganglienzellen verschaltet, was eine sehr hohe Auflösung ermöglicht (Lüllmann-Rauch und Paulsen 2012).

Pathologische Veränderungen in diesem Bereich, wie bei der altersabhängigen Makuladegeneration (siehe Kapitel 1.3.2.) können daher schnell zu einer massiven Verschlechterung des Sehens führen.

## 1.2 Funktionen des Photorezeptor/RPE/Bruch-Membran/Choroidea-Komplexes

Jeder Bestandteil des Augenhintergrundes, bestehend aus Photorezeptor, RPE, Bruch-Membran und Choriokapillaris, übernimmt wichtige Funktionen, um die hochaktiven Photorezeptoren zu versorgen und so die Sehfunktion aufrecht zu halten (Chirco et al. 2017).

### 1.2.1 Die Choroidea

Die Choroidea dient der Bereitstellung von Sauerstoff und Nährstoffen aus dem Blut und fungiert als Kühlelement. Der Großteil des retinalen Sauerstoffbedarfs wird aus der Choriokapillaris gedeckt. Nur zehn Prozent stammen aus den retinalen Gefäßen. Im Bereich der Fovea sind zugunsten einer besonders hohen Auflösung keine retinalen Gefäße und die Versorgung erfolgt ausschließlich über die Diffusion aus der Choriokapillaris. Damit die hochaktiven Photorezeptoren ausreichend Sauerstoff erhalten, muss der Sauerstoffgradient über das RPE entsprechend hochgehalten werden. Dies erfolgt über einen hohen Blutfluss, der zehnmal so hoch ist, wie im Gehirn (Nickla und Wallman 2010). Zudem ermöglicht der hohe Blutfluss eine Thermoregulation, die die Retina vor Schäden durch extreme Kälte oder Wärme schützt. Über das fenestrierte Endothel gelangen Glucose sowie Aminosäuren in das extrazelluläre Gewebe. Eine weitere Funktion der Choroidea ist die Sekretion von Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) und *Transforming Growth Factor  $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) (Nickla und Wallman 2010).

### 1.2.2 Die Bruch-Membran

Die Bruch-Membran ist ein molekulares Sieb aus einer elastin- und kollagenreichen Extrazellulärmatrix und bildet eine physikalische und biochemische Grenze für alle physiologischen und pathologischen Prozesse. Sie reguliert die Diffusion zwischen Choroidea und RPE, bietet eine Adhäsionsfläche für das RPE, unterstützt die Wundheilung und beschränkt als Teil der Blut-Retina-Schranke die Migration von Immunzellen (Bhutto und Lutty 2012). Zudem verfügt die Membran über einen Speicher von anti-angiogenetischen Faktoren (Chirco et al. 2017).

### 1.2.3 Das Retinale Pigmentepithel (RPE)

Das RPE hat eine maßgebende Rolle in der Aufrechterhaltung der Sehfunktion. Es bildet die Grenzschicht und den Vermittler zwischen der Aderhaut und der Retina. Eine normale Funktion des RPE ist damit unverzichtbar für das Sehen (Bergmann et al. 2004; Strauss 2005; Klettner 2015a; Kauppinen et al. 2016). In der vorliegenden Studie soll daher ein besonderer Fokus auf die Aufgaben des RPE gelegt werden. Ein Teil dieser Funktionen ist in Abbildung 1 dargestellt und wird im Folgenden näher erläutert.

#### 1.2.3.1 Transport

Die RPE Zellen sind untereinander durch *tight junctions* undurchlässig verbunden und schützen die Neuroretina vor schädlichen Bestandteilen oder Zellen aus dem Blut. Die *tight junctions* bilden damit

einen Teil der Blut-Retina-Schranke (siehe Kapitel 1.2.3.7.) und ermöglichen einen polarisierten Aufbau des RPE (Strauss 2005; Klettner 2015a). Überlebensnotwendige Bestandteile, wie Glucose, Fettsäuren und Aminosäuren, gelangen durch spezifische Transporter aus dem Blut zu den Photorezeptoren. In die entgegen gesetzte Richtung erfolgt der aktive Transport von Abfallprodukten wie Laktat und subretinaler Flüssigkeit durch das RPE in die Choroidea (Strauss 2005; Bhutto und Luty 2012).

#### 1.2.3.2 Phagozytose

Die Photorezeptoren sind metabolisch hochaktiv und einer hohen Lichtenergie ausgesetzt. Dies kann zu photo-oxidativen Radikalen und Schäden in Proteinen und Lipiden führen. Um dennoch die Funktion der Photorezeptoren aufrecht zu erhalten, unterliegen die Außensegmente einem fortwährenden Erneuerungsprozess (Strauss 2005). Die ältesten Anteile werden von den Photorezeptoren regelmäßig abgeworfen und vom RPE phagozytiert. Pro Tag werfen die Photorezeptoren circa zehn Prozent der Außensegmente ab (Marmorstein 2001). Dabei steht eine RPE Zelle in Kontakt mit 20-30 Außensegmenten. Im RPE werden die Metabolite abgebaut oder wichtige Substanzen wie das Sehpigment Retinal recycelt und in die Photorezeptoren zurück transportiert (Marshall 1987; Strauss 2005).

#### 1.2.3.3 Recycling des Sehpigments

Die Photorezeptoren können Licht über das photosensitive 11-*cis*-Retinal absorbieren und es in einen elektrischen Impuls umwandeln. Durch die Aktivierung mit einem Photon isomerisiert 11-*cis*-Retinal zu all-*trans*-Retinal (Strauss 2005). Ein Großteil der Enzyme für die Reisoomerisierung befinden sich im RPE (Thompson und Gal 2003). Die all-*trans*-Retinolsäure gelangt über die Phagozytose von Photorezeptoraußensegmenten oder Transportproteine in das RPE (Strauss 2005). Dort findet die Konversion an einem Enzymkomplex statt. Ein Schlüsselenzym ist dabei das RPE-spezifische Protein 65-kDA (RPE65), welches auch 11-*cis*-Retinal-Isomerase genannt wird. Seine Funktion ist für die Aufrechterhaltung des Sehzyklus unabdinglich (Redmond et al. 1998).

#### 1.2.3.4 Absorption von Licht und Schutz vor oxidativem Stress

Bei vielen physiologischen Stoffwechselprozessen wird die Bildung von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) und oxidativen Stress begünstigt. Im RPE zählen dazu der hohe Sauerstoffmetabolismus, viele ungesättigte Fettsäuren und Lipidperoxidation, das Vorhandensein von photosensitiven Molekülen (Rhodopsin und Lipofuszin), die Phagozytose von Photorezeptoraußensegmenten und die UV-Strahlung, die durch die Linse auf die Makula fokussiert wird. Wenn das physiologische Maß an ROS und oxidativen Stress überschritten wird, können Proteine, Lipide und DNA modifiziert oder

irreversibel beschädigt werden und ihre Aufgaben nicht mehr oder nur ungenügend erfüllen (Strauss 2005; Xu et al. 2009; Gallenga et al. 2014; Abokyi et al. 2020).

Das RPE verfügt deshalb über mehrere Schutzmechanismen gegen oxidativen Stress. Zum einen wird einfallendes Licht durch Pigmente gefiltert und absorbiert. Im RPE absorbiert das Pigment Melanin den größten Anteil des Lichtes und kann freie Radikale und ROS abfangen (Strauss 2005; Seagle et al. 2005). In den Photorezeptoren fungieren Lutein und Zeaxanthin als Blaufilter und schützen das Auge vor der Bildung des zelltoxischen Alterspigment Lipofuszin (siehe 1.3.2.). Des Weiteren können Antioxidantien, wie Carotinoide und Vitamin E sowie die enzymatische Superoxid-Dismutase und Katalase ROS und Superoxide abbauen. Auch die allgemeine zelluläre Eigenschaft DNA, Lipide und Proteine zu reparieren, trägt zum Schutz der Zellen und zur Aufrechterhaltung ihrer Funktion bei (Strauss 2005; Abokyi et al. 2020).

#### 1.2.3.5 Wundheilung

RPE Zellen sind in der Lage, Defekte im Zellteppich wieder zu verschließen. Kleine Defekte (kleiner als 125 µm) können durch Ausbreitung der umliegenden Zellen vollständig bedeckt werden, während größere Defekte eine aktive Migration und Proliferation von peripher liegenden Zellen benötigen (Del Priore et al. 2002; Sugino et al. 2003).

#### 1.2.3.6 Sekretion von Wachstumsfaktoren

Das RPE ist in der Lage neben einer direkten Interaktion über Oberflächenproteine und Rezeptoren eine Vielzahl an Wachstumsfaktoren zu sezernieren. Diese sorgen für eine stabile Integrität der Retina und eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen (Strauss 2005). Durch den polarisierten Aufbau des RPE gibt es Unterschiede zwischen der apikalen und basalen Sekretion. Beispielsweise wird der *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) überwiegend basal in Richtung der Choroidea sezerniert, während der neuroprotektive, anti-angiogenetische *Pigment Epithelium-Derived Factor* (PEDF) apikal vom RPE sezerniert wird (Strauss 2005; Bhutto und Lutty 2012). Das RPE sezerniert zudem immunsuppressive Faktoren wie TGF-β, Interferon-β und Interleukin-11, um die Retina vor schädlicher, entzündlicher Aktivität zu schützen (Xu et al. 2009; Detrick und Hooks 2020).

#### 1.2.3.7 Aufrechterhaltung des Immunprivilegs

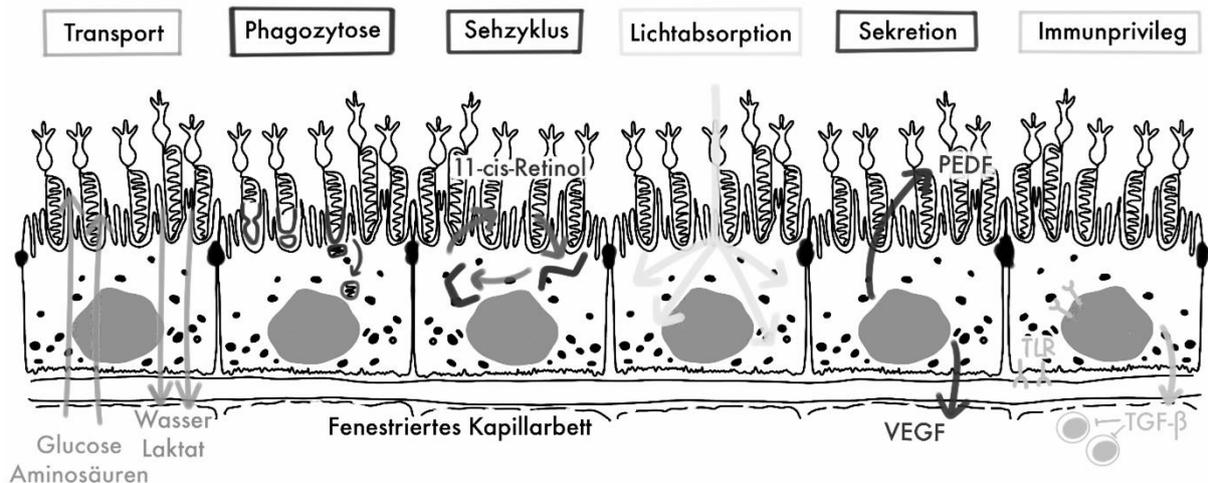
Die sensiblen Photorezeptoren sind Teil des zentralen Nervensystems und werden durch ein Immunprivileg sowohl passiv als auch aktiv vor potenziellen Schäden durch Erreger oder systemische

Entzündungsreaktion geschützt. Das RPE übernimmt in seiner Lage zwischen Körperkreislauf und Neuroretina mehrere immunregulatorische Funktionen (Klettner 2015b).

Die dichten Verbindungen (*tight junctions*) zwischen den RPE Zellen (äußere Blut-Retina-Schranke) sowie zwischen den retinalen Kapillarendothelzellen (innere Blut-Retina-Schranke) bilden die Blut-Retina-Schranke als anatomische Barriere. Sie verhindert das Eindringen von Immunzellen oder Pathogenen aus dem Blut (Klettner 2015b; Chen et al. 2019).

Das RPE reguliert sowohl die adaptive als auch die angeborene Immunantwort (Detrick und Hooks 2020). Als Teil der angeborenen Immunität exprimiert das RPE Immunsensoren, sogenannte *Pattern-Recognition-Rezeptoren* (PRR) mit denen potenziell gefährliche Moleküle detektiert werden können. Im RPE gehören dazu die NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*)-Like Rezeptoren und Toll-Like Rezeptoren (TLR). Sie erkennen *damage*-assoziierte Molekulare Muster (DAMP) wie RNA von sterbenden Zellen oder Pathogen-assoziierte Molekulare Muster (PAMP) wie Lipopolysaccharide (LPS) von gramnegativen Bakterien. Durch die Bindung von potenziell schädlichen Mustern werden Signalkaskaden mit Freisetzung von Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen ausgelöst (Kumar et al. 2004; Xu et al. 2009; Klettner 2015b; Klettner und Roider 2021). Das humane RPE exprimiert die TLR 1-7, 8 und 9 (Detrick und Hooks 2020). Deren Bedeutung im Rahmen von degenerativen Erkrankungen wird in Kapitel 1.3.2.3. vertieft. Das RPE ist Bildungs- und Sekretionsort von Zytokinen, Chemokinen, Komplementfaktoren, -regulatoren sowie Wachstumsfaktoren. Das RPE kann zudem eine Antigen-präsentierende Zelle werden und über *Major Histocompatibility Complex* (MHC) I und II - Moleküle mit Immunzellen aus dem Blut interagieren (Detrick und Hooks 2020). Dabei führt die Interaktion mit T-Zellen stets zu einer Reduktion der Immunantwort, die zum Beispiel über TGF- $\beta$  vermittelt werden kann (Klettner 2015b). Für die Regulation von Inflammation sezerniert das RPE drei immunsuppressive Zytokine: Interleukin-11, Interferon- $\beta$  und TGF- $\beta$  (Detrick und Hooks 2020). Hervorzuheben ist das multifunktionelle Zytokin TGF- $\beta$ , da es unter anderem Zellwachstum, Immunreaktionen, Differenzierung und die Synthese von Extrazellulärmatrix reguliert. Um das Immunprivileg der Retina zu erhalten, kann über TGF- $\beta$  die Aktivierung und Migration von T-Zellen gehemmt und die Differenzierung zu regulatorischen T-Zellen gefördert werden (Klettner 2015b; Detrick und Hooks 2020). Auch die spezialisierten, im Gehirn und dem Auge ansässigen Makrophagen, die Mikroglia, werden durch TGF- $\beta$  im ruhenden Zustand gehalten. Eine Aktivierung der Mikroglia führt zu einer schnellen Immunantwort mit Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen, Migration in den subretinalen Raum und einer hohen Phagozytoserate, die Gewebsschäden hinterlassen können (Klettner 2015b).

Damit hat das RPE eine Vielzahl an Möglichkeiten, um das Gleichgewicht zwischen notwendiger Inflammation durch Pathogene oder Gewebsverletzung und Immunsuppression zum Schutz der Neuroretina zu erhalten. Kommt es zum Beispiel durch Alterung oder degenerative Prozesse zu einem Funktionsverlust des RPE, kann diese fein abgestimmte Homöostase nicht aufrecht erhalten werden und es kommt zu Schäden des gesamten Photorezeptor/RPE/Bruch-Membran/Choroidea-Komplexes (Strauss 2005; Detrick und Hooks 2010). Eine besonders relevante Erkrankung in diesem Zusammenhang ist die altersabhängige Makuladegeneration (AMD).



**Abbildung 1: Funktionen des RPE.** Dargestellt sind einige wichtige Funktionen des RPE. VEGF = Vascular Endothelial Growth Factor, PEDF = Pigment Epithelium-Derived Factor, TGF- $\beta$  = Transforming Growth Factor  $\beta$ , TLR = Toll-Like-Rezeptor (modifiziert nach Strauss, 2005)

### 1.3 Die altersabhängige Makuladegeneration (AMD)

Die altersabhängige Makuladegeneration (AMD) ist eine häufige, degenerative und komplexe Erkrankung, die mit dem Verlust des zentralen Sehens einhergeht (Klettner 2015a). Sie stellt in Anbetracht des demographischen Wandels eine immer größer werdende Herausforderung für die persönliche und globale Gesundheit dar. Weltweit ist die AMD die dritthäufigste Ursache für eine moderate bis schwerwiegende Beeinträchtigung des Sehens und der vierthäufigste Grund für Erblindung (Jonas et al. 2017). In der populationsbasierten Kohortenstudie, der Gutenberg Gesundheitsstudie, ist die AMD mit 21 % die häufigste (Teil-) Ursache für Sehbeeinträchtigung oder Blindheit in Deutschland (Wolfram et al. 2019). Hochrechnungen für 2050 rechnen mit 1,6 Millionen Personen mit fortgeschrittener Makuladegeneration in der deutschen Bevölkerung (Schrader 2006). Dabei gibt es erhebliche Unterschiede zwischen den Altersgruppen. Ab dem 50. Lebensjahr zeigt sich ein exponentieller Anstieg der Prävalenz (Schrader 2006). In einer Regensburger Studie stieg die Prävalenz für eine fortgeschrittene AMD von 2 % für 70- bis 74-Jährige auf 19 % für über 90-Jährige (Brandl et al. 2018).

### 1.3.1 Stadien der AMD

Die AMD lässt sich in drei Stadien einteilen. In der Frühform und intermediären Form treten keine oder nur moderate Symptome auf. Ein Kennzeichen der Erkrankung ist das Auftreten von Drusen, subzellulären Ansammlungen von Lipiden, Glykokonjugaten und (entzündungsfördernden) Proteinen (Spraul et al. 1998; Kauppinen et al. 2016; Chirco et al. 2017). Im natürlichen Krankheitsverlauf nimmt die zentrale Sehschärfe progredient ab. Dadurch werden alltägliche Aufgaben wie Lesen und das Erkennen von Gesichtern oder Zahlen zunehmend schwerer und die Einschränkung kann bis zur Erblindung voranschreiten (Bhutto und Luty 2012). Bei den visusbedrohenden Spätformen wird zwischen einer trockenen/atrophen und einer feuchten/exsudativen Form unterschieden.

Bei der trockenen Form zeigen sich in der Augenhintergrundspiegelung, der Fundoskopie, atrophe Areale, die in eine geographische Atrophie mit einem flächigen Zellverlust von Photorezeptoren und RPE resultieren können. In den meisten Fällen bleibt die Fovea zunächst von der Degeneration verschont und der Progress schreitet langsam voran. Im Verlauf kann es jedoch zu einem Übergang von der trockenen in die feuchte Form kommen (Bhutto und Luty 2012). Die feuchte Form, auch neovaskuläre AMD (nAMD) genannt, betrifft etwa 10 - 15 % der Patienten. Sie ist charakterisiert durch das Einsprossen von unreifen und undichten Gefäßen aus der Choroidea in den subretinalen Raum. Daraus können Ödeme, Pigmentepithelabhebungen und Einblutungen mit Gewebsverlust resultieren. Dadurch ist insbesondere die feuchte AMD häufig ursächlich für einen rasch fortschreitenden zentralen Visusverlust. Unbehandelt kommt es zu einer Größenzunahme des Defektes und Narbenbildung, die mit einer fortschreitenden Sehverschlechterung einhergehen (Bhutto und Luty 2012; Klettner 2015a).

Um diese Erkrankung und ihre Therapie besser zu verstehen, werden im Folgenden relevante Ereignisse der multifaktoriellen und noch nicht vollständig geklärten Pathogenese erklärt und auf Wirkung und Nebenwirkungen der Therapie der feuchten Spätform eingegangen.

### 1.3.2 Pathogenese der AMD

Die Pathogenese der AMD ist ein heterogenes, multifaktorielles Geschehen und noch nicht vollständig geklärt. In Anbetracht der Risikofaktoren spielen Alterung, erhöhter oxidativer Stress durch Rauchen und genetische Prädisposition eine wichtige Rolle (Dietzel et al. 2010; Abokyi et al. 2020). Ein Genpolymorphismus für den Komplementfaktor H, der normalerweise für einen kontrollierten Ablauf von Entzündungen sorgt, ist mit einem gesteigerten Risiko an AMD zu erkranken assoziiert. Vor allem

durch weitere Gen-Gen- oder Gen-Umweltinteraktionen wird das Risiko weiter erhöht (Dietzel et al. 2010). Als weitere Risikofaktoren werden erhöhte Sonnenlichtexposition und kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Hypertonus und ein erhöhter Body-Mass-Index diskutiert (Dietzel et al. 2010).

Im Folgenden werden einzelne Aspekte der Pathogenese näher erläutert, die sich gegenseitig beeinflussen und so ein schädliches Milieu aufrechterhalten. Es kommt zu (1) Ablagerungen und einen verminderten Transport durch die Bruch-Membran, Schäden durch (2) gesteigerten oxidativen Stress und (3) Entzündungsreaktionen sowie zur (4) Atrophie oder Ausbildung von pathologischen Gefäßen.

#### 1.3.2.1 Ablagerungen und verminderter Transport durch die Bruch-Membran

Sowohl im Alterungsprozess als auch bei der AMD kommt es zu einer heterogenen, diffusen Verdickung der Bruch-Membran durch Ablagerungen von Lipiden, Alterationen der Extrazellulärmatrix sowie Akkumulation von Abbauprodukten (Bhutto und Lutty 2012). Je nach Lokalisation und Bestandteilen wird zwischen *Basal Lamina Deposit* (BLamD), *Basal Linear Deposit* (BLinD) und Drusen unterschieden.

BLamD befinden sich in der Matrix zwischen dem RPE und dessen Basallamina. Schon 1998 fanden Spraul et al. in ihrer histologischen Studie, dass die Menge und Dicke der BLamD am stärksten mit der AMD assoziiert ist (Spraul et al. 1998). Bei alten Spenderaugen ohne AMD sind BLamD dünn und fleckenförmig verteilt, während sie bei Patienten mit AMD deutlich häufiger und dicker sind (Sura et al. 2020). Zwischen dem RPE und der inneren kollagenen Schicht akkumulieren hydrophobe, membranöse Anteile als kontinuierliche BLinD oder kuppelförmigen Drusen. In der Funduskopie erscheinen Drusen als gelblich-weiße Läsionen und sind ein frühes diagnostisches Merkmal der AMD. Es wird zwischen harten und weichen Drusen unterschieden (Chirco et al. 2017). Einen Zusammenhang mit der Pathogenese scheinen dabei vor allem weiche, konfluierende und große Drusen zu haben, da diese bei AMD-Patienten signifikant häufiger detektierbar sind, als bei einer gleichaltrigen Kontrollgruppe (Spraul et al. 1998). Drusen enthalten neben Lipiden und Lipoproteinen auch Zellreste aus dem RPE, Nebenprodukte durch Oxidation und Glykosylierung und eine Vielzahl von entzündungsbedingten Faktoren, beispielsweise Komplementfaktoren, Immunglobuline und Akut-Phase-Proteine. Daher scheinen oxidativer Stress, gestörte Autophagie mit inadäquater Degradierung von Zellresten und eine chronische, niedrigschwellige Entzündung mit Komplementaktivierung eine wichtige Rolle bei der Bildung von Drusen zu spielen (Kauppinen et al. 2016; Abokyi et al. 2020). Die hydrophoben Ablagerungen bilden eine Barriere für Flüssigkeit, Nährstoffe, Sauerstoff und den Abtransport von toxischen Metaboliten (Strauss 2005). Zudem kommt es mit zunehmendem Alter zu einer Ausdünnung der Choriokapillaris mit einer Reduktion der Kapillarlumen (Nickla und Wallman

2010; Chirco et al. 2017). Letztendlich resultieren aus der Diffusionsbarriere und dem verminderten Blutfluss eine lokale Unterversorgung bis hin zum Zelluntergang von RPE und Photorezeptoren. Im Alterungsprozess kommt es ohnehin zu einer Abnahme von RPE Zellen sowie morphologischen und funktionellen Veränderungen. Die übrig gebliebenen Zellen vergrößern sich und werden zum Teil bi- oder multinukleär. Wichtige Funktionen wie Phagozytose und Lysosomenaktivität werden bei einer gleichzeitig steigenden Anzahl an Stoffwechselendprodukten herabgesetzt (Chen et al. 2019).

### 1.3.2.2 Zunahme von oxidativem Stress

Als Zeichen einer unvollständigen Degradierung und Verdauung von phagozytiertem Material entstehen Lipofuszin-Granula. Im Auge ist dies insbesondere durch den hohen Umsatz von Photorezeptoraußensegmenten bedingt. Lipofuszin ist als gelb-braunes Lipopigment im RPE erkennbar und steigt signifikant mit zunehmendem Alter. Dabei verteilt es sich in der gesamten Zelle (Wing et al. 1978). Die Lipofuszin-Granula sind Residualkörper, die aufgrund von unverdaulichen Materialien ihre lysosomale Enzymaktivität eingestellt haben. Sie enthalten heterogene, unlösliche Komplexe aus Lipiden und Proteinen (Lüllmann-Rauch und Paulsen 2012). In hoher Konzentration wirkt Lipofuszin toxisch und induziert Apoptose. Es generiert reaktive Sauerstoffradikale, hemmt die Phagozytose und scheint damit ein schädliches Milieu aufrecht zu erhalten (Bhutto und Luty 2012; Abokyi et al. 2020).

Während der Lipofuszinanteil steigt, kommt es zu einer altersabhängigen Abnahme von Melanin und schützenden Antioxidantien. Das Gleichgewicht zwischen oxidativen Schäden und Schutz- bzw. Reparaturmechanismen verschiebt sich zugunsten einer weiteren Zunahme des oxidativen Stresses. Ein zelluläres Äquivalent für oxidativen Stress scheinen *Advanced Glycation Endproducts* (AGE) zu sein (Strauss 2005). AGE entstehen irreversibel aus nicht-enzymatisch glykosylierten Lipiden oder Proteinen, die wiederum andere Moleküle modifizieren und zu Akkumulationen in Lysosomen führen können (Klettner et al. 2013a; Kauppinen et al. 2016; Chirco et al. 2017). AGE haben Einfluss auf Entzündungen und Angiogenese, modifizieren Lipofuszin, hemmen die Phagozytose durch eine beeinträchtigte Fusion mit Lysosomen und induzieren VEGF (Lu et al. 1998; Xu et al. 2009; Klettner et al. 2013a; Kauppinen et al. 2016; Chirco et al. 2017; Puddu et al. 2012). Mit zunehmenden Alter steigt die Menge an Rezeptor für AGE (RAGE) am RPE, der Neuroretina und den retinalen Gefäßen (Xu et al. 2009). RAGE werden zudem durch sterbende Zellen oder verletztes Gewebe aktiviert. Über den *Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B Cells* (NF- $\kappa$ B) Signalweg wirkt diese Aktivierung proinflammatorisch (Kauppinen et al. 2016).

### 1.3.2.3 Inflammation

Inflammation ist eine wichtige Schnittstelle in der Pathogenese der AMD. Entzündung ist dabei zunächst ein gewebeerhaltender, zellulärer Schutzmechanismus, der fremdes oder beschädigtes Material erkennt und abräumt. Mit zunehmendem Alter kommt es gleichzeitig zu einer Abnahme der Anzahl und Funktion der Immunzellen und einer Zunahme an entzündungsfördernden Stimulatore. Folglich können potenzielle Noxen und Zellschäden nicht effizient bekämpft werden, der Stimulus bleibt erhalten und es entwickelt sich eine chronische Entzündung (Kauppinen et al. 2016).

Viele der bereits genannten Aberrationen der AMD führen zu einer proinflammatorischen Aktivierung. Dazu zählen unter anderem Lipofuszin, Druseninhalt, oxidativer Stress, AGE, Zelldegeneration und die damit verbundene Abnahme der Stoffwechselfunktionen, Apoptose und generell der Zelluntergang (Xu et al. 2009; Kauppinen et al. 2016). Die ineffiziente, niedrighwellig ablaufende Entzündung führt wiederum zu einer Zellalterung und Drusenbildung und unterhält eine fortwährende Abwärtsspirale (Klettner et al. 2013a).

Relevante Veränderungen des Immunprivilegs in der Pathogenese der AMD sind die Aktivierung von Mikroglia, Infiltration von Immunzellen in den subretinalen Raum (Mikroglia und Makrophagen) mit Störung der Blut-Retina-Schranke und eine Dysregulation des Komplementsystem (Chen et al. 2019). Zudem trägt die Aktivierung von TLR-2, TLR-3 und TLR-4 am RPE zu einer retinalen Inflammation bei. Durch die Rezeptoraktivierung wird die Aktivierung und Expression von Genen und Zytokinen induziert, die die Funktionen des RPE beeinträchtigt. Es folgen Zelldegeneration und -untergang was seinerseits wieder TLR-Liganden bereitstellt und die Induktion von Neuem startet (Klettner und Roeder 2021).

TLR-3 ist reichlich in Endosomen des RPE exprimiert und erkennt doppelsträngige RNA (dsRNA), ein Zwischenprodukt der Virusreplikation und das dsRNA-Analogon Polyinosinsäure:Polycytidylsäure (Poly I:C) (Detrick und Hooks 2010). Poly I:C induziert über eine TLR-3-Aktivierung die Expression und Sekretion von vielen proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen, Komplementfaktoren Adhäsionsmolekülen, den Hypoxie-induzierten Faktor-1 $\alpha$  und *Basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF) (Kumar et al. 2004; Klettner und Roeder 2021). VEGF wird dosisabhängig induziert (Klettner et al. 2013b). Viele Studien zeigen eine Assoziation von TLR-3 Aktivierung und Zellschäden, die zu Degeneration und Zelltod führen können (Detrick und Hooks 2020; Klettner und Roeder 2021). Interessanterweise hat die Aktivierung auch einen protektiven Effekt: unter oxidativem Stress wirkt es zytoprotektiv (Patel und Hackam 2013) und steigert die Sekretion von dem immunsuppressiven Interferon- $\beta$ , welches spezifisch für TLR-3-Aktivierung ist (Klettner 2015b; Detrick und Hooks 2020). Im Rahmen der AMD scheinen die entzündungsfördernden und destruktiven Effekte der TLR-3

Aktivierung zu überwiegen. Die Funktionsfähigkeit der retinalen Zellen in der Interaktion mit einer TLR-3 Aktivierung sollte daher weiter erforscht werden.

Der TLR-4 ist überwiegend in der Zellmembran exprimiert und wird durch Lipopolysaccharide (LPS) von gramnegativen Bakterien, Druseninhalten, aktivierten Komplementfaktoren und der Aufnahme von Photorezeptoraußensegmenten aktiviert (Zhu et al. 2015; Klettner und Roeder 2021). Die Stimulation von TLR-4 durch LPS induziert die Expression und Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen. Dies führt zu einer Zunahme von Monozyten/Mikroglia im subretinalen Raum und Zelldegeneration. Zudem wird die Barrierefunktion und damit die Integrität der Blut-Retina-Schranke des RPE gestört (Klettner und Roeder 2021). Neben der Entzündungsreaktion unterstützt der TLR-4 wichtige Funktionen im RPE. Dazu gehört die Erkennung und Phagozytose von Photorezeptoraußensegmenten (Kindzelskii et al. 2004). Eine Beeinträchtigung der Phagozytose führt zur Ansammlung von Sauerstoff-Radikalen und Lipofuszin, was die Entwicklung einer AMD begünstigt (Klettner und Roeder 2021; Chen et al. 2016). Der TLR-4 hat damit Einfluss auf Inflammation, Akkumulation, oxidativen Stress und RPE-Funktion. Der Einfluss auf die Pathogenese der AMD insbesondere in Bezug auf die Zellfunktion sollte deshalb genauer untersucht werden.

Sowohl die Aktivierung von TLR-3 (durch Poly I:C) als auch von TLR-4 (durch LPS) steigert die Sekretion von dem proinflammatorischen Zytokin Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (Terheyden et al. 2021). TNF $\alpha$  ist ein multifunktionelles Zytokin, das ein Regulator von Zellproliferation, -überleben, Differenzierung und Apoptose ist. Es wird vor allem von aktivierten monozytären Zellen, wie Makrophagen und Mikroglia gebildet (Parameswaran und Patial 2010). Bei Gewebsschäden durch Trauma, Infektion oder Exposition von LPS ist TNF $\alpha$  eines der ersten und reichlichsten Mediatoren im Gewebe. TNF $\alpha$  hat eine zentrale Rolle in der Regulation, Aktivierung und Rekrutierung von Immunzellen und der Induktion der Zytokinproduktion. Als Hauptregulator von Entzündung ist TNF $\alpha$  an der Entwicklung vieler chronisch-entzündlicher Erkrankungen wie rheumatoide Arthritis und entzündlichen Darmerkrankungen beteiligt. Bei diesen Erkrankungen werden bereits erfolgreich TNF $\alpha$ -Blocker in der Therapie eingesetzt (Parameswaran und Patial 2010). Im Gehirngewebe von Mäusen kommt es zu einem altersabhängigen Anstieg von TNF $\alpha$  (Terao et al. 2002) und erhöhte Spiegel des löslichen TNF-Rezeptor sind mit der frühen und neovaskulären AMD assoziiert (Faber et al. 2015). AMD-relevante Veränderungen wie Umgestaltung der Extrazellulärmatrix, Komplementsystemaktivierung und Angiogenese können durch TNF $\alpha$  getriggert werden (An et al. 2008). Die Angiogenese wird durch eine TNF $\alpha$ -induzierte Abnahme der Barrierefunktion mit Störung der Blut-Retina-Schranke und einer vermehrten Expression von VEGF gefördert (Grossniklaus et al. 2002; Miller et al. 2013; Touhami et al. 2018). Dadurch können Gefäße und Immunzellen in den subretinalen Raum eindringen. Zudem reduziert TNF $\alpha$  in vitro die Genexpression von wichtigen Funktionsproteinen des RPE für den Sehzyklus, Epithelmorphologie,

Melanogenese und Phagozytose (Kutty et al. 2016). Bei Begleiterkrankungen oder Therapieversagen wurde bei wenigen AMD-Patienten ein TNF $\alpha$ -Inhibitor mit erfolgsversprechenden Ergebnissen eingesetzt. Die Datenlage ist jedoch noch nicht ausreichend und bedarf weiterer Untersuchungen der Rolle von TNF $\alpha$  in der Pathogenese und Therapie der AMD (Wang et al. 2011).

#### 1.3.2.4 Choroideale Neovaskularisation (CNV)

Ebenso wie eine Entzündungsreaktion führt auch die Angiogenese zunächst zu einer Aufrechterhaltung der Gewebefunktion. Angiogenese beschreibt die Bildung von neuen Gefäßen aus bereits bestehenden Gefäßen durch Sprossen oder Spaltung (Risau 1997). Es dient der schnellen Bereitstellung von Sauerstoff, Nährstoffen und Entzündungszellen und dem Abtransport von Zellresten (Kent und Sheridan 2003). Sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen scheint Angiogenese von einer Entzündungsreaktion begleitet zu werden (Risau 1997).

Die CNV ist ein häufiger Endpunkt von chorioretinalen Erkrankungen. Die CNV ist ein dynamischer Prozess und ähnelt einer klassischen Wundheilung, bestehend aus einer inflammatorischen Initiationsphase, einer aktiven Expansion der Gefäße und schließlich einer Involution oder Reifung, die gegebenenfalls mit einem fibrotischem Umbau und einer Narbenbildung einhergeht (Grossniklaus et al. 2002; Kent und Sheridan 2003; Bhutto und Lutty 2012).

Der wichtigste proangiogenetische Wachstumsfaktor in der Entstehung von CNV ist VEGF (Strauss 2005; Klettner und Roeder 2009; Miller et al. 2013). Er führt zu Angiogenese, erhöht die Gefäßpermeabilität bei entzündlichen Veränderungen im Gewebe und schützt vor Apoptose (Ferrara et al. 2003). Mögliche Auslöser für eine vermehrte VEGF-Expression sind Hypoxie, Hyperglykämie, Entzündung, Bestandteile des Komplementsystems, inflammatorische Zytokine, Wachstumsfaktoren wie *Insulin-Like-Growth Factor-1*, TGF- $\alpha$  und - $\beta$ , *Basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF), TNF $\alpha$ , Druseninhalte wie beispielsweise AGE sowie die Aktivierung von TLR (Lu et al. 1998; Ferrara et al. 2003; Strauss 2005; Kauppinen et al. 2016; Klettner und Roeder 2021).

Gleichzeitig nehmen anti-angiogenetischen Faktoren, wie PEDF, Endostatin und Thrombospondin-1 bei der AMD ab. Das Gleichgewicht zwischen pro- und antiangiogenetischen Faktoren kippt zu Gunsten der Angiogenese (Bhutto und Lutty 2012). Es folgt eine Rekrutierung von Endothelzellen und Monozyten, die wiederum inflammatorische Zytokine und VEGF sezernieren (Grossniklaus et al. 2002). Über Spalten in der Bruch-Membran können Immunzellen und bei weiterem Voranschreiten der Erkrankung auch neue Blutgefäße in den subretinalen Raum gelangen (Marshall 1987; Sura et al. 2020). Die Spalten entstehen durch altersabhängige Kalzifizierung und Fragmentierung, die insbesondere im Bereich der Makula und bei Patienten mit exsudativer AMD stark ausgeprägt sind (Spraul et al. 1998;

Sura et al. 2020). Auch Drusen stellen eine potenzielle Invasionsstelle für CNV dar (Chirco et al. 2017). Die Gefäßinvasion, Inflammation, erhöhte VEGF-Spiegel und altersbedingte Veränderungen von RPE und Bruch-Membran führen zu einer Störung der Blut-Retina-Schranke (Miller et al. 2013; Marshall 1987; Xu et al. 2009). Als Folge der unreifen und leckenden Gefäße kann es zu Ansammlungen von Flüssigkeit und Blut in oder unter der Retina kommen. Der regelmäßige und präzise Aufbau der Retina wird gestört, was zu einer Abhebung von RPE und Photorezeptoren mit verzerrtem Sehen, so genannten Metamorphopsien führen kann (Strauss 2005). Die Gerinnung und Fibrose nach einer Blutung kann zu einer Narbe mit massivem Sehverlust führen (Miller et al. 2013).

Die herausragende Rolle von VEGF in intraokulären Erkrankungen wird durch drei Ergebnisse gezeigt: (1) VEGF ist bei komprimierter Bruch-Membran ausreichend zur Initiation von CNV (Schwesinger et al. 2001), (2) pathologische Veränderungen sind mit einer erhöhten VEGF Expression assoziiert und (3) die intraokuläre VEGF-Inhibition verbessert das Sehen von betroffenen Patienten (Miller et al. 2013).

### 1.3.3 Therapie der feuchten AMD

Der Goldstandard für die Therapie der feuchten AMD ist die wiederholte intravitreale Injektion von VEGF-Inhibitoren (Schmidt-Erfurth et al. 2014). Aktuell sind die drei Wirkstoffe Ranibizumab, Aflibercept und Brolucizumab für die Behandlung in Deutschland zugelassen (DOG, Retinologische Gesellschaft, BVA 2020). Zudem wird der rekombinante monoklonale Antikörper Bevacizumab als *off-label* Medikament eingesetzt (Chakravarthy et al. 2013). Bevacizumab wurde 2005 zur intravenösen Therapie von metastasierten kolorektalen Karzinomen zugelassen (European Medicines Agency (EMA) 2017). Es gibt bisher keine Zulassungsstudie für intravitreale Injektionen. Da Bevacizumab deutlich günstiger ist als die anderen VEGF-Inhibitoren, wird es immer wieder als Alternative diskutiert (Schmidt-Erfurth et al. 2014). Ranibizumab wurde 2007 in Europa zugelassen, ist ein rekombinantes, humanisiertes Fab-Fragment eines monoklonalen Antikörpers und bindet sowohl die löslichen als auch die membrangebundenen Isoformen von VEGF. Anders als das Antikörperfragment Ranibizumab ist das 2012 zugelassene Aflibercept ein lösliches Fusionsprotein aus Domänen der beiden VEGF-Rezeptoren und dem Fc-Fragment eines Antikörpers. Durch die Kombination der Rezeptordomänen ist die Affinität zum VEGF höher als bei den anderen VEGF-Inhibitoren und sogar höher als der native Rezeptor. Aflibercept bindet alle VEGF Isoformen und den *Placental Growth Factor* (Schmidt-Erfurth et al. 2014). Seit 2020 ist das humanisierte Einzelketten-Antikörperfragment Brolucizumab zugelassen (European Medicines Agency (EMA) 2020).

Die Medikamente unterliegen Abbauprozessen und müssen regelmäßig intravitreal injiziert werden, um den natürlichen Progress der Erkrankung zu verlangsamen. Durch die lokale Verabreichung sind

systemische Nebenwirkungen sehr selten. Einhergehend mit jeder Injektion besteht das Risiko einer intraokulären Entzündung (Endophthalmitis) (0,029 %), einer sterilen Entzündungsreaktion (0,09 - 2,9 %) oder einer Netzhautablösung (0,013 %) (Stahl 2020). Im Durchschnitt benötigen die Patienten im ersten Jahr sieben bis acht Injektionen, in den Folgejahren sinkt die Anzahl meistens. Die Kosten liegen bei den zugelassenen Medikamenten bei über 1000 € pro Injektion. Im Vergleich dazu kostet eine Injektion des *off-label* Medikaments Bevacizumab circa 40 € (Stahl 2020).

Über einen Beobachtungszeitraum von zwei Jahren zeigen alle vier Medikamente eine vergleichbare Wirksamkeit (DOG, Retinologische Gesellschaft, BVA 2020). Sicherheit, Effizienz und Langzeiteffekte wurden insbesondere von Ranibizumab in zahlreichen klinischen Studien (z.B. MARINA, ANCHOR und HORIZON, zusammengefasst in Schmidt-Erfurth et al. 2014) untersucht. In den Kohortenstudien IVAN (*Inhibition of VEGF in Age-related choroidal Neovascularisation*) in Großbritannien (Chakravarthy et al. 2013) und CATT (*Comparison of Age-related Macular Degeneration Treatment Trails*) in den USA (Martin et al. 2012) wurden Ranibizumab und Bevacizumab verglichen. Dabei zeigte sich keine Unterlegenheit für Bevacizumab. Allerdings war der Visusgewinn in der Bevacizumab-Gruppe numerisch geringer als bei der Ranibizumab-Gruppe. Das Risiko für systemische Nebenwirkungen war unter Bevacizumab signifikant häufiger als unter Ranibizumab (Martin et al. 2012; Chakravarthy et al. 2013). Generell waren die Studien aber nicht darauf ausgelegt, die Sicherheit von Bevacizumab zum intravitrealen Gebrauch abzubilden. Somit gibt es keinen Beweis für eine vergleichbare Sicherheit zu Ranibizumab (Schmidt-Erfurth et al. 2014). Aflibercept ist in Bezug auf Sicherheit und Effizienz bei ein- oder zweimonatiger Applikation vergleichbar mit Ranibizumab bei monatlicher Gabe (Heier et al. 2012).

Mehrere interventionelle Studien deklarieren, dass Aflibercept in der anatomischen Effizienz Bevacizumab und Ranibizumab überlegen sei (Schmidt-Erfurth et al. 2014). Aflibercept scheint zudem einen geringeren Einfluss auf den intraokulären Druck zu haben als Ranibizumab oder Bevacizumab (Unsal und Cubuk 2018). In dieser Studie werden Aflibercept und Bevacizumab in Hinblick auf ihren Einfluss auf die RPE-Funktion genauer untersucht, da sie durch das Vorhandensein eines Fc-Fragmentes vom RPE aufgenommen und gespeichert werden (Klettner et al. 2014b; Aboul Naga et al. 2015). In vitro hat weder Aflibercept noch Bevacizumab über einen Untersuchungszeitraum von bis zu 12 Wochen einen toxischen Effekt auf porcines RPE oder die humane ARPE-Zelllinie (*Adult Retinal Pigment Epithelial Cell Line-19*) (Borchers et al. 2021). In Bezug auf die Funktionen des RPE senken beide Medikamente die Phagozytose und Wundheilung nach kurz- bis mittelfristiger Stimulation (Klettner et al. 2010; Klettner et al. 2014b; Aboul Naga et al. 2015). Dabei ist zu beachten, dass die Versuche an gesunden Zellen durchgeführt worden. Bei dem Versuch, diese Ergebnisse in vivo zu

übertragen, sollten Wechselwirkungen mit weiteren AMD-relevanten Noxen wie Akkumulation, oxidativem Stress und vor allem Inflammation untersucht werden.

#### 1.3.4 Geografische Atrophie nach Langzeitbehandlung mit VEGF-Inhibitoren

Da die Anwendung von VEGF-Inhibitoren nicht kurativ ist, muss die Gabe über einen langen Zeitraum wiederholt werden. Sowohl die CATT als auch die IVAN-Studie legen nahe, dass VEGF-Inhibitoren einen Einfluss auf die Entwicklung einer geographischen Atrophie haben. Nach zwei Jahren zeigte sich bei 18,3 % (CATT) bzw. 30 % (IVAN) der Patienten eine geographische Atrophie. Das Risiko ist bei kontinuierlichen, monatlichen Injektionen höher als bei einer bedarfsadaptierten Gabe (Grunwald et al. 2014; Chakravarthy et al. 2013). Die Langzeitanwendung von VEGF-Inhibitoren über sieben Jahre führte bei 98 % der Patienten zu einer Atrophie im Bereich der Makula, deren Größe mit einem schlechten visuellen Ergebnis korrelierte (Rofagha et al. 2013). Es ist noch ungeklärt, ob die Atrophie als Folge der Medikamentennebenwirkung, der Injektionshäufigkeit oder als natürlicher Krankheitsverlauf der nAMD auftritt. Daraus ergibt sich ein Dilemma für ein optimales Therapieschema, da sowohl die Injektionen und Medikamente mit einer Atrophie in Verbindung gebracht werden, als auch das Unterlassen der Anti-VEGF Therapie über den natürlichen Krankheitsverlauf zu einem Sehverlust führen könnte (Sadda et al. 2020). In atrophen Arealen ist der Verlust von Photorezeptoren mit einem RPE-Verlust assoziiert (Bhutto und Lutty 2012). Da es keine Behandlung einer Atrophie gibt, ist die Aufrechterhaltung des RPE mit seinen Funktionen therapierelevant (Sadda et al. 2020).

Bevacizumab und Aflibercept werden über ihr Fc-Fragment in das RPE aufgenommen und gespeichert und könnten dadurch unerwünschte Nebenwirkungen auf das RPE haben (Klettner et al. 2014b; Aboul Naga et al. 2015; Borchers et al. 2021). Für die kurzfristige Stimulation mit Aflibercept und Bevacizumab konnte bereits ein negativer Einfluss auf Funktionen des RPE gezeigt werden (Klettner et al. 2010; Klettner et al. 2014b). Deshalb sollen in dieser Studie die Konsequenzen für das RPE nach einer langfristigen Stimulation mit VEGF-Inhibitoren untersucht werden.

### 1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Das RPE übernimmt eine Schlüsselfunktion in der Aufrechterhaltung der Sehfunktion. Insbesondere die Sekretion von Wachstumsfaktoren, Phagozytose, Recycling des Sehpigments, Wundheilung und die Aufrechterhaltung des Immunprivilegs sind dafür unabdingbar. Ein Funktionsverlust des RPE deutet auf ein höheres Risiko für Degeneration und Atrophie hin (Strauss 2005; Klettner 2015b). Inflammation und die Überexpression von VEGF spielen eine wesentliche Rolle in der Pathogenese der nAMD und

beeinflussen sich gegenseitig (Miller et al. 2013; Kauppinen et al. 2016; Chen et al. 2019). Sie sind daher beide potenzielle Ansatzpunkte für eine Therapie. Der aktuelle Goldstandard, der nur aus Anti-Angiogenese besteht, erreicht die Pathogenese der nAMD nicht vollständig. Die Therapie könnte sogar den normalen Prozess der Wundheilung und Reparatur hinauszögern (Kent und Sheridan 2003). Der anfängliche Erfolg der VEGF-Inhibitoren bringt keine Heilung und nicht alle Patienten profitieren davon (Miller et al. 2013). Insbesondere die langjährige und häufige Applikation ist mit der Entwicklung einer geografischen Atrophie mit Sehverlust assoziiert (Rofagha et al. 2013; Grunwald et al. 2014; Maguire et al. 2016). Die Prüfung auf Kausalität der VEGF-Inhibitoren für eine Atrophie erfordert ein besseres Verständnis der Wechselwirkungen der Medikamente mit dem RPE auf zellulärer Ebene.

Bisherige Studien zu den Wechselwirkungen von VEGF-Inhibitoren mit dem RPE betrachten häufig nur einen kurzen Zeitraum, der meistens 24 Stunden nicht überschreitet (siehe z.B. An et al. 2008; Klettner et al. 2013b; Zhu et al. 2015; Kutty et al. 2016). Da es sich bei der nAMD um eine chronische, unheilbare Erkrankung handelt, sollten auch in vitro Studien den Langzeitaspekt betrachten. Nur so ist ein optimales Verständnis der Pathophysiologie sowie der Therapiemöglichkeiten und -limitationen möglich.

Das Ziel dieser Arbeit ist es daher, die Funktionsfähigkeit des RPE unter proinflammatorischen Einflüssen, unter Anti-VEGF Therapie sowie unter der Kombination aus beidem zu untersuchen. Es ist damit ein Ansatz, um auf die Komplexität der Therapie und Erkrankung mit ihren Wechselwirkungen einzugehen. Dazu sollen folgende Fragen beantwortet werden:

- Beeinflussen die VEGF-Inhibitoren Aflibercept und Bevacizumab bei kurz-, mittel- oder langfristiger Gabe die Zellfunktionen des RPE? Gibt es einen signifikanten Unterschied zwischen Aflibercept und Bevacizumab?
- Hat die kurz-, mittel- oder langfristige Anwendung von TLR-Agonisten (LPS und Poly I:C) und dem Zytokin TNF $\alpha$  eine Auswirkung auf die Zellfunktionen des RPE?
- Wie wirken sich die beiden Medikamente in einem proinflammatorischen Milieu über einen kurz-, mittel- oder langfristigen Zeitraum auf die Funktionsfähigkeit des RPE aus?

Im Rahmen dieser in vitro Studie werden (1) die Sekretion von TGF- $\beta$ 1, (2) die Phagozytose, (3) die Wundheilung und (4) die Expression von RPE65, als Surrogat-Parameter für das Recycling des Sehpigments als relevante Funktionen des RPE untersucht.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

---

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Antikörper

Tabelle 1: verwendete Antikörper

Antikörper	Spezies/Kopplung	Ausgangskonzentration (Verdünnung)	Firma, Hersteller
Anti-Human-IgG	Ziege/ AlexaFlour 555	2 mg/ml (1:500)	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Anti-Kaninchen-IgG	Ziege/HRP-linked	66 µg/ml (1:2000)	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Anti-Maus-IgG	Pferd/ HRP-linked	170 µg/ml (1:2000)	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Anti-RPE65	Maus	1 mg/ml (1:2000)	Abcam, Cambridge, UK
Anti-β-Aktin	Kaninchen	8 µg/ml (1:2000)	Cell Signaling, Danvers, MA, USA

#### 2.1.2 Chemikalien

Tabelle 2: verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
30 % Acrylamide/Bis Solution	Serva, Heidelberg, D
Aceton	Merck, Darmstadt, D
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Merck, Darmstadt, D
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, D
<i>Buffer substance Dulbecco's</i>	Serva, Heidelberg, D
Ethanol	Merck, Darmstadt, D
Ethylendinitriltetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt, D
Glycerin, 87 %	Merck, Darmstadt, D
Glycine	Merck, Darmstadt, D
Isopropanol	Sigma, Aldrich, D
Kalilauge, 10 %	Walter GmbH & Co. KG, Kiel, D
Methanol	Merck, Darmstadt, D
Milchpulver	Roth, Karlsruhe, D
Natriumazid	Sigma, Aldrich, D
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, D
Natriumchlorid, 0,9 %	Fresenius, Bad Homburg, D
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt, D
Natronlauge 10 mol/l	Merck, Darmstadt, D
Nonidet® P40 Substitute (NP-40)	Sigma, Aldrich, D
Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe, D

Salzsäure 25 %	Roth, Karlsruhe, D
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe, D
Triton X 100	Roth, Karlsruhe, D
Trizma® Base (Tris)	Sigma, Steinheim, D
Tween® 20	Merck, Darmstadt, D

### 2.1.3 Geräte und Verbrauchsgegenstände

Tabelle 3: verwendete Geräte und Verbrauchsgegenstände

Bezeichnung	Hersteller
-20° C-Schrank	Liebherr, Kirchdorf, D
-80° C-Schrank	Sanyo, Moriguchi, J
Abzug	Köttermann GmbH & Co. KG, Uetze/ Hänigsen, D
Anatomische Pinzette	Bausch & Lomb GmbH, Berlin, D
Apotome.2, Mikroskop	Carl Zeiss AG, Jena, D
Autoklav, Varioklav	Thermo scientific, Dreieich, D
Brutschrank	Labotec, Göttingen, D
Chemilumineszenzkamera Bio Imaging Systems MF-ChemiBis 1.6	Biotek GmbH, Jahnsdorf, D
Deckgläschen	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, D
Einkanalpipetten, 10 µl, 100 µl, 1000µl	Eppendorf AG, Hamburg, D
Einmalküvetten, 1,5 ml	Brand, Wertheim, D
Einmalpasteurpipetten 1 ml, 5 ml	Roth, Karlsruhe, D
Eismaschine AF80	Scotsman, Milan, I
Feinwaage	Sartorius analytic, Göttingen, D
Filterpapiere	Macherey-Nagel, Düren, D
Floureszenzmikroskop Imager, M2	Carl Zeiss AG, Jena, D
Fluoreszenzkamera AxioCam MRm	Carl Zeiss AG, Jena, D
Gelelektrophoresekammer Mini-Protean® Tetra-cell	Bio-Rad, München, D
Glasplatten für Gelelektrophorese Mini-Protean®	Bio-Rad, München, D
Heizblock, Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, D
Inverses Lichtmikroskop, Axiovert 100	Carl Zeiss AG, Jena, D
Kohlenstoffdioxid-Inkubator BB15	Thermo Scientific, Dreieich, D
Magnetrührer Combimag RCT	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, D
Mikrotiterplatten-Photometer	Biostep, Jahnsdorf, D
Objektträger	Karl Hecht GmbH, Sondheim, D
Parafilm	Bemis Company, Oshkosh, USA
Pipettenspitzen, 10-1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht, D
Rasierklinge T585	Plano GmbH, Wetzlar, D
Reaktionsgefäße, 1-2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
Rollmischgerät, RM5 Nr. 348	Karl Hecht GmbH, Sondheim, D
Roti® - PVDF - Membran	Roth, Karlsruhe, D
Saugpumpe Vacusafe comfort	Integra Bioscience AG, Zizers, CH
Schere 545A	Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, D
Schüttler, Rocking platform	VWR, Pennsylvania, USA
Serologische Pipetten, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Th. Geyer, Berlin, D

Spektralphotometer Spectronic Genesys	Thermo Electron Corporation Erlangen, D
Sterilbank <ul style="list-style-type: none"> <li>• Antair BSK</li> <li>• Safe 2020</li> </ul>	Sternkopf, Lübeck, D Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D
Ultraschallgerät Vibra cell	Sonics & Material, Connecticut, USA
Vortexer Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Wasserbad 1086	GFL, Burgwedel, D
Wet Blot Mini Trans Blot Cell Module	Bio-Rad, München, D
Zellkultur Testplatten (12-Kammer, 96-Kammer)	Biochrom GmbH, Berlin, D
Zellschaber 16 cm, 25 cm	Sarstedt, Nümbrecht, D
Zentrifugen <ul style="list-style-type: none"> <li>• Servall ST40</li> <li>• Centrifuge 5414</li> <li>• Heralus Fresco 17</li> </ul>	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, D Eppendorf AG, Hamburg, D Thermo Electron Corporation, Erlangen, D
Zentrifugenröhrchen, 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D

#### 2.1.4 Sonstige Materialien

Tabelle 4: sonstige verwendete Materialien

Bezeichnung	Hersteller
2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperatiny] - ethansulfonat (HEPES)	Biochrom, Berlin, D
Aflibercept, Eylea® 40 mg/ml	Bayer AG, Leverkusen, D
Aqua bidest	Fresenius Kabi, Bad Homburg, D
Betaisodona®	Munipharma, Limburg, D
Bevacizumab, Avastin® 25 mg/ml	Novartis, Basel, CH
Bio-Rad-Färbelösung/Proteinassay	Bio-Rad, München, D
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma, Steinheim, D
Collagen	Biochrom, Berlin, D
ECL-Western-Blotting Detection Reagent	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
FITC-markierte Latexkügelchen	Sigma, Deisenhofen, D
Fluoromount-G™ mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Bioscience, Frankfurt, D
Fötale Kälberserum (FCS)	Linaris, Wertheim-Bettingen, D
Hoechst-Farbstoff	Sigma, Deisenhofen, D
HyClone™ Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) high Glucose	Biochrom, Berlin, D
Immersionsöl Immersol™ 518F	Carl Zeiss AG, Jena, D
Kaleidoscope™ Prestained Standards	Bio-Rad, München, D
Lipopolysaccharid (LPS) aus E.Coli	Sigma, Aldrich, D
Nicht essenzielle Aminosäuren (NEA)	Biochrom, Berlin, D
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin, D
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	Sigma, Steinheim, D
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) Dulbecco	Biochrom, Berlin, D
Polyinosin-polycytidyl acid sodium salt (Poly(I:C))	Tocris Bioscience, Bristol, UK
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma, Steinheim, D
Quantikine® ELISA Kit TGF-β1	R&D System, Minneapolis, USA
Roti® Immuno-Block	Roth, Karlsruhe, D

SDS <i>Sample Buffer</i> (4x)	Merck, Darmstadt, D
Sodium Pyruvat	Biochrom, Berlin, D
TGS Laufpuffer (10x Tris/Glycine/SDS)	Bio-Rad, München, D
Trypsin	PAN Biotech, Aidenbach, D
Trypsin/EDTA	PAN Biotech, Aidenbach, D
Tumornekrosefaktor alpha (TNF $\alpha$ )	R&D System, Minneapolis, USA

### 2.1.5 Zusammensetzung von Puffern und Lösungen

Tabelle 5: verwendete Puffer und Lösungen

<b>Puffer oder Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Blocking Solution 4%	4 % Milchpulver in TBST
Homogenisierungspuffer	34 % Saccharose 65 mM NaCl 2 mM Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> ) 5 mM HEPES
NP-40 Lysispuffer, pH 8,0	150 mM NaCl 50 mM Tris 1 % Nonidet P-40
PBS 10x konzentriert	80 g NaCl 2 g Kaliumchlorid (KCl) 14,4 g Natriumphosphat (Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) 2,4 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )
PBS-Azid	0,1 % Natriumazid in PBS
Sammelgelpuffer, 2x, pH 6,8	250 mM Tris 0,1 % SDS
Transferblotpuffer	24,8 mM Tris 192 mM Glycin 20 % Methanol
Trenngelpuffer, 4x, pH 8,8	1,5 M Tris 0,1 % SDS
Tris/Glycin/SDS (TGS) Laufpuffer (10x), pH 8,3	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % SDS
Tris-gepufferte Natriumchloridlösung (TBS), pH 7,5	100 mM Tris 150 mM NaCl
Tris-gepufferte Natriumchloridlösung mit Tween® 20 (TBST), pH 7,5	0,1 M Tris 0,1 % Tween® 20 0,15 M NaCl
Trypsin-EDTA	0,05 % Trypsin 0,1 % EDTA In PBS
Zellkulturmedium	500 ml DMEM high Glucose + Phenolrot 10 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin 100 mM Sodium Pyruvat 1 M HEPES 1 % nicht essenzielle Aminosäuren (NEA)

## 2.1.6 Verwendete Software

Tabelle 6: verwendete Software

Bezeichnung	Firma
Axiovision, Rel. 4.8	Carl Zeiss AG, Jena, D
Fiji	Image J, <i>Download: <a href="https://imagej.net/Fiji">https://imagej.net/Fiji</a></i>
Gel Capture Version 5.8	Biotek GmbH, Jahnsdorf, D
Gen 5	Biotek GmbH, Jahnsdorf, D
Microsoft Office 365, Excel	Microsoft, Redmond, Washington, USA
Total Lab TL 100	Biosystematica, Mountain Hall, UK
Zen 2012	Carl Zeiss AG, Jena, D

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

Die Arbeit mit den RPE Zellen erfolgte unter der Sterilbank mit sterilen, autoklavierten oder desinfizierten Materialien. Im Inkubator wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % Kohlenstoffdioxidgehalt kultiviert.

### 2.2.2 Präparation von primären RPE Zellen aus Schweineaugen

Zur Gewinnung der RPE Zellen wurde das Protokoll von Wiencke et al. modifiziert nach Klettner et al. angewendet (Wiencke et al. 2003; Klettner und Roeder 2008). Die Zellen wurden aus porcinen Augäpfeln von regionalen Schlachthöfen innerhalb von vier Stunden post mortem gewonnen. Die Augen wurden von Muskeln und Bindegewebe freigeschnitten, in Betaisodonalösung desinfiziert und anschließend in sterile Natriumchloridlösung gegeben. Die weitere Verarbeitung erfolgte unter der Sterilbank. Der vordere Teil des Auges wurde mit einer Rasierklinge abgeschnitten und der Glaskörper entfernt. Das entstandene Augenschälchen wurde mit PBS gefüllt, um die Retina schonend vom RPE zu lösen und zu entfernen. Damit sich die Zellverbände lösen, wurden die RPE Zellen 10 Minuten mit Trypsin und weitere 30 - 45 Minuten mit Trypsin-EDTA bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren von der Choroidea gelöst. Die Zellen in Suspension wurden in Falcons mit doppelter Menge Zellkulturmedium gegeben, um die Wirkung des Trypsins zu neutralisieren. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 900 Umdrehungen pro Minute wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in Zellkulturmedium resuspendiert. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt, bevor alle Zellen in einem Falcon vereinigt und gleichmäßig auf eine 12-Kammer Platte ausgesät wurden. Das RPE-Zellkulturmedium wurde alle drei bis vier Tage erneuert.

### 2.2.3 Versuchsaufbau und Stimulation

Um den Einfluss der Anti-VEGF Therapie unter Entzündungsparametern zu simulieren, wurden die RPE Zellen unterschiedlichen Konzentrationen der Entzündungsmediatoren ausgesetzt. Zusätzlich zu einer Kontrolle (oberste Zeile einer 12-Kammer Platte) wurden diese mit den VEGF-Inhibitoren Aflibercept (250 µg/ml) (mittlere Zeile) oder Bevacizumab (250 µg/ml) (unterste Zeile) in therapierelevanten Dosen kombiniert.

Von dem TLR-3 Agonist Polyinosinsäure: Polycytidylsäure (Poly I:C) wurden 1 µg/ml, 10 µg/ml und 100 µg/ml, von dem TLR-4 Agonist Lipopolysaccharid (LPS) 0,1 µg/ml, 1 µg/ml und 10 µg/ml und von dem Zytokin Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) 12,5 ng/ml, 25 ng/ml und 50 ng/ml eingesetzt. Dabei wurde die geringste Konzentration in die zweite Spalte, die mittlere Konzentration in die dritte Spalte und die höchste Konzentration in die vierte Spalte einer 12-Kammer Platte gegeben. Sowohl die Entzündungsmediatoren als auch die VEGF-Inhibitoren wurden alle drei bzw. vier Tage nach dem Mediumwechsel erneut hinzugefügt.

### 2.2.4 Gewinnung der Überstände

Nach 24 Stunden, sieben Tagen und vier Wochen wurden die Überstände abgenommen. Diese wurden zentrifugiert und anschließend in neue Gefäße überführt. Die Überstände wurden direkt verwendet oder bei -20 °C oder -80 °C gelagert.

### 2.2.5 TGF- $\beta$ 1 ELISA

Die Retina ist eine immunprivilegierte Region und das RPE kann mit Makrophagen und Monozyten interagieren und hat einen immunsuppressiven, regulierenden Einfluss auf T-Zellen (Detrick und Hooks 2010; Klettner 2015b). Das Zytokin TGF- $\beta$ 1 ist an der Aufrechterhaltung des Immunprivilegs beteiligt (Klettner 2015b).

Um eine quantitative Aussage über die Konzentration von TGF- $\beta$ 1 nach Behandlung mit Entzündungsmediatoren und den VEGF-Inhibitoren zu machen, wurde ein enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA) durchgeführt. Der Test wurde 1971 von Engvall und Perlmann zeitgleich mit van Weemen und Schnuurs entwickelt (Engvall und Perlmann 1971; van Weemen und Schuurs 1971) und beruht darauf, dass zwei Antikörper nacheinander an unterschiedlichen Epitopen des zu untersuchenden Proteins binden. Dabei ist der erste monoklonale Antikörper am Boden einer 96-Kammer Platte gebunden. Die zu untersuchende Probe wird hinzugefügt und das gesuchte Protein gebunden. Der ungebundene Teil der Probe wird ausgewaschen, sodass im nächsten Schritt der zweite

Peroxidase-gekoppelte Antikörper spezifisch an das Protein binden kann. Alle ungebundenen Antikörper werden durch erneutes Waschen entfernt. Anschließend wird eine Farbreagenz hinzugegeben, die durch die Peroxidase umgesetzt wird und zu einem Farbumschlag führt. Dieser ist proportional zu der Enzymmenge in der Probe und kann photometrisch gemessen werden.

#### 2.2.5.1 TGF- $\beta$ 1 Quantikine®ELISA

In der vorliegenden Arbeit wurde der ELISA nach den Anweisungen des TGF- $\beta$ 1 Quantikine® ELISA Kit durchgeführt. Dafür musste zunächst das latente TGF- $\beta$ 1 aktiviert werden, damit es immunreaktiv wurde. Dafür wurden die Überstände mit 1 N Salzsäure 10 Minuten aktiviert. Anschließend wurden die Proben mit 1,2 N Natronlauge mit 0,5 M HEPES neutralisiert.

Aus dem TGF- $\beta$ 1 Standard (2000 pg/ml) wurde mit dem *Calibrator Diluent* RD5-53 (1:4 verdünnt) eine Standardreihe erstellt mit 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml und 31,3 pg/ml. Der TGF- $\beta$ 1 Standard (2000 pg/ml) diente als höchster Standard und das *Calibrator Diluent* RD5-53 (1:4 verdünnt) als Nullwert (0 pg/ml).

In jede Kammer der ELISA Platte wurde *Assay Diluent* RD1-21 und anschließend die gleiche Menge der aktivierten Proben, der Standards, der Positiv- oder der Negativ-Kontrolle gegeben. Die Platte wurde eine Minute leicht geschüttelt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Platte viermal mit Waschpuffer in einem automatischen *microplate washer* gewaschen und auf Papiertücher ausgeklopft. Der zweite enzymgekoppelte Antikörper (TGF- $\beta$ 1 Konjugat) wurde aufgetragen und die Platte erneut zwei Stunden inkubiert und viermal gewaschen. Anschließend wurde die Farbreagenz in jede Probe gegeben und 30 Minuten lichtgeschützt inkubiert. Durch die Stop-Lösung wurde die Farbreaktion beendet und die optische Dichte jeder Probe mit BioTek im Programm Gen5 bei 450 nm gemessen. Die Auswertung erfolgte mithilfe der Standardkurve.

#### 2.2.6 Phagozytoseassay

Eine essenzielle Funktion der RPE Zellen ist die Phagozytose von Photorezeptoraußensegmenten (Strauss 2005). Um den Einfluss der Anti-VEGF Therapie unter Entzündungsparametern zu beurteilen, wurde das Phagozytoseassay nach Klettner et al. durchgeführt (Klettner et al. 2011).

##### 2.2.6.1 Collagenbeschichtung von Deckgläschen

Für die Durchführung des Assays musste das RPE auf Deckgläschen anwachsen, weshalb die Deckgläschen mit einer Collagengebrauchslösung aus Collagen A und PBS beschichtet wurden. Dafür wurde in jede Kammer einer 12-Kammer Platte ein Deckgläschen gelegt, mit der Lösung benetzt und

für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde mit PBS mit Penicillin/Streptomycin gewaschen und die Platte konnte sofort genutzt oder für den späteren Gebrauch nach dem Trocknen im Kühlschrank gelagert werden.

#### 2.2.6.2 Gewinnung von Photorezeptoraußensegmenten aus porcinen Retinae

Die Außensegmente der Photorezeptoren werden regelmäßig vom RPE phagozytiert (Strauss 2005). Um die Phagozytose unter dem Mikroskop sichtbar zu machen, wurden Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-markierte Latexkügelchen mit diesem physiologischen Substrat opsoniert. Die Außensegmente wurden aus der RPE-Präparation von frisch geschlachteten Schweinen gewonnen (siehe Kapitel 2.2.2.). Dafür wurden 12 Netzhäute in einem Falcon mit Homogenisierungspuffer gesammelt und für zwei Minuten stark geschüttelt. Dadurch brachen die Außensegmente von den Zellkörpern ab. Durch vierminütige Zentrifugation bei 3800 rpm wurden diese voneinander getrennt. Der Überstand enthielt die Außensegmente und wurde in ein neues Falcon überführt und mit 10 mM HEPES verdünnt. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in HEPES aufgenommen und durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren zerkleinert und suspendiert. Die Suspension wurde so aliquotiert, dass circa ein Viertel der Außensegmente von einer Retina in einem Aliquot waren. Diese wurden bei -80 °C gelagert.

#### 2.2.6.3 Opsonierung der FITC-markierten Latexkügelchen

Für den Einsatz auf einer 12-Kammer-Zellkulturplatte wurde ein Aliquot mit Photorezeptoraußensegmenten (115 µl, entspricht circa einem Viertel aus einer porcinen Retina) aufgetaut und zweimal kurz im Ultraschallbad geschallt. Unter der Sterilbank wurden diese mit FITC-markierten Latexkügelchen (88 µl) und Aqua bidest (1150 µl) in einem Reaktionsgefäß gemischt und eine Stunde bei Raumtemperatur im Thermomixer geschüttelt. Die opsonierten Latexkügelchen wurden 2 Minuten in der Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in physiologischer Kochsalzlösung (0,9 %) resuspendiert und anschließend noch zweimal zentrifugiert und gewaschen. Für die Phagozytose wurden 100 µl pro Kammer eingesetzt.

#### 2.2.6.4 Phagozytoseassay und Fixierung

Vor Versuchsbeginn wurde das Medium in der 12-Kammer Platte erneuert (inkl. Medikamente und Stimulanzen) und die frisch hergestellten opsonierten Latexkügelchen hinzugefügt. Das RPE konnte über vier Stunden bei 37 °C im Inkubator die opsonierten Latexkügelchen phagozytieren. Nach Ablauf der Zeit wurde die Platte mit Zellkulturmedium und anschließend mit PBS gewaschen. Es wurde für zwei Minuten 1 % PBS-Azid zugegeben, um die Zellen abzutöten. Nachdem die Zellen zweimal mit PBS gewaschen wurden, wurden sie mit 3 % Paraformaldehyd fixiert. Die Zellen wurden erneut mit PBS

gewaschen und durch Zugabe von eiskaltem Ethanol/Aceton permeabel gemacht. Nach zweimaligem Waschen mit TBS wurden unspezifische Bindungen mit der *Blocking Solution* geblockt. In einer feuchten Kammer wurde für jedes Deckgläschen ein Tropfen aus der *Blocking Solution*, 300 µl Höchst Kernfärbung (1:1000) und einem Antikörper gegen humanes IgG (*AlexaFlour 555 goat anti-human IgG (1:500)*) aufgetragen. Die Deckgläschen wurden daraufgelegt und im Dunkeln eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläschen zweimal mit TBST und dreimal mit TBS gewaschen. Zuletzt wurden die Deckgläschen in einem Tropfen Fluoromount mit DAPI auf einem Objektträger eingedeckelt.

#### 2.2.6.5 Mikroskopie und Auswertung

Pro Deckgläschen wurden mit dem Immunfluoreszenzmikroskop in jedem Quadranten ein Bild aufgenommen. Das Bild wurde zufällig an einer Stelle gemacht, an dem die Zellkerne und die Latexkügelchen gut zu erkennen waren. Mit einem Skript von AxioVision wurden alle Zellkerne und Latexkügelchen pro Bild gezählt und in Relation zueinander gesetzt. Dabei konnte für ein optimales Ergebnis der Schwellwert zur Erkennung der Zellkerne und der Latexkügelchen angepasst und in einem weiteren Schritt per Mausclick Zellkerne bzw. Latexkügelchen hinzugefügt oder abgewählt werden. Von den angeschnittenen Zellkernen wurden nur die am rechten und oberen Bildrand gezählt, während die am unteren und linken Bildrand nicht gezählt wurden.

#### 2.2.7 In-vitro Wundheilung

Um die Wundheilung unter dem Einfluss der Anti-VEGF Therapie und Entzündungsparametern zu beurteilen, wurden die RPE Zellen auf eine 12-Kammer Zellkulturplatte ausgesät. Sobald die Zellen dicht gewachsen waren, wurden sie wie oben beschrieben mit den VEGF-Inhibitoren und/oder den Entzündungsmediatoren für 24 Stunden, sieben Tage oder vier Wochen stimuliert. Anschließend wurde mit einer 10 µl Pipettenspitze eine Wunde in jede Kammer gekratzt. Das Medium und die abgekratzten Zellreste wurden abgesaugt und die Platte einmal mit PBS gewaschen. Danach wurde erneut das Zellkulturmedium und die Stimulanzen aufgetragen. An mindestens drei markierten Stellen der Wunde wurden die Wundränder mit dem Programm von Axio Vision fotografiert. Nach 24 und 48 Stunden wurden an denselben Stellen die Wundränder erneut fotografiert. Mit dem Programm Fiji wurde der Flächeninhalt der Wunde gemessen. Dabei wurde die Fläche der initialen Wunde auf 100 % gesetzt und die Fläche nach 24 bzw. 48 Stunden ins Verhältnis dazu gesetzt.

## 2.2.8 RPE65 Expression im Western Blot

RPE65 ist ein intrazelluläres und RPE-spezifisches Protein, welches eine essenzielle Aufgabe in der Wiederaufarbeitung des Sehpigments übernimmt (Redmond et al. 1998).

### 2.2.8.1 Lysieren der RPE Zellen

Zur Gewinnung dieses Proteins wurde eine Lyse der Zellen nach der Methode von Eckert und Kartenbeck durchgeführt (Eckert und Kartenbeck 1997). Nach der Stimulation wurde das RPE mit PBS gewaschen und anschließend auf Eis gelagert. Durch die Hinzugabe von kaltem PBS konnten die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden gelöst werden. Die Suspension wurde in Reaktionsgefäße überführt und bei 4 °C und 3000 rpm 5 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Pellets in NP-40 Lysepuffer (siehe Tabelle 5) mit Protease- und Phosphatase-Inhibitor (1:100) resuspendiert und mindestens 30 Minuten lysiert. Anschließend wurden die Lysate 15 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert und in neue Reaktionsgefäße überführt. Diese wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

### 2.2.8.2 Quantitative Proteinbestimmung

Von jeder Probe wurde die quantitative Proteinmenge nach der Methode von Bradford bestimmt (Bradford 1976). Das Prinzip beruht darauf, dass die Bindung des Farbstoffs *Coomassie Brilliant Blue* an Proteine photometrisch gemessen werden kann. Der Farbstoff bindet vor allem an kationische und nichtpolare Seitenketten der Proteine, was im sauren Milieu zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs von 465 nm zu 595 nm führt. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm kann photometrisch gemessen werden (Bradford 1976).

Die RPE-Lysate wurden aufgetaut und 1:50 mit destilliertem Wasser verdünnt. Je 20 µl der verdünnten Proben wurden mit 1 ml einer 1:5 verdünnten Bio-Rad-Färbelösung in eine Küvette gegeben. Der Inhalt wurde gevortext und für 15 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte die photometrische Messung bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 595$  nm gegen einen Leerwert aus destilliertem Wasser. Mithilfe einer Kalibriergerade mit Rinderserumalbumin (BSA) als Standardprotein (0 µg/ml bis 1000 µg/ml) konnten die Proteinkonzentrationen der Proben bestimmt werden.

### 2.2.8.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist ein Verfahren, bei dem Proteine durch die Wanderung in einem elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt werden

können (Eckert und Kartenbeck 1997). Damit die Auftrennung nur nach der Größe und nicht nach der Ladung der Proteine erfolgte, wurden von den zu untersuchenden Proben je 15 µg Protein mit 3 µl eines vierfachen SDS-Ladepuffers gemischt und für fünf Minuten bei 95 °C denaturiert. Dadurch wurde die Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur der Proteine zerstört und alle Proteine lagen negativ geladen vor. Damit eine gleichmäßige Lauffront im Polyacrylamidgel entstehen konnte, wurden alle Proben mit destilliertem Wasser auf das gleiche Volumen aufgefüllt.

Die Gelelektrophorese wurde in einem Trenngel aus 12 % Acrylamid und einem Sammelgel aus 5 % Acrylamid durchgeführt. Die Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 7 aufgeführt. Das Trenngel wurde zuerst in eine 1 mm breite Kammer gegossen. Sobald das Trenngel polymerisiert war, wurde das Sammelgel aufgetragen und ein Kamm luftblasenfrei eingesetzt. Nachdem beide Gele fest waren, konnte es in feuchte Tücher gewickelt im Kühlschrank gelagert oder direkt genutzt werden.

Das Polyacrylamidgel wurde anschließend in eine BioRAD TetraCell eingespannt, in eine große Kammer mit Laufpuffer gestellt, der Kamm entfernt und die Taschen einmal gespült. Anschließend konnten ein Kaleidoskop-Marker sowie die vorbereiteten Proben in die Taschen pipettiert werden. Die Sammelphase erfolgte bei 12 mA, die anschließende Trennphase bei 24 mA.

Tabelle 7: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für die SDS-PAGE

Material	12 %-iges Trenngel	5 %-iges Sammelgel
Acrylamid, 30 % w/v	2 ml	0,335 ml
Aqua bidest	1,75 ml	1,15 ml
Trenngelpuffer (4x)	1,25 ml	-
Sammelgelpuffer (2x)	-	0,5 ml
APS	40 µl	15 µl
TEMED	5 µl	5 µl

#### 2.2.8.4 Western Blot

Der Western Blot, auch Immunblot genannt, ist ein semiquantitatives Verfahren, bei dem Proteine nach der Übertragung (englisch: *blotting*) auf eine Trägermembran durch eine Antigen-Antikörper basierte Methode nachgewiesen werden können (Eckert und Kartenbeck 1997). Das Elektrophorese-Gel, in dem die Proteine der Größe nach aufgetrennt wurden, wurde über die *Tank-Blot*-Methode auf eine Polyvinylidenfluorid-(PVDF) Membran übertragen. Die PVDF-Membran wurde dafür drei Minuten in Methanol aktiviert und direkt auf das Gel gelegt. Zusammen wurden sie zwischen zwei 1,5 mm dicken Filterpapieren und zwei in Transferpuffer getränkte Fasermatten in eine Kassette eingespannt.

Die geschlossene Kasette wurde in eine *Tank-Blot*-Apparatur eingesetzt und mit kaltem Transferpuffer gefüllt. Die Proteine wurden bei 100 V vom Gel auf die Membran übertragen.

Nach der Proteinübertragung wurde die PVDF-Membran aus der Kammer entnommen und dreimal für 10 Minuten in TBST gewaschen. Damit der Antikörper für das gesuchte Protein nicht unspezifisch bindet, wurde die Membran für mindestens 60 Minuten bei Raumtemperatur mit einer 4 %-igen *Blocking Solution* behandelt.

Die Bande für das gesuchte Protein RPE65 lag bei 65 kDa und die der Ladekontrolle  $\beta$ -Aktin bei 42 kDa. Da die beiden Banden weit genug auseinander lagen, konnte die Membran mittig durchgeschnitten und beide Hälften parallel inkubiert und ausgewertet werden. Der obere Teil wurde mit Anti-RPE65 (1:2000) und der untere Teil mit Anti- $\beta$ -Aktin (1:2000) als ersten Antikörper in einer 4 %-igen *Blocking Solution* über Nacht bei 4 °C auf dem Rollgerät inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden beide Membranteile dreimal für 10 Minuten in TBST gewaschen. Anschließend wurden sie für 30 Minuten mit dem jeweiligen zweiten Antikörper inkubiert. Dieser richtete sich gegen den ersten Antikörper und hatte eine Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) gebunden. Gegen Anti- $\beta$ -Aktin wurde Anti-*rabbit* (1:2000) und gegen Anti-RPE65 wurde Anti-*mouse* (1:2000) verwendet. Um die Banden durch eine *enhanced* Chemilumineszenz (ECL)-Reaktion sichtbar zu machen, wurde die ECL-Western-Blot-Detektionsreagenz aus den Substraten Luminol und Peroxid im Verhältnis 1:1 hergestellt. Die PVDF-Membranen wurden damit benetzt und für fünf Minuten inkubiert. Das Enzym Meerrettichperoxidase katalysiert die Oxidation von Luminol mit Wasserstoffperoxid, was zu einer Chemilumineszenz führt. Diese wurde mit der Chemilumineszenzkamera Bio Imaging Systems MF-ChemiBis 1.6 von Biotep® sichtbar gemacht. Anschließend konnte die densitometrische Dichte der Banden mit dem Programm Total Lab ausgewertet und der RPE65 Gehalt auf den  $\beta$ -Aktin Gehalt normalisiert werden.

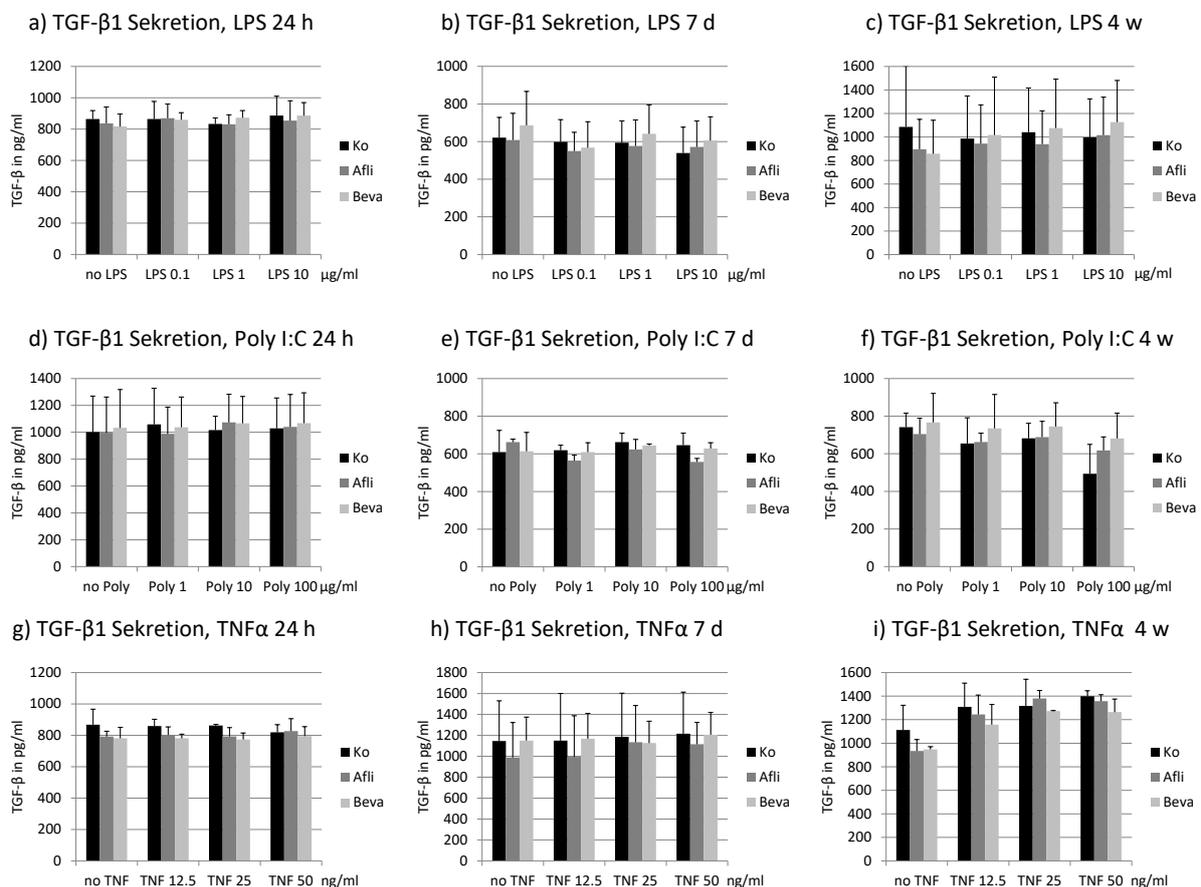
### 2.2.9 Statistik

Alle Versuche wurden unabhängig voneinander mindestens dreimal wiederholt. Die Auswertung erfolgte mit dem *Student's t-Test* in Excel (Microsoft) mit einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$ .

## 3 ERGEBNISSE

### 3.1 TGF- $\beta$ 1 Sekretion

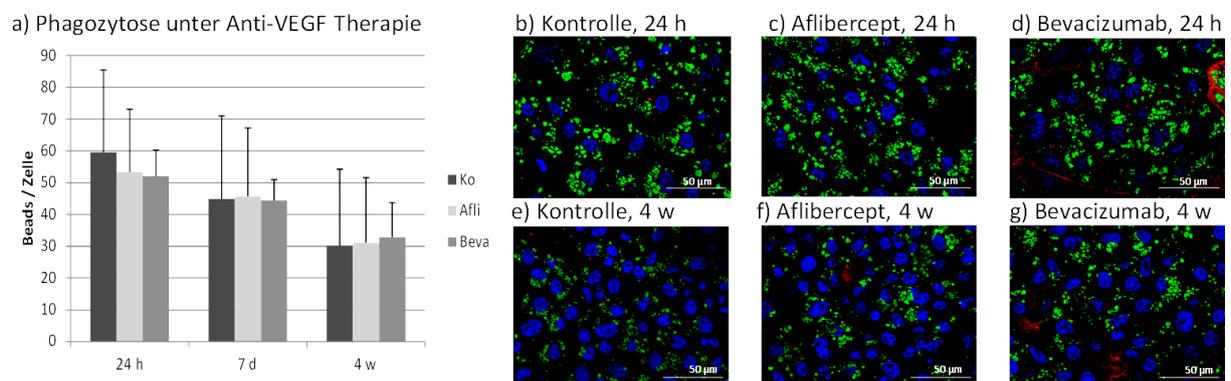
Primäre porcine RPE Zellen wurden 24 Stunden, sieben Tage oder vier Wochen mit Aflibercept oder Bevacizumab sowie LPS, Poly I:C oder TNF $\alpha$  in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt. TGF- $\beta$ 1 wurde zu jedem Zeitpunkt von unbehandelten RPE Zellen sezerniert. LPS (0,1, 1, 10  $\mu$ g/ml) hatte unabhängig von der Konzentration keinen Einfluss auf die Sekretion, auch in Kombination mit den VEGF-Inhibitoren kam es zu keinem signifikanten Unterschied zur Kontrolle (Abb. 2 a-c). Auch die Ansätze mit Poly I:C (1, 10, 100  $\mu$ g/ml) (Abb. 2 d-f) und TNF $\alpha$  (12,5, 25, 50 ng/ml) (Abb. 2 g-i) zeigten weder einzeln noch in Kombination mit den VEGF-Inhibitoren eine signifikante Veränderung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.



**Abbildung 2: TGF- $\beta$ 1 Sekretion unter Entzündungsmediatoren und VEGF-Inhibitoren.** Dargestellt ist die TGF- $\beta$ 1 Sekretion von primären RPE Zellen nach Stimulation mit LPS (0,1, 1, 10  $\mu$ g/ml) (a-c), Poly I:C (1, 10, 100  $\mu$ g/ml) (d-f) oder TNF $\alpha$  (12,5, 25, 50 ng/ml) (g-i) und Aflibercept (250  $\mu$ g/ml) oder Bevacizumab (250  $\mu$ g/ml) für 24 Stunden (a + d + g), sieben Tage (b + e + h) oder vier Wochen (c + f + i). Weder die Entzündungsmediatoren oder die Medikamente allein noch die Kombinationen führten zu einer signifikanten Beeinflussung der Sekretion von TGF- $\beta$ 1. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-test berechnet, n = 3. LPS = Lipopolysaccharid, Poly/ Poly I:C = Polyinosinsäure:Polycytidylsäure, TNF/ TNF $\alpha$  = Tumornekrosefaktor  $\alpha$ , no = kein Entzündungsmediator, Ko = Kontrolle, Afli = Aflibercept, Beva = Bevacizumab, h = Stunden, d = Tage, w = Wochen (nach Klettner et al. 2020 und Brinkmann et al. 2021)

## 3.2 Phagozytose von Photorezeptoraußensegmenten

Eine wichtige Aufgabe der RPE Zellen ist die Phagozytose der Photorezeptoraußensegmente. Im Phagozytose-Assay wurde getestet, wie viele mit Außensegment opsonierte Kügelchen (*Beads*) pro Zelle phagozytiert wurden (Klettner et al. 2011). Unbehandelte RPE Zellen phagozytierten zu jedem der getesteten Zeitpunkte. Nach 24 Stunden wurden im Mittel 60 Kügelchen pro Zellkern phagozytiert mit einem Minimum von 30 und einem Maximum von 160 Kügelchen pro Zellkern. Nach einwöchiger Behandlung lag der Mittelwert bei 45, mit Werten von 11 bis 97 Kügelchen pro Zellkern. Nach vier Wochen lagen die Werte zwischen 12 und 45 mit einem Mittelwert von 30 Kügelchen pro Zellkern. Die Behandlung mit Aflibercept oder Bevacizumab führte an keinem der getesteten Zeitpunkte zu einer signifikanten Veränderung der Phagozytosefähigkeit (Abb. 3).



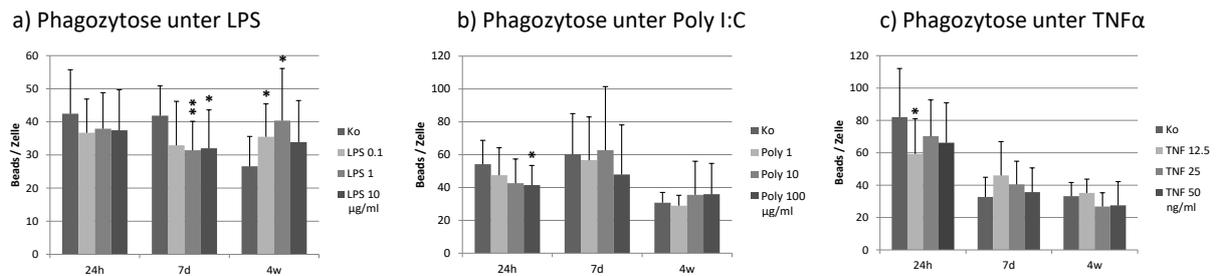
**Abbildung 3: Phagozytose unter Anti-VEGF Therapie.** Dargestellt sind die phagozytierten Beads pro Zellkern von primären RPE Zellen nach vier Stunden Inkubationszeit nach Stimulation mit Aflibercept (250 µg/ml) oder Bevacizumab (250 µg/ml) für 24 Stunden, sieben Tage oder vier Wochen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Zu keinem gemessenen Zeitpunkt unterschied sich die Phagozytoserate unter Anti-VEGF Therapie signifikant von der Kontrolle. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-test berechnet,  $n = 36$  (a). Beispielbilder der phagozytierten Beads nach 24 Stunden (b – d) und vier Wochen (e – g). Maßstab 50 µm, blau = Zellkerne, grün = Beads, rot = Anti-human-IgG. Ko = Kontrolle, Afli = Aflibercept, Beva = Bevacizumab, h = Stunden, d = Tage, w = Wochen (nach Brinkmann et al. 2021)

Von den getesteten Entzündungsmediatoren hatte LPS nach 24-stündiger Stimulation keinen Einfluss. Nach sieben Tagen reduzierte jede der eingesetzten Konzentration von LPS die Phagozytose. Bei 0,1 µg/ml (Ko:  $41,85 \pm 9,0$ ; 0,1 µg/ml:  $32,92 \pm 13,28$ ,  $p = 0,07$ ) war ein Trend erkennbar und bei 1 µg/ml (1 µg/ml:  $31,43 \pm 8,74$ ,  $p < 0,01$ ) und 10 µg/ml (10 µg/ml:  $32,02 \pm 11,56$ ,  $p < 0,03$ ) war es signifikant. Dieser Effekt kehrte sich jedoch bei der Langzeitstimulation um und führte zu einer gesteigerten Phagozytose durch 0,1 µg/ml und 1 µg/ml LPS (Ko:  $26,58 \pm 9,03$ ; 0,1 µg/ml:  $35,48 \pm 9,94$ ,  $p < 0,04$ ; 1 µg/ml:  $40,36 \pm 15,76$ ,  $p < 0,02$ ) (Abb. 4a).

Durch die kurzfristige Stimulation mit Poly I:C führte nur die höchste Konzentration von Poly I:C zu einer signifikanten Reduktion der Phagozytose (Ko:  $54,26 \pm 14,55$ ; 100 µg/ml:  $41,52 \pm 11,98$ ,  $p < 0,03$ ). Für 10 µg/ml zeigte sich ebenfalls eine Reduktion, die jedoch nicht signifikant war (10 µg/ml:  $42,60 \pm$

14,74,  $p < 0,07$ ). Die mittel- und langfristigen Stimulationen mit Poly I:C hatten unabhängig von der Konzentration keinen Einfluss auf die Phagozytosefähigkeit (Abb. 4b).

Die Stimulation mit TNF $\alpha$  führte nur nach 24 Stunden bei einer Konzentration von 12,5 ng/ml zu einer signifikanten Abnahme (Ko:  $82,0 \pm 30,09$ ; 12,5 ng/ml:  $59,24 \pm 21,77$ ,  $p < 0,05$ ). Die höheren Konzentrationen hatten keinen Einfluss. Nach sieben Tagen und vier Wochen zeigte sich für keine der getesteten Konzentrationen eine signifikante Veränderung der Phagozytoserate (Abb. 4c).

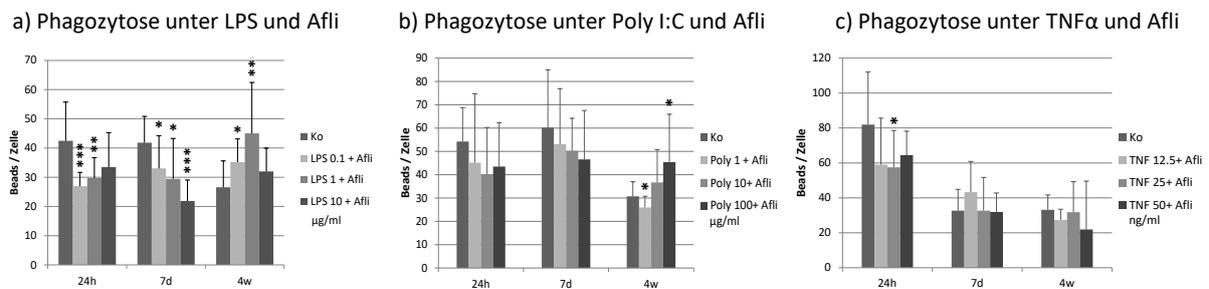


**Abbildung 4: Phagozytose unter Entzündungsmediatoren.** Dargestellt sind die phagozytierten Beads pro Zellkern von primären RPE Zellen nach Stimulation mit a) LPS (0,1, 1, 10  $\mu\text{g/ml}$ ), b) Poly I:C (1, 10, 100  $\mu\text{g/ml}$ ) oder c) TNF $\alpha$  (12,5, 25, 50 ng/ml) für 24 Stunden, sieben Tage oder vier Wochen. LPS setzte nach einwöchiger Behandlung mit 1 oder 10  $\mu\text{g/ml}$  LPS die Phagozytosefähigkeit herab, nach vierwöchiger Stimulation mit 0,1 oder 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS wurde diese signifikant gesteigert. Die 24-stündige Stimulation mit Poly I:C in der höchsten sowie mit TNF $\alpha$  in der niedrigsten getesteten Konzentration senkten die Phagozytose signifikant. Alle anderen getesteten Zeitpunkte und Konzentrationen zeigten keinen signifikanten Einfluss. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-test berechnet, \* = signifikant mit  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ,  $n = 12$ . Ko = Kontrolle, LPS = Lipopolysaccharid, Poly/ Poly I:C = Polyinosinsäure:Polycytidylsäure, TNF/ TNF $\alpha$  = Tumornekrosefaktor  $\alpha$ , h = Stunden, d = Tage, w = Wochen (nach Klettner et al. 2020).

Die Kombination von Aflibercept (250  $\mu\text{g/ml}$ ) mit LPS für 24 Stunden oder sieben Tage führte zu einer Abnahme der Phagozytosefähigkeit des RPE für jede der getesteten Konzentration. Nach 24 Stunden war es für 0,1  $\mu\text{g/ml}$  und 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS signifikant (Ko:  $42,47 \pm 13,26$ ; 0,1  $\mu\text{g/ml}$  + Afli:  $26,94 \pm 4,73$ ,  $p < 0,001$ ; 1  $\mu\text{g/ml}$  + Afli:  $29,72 \pm 6,98$ ,  $p < 0,01$ ) und ein Trend erkennbar für 10  $\mu\text{g/ml}$  LPS (10  $\mu\text{g/ml}$  + Afli:  $33,50 \pm 11,73$ ,  $p < 0,09$ ). Nach sieben Tagen war die Abnahme durch die Ko-Stimulation mit Aflibercept für jede eingesetzte LPS-Konzentration signifikant (Ko:  $41,85 \pm 9,0$ ; 0,1  $\mu\text{g/ml}$  + Afli:  $33,05 \pm 11,14$ ,  $p < 0,05$ ; 1  $\mu\text{g/ml}$  + Afli:  $29,44 \pm 13,83$ ,  $p < 0,02$ ; 10  $\mu\text{g/ml}$  + Afli:  $21,90 \pm 7,13$ ,  $p < 0,001$ ). Die Langzeitbehandlung mit Aflibercept zusammen mit 0,1  $\mu\text{g/ml}$  oder 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS führte hingegen zu einer Steigerung der Phagozytoserate (Ko:  $26,58 \pm 9,03$ ; 0,1  $\mu\text{g/ml}$  + Afli:  $35,20 \pm 7,92$ ,  $p < 0,02$ ; 1  $\mu\text{g/ml}$  + Afli:  $45,04 \pm 17,43$ ,  $p < 0,004$ ) (Abb. 5a).

Die Ko-Stimulation von Aflibercept mit Poly I:C hatte nach kurz- und mittelfristiger Stimulation keinen Einfluss auf die Phagozytose. Nach der vierwöchigen Stimulation führte die niedrigste getestete Konzentration von Poly I:C in Verbindung mit Aflibercept zu einer Abnahme der Phagozytose, während die höchste Konzentration von Poly I:C diese steigerte (Ko:  $30,74 \pm 6,29$ ; 1  $\mu\text{g/ml}$  + Afli:  $25,95 \pm 4,81$ ,  $p < 0,05$ ; 100  $\mu\text{g/ml}$  + Afli:  $45,40 \pm 20,58$ ,  $p < 0,03$ ). Keine der weiteren Kombinationen von Poly I:C mit Aflibercept hatten einen signifikanten Einfluss auf die Phagozytose (Abb. 5b).

Die Ko-Stimulation von TNF $\alpha$  mit Afibercept über 24 Stunden führte zu einer Senkung der Phagozytoserate. Diese war für die mittlere getestete TNF $\alpha$ -Konzentration signifikant (Ko: 82,0  $\pm$  30,09; 25 ng/ml + Afli: 57,46  $\pm$  21,12, p < 0,03), während sich für 12,5 ng/ml und 50 ng/ml TNF $\alpha$  nur ein Trend zeigte (12,5 ng/ml + Afli: 58,97  $\pm$  26,70, p < 0,06; 50 ng/ml + Afli: 64,50  $\pm$  13,70, p < 0,08). Nach sieben Tagen und vier Wochen führte keine getestete Kombination zu einer signifikanten Beeinflussung der Phagozytose (Abb. 5c).



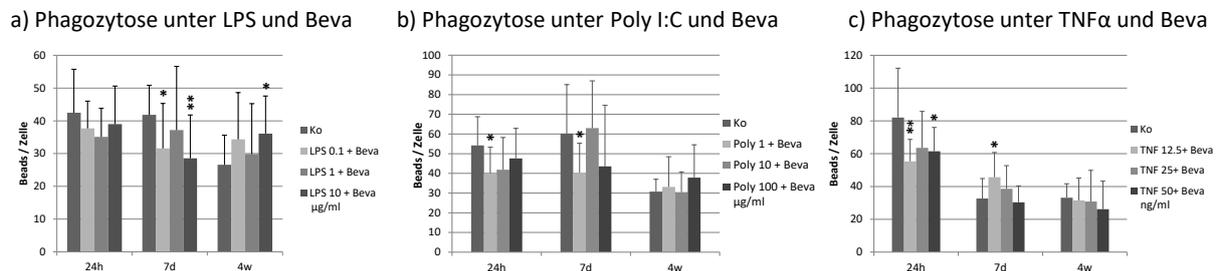
**Abbildung 5: Phagozytose unter Entzündungsmediatoren in Kombination mit Afibercept.** Dargestellt sind die phagozytierten Beads pro Zellkern von primären RPE Zellen nach Stimulation mit a) LPS (0,1, 1, 10  $\mu$ g/ml), b) Poly I:C (1, 10, 100  $\mu$ g/ml) oder c) TNF $\alpha$  (12,5, 25, 50 ng/ml) für 24 Stunden, sieben Tage oder vier Wochen in Kombination mit Afibercept (250  $\mu$ g/ml). Die Phagozytoserate sank durch jede getestete LPS-Konzentration in Verbindung mit Afibercept nach 24 Stunden und sieben Tagen, nur für 10  $\mu$ g/ml LPS mit Afibercept nach 24 Stunden war die Senkung nicht signifikant. Nach vier Wochen Stimulation mit LPS 0,1 und 1  $\mu$ g/ml zusammen mit Afibercept war die Phagozytose hingegen signifikant gesteigert. Poly I:C mit Afibercept führte nur nach vierwöchiger Stimulation mit 1  $\mu$ g/ml zu einer signifikanten Abnahme sowie mit 100  $\mu$ g/ml zu einer Steigerung der Phagozytose. Afibercept in Kombination mit 25 ng/ml TNF $\alpha$  über 24 Stunden senkte die Phagozytoserate signifikant im Vergleich zur Kontrolle. Alle anderen getesteten Zeitpunkte und Konzentrationen zeigten keinen signifikanten Einfluss. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-test berechnet, \* = signifikant mit p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001, n = 12. Ko = Kontrolle, Afli = Afibercept, LPS = Lipopolysaccharid, Poly/ Poly I:C = Polyinosinsäure:Polycytidylsäure, TNF/ TNF $\alpha$  = Tumornekrosefaktor  $\alpha$ , h = Stunden, d = Tage, w = Wochen.

Die Kombination von Bevacizumab (250  $\mu$ g/ml) mit LPS hatte nach kurzfristiger Stimulation keinen signifikanten Einfluss auf die Phagozytose. Die siebentägige Ko-Stimulation von Bevacizumab mit 0,1  $\mu$ g/ml oder 10  $\mu$ g/ml LPS setzte die Phagozytose der RPE Zellen signifikant herab (Ko: 41,85  $\pm$  9,0; 0,1  $\mu$ g/ml + Beva: 31,59  $\pm$  13,70, p < 0,05; 10  $\mu$ g/ml + Beva: 28,54  $\pm$  13,25, p < 0,01). Die vierwöchige Behandlung mit Bevacizumab und der höchsten Konzentration von LPS führte hingegen zu einer Steigerung der Phagozytose (Ko: 26,58  $\pm$  9,03; 10  $\mu$ g/ml + Beva: 36,08  $\pm$  11,52, p < 0,04). Alle anderen Kombinationen zeigten keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle (Abb. 6a).

Die Ko-Stimulation von Bevacizumab mit der geringsten getesteten Konzentration von Poly I:C führte sowohl nach 24 Stunden (Ko: 54,26  $\pm$  14,55; 1  $\mu$ g/ml + Beva: 40,01  $\pm$  13,28, p < 0,02) als auch nach sieben Tagen (Ko: 60,21  $\pm$  24,87; 1  $\mu$ g/ml + Beva: 40,37  $\pm$  14,94, p < 0,03) zu einer herabgesetzten Phagozytose. Ansonsten zeigte sich für keine weitere Kombination von Bevacizumab und Poly I:C ein signifikanter Einfluss auf die Phagozytosefähigkeit (Abb. 6b).

Auch die Ko-Stimulation von Bevacizumab mit 12,5 und 50 ng/ml TNF $\alpha$  senkte die Phagozytose nach 24-stündiger Behandlung (Ko: 82,0  $\pm$  30,09; 12,5 ng/ml + Beva: 55,29  $\pm$  13,42, p < 0,01; 50 ng/ml + Beva: 61,47  $\pm$  14,57, p < 0,05). Allerdings führte die siebentägige Stimulation von 12,5 ng/ml TNF $\alpha$  in

Verbindung mit Bevacizumab zu einer Steigerung der Phagozytose (Ko:  $32,68 \pm 12,21$ ;  $12,5 \text{ ng/ml} + \text{Beva}$ :  $45,63 \pm 15,10$ ,  $p < 0,03$ ). Abgesehen davon hatten die Kombination aus Bevacizumab und  $\text{TNF}\alpha$  keinen signifikanten Einfluss (Abb. 6c).



**Abbildung 6: Phagozytose unter Entzündungsmediatoren in Kombination mit Bevacizumab.** Dargestellt sind die phagozytierten Beads pro Zellkern von primären RPE Zellen nach Stimulation mit a) LPS (0,1, 1, 10  $\mu\text{g/ml}$ ), b) Poly I:C (1, 10, 100  $\mu\text{g/ml}$ ) oder c)  $\text{TNF}\alpha$  (12,5, 25, 50  $\text{ng/ml}$ ) für 24 Stunden, sieben Tage oder vier Wochen in Kombination mit Bevacizumab (250  $\mu\text{g/ml}$ ). Bevacizumab senkte nach siebentägiger Stimulation zusammen mit 0,1 und 10  $\mu\text{g/ml}$  LPS die Phagozytose. Die vierwöchige Ko-Stimulation von Bevacizumab und 10  $\mu\text{g/ml}$  LPS steigerte die Phagozytose signifikant. Die niedrigste getestete Konzentration von Poly I:C senkte die Phagozytose nach 24 Stunden und sieben Tagen.  $\text{TNF}\alpha$  senkte in der niedrigsten und höchsten getesteten Konzentration nach 24-stündiger Kombination mit Bevacizumab die Phagozytose, nach sieben Tagen wurde diese durch 12,5  $\text{ng/ml}$   $\text{TNF}\alpha$  zusammen mit Bevacizumab gesteigert. Alle anderen getesteten Zeitpunkte und Konzentrationen zeigten keinen signifikanten Einfluss. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-test berechnet, \* = signifikant mit  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ,  $n = 12$ . Ko = Kontrolle, Beva = Bevacizumab, LPS = Lipopolysaccharid, Poly/ Poly I:C = Polyinosinsäure: Polycytidylsäure, TNF/  $\text{TNF}\alpha$  = Tumornekrosefaktor  $\alpha$ , h = Stunden, d = Tage, w = Wochen.

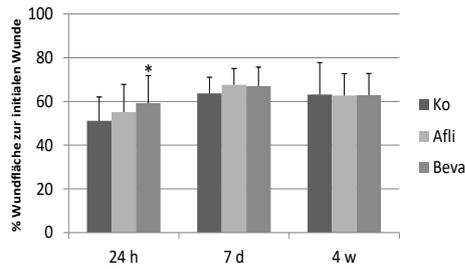
Zusammenfassend hatten die getesteten VEGF-Inhibitoren keinen Einfluss auf die Phagozytoserate. LPS führte sowohl allein als auch in der Kombination mit den VEGF-Inhibitoren zu einer kurz- und mittelfristigen Senkung, wohingegen die langfristige Stimulation zu einer Steigerung der Phagozytose führte. Diese Effekte wurden durch die Ko-Stimulation mit Aflibercept verstärkt. Für die Stimulation mit Poly I:C und  $\text{TNF}\alpha$  zeigten sich sowohl allein als auch in Kombination mit den VEGF-Inhibitoren nur einzelne, vernachlässigbare Effekte.

### 3.3 Wundheilung

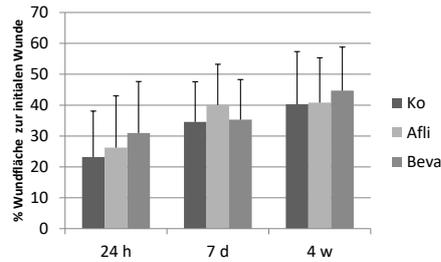
Unbehandelte RPE Zellen sind in der Lage, Wunden im Epithel wieder zu verschließen (Del Priore et al. 2002). Im *Scratch-Assay* wurde diese Funktion am ersten und zweiten Tag (24 bzw. 48 Stunden) nach einer initialen Verletzung näher betrachtet. Dabei wurde die noch unverheilte Fläche mit der erzeugten Wundfläche von Tag 0 ins Verhältnis gesetzt und in Prozent angegeben. Die RPE Zellen waren zu jedem Zeitpunkt in der Lage, die Wunde wieder zu verschließen (Beispielbilder in Abb. 7c).

Aflibercept allein hatte zu keinem der getesteten Zeitpunkte einen signifikanten Einfluss auf die Wundheilung. Die 24-stündige Behandlung mit Bevacizumab verlangsamte die Wundheilung nur am ersten Tag signifikant (1. Tag Ko:  $51,13 \% \pm 10,90 \%$ ; Beva:  $59,22 \% \pm 12,62 \%$ ,  $p < 0,02$ ) (Abb. 7a). Nach sieben Tagen oder vier Wochen wurde die Wundheilung nicht signifikant von den VEGF-Inhibitoren beeinflusst (Abb. 7).

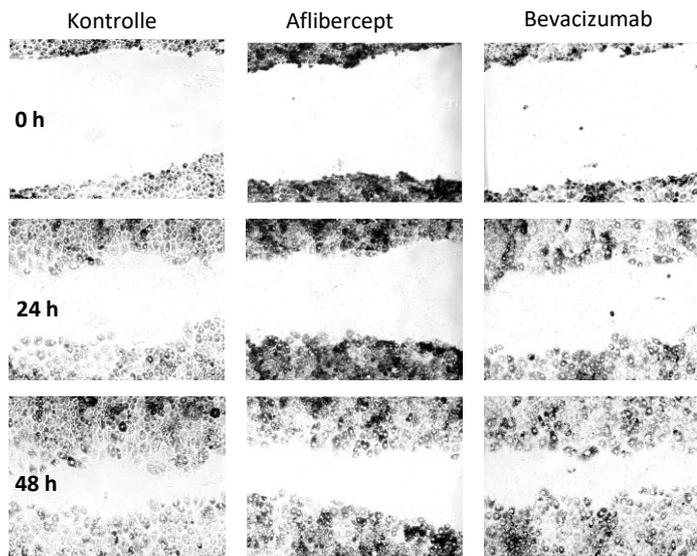
a) 1. Tag nach der initialen Wunde



b) 2. Tag nach der initialen Wunde



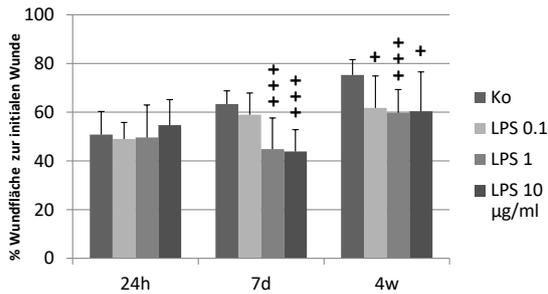
c) Beispielbilder nach 24-stündiger Stimulation mit Aflibercept oder Bevacizumab



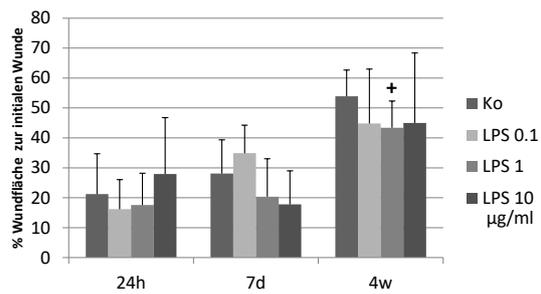
**Abbildung 7: Wundheilung unter dem Einfluss von VEGF-Inhibitoren.** Dargestellt ist die noch vorhandene Wundfläche in Prozent zur initialen Wunde nach 24 h (a) (1. Tag) und 48 h (b) (2. Tag) nach Behandlung des RPE mit Aflibercept (250 µg/ml) oder Bevacizumab (250 µg/ml) für 24 Stunden, sieben Tage oder vier Wochen. Die Stimulation über 24 Stunden mit Bevacizumab verlangsamte die Wundheilung am 1. Tag signifikant. Zu allen anderen gemessenen Zeitpunkten sowie am 2. Tag nach der initialen Wunde zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Aflibercept hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Wundheilung. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-test berechnet, \* = signifikant verlangsamt mit  $p < 0,05$ ,  $n = 27$ . Beispielbilder des Scratch-Assay (c) nach 24-stündiger Stimulation mit Aflibercept (250 µg/ml) oder Bevacizumab (250 µg/ml). Am Ober- und Unterrand ist das RPE erkennbar. In der obersten Reihe (0 h) ist die initiale Wundfläche zu sehen. Die mittlere Reihe zeigt die Wundheilung am 1. Tag (24 h) und die unterste am 2. Tag (48 h). Ko = Kontrolle, Afli = Aflibercept, Beva = Bevacizumab, h = Stunden, d = Tage, w = Wochen (nach Brinkmann et al. 2021).

Die 24-stündige Stimulation mit LPS hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Wundheilung. Nach sieben Tagen und vier Wochen war die Wundheilung am ersten Tag nach der initialen Wunde durch alle getesteten LPS-Konzentrationen beschleunigt (7 Tage: Ko: 63,35 % ± 5,43 %; 1 µg/ml: 44,85 % ± 12,75 %,  $p < 0,001$ ; 10 µg/ml: 43,87 % ± 8,98 %,  $p < 0,001$ ; 4 Wochen: Ko: 75,27 % ± 6,31 %; 0,1 µg/ml: 61,76 % ± 13,10 %,  $p < 0,02$ ; 1 µg/ml: 59,78 % ± 9,51 %,  $p < 0,001$ ; 10 µg/ml: 60,38 % ± 16,14 %,  $p < 0,02$ ). Einzige Ausnahme war die geringste Konzentration von LPS nach sieben Tagen Stimulation, die zu keiner signifikanten Veränderung führte (Abb. 8a). Am zweiten Tag war dieser Effekt weitestgehend aufgehoben und nur noch nach vierwöchiger Behandlung mit 1 µg/ml LPS signifikant (Ko: 53,92 % ± 8,71 %; 1 µg/ml: 43,38 % ± 8,92 %,  $p < 0,03$ ) (Abb. 8b).

a) 1. Tag nach der initialen Wunde



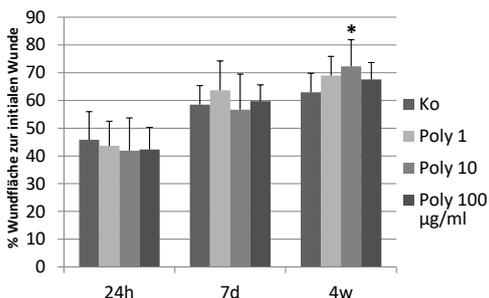
b) 2. Tag nach der initialen Wunde



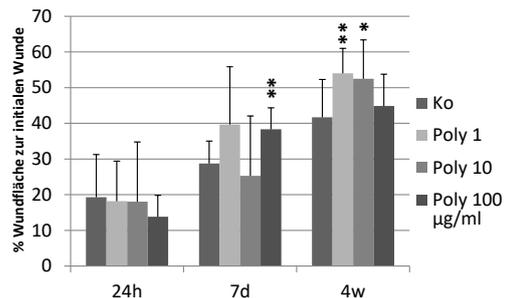
**Abbildung 8: Wundheilung unter dem Einfluss von LPS.** Dargestellt ist die noch vorhandene Wundfläche in Prozent zur initialen Wunde nach 24 h (a) (1. Tag) und 48 h (b) (2. Tag) nach Behandlung mit LPS (0,1, 1, 10 µg/ml) für 24 Stunden, sieben Tage oder vier Wochen. Am 1. Tag war die Wundheilung des RPE nach siebentägiger Behandlung mit 1 und 10 µg/ml LPS sowie für jede getestete Konzentration über vier Wochen signifikant schneller als die Kontrolle (a). Am 2. Messtag ist die Wundheilung nur nach der vierwöchigen Behandlung mit 1 µg/ml LPS signifikant schneller. Alle weiteren getesteten Zeitpunkte und Konzentrationen zeigten keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-test berechnet, + = signifikant beschleunigt mit  $p < 0,05$  und +++ mit  $p < 0,001$ ,  $n = 9$ . Ko = Kontrolle, LPS = Lipopolysaccharid, h = Stunden, d = Tage, w = Wochen (nach Klettner et al. 2020).

Die kurzfristige Behandlung des RPE mit Poly I:C hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Wundheilung. Nach sieben Tagen kam es lediglich am zweiten Messtag durch die höchste getestete Konzentration von Poly I:C zu einer signifikanten Reduktion der Wundheilung (Ko: 28,74 % ± 6,30 %; 100 µg/ml: 38,34 % ± 5,99 %,  $p < 0,01$ ). Die Wundheilung war nach vier Wochen an beiden Messtagen nach der initialen Verletzung für 1 µg/ml und 10 µg/ml Poly I:C herabgesetzt (am ersten Tag war es für die geringere Konzentration nur ein Trend, der am zweiten Tag signifikant war) (1. Tag: Ko: 62,93 % ± 6,88 %; 1 µg/ml (Trend): 68,96 % ± 6,93 %,  $p < 0,09$ ; 10 µg/ml: 72,31 % ± 9,56 %,  $p < 0,03$ ; 2. Tag: Ko: 41,71 % ± 10,59 %; 1 µg/ml: 54,01 % ± 7,03 %,  $p < 0,01$ ; 10 µg/ml: 52,48 % ± 10,91 %,  $p < 0,05$ ) (Abb. 9).

a) 1. Tag nach der initialen Wunde

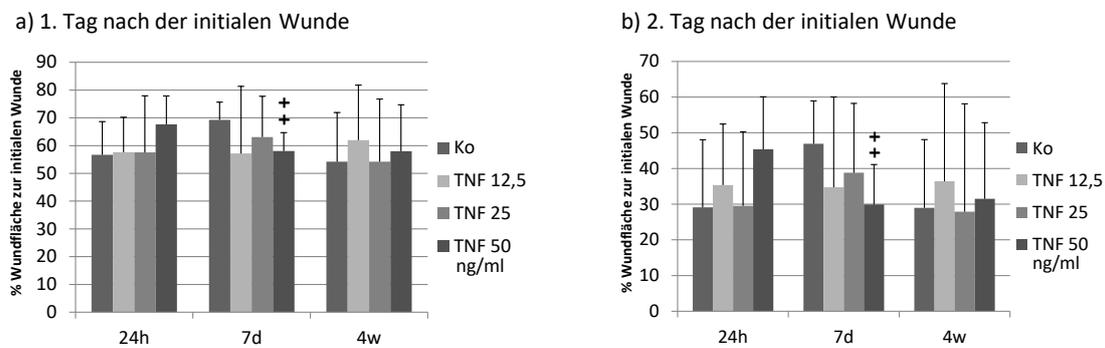


b) 2. Tag nach der initialen Wunde



**Abbildung 9: Wundheilung unter dem Einfluss von Poly I:C.** Dargestellt ist die noch vorhandene Wundfläche in Prozent zur initialen Wunde nach 24 h (a) (1. Tag) und 48 h (b) (2. Tag) nach Behandlung mit Poly I:C (1, 10, 100 µg/ml) für 24 Stunden, sieben Tage oder vier Wochen. Am 1. und 2. Tag nach der initialen Wunde war die Wundheilung durch die vierwöchige Stimulation mit 10 µg/ml Poly I:C signifikant verlangsamt. Am 2. Tag zeigte sich auch nach vierwöchiger Stimulation mit 1 µg/ml Poly I:C sowie nach siebentägiger Stimulation mit 100 µg/ml Poly I:C eine signifikante Abnahme der Wundheilung. Alle weiteren getesteten Konzentrationen und Zeitpunkte zeigten keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-test berechnet, \* = signifikant verlangsamt  $p < 0,05$ , \*\* mit  $p < 0,01$ ,  $n = 9$ . Ko = Kontrolle, Poly/ Poly I:C = Polyinosinsäure:Polycytidylsäure, h = Stunden, d = Tage, w = Wochen (nach Klettner et al. 2020).

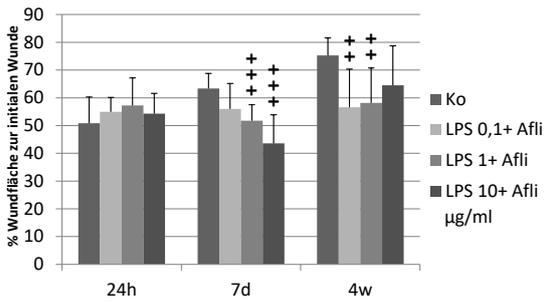
Die kurzfristige Behandlung mit TNF $\alpha$  hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Wundheilung. Nach der siebentägigen Behandlung führte die höchste getestete Konzentration von TNF $\alpha$  zu einer signifikanten Beschleunigung der Wundheilung an beiden Messzeitpunkten (1. Tag: Ko: 69,26 %  $\pm$  6,38 %; 50 ng/ml: 58,03 %  $\pm$  6,66 %,  $p < 0,003$ ; 2. Tag: Ko: 46,93 %  $\pm$  12,01 %; 50 ng/ml: 29,90 %  $\pm$  11,27 %,  $p < 0,01$ ). Nach vierwöchiger Stimulation mit TNF $\alpha$  zeigte sich kein signifikanter Einfluss (Abb. 10).



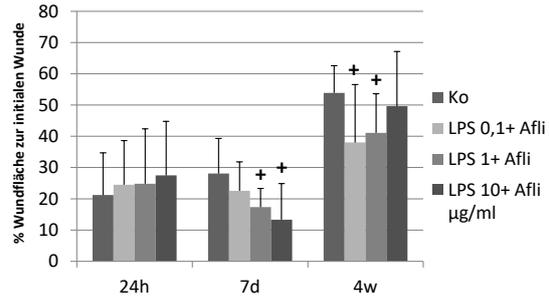
**Abbildung 10: Wundheilung unter dem Einfluss von TNF $\alpha$ .** Dargestellt ist die noch vorhandene Wundfläche in Prozent zur initialen Wunde nach 24 h (a) (1. Tag) und 48 h (b) (2. Tag) nach Behandlung mit TNF $\alpha$  (12,5, 25, 50 ng/ml) für 24 Stunden, sieben Tage oder vier Wochen. Nach der siebentägigen Stimulation mit 50 ng/ml TNF $\alpha$  zeigte sich eine signifikante Beschleunigung der Wundheilung an beiden Messtagen. Alle weiteren getesteten Konzentrationen und Zeitpunkte zeigten keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-test berechnet, ++ = signifikant beschleunigt mit  $p < 0,01$ ,  $n = 9$ . Ko = Kontrolle, TNF/ TNF $\alpha$  = Tumornekrosefaktor  $\alpha$ , h = Stunden, d = Tage, w = Wochen (nach Klettner et al. 2020).

Wie LPS allein führte auch die Kombination von LPS und Aflibercept über 24 Stunden zu keinem signifikanten Einfluss. Nach sieben Tagen und vier Wochen zeigte sich an beiden Tagen nach der initialen Verletzung eine Beschleunigung der Wundheilung. Nach sieben Tagen war es für 1  $\mu$ g/ml und 10  $\mu$ g/ml LPS in Verbindung mit Aflibercept signifikant (7 Tage: 1. Tag: Ko: 63,35 %  $\pm$  5,43 %; 1  $\mu$ g/ml + Afli: 51,76 %  $\pm$  5,70 %,  $p < 0,001$ ; 10  $\mu$ g/ml + Afli: 43,60 %  $\pm$  10,25 %,  $p < 0,001$ ; 2. Tag: Ko: 28,08 %  $\pm$  11,25 %; 1  $\mu$ g/ml + Afli: 17,34 %  $\pm$  5,95 %,  $p < 0,03$ ; 10  $\mu$ g/ml + Afli: 13,29 %  $\pm$  11,59 %,  $p < 0,02$ ). Nach vier Wochen war die Wundheilung durch die Stimulation mit 0,1  $\mu$ g/ml und 1  $\mu$ g/ml LPS zusammen mit Aflibercept signifikant beschleunigt (4 Wochen: 1. Tag: Ko: 75,27 %  $\pm$  6,31 %; 0,1  $\mu$ g/ml + Afli: 56,60 %  $\pm$  13,74 %,  $p < 0,002$ ; 1  $\mu$ g/ml + Afli: 58,14 %  $\pm$  12,59 %,  $p < 0,003$ ; 2. Tag: Ko: 53,92 %  $\pm$  8,71 %; 0,1  $\mu$ g/ml + Afli: 38,01 %  $\pm$  18,57 %,  $p < 0,04$ , 1  $\mu$ g/ml + Afli: 41,08 %  $\pm$  12,57 %,  $p < 0,03$ ) (Abb. 11).

a) 1. Tag nach der initialen Wunde



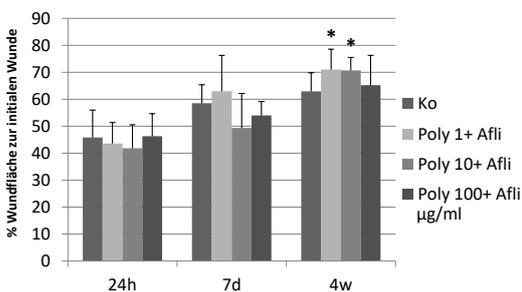
b) 2. Tag nach der initialen Wunde



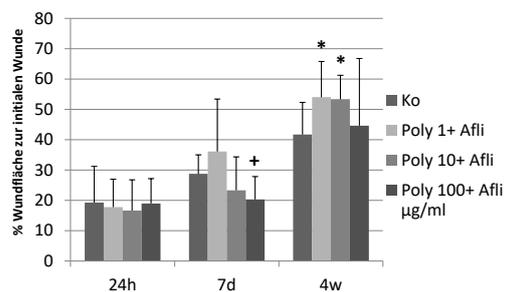
**Abbildung 11: Wundheilung unter dem Einfluss von Aflibercept in Kombination mit LPS.** Dargestellt ist die noch vorhandene Wundfläche in Prozent zur initialen Wunde nach 24 h (a) (1. Tag) und 48 h (b) (2. Tag) nach Behandlung mit Aflibercept (250 µg/ml) in Kombination mit unterschiedlichen Konzentrationen von LPS (0,1, 1, 10 µg/ml) für 24 Stunden, sieben Tage oder vier Wochen. An beiden Messzeitpunkten heilten die RPE Zellen nach siebentägiger Ko-Stimulation mit 1 und 10 µg/ml LPS und Aflibercept sowie mit 0,1 und 1 µg/ml LPS und Aflibercept über vier Wochen signifikant schneller als die Kontrolle. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-test berechnet, + = signifikant beschleunigt mit  $p < 0,05$ , ++ mit  $p < 0,01$  und +++ mit  $p < 0,001$ ,  $n = 9$ . Ko = Kontrolle, Afli = Aflibercept, LPS = Lipopolysaccharid, h = Stunden, d = Tage, w = Wochen.

Die Kurzzeitbehandlung mit Aflibercept zusammen mit Poly I:C hatte keinen Einfluss auf die Wundheilung. Aflibercept führte durch die siebentägige Ko-Stimulation mit der höchsten getesteten Konzentration von Poly I:C zu einer signifikanten Beschleunigung der Wundheilung am zweiten Tag nach der initialen Wunde (2. Tag: Ko: 28,74 % ± 6,30 %; 100 µg/ml + Afli: 20,33 % ± 7,51 %,  $p < 0,02$ ). Durch die vierwöchige Ko-Stimulation von Aflibercept mit 1 µg/ml oder 10 µg/ml Poly I:C war die Wundheilung an beiden Messtagen signifikant verlangsamt (1. Tag: Ko: 62,93 % ± 6,88 %; 1 µg/ml + Afli: 70,96 % ± 7,58 %,  $p < 0,04$ ; 10 µg/ml + Afli: 70,71 % ± 4,83 %,  $p < 0,02$ ; 2. Tag: Ko: 41,71 % ± 10,59 %; 1 µg/ml + Afli: 54,06 % ± 11,74 %,  $p < 0,04$ ; 10 µg/ml + Afli: 53,39 % ± 7,83 %,  $p < 0,02$ ) (Abb. 12).

a) 1. Tag nach der initialen Wunde

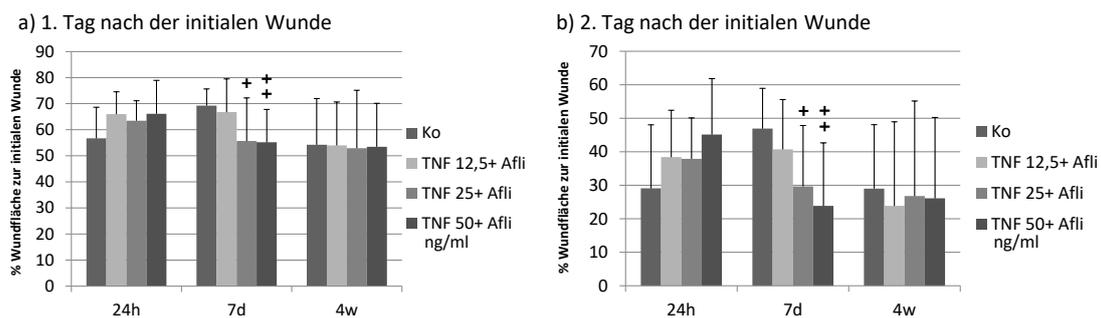


b) 2. Tag nach der initialen Wunde



**Abbildung 12: Wundheilung unter dem Einfluss von Aflibercept in Kombination mit Poly I:C.** Dargestellt ist die noch vorhandene Wundfläche in Prozent zur initialen Wunde nach 24 h (a) (1. Tag) und 48 h (b) (2. Tag) nach Behandlung mit Aflibercept (250 µg/ml) in Kombination mit unterschiedlichen Konzentrationen von Poly I:C (1, 10, 100 µg/ml) für 24 Stunden, sieben Tage oder vier Wochen. Am 2. Tag war die Wundheilung nach siebentägiger Stimulation mit 100 µg/ml Poly I:C und Aflibercept signifikant beschleunigt. An beiden Messtagen war die Wundheilung des RPE nach vierwöchiger Behandlung mit 1 und 10 µg/ml Poly I:C und Aflibercept signifikant langsamer als bei der Kontrolle. Alle weiteren getesteten Konzentrationen und Zeitpunkte zeigten keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-test berechnet, \* = signifikant verlangsamt mit  $p < 0,05$ , + = signifikant beschleunigt mit  $p < 0,05$ ,  $n = 9$ . Ko = Kontrolle, Afli = Aflibercept, Poly/ Poly I:C = Polyinosinsäure: Polycytidylsäure, h = Stunden, d = Tage, w = Wochen.

Die kurzzeitige Behandlung des RPE mit TNF $\alpha$  in Verbindung mit Aflibercept hatte unabhängig von der eingesetzten Konzentration keinen Einfluss auf die Wundheilung. Nach einwöchiger Behandlung beschleunigte TNF $\alpha$  in der mittleren und höchsten getesteten Konzentration in Verbindung mit Aflibercept die Wundheilung an beiden Messtagen nach der initialen Wunde (1. Tag Ko: 69,26 %  $\pm$  6,38 %; 25 ng/ml + Afli: 55,70 %  $\pm$  16,50 %,  $p < 0,04$ ; 50 ng/ml + Afli: 55,18 %  $\pm$  12,61 %,  $p < 0,01$ ; 2. Tag: Ko: 46,93 %  $\pm$  12,01 %; 25 ng/ml + Afli: 29,67 %  $\pm$  18,17 %,  $p < 0,03$ ; 50 ng/ml + Afli: 23,87 %  $\pm$  18,79 %,  $p < 0,007$ ). Die vierwöchige Ko-Stimulation von Aflibercept und TNF $\alpha$  hatte keinen Einfluss auf die Wundheilung (Abb. 13).

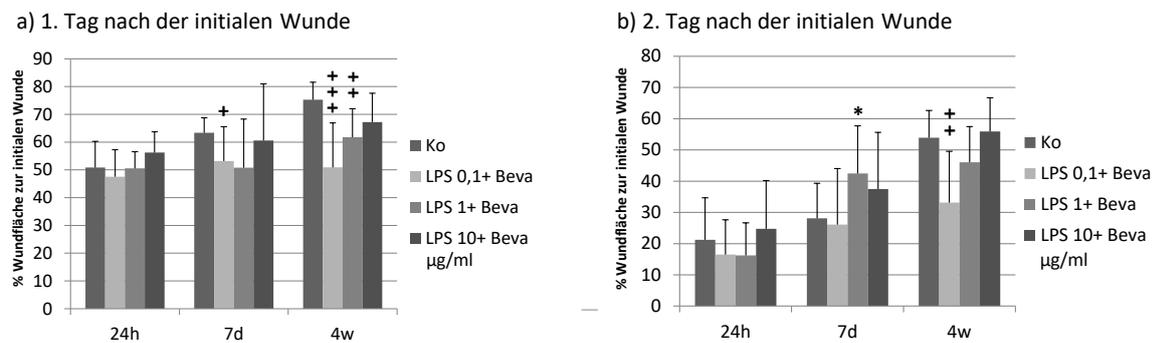


**Abbildung 13: Wundheilung unter dem Einfluss von Aflibercept in Kombination mit TNF $\alpha$ .** Dargestellt ist die noch vorhandene Wundfläche in Prozent zur initialen Wunde nach 24 h (a) (1. Tag) und 48 h (b) (2. Tag) nach Behandlung mit Aflibercept (250  $\mu$ g/ml) in Kombination mit unterschiedlichen Konzentrationen von TNF $\alpha$  (12,5, 25, 50 ng/ml) für 24 Stunden, sieben Tage oder vier Wochen. An beiden Messtagen war die Wundheilung nach siebentägiger Stimulation mit 25 und 50 ng/ml zusammen mit Aflibercept signifikant beschleunigt. Alle weiteren getesteten Konzentrationen und Zeitpunkte zeigten keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-test berechnet, + = signifikant beschleunigt mit  $p < 0,05$ , ++ mit  $p < 0,01$ ,  $n = 9$ . Ko = Kontrolle, Afli = Aflibercept, TNF $\alpha$ / TNF = Tumornekrosefaktor  $\alpha$ , h = Stunden, d = Tage, w = Wochen.

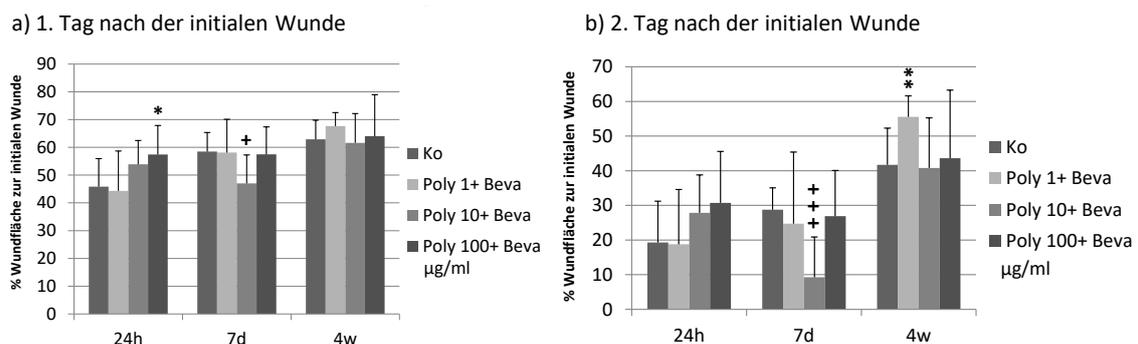
Die Behandlung des RPE mit Bevacizumab und LPS hatte keinen kurzfristigen Einfluss auf die Wundheilung. Nach sieben Tagen war die Wundheilung durch die Ko-Stimulation von 0,1  $\mu$ g/ml LPS mit Bevacizumab nur am ersten Messtag signifikant beschleunigt (1. Tag: Ko: 63,35 %  $\pm$  5,43 %; 0,1  $\mu$ g/ml + Beva: 53,19 %  $\pm$  12,36 %,  $p < 0,04$ ). Am zweiten Tag führte 1  $\mu$ g/ml LPS in Verbindung mit Bevacizumab zu einer signifikanten Abnahme der Wundheilung (2. Tag: Ko: 28,08 %  $\pm$  11,25 %; 1  $\mu$ g/ml + Beva: 42,48 %  $\pm$  15,26 %,  $p < 0,04$ ). Nach vierwöchiger Ko-Stimulation von Bevacizumab mit 0,1 oder 1  $\mu$ g/ml LPS war die Wundheilung am beiden Tagen signifikant beschleunigt, allerdings war es am zweiten Tag nur noch für die niedrigste Konzentration von LPS signifikant (1. Tag: Ko: 75,27 %  $\pm$  6,31 %; 0,1  $\mu$ g/ml + Beva: 50,91 %  $\pm$  16,03 %,  $p < 0,001$ ; 1  $\mu$ g/ml + Beva: 61,76 %  $\pm$  10,25 %,  $p < 0,004$ ; 2. Tag: Ko: 53,92 %  $\pm$  8,71 %; 0,1  $\mu$ g/ml + Beva: 33,18 %  $\pm$  16,38 %,  $p < 0,005$ ) (Abb. 14).

Die Kombinationen aus Bevacizumab und Poly I:C hatten wenig Einfluss auf die Wundheilung. Durch die 24-stündige Ko-Stimulation von Bevacizumab mit 100  $\mu$ g/ml Poly I:C war die Wundheilung in der frühen Phase (1. Tag) signifikant verlangsamt (1. Tag: Ko: 45,84 %  $\pm$  10,12 %; 100  $\mu$ g/ml + Beva: 57,43

% ± 10,46 %, p < 0,03). Nach einwöchiger Behandlung mit 10 µg/ml Poly I:C in Verbindung mit Bevacizumab wurde die Wundheilung an beiden Messtagen signifikant beschleunigt (1. Tag: Ko: 58,50 % ± 6,86 %; 10 µg/ml + Beva: 47,05 % ± 10,21 %, p < 0,02; 2. Tag: Ko: 28,74 % ± 6,30 %; 10 µg/ml + Beva: 9,24 % ± 11,63 %, p < 0,001). Nach vier Wochen führte nur 1 µg/ml zusammen mit Bevacizumab am zweiten Tag nach der initialen Wunde zu einer signifikanten Abnahme der Wundheilung (2. Tag: Ko: 41,71 % ± 10,59 %; 1 µg/ml + Beva: 55,55 % ± 6,07 %, p < 0,004) (Abb. 15).

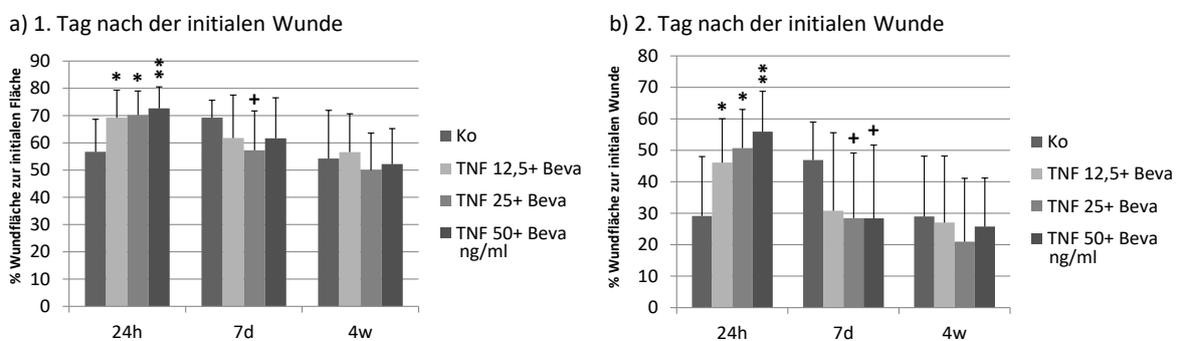


**Abbildung 14: Wundheilung unter dem Einfluss von Bevacizumab in Kombination mit LPS.** Dargestellt ist die noch vorhandene Wundfläche in Prozent zur initialen Wunde nach 24 h (a) (1. Tag) und 48 h (b) (2. Tag) nach Behandlung mit Bevacizumab (250 µg/ml) und unterschiedlichen Konzentrationen von LPS (0,1, 1, 10 µg/ml) für 24 Stunden, sieben Tage oder vier Wochen. Am 1. Tag heilten die RPE Zellen nach siebentägiger Behandlung mit 0,1 µg/ml LPS und Bevacizumab sowie nach vierwöchiger Stimulation mit 0,1 und 1 µg/ml LPS und Aflibercept signifikant schneller als die Kontrolle. Am 2. Tag war die Wundheilung nach siebentägiger Stimulation mit 1 µg/ml LPS und Bevacizumab verlangsamt. Durch die vierwöchige Stimulation mit 0,1 µg/ml LPS und Bevacizumab war sie weiterhin signifikant beschleunigt. Alle weiteren getesteten Konzentrationen und Zeitpunkte zeigten keinen signifikanten Unterschied. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-test berechnet, \* = signifikant verlangsamt mit p < 0,05, + = signifikant beschleunigt mit p < 0,05, ++ mit p < 0,01, +++ mit p < 0,001, n = 9. Ko = Kontrolle, Beva = Bevacizumab, LPS = Lipopolysaccharid, h = Stunden, d = Tage, w = Wochen.



**Abbildung 15: Wundheilung unter dem Einfluss von Bevacizumab in Kombination mit Poly I:C.** Dargestellt ist die noch vorhandene Wundfläche in Prozent zur initialen Wunde nach 24 h (a) (1. Tag) und 48 h (b) (2. Tag) nach Behandlung mit Bevacizumab (250 µg/ml) mit unterschiedlichen Konzentrationen von Poly I:C (1, 10, 100 µg/ml) für 24 Stunden, sieben Tage oder vier Wochen. Am 1. Tag zeigte sich die Wundheilung nach 24-stündiger Stimulation mit 100 µg/ml Poly I:C mit Bevacizumab signifikant verlangsamt. An beiden Messtagen heilte das RPE nach siebentägiger Stimulation mit 10 µg/ml Poly I:C mit Bevacizumab signifikant schneller. Am 2. Tag war die Wundheilung nach vierwöchiger Stimulation mit 1 µg/ml Poly I:C mit Bevacizumab signifikant verlangsamt. Alle weiteren getesteten Konzentrationen und Zeitpunkte zeigten keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-test berechnet, + = signifikant beschleunigt mit p < 0,05, +++ mit p < 0,001, \* = signifikant verlangsamt mit p < 0,05, \*\* mit p < 0,01, n = 9. Ko = Kontrolle, Beva = Bevacizumab, Poly/ Poly I:C = Polyinosinsäure: Polycytidylsäure, h = Stunden, d = Tage, w = Wochen.

Jede getestete TNF $\alpha$ -Konzentration führte durch die 24-stündige Ko-Stimulation mit Bevacizumab zu einer signifikanten Abnahme der Wundheilung an beiden Messtagen (1. Tag: Ko: 56,71 %  $\pm$  11,95 %, 12,5 ng/ml + Beva: 69,26 %  $\pm$  10,07 %,  $p < 0,03$ ; 25 ng/ml + Beva: 70,18 %  $\pm$  8,85 %,  $p < 0,02$ , 50 ng/ml + Beva: 72,67 %  $\pm$  7,91 %,  $p < 0,005$ ; 2. Tag: Ko: 29,11 %  $\pm$  18,93 %, 12,5 ng/ml + Beva: 46,10 %  $\pm$  13,91 %,  $p < 0,05$ ; 25 ng/ml + Beva: 50,69 %  $\pm$  12,29 %,  $p < 0,02$ , 50 ng/ml + Beva: 55,95 %  $\pm$  12,80 %,  $p < 0,003$ ). Nach sieben Tagen zeigte sich am ersten Tag eine Beschleunigung der Wundheilung durch 25 ng/ml TNF $\alpha$  in Verbindung mit Bevacizumab (1. Tag: Ko: 69,26 %  $\pm$  6,38 %; 25 ng/ml + Beva: 57,29 %  $\pm$  14,45 %,  $p < 0,04$ ). Am zweiten Tag führten sowohl die mittlere als auch die höchste getestete Konzentration von TNF $\alpha$  zusammen mit Bevacizumab zu einer beschleunigten Wundheilung (2. Tag: Ko: 46,93 %  $\pm$  12,01 %; 25 ng/ml + Beva: 28,45 %  $\pm$  20,70 %,  $p < 0,04$ ; 50 ng/ml + Beva: 28,36 %  $\pm$  23,27 %,  $p < 0,05$ ). Die vierwöchige Behandlung hatte keinen Einfluss auf die Wundheilung (Abb. 16).

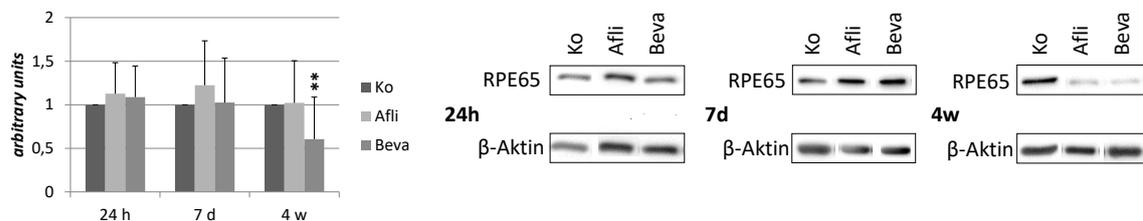


**Abbildung 16: Wundheilung unter dem Einfluss von Bevacizumab in Kombination mit TNF $\alpha$ .** Dargestellt ist die noch vorhandene Wundfläche in Prozent zur initialen Wunde nach 24 h (a) (1. Tag) und 48 h (b) (2. Tag) nach Behandlung mit Bevacizumab (250  $\mu$ g/ml) mit unterschiedlichen Konzentrationen von TNF $\alpha$  (12,5, 25, 50 ng/ml) für 24 Stunden, sieben Tage oder vier Wochen. An beiden Messtagen war die Wundheilung nach 24-stündiger Stimulation mit jeder getesteten TNF $\alpha$ -Konzentration zusammen mit Bevacizumab signifikant verlangsamt. Nach siebentägiger Stimulation mit 12,5 und 25 ng/ml TNF $\alpha$  und Bevacizumab zeigte sich am 2. Messtag eine signifikante Beschleunigung der Wundheilung, die bei 25 ng/ml auch schon am 1. Tag signifikant war. Alle weiteren getesteten Konzentrationen und Zeitpunkte zeigten keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-test berechnet, + = signifikant beschleunigt mit  $p < 0,05$ , \* = signifikant verlangsamt mit  $p < 0,05$ , \*\* mit  $p < 0,01$ ,  $n = 9$ . Ko = Kontrolle, Beva = Bevacizumab, TNF $\alpha$ / TNF = Tumornekrosefaktor  $\alpha$ , h = Stunden, d = Tage, w = Wochen.

Insgesamt wurde die Wundheilung durch die VEGF-Inhibitoren nur wenig beeinflusst. Unter den Entzündungsmediatoren führte die Langzeitbehandlung mit LPS eher zu einer Beschleunigung der Wundheilung, die in Kombination mit Aflibercept auch schon nach einwöchiger Stimulation signifikant war. Die langfristige Stimulation mit Poly I:C führte eher zu einer verzögerten Wundheilung. TNF $\alpha$  hatte keine Langzeiteffekte, während die mittelfristige Stimulation zu einer Beschleunigung der Wundheilung führte, die auch durch die Kombination mit den VEGF-Inhibitoren zu beobachten war. Zudem führte die kurzfristige Ko-Stimulation von TNF $\alpha$  mit Bevacizumab zu einer verlangsamt Wundheilung.

### 3.4 Expression von RPE65

Das RPE-spezifische Enzym RPE65 ist obligat für das Recycling des Sehpigments und damit für die Aufrechterhaltung des Sehens (Redmond et al. 1998; Strauss 2005). Um den Einfluss von Inflammation und VEGF-Inhibitoren auf die RPE65 Expression zu untersuchen, wurde der RPE65 Gehalt nach 24-stündiger, siebentägiger oder vierwöchiger Stimulation im Western Blot gemessen. In den folgenden Diagrammen ist der Gehalt von RPE65 auf den  $\beta$ -Aktin Gehalt (als Ladekontrolle) normalisiert dargestellt. Die unbehandelte Kontrolle exprimiert zu jedem Zeitpunkt RPE65 und wurde als Referenz auf eins gesetzt. Aflibercept hatte unabhängig von der Stimulationsdauer keinen signifikanten Einfluss auf den RPE65 Gehalt. Ebenso verhielt es sich für Bevacizumab nach 24 Stunden und sieben Tagen. Allerdings führte die Langzeitbehandlung mit Bevacizumab zu einer signifikanten Abnahme der RPE65 Expression ( $0,60 \pm 0,48$ ,  $p < 0,01$ ) (Abb. 17).

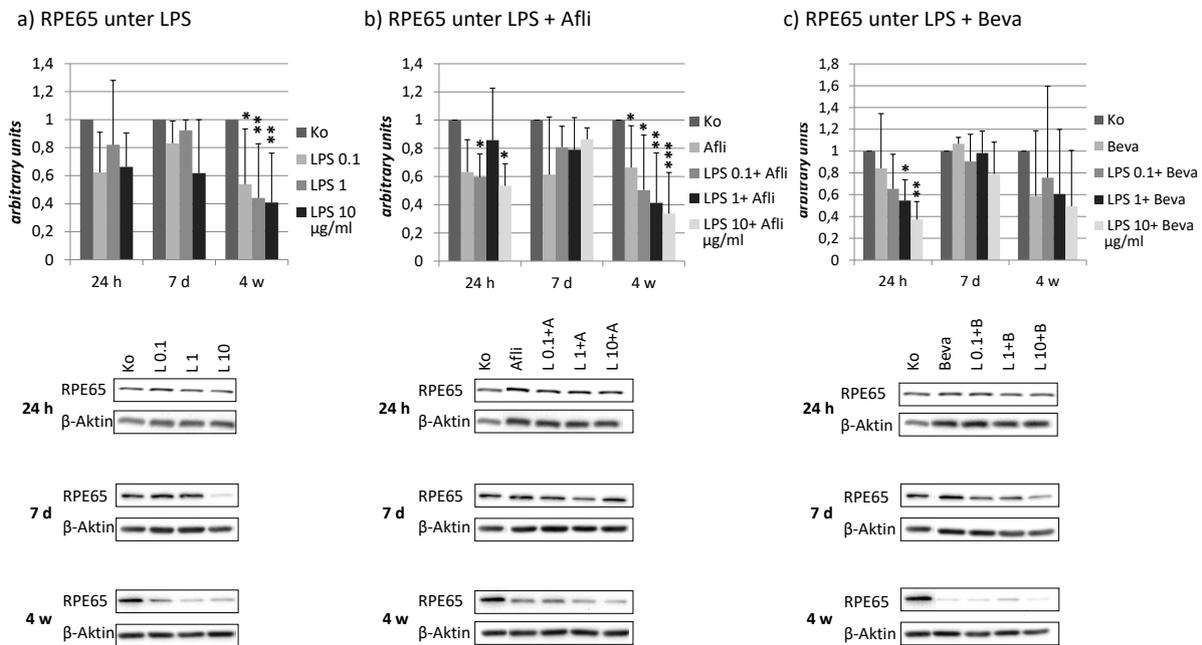


**Abbildung 17: RPE65 Expression unter VEGF-Inhibitoren.** Dargestellt ist der Gehalt an RPE65 normalisiert auf  $\beta$ -Aktin nach Stimulation mit Aflibercept (250  $\mu\text{g/ml}$ ) oder Bevacizumab (250  $\mu\text{g/ml}$ ) für 24 Stunden, sieben Tage oder vier Wochen. Nach der vierwöchigen Behandlung mit Bevacizumab war der Gehalt an RPE65 signifikant reduziert. Die kurz- und mittelfristige Stimulation mit Bevacizumab sowie jede getestete Stimulationsdauer von Aflibercept hatten keinen signifikanten Einfluss. Die dargestellten Banden sind Beispielbilder vom Western Blot für RPE65 bei circa 65 kDa und für die Ladekontrolle  $\beta$ -Aktin bei circa 42 kDa. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-test berechnet. \*\* = signifikant mit  $p < 0,01$ ,  $n = 10 - 13$ . Ko = Kontrolle, Afli = Aflibercept, Beva = Bevacizumab, h = Stunden, d = Tage, w = Wochen (nach Brinkmann et al. 2021).

Von den getesteten Entzündungsmediatoren hatte die Stimulation mit LPS über 24 Stunden oder sieben Tage keinen signifikanten Einfluss auf die RPE65 Expression. Die Langzeitbehandlung mit LPS reduzierte den RPE65 Gehalt für jede der eingesetzten Konzentrationen (0,1  $\mu\text{g/ml}$ :  $0,54 \pm 0,39$ ,  $p < 0,03$ ; 1  $\mu\text{g/ml}$ :  $0,44 \pm 0,39$ ,  $p < 0,01$ ; 10  $\mu\text{g/ml}$ :  $0,41 \pm 0,35$ ,  $p < 0,004$ ) (Abb. 18a).

In Verbindung mit Aflibercept führte die niedrigste und höchste getestete Konzentration von LPS nach 24-stündiger Ko-Stimulation zu einer Abnahme von RPE65 (0,1  $\mu\text{g/ml}$ :  $0,60 \pm 0,16$ ,  $p < 0,03$ ; 10  $\mu\text{g/ml}$ :  $0,53 \pm 0,16$ ,  $p < 0,02$ ). Von den getesteten siebentägigen Kombinationen aus Aflibercept und LPS führte keine zu einer signifikanten Veränderung. Wie LPS allein, führte auch die langfristige Ko-Stimulation von Aflibercept mit jeder getesteten LPS Konzentration zu einer signifikanten Reduktion der RPE65 Expression (0,1  $\mu\text{g/ml}$  + Afli:  $0,50 \pm 0,39$ ,  $p < 0,02$ ; 1  $\mu\text{g/ml}$  + Afli:  $0,41 \pm 0,35$ ,  $p < 0,004$ ; 10  $\mu\text{g/ml}$  + Afli:  $0,34 \pm 0,29$ ,  $p < 0,0005$ ) (Abb. 18b).

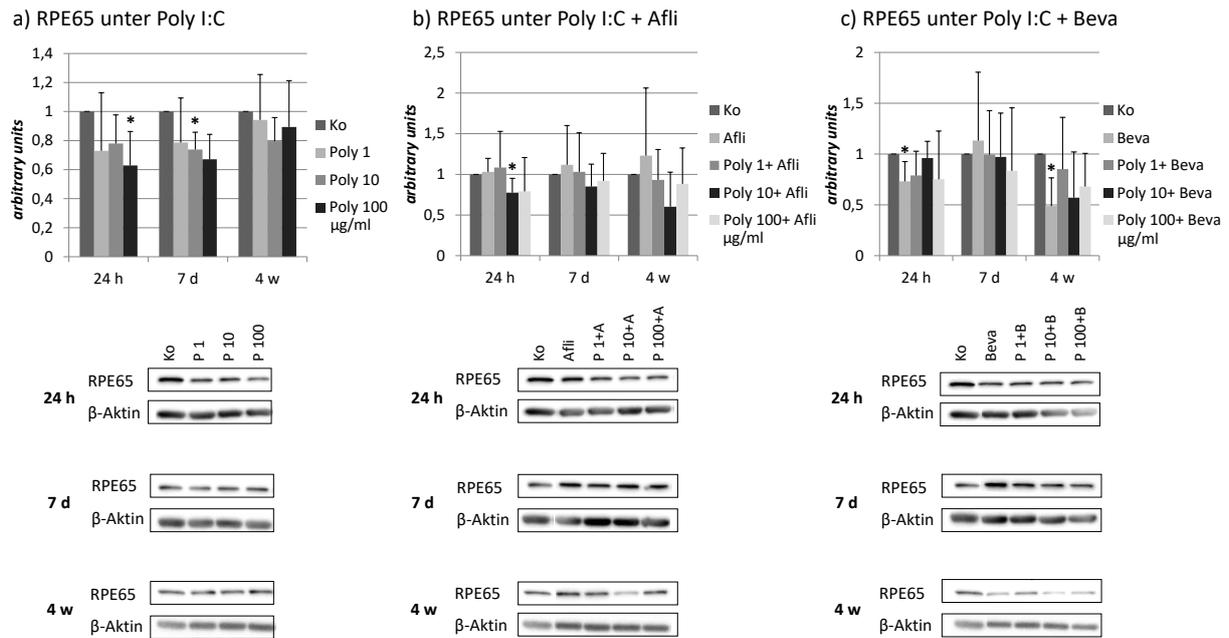
In Kombination mit Bevacizumab senkten die mittlere und höchste getestete Konzentration von LPS nach 24 Stunden die RPE65 Expression (1 µg/ml: 0,55 ± 0,19, p < 0,03; 10 µg/ml: 0,37 ± 0,16, p < 0,006). Die mittel- oder langfristige Stimulation mit LPS zusammen mit Bevacizumab hatte keinen signifikanten Einfluss auf den RPE65 Gehalt (Abb. 18c).



**Abbildung 18: RPE65 Expression unter LPS und VEGF-Inhibitoren.** Dargestellt ist der Gehalt an RPE65 normalisiert auf  $\beta$ -Aktin nach Stimulation mit a) LPS (0,1, 1, 10 µg/ml), der Kombination von b) LPS und Aflibercept (250 µg/ml) bzw. c) LPS und Bevacizumab (250 µg/ml) für 24 Stunden, sieben Tage oder vier Wochen. Die vierwöchige Stimulation mit LPS senkte den Gehalt an RPE65 signifikant für alle eingesetzten Konzentrationen. In Kombination mit Aflibercept war der Unterschied zur Kontrolle nach 24 Stunden mit 0,1 und 1 µg/ml LPS und nach vier Wochen mit allen Konzentrationen signifikant. Aflibercept senkte den RPE65 Gehalt nach vierwöchiger Stimulation. Bevacizumab führte nur nach 24 Stunden in Kombination mit 1 und 10 µg/ml LPS zu einer signifikanten Reduktion des Proteins. Die dargestellten Banden sind Beispielbilder vom Western Blot für RPE 65 bei circa 65 kDa und für die Ladekontrolle  $\beta$ -Aktin bei circa 42 kDa. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-test berechnet, \* = signifikant mit p < 0,05, \*\* mit p < 0,01, \*\*\* mit p < 0,001, n = 3 - 6. Ko = Kontrolle, LPS/L = Lipopolysaccharid, Afli/A = Aflibercept, Beva/B = Bevacizumab, h = Stunden, d = Tage, w = Wochen (nach Klettner et al. 2020).

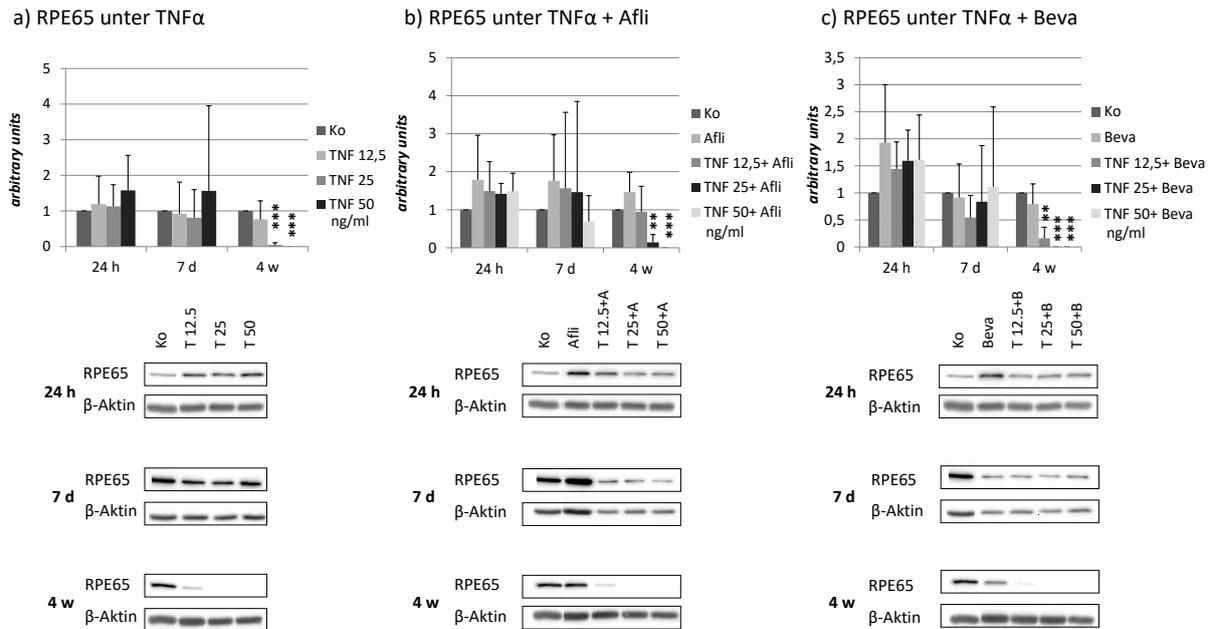
Die kurzfristige Stimulation mit Poly I:C führte zu einer Abnahme der RPE65 Expression, die für 10 µg/ml Poly I:C nur ein Trend und für 100 µg/ml Poly I:C signifikant war (10 µg/ml: 0,78 ± 0,20, p < 0,06; 100 µg/ml: 0,63 ± 0,23, p < 0,02). Nach siebentägiger Stimulation war die Reduktion des RPE65 Gehalts durch 10 µg/ml Poly I:C signifikant, während es durch 100 µg/ml Poly I:C nur ein Trend war (10 µg/ml: 0,74 ± 0,12, p < 0,04; 100 µg/ml: 0,67 ± 0,17, p < 0,06). Die Langzeitbehandlung mit Poly I:C hatte keinen signifikanten Einfluss auf die RPE65 Expression (Abb. 19a).

In Kombination mit den VEGF-Inhibitoren führte nur die Kombination von Aflibercept mit 10 µg/ml Poly I:C über 24 Stunden zu einer signifikanten Abnahme (10 µg/ml: 0,78 ± 0,18, p < 0,04). Alle anderen getesteten Zeitpunkte und Kombination hatten keinen signifikanten Einfluss (Abb. 19 b-c).



**Abbildung 19: RPE65 Expression unter Poly I:C und VEGF-Inhibitoren.** Dargestellt ist der Gehalt an RPE65 normalisiert auf  $\beta$ -Aktin nach Stimulation mit a) Poly I:C (1, 10, 100  $\mu\text{g/ml}$ ), der Kombination von b) Poly I:C und Aflibercept (250  $\mu\text{g/ml}$ ) bzw. c) Poly I:C und Bevacizumab (250  $\mu\text{g/ml}$ ) für 24 Stunden, sieben Tage oder vier Wochen. Poly I:C reduzierte nach 24-stündiger Stimulation mit 100  $\mu\text{g/ml}$  sowie nach einwöchiger Stimulation mit 10  $\mu\text{g/ml}$  die RPE65 Expression signifikant. Nur die Kombination von 10  $\mu\text{g/ml}$  Poly I:C mit Aflibercept über 24 Stunden führte zu einer signifikanten Reduktion von RPE65. Die Kombinationen aus Bevacizumab und Poly I:C hatten keinen signifikanten Einfluss. Die Stimulation mit Bevacizumab für 24 Stunden und vier Wochen allein senkte den RPE65 Gehalt signifikant. Die dargestellten Banden sind Beispielbilder vom Western Blot für RPE65 bei circa 65 kDa und für die Ladekontrolle  $\beta$ -Aktin bei circa 42 kDa. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-test berechnet, \* = signifikant mit  $p < 0,05$ ,  $n = 3 - 5$ . Ko = Kontrolle, Poly/P/Poly I:C = Polyinosinsäure: Polycytidylsäure, Afli/A = Aflibercept, Beva/B = Bevacizumab, h = Stunden, d = Tage, w = Wochen (nach Klettner et al. 2020)

TNF $\alpha$  hatte keinen kurz- oder mittelfristigen Einfluss auf die Expression von RPE65. Nach vier Wochen führte TNF $\alpha$  ab einer Konzentration von 25 ng/ml zu einer signifikanten Reduktion (25 ng/ml:  $0,04 \pm 0,06$ ,  $p < 0,0001$ ). Bei der höchsten getesteten Konzentration war RPE65 im Western Blot nicht mehr nachweisbar (50 ng/ml:  $0$ ,  $p < 7 \cdot 10^{-38}$ ) (Abb. 20a). Ebenso verhielt es sich bei der Kombination von 25 und 50 ng/ml TNF $\alpha$  mit Aflibercept (25 ng/ml:  $0,14 \pm 0,20$ ,  $p < 0,004$ ; 50 ng/ml:  $0$ ,  $p < 7 \cdot 10^{-38}$ ) (Abb. 20b). Zusammen mit Bevacizumab führte sogar die geringste getestete TNF $\alpha$ -Konzentration zu einer signifikanten Abnahme und in höherer Konzentration zum Verlust der RPE65 Expression (12,5 ng/ml:  $0,16 \pm 0,20$ ,  $p < 0,005$ ; 25 ng/ml:  $0$ ,  $p < 7 \cdot 10^{-30}$ ; 50 ng/ml:  $0$ ,  $p < 7 \cdot 10^{-38}$ ) (Abb. 20c).



**Abbildung 20: RPE65 Expression unter TNF $\alpha$  und VEGF-Inhibitoren.** Dargestellt ist der Gehalt an RPE65 normalisiert auf  $\beta$ -Aktin nach Stimulation mit a) TNF $\alpha$  (12,5, 25, 50 ng/ml), der Kombination von b) TNF $\alpha$  und Aflibercept (250  $\mu$ g/ml) bzw. c) TNF $\alpha$  und Bevacizumab (250  $\mu$ g/ml) für 24 Stunden, sieben Tage oder vier Wochen. Die Stimulation mit TNF $\alpha$  über 4 Wochen allein sowie in Kombination mit Aflibercept oder Bevacizumab führte ab einer Konzentration von 25 ng/ml TNF $\alpha$  zu einer deutlichen, signifikanten Reduktion der RPE65 Expression. Bevacizumab führte in Kombination mit 12,5 ng/ml TNF $\alpha$  ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion. Bei allen anderen gemessenen Zeitpunkten und Konzentrationen kam es zu keinem signifikanten Unterschied zur Kontrolle. Die dargestellten Banden sind Beispielbilder vom Western Blot für RPE65 bei circa 65 kDa und für die Ladekontrolle  $\beta$ -Aktin bei circa 42 kDa. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-test berechnet, \*\* = signifikant mit  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ ,  $n = 3 - 4$ . Ko = Kontrolle, Afli/A = Aflibercept, Beva/B = Bevacizumab TNF/T/TNF $\alpha$  = Tumornekrosefaktor  $\alpha$ , h = Stunden, d = Tage, w = Wochen (nach Klettner et al. 2020).

Insgesamt hatte vor allem die Langzeitstimulation mit Bevacizumab, LPS oder TNF $\alpha$  einen massiven, reduzierenden Einfluss auf die RPE65 Expression. Der dosisabhängige Effekt von TNF $\alpha$  führte bis zum vollständigen Verlust der RPE65 Expression und wurde durch Bevacizumab noch zusätzlich verstärkt.

## 4 DISKUSSION

---

Das RPE übernimmt in seiner strategischen Lage zwischen der Neuroretina und der Choroidea wichtige Funktionen, die für die Photorezeptoren überlebensnotwendig sind (Strauss 2005). Dazu gehören der transepitheliale Transport, Phagozytose von Photorezeptoraußensegmenten, Recycling des Sehpigments, Absorption von Licht, Schutz vor oxidativen Stress, Sekretion von Wachstumsfaktoren und die Aufrechterhaltung des Immunprivilegs (vgl. Kapitel 1.2.3.) (Strauss 2005).

Viele dieser Zellfunktionen können durch altersbedingte Veränderungen beeinflusst werden und zu degenerativen Erkrankungen mit Sehverlust führen (Bhutto und Luty 2012). In Deutschland ist die AMD die häufigste (Teil-) Ursache für Sehbeeinträchtigung oder Blindheit (Wolfram et al. 2019). Altersabhängige Erkrankungen wie die AMD entstehen nicht durch einen einzelnen Schaden, sondern durch die kumulativen Veränderungen und Belastungen des Organismus (Gallenga et al. 2014). Dabei bildet Inflammation eine wichtige Schnittstelle in der Pathogenese der AMD, da Veränderungen wie Drusen, verminderter Transport, oxidativer Stress, Zelldegeneration und -untergang zu einer proinflammatorischen Aktivierung führen können (Bhutto und Luty 2012; Kauppinen et al. 2016).

Zudem stellt der Begriff *Inflamm-Aging* den direkten Zusammenhang zwischen Inflammation und Alterung dar (Franceschi et al. 2000), welcher ein bedeutender Risikofaktor für Morbidität und Mortalität ist (Franceschi und Campisi 2014). Mit steigendem Alter ist ein kontinuierlicher Anstieg von proinflammatorischen Zytokinen messbar, welcher per se mit Gesundheit und Langlebigkeit vereinbar ist, aber eine erhöhte Anfälligkeit für altersbedingte Erkrankungen darstellt (Franceschi und Campisi 2014). Es ist daher wahrscheinlich, dass das RPE im Rahmen der AMD einer ständigen, niedrigschwelligen Inflammation ausgesetzt ist (Kauppinen et al. 2016).

Zahlreiche in vitro Studien deuten auf eine Einschränkung wichtiger RPE Funktionen in einem entzündlichen Milieu hin (An et al. 2008; Klettner et al. 2013b; Kutty et al. 2016; Touhami et al. 2018; Terheyden et al. 2021), welche durch die Kombination aus mehreren proinflammatorischen Zytokinen noch weiter verstärkt werden (Kutty et al. 2016). Die Einschränkung oder der Verlust von Zellfunktionen des RPE kann zu einer schnelleren Zellaalterung und im weiteren Verlauf zum Zelluntergang führen (Strauss 2005; Klettner 2015a). Zudem wurde mit steigendem Alter ein Zellverlust von RPE beschrieben, welcher zu einer Überlastung des übrig gebliebenen RPE führen kann (Marshall 1987). Im schlimmsten Fall kann es zu einer Abwärtsspirale mit ausgedehntem Zellverlust und Atrophie kommen, die sich durch die starke Abhängigkeit der Photorezeptoren vom RPE auch auf das Überleben der Photorezeptoren auswirken könnte (Strauss 2005).

Die Entwicklung einer Atrophie ist nicht nur bei der trockenen sondern auch bei der feuchten Form der AMD unter langfristiger Anti-VEGF Therapie zu beobachten (Rofagha et al. 2013; Sadda et al. 2020). Ob der natürliche Krankheitsverlauf, Nebenwirkungen der Medikamente oder die Häufigkeit der Injektionen zu der Atrophie führen, ist bisher noch unklar (Sadda et al. 2020). Da es keine Therapie bei Atrophie gibt, ist es umso wichtiger die Pathophysiologie dahinter zu erforschen, insbesondere in Hinblick auf Langzeiteffekte auf die Funktionsfähigkeit des RPE und mögliche Interaktionen der Medikamente mit weiteren Aberrationen der AMD.

Allerdings wurden die meisten Experimente, die den Einfluss von VEGF-Inhibitoren auf zellulärer Ebene untersuchen, nur über einen kurzen Zeitraum von maximal einer Woche an gesunden/jungen Zellen durchgeführt (z.B. bei (Spitzer et al. 2007; Klettner et al. 2010; Klettner et al. 2014b; Aboul Naga et al. 2015; Sheu et al. 2015; Saenz-de-Viteri et al. 2016; Cillà et al. 2020)). Es gibt kaum Studien, die den Einfluss der VEGF-Inhibitoren in einem entzündlichen Milieu testen. Da jedoch viele Aberrationen der AMD mit einer proinflammatorischen Aktivierung einhergehen (Bhutto und Luty 2012; Kauppinen et al. 2016), sollte Inflammation in Untersuchungen zur Effektivität und Sicherheit der meist lebenslangen Therapie der neovaskulären AMD berücksichtigt werden.

Um ein besseres Verständnis von Inflammation in der Interaktion mit den RPE Funktionen zu erhalten, wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von den drei proinflammatorischen Mediatoren LPS, Poly I:C und TNF $\alpha$  allein und in Kombination mit VEGF-Inhibitoren untersucht. Die Aktivierung von TLR-3 (durch Poly I:C) und TLR-4 (durch LPS) sowie das Zytokin TNF $\alpha$  werden mit einzelnen Aspekten der Pathogenese der nAMD in Verbindung gebracht (vgl. Kapitel 1.3.2.3.) (Kauppinen et al. 2016; Wang et al. 2016; Klettner und Roider 2021; Detrick und Hooks 2020). In der vorliegenden Studie sollten diese Erkenntnisse weiter vertieft und in Kombination mit der nAMD-Therapie untersucht werden. Deshalb wurden die Langzeiteffekte der proinflammatorischen Mediatoren LPS (TLR-4 Agonist), Poly I:C (TLR-3 Agonist) und TNF $\alpha$ , der VEGF-Inhibitoren Aflibercept und Bevacizumab sowie deren Kombinationen auf wichtige Zellfunktionen untersucht.

## 4.1 Diskussion der Methoden

Im Folgenden sollen die Vorteile und Limitationen der gewählten Methoden diskutiert werden. Dabei wird zunächst die Wahl der Zellkultur und die Stimulation erläutert, während die einzelnen Methoden der Funktionsprüfung im jeweiligen Unterkapitel besprochen werden.

#### 4.1.1 Die Zellkultur

Für diese Studie wurde primäres porcines RPE verwendet. Die Präparation des RPE aus Schweineaugen und die Anzucht in Zellkulturen ist etabliert und weit verbreitet (Wiencke et al. 2003). Zudem müssen dafür keine Versuchstiere angezchtet oder speziell zu diesem Zweck getötet werden, da die Schweineaugen als Abfallprodukt der Lebensmittelverarbeitung von regionalen Schlachthöfen bezogen werden können. Dadurch kann die Zeit zwischen Enukleation und Präparation kurzgehalten werden (Klettner 2020). Unter den Nicht-Primaten scheint das Schweineauge die größte anatomische Ähnlichkeit mit dem menschlichen Auge zu haben. Beide haben einen zehnschichtigen Aufbau der Retina, mit einer vergleichbaren Dicke der Retina und einer ähnlichen Verteilung von Zapfen und Stäbchen, weshalb sie als Modell für retinale Pathologien gut geeignet sind (Sanchez et al. 2011; Schnichels et al. 2021). Allerdings hat das Schweineauge, genauso wie alle anderen Nicht-Primaten, keine Makula. Die Area centralis ist bei Schweinen der Bereich mit einer höheren Dichte an Zapfen, die ein schärferes Sehen erlaubt (Schnichels et al. 2021). Der mikroskopische und ultrastrukturelle Phänotyp, das DNA-Profil und die Proliferationseigenschaften der primären porcinen Zellkultur weisen, bis auf eine geringere Pigmentierung, kaum Unterschiede zur nativen porcinen RPE Zelle auf (Wiencke et al. 2003). Um die RPE-Funktion in vitro zu untersuchen, eignen sich daher insbesondere primäre Zellkulturen, da mit zunehmender Distanz zur Originalzelle eine mesenchymale Transformation mit Verlust von wichtigen Eigenschaften beobachtet werden kann (Grisanti und Guidry 1995; Wiencke et al. 2003). In dieser Studie wurden daher nur unpassagierte, primäre RPE-Zellkulturen verwendet. Generell bleibt die Limitation, dass die in vitro Ergebnisse mit porcinem RPE nur bedingt auf AMD-Patienten übertragen werden kann.

Zudem waren die Schweine für die vorliegende Studie jung und wurden unsteril und unter verschiedenen Umwelteinflüssen aufgezogen. Die daraus resultierende Heterogenität kann zum einen zu einer höheren Standardabweichung in den Versuchsergebnissen führen, zum anderen aber auch die unterschiedlichen Umwelteinflüsse von Menschen nachahmen (Winkelmann 2020).

Die Verwendung von alten humanen Spenderaugen stellt ebenfalls eine Option dar, die einen Ansatz liefert, bei dem altersabhängige Veränderungen bereits stattgefunden haben. Allerdings ist die Verfügbarkeit stark begrenzt und die Verwendung müsste ethisch gut begründet werden. Ein weiterer limitierender Faktor ist die lange post mortem Zeit vor der Weiterverarbeitung (Schnichels et al. 2021). Es wäre außerdem mit einer sehr großen Heterogenität der Zellen in Hinblick auf Alter und Störfaktoren zu rechnen, die im Falle der vorliegenden Versuche keine eindeutige Untersuchung der einzelnen Komponenten sowie deren Kombination ermöglichen würden.

Ein genereller Nachteil von Versuchen in Zellkulturen ist, dass nur eine Zellart berücksichtigt wird und die Interaktion mit den angrenzenden Schichten fehlt. Für die Beantwortung der Forschungsfragen ist die Verwendung von primären RPE-Zellkulturen dennoch gut geeignet, da der Einfluss von Inflammation und/oder den VEGF-Inhibitoren auf die Zellfunktion des RPE beurteilt werden sollte.

#### 4.1.2 Die Stimulation mit VEGF-Inhibitoren und Entzündungsmediatoren

Von den am häufigsten eingesetzten VEGF-Inhibitoren sind in der Interaktion mit dem RPE besonders Aflibercept und Bevacizumab von Bedeutung, da sie durch ihr Fc-Fragment vom RPE aufgenommen und intrazellulär gespeichert werden können, wohingegen Ranibizumab durch das Fehlen eines Fc-Fragmentes kaum aufgenommen wird (Klettner et al. 2009; Klettner et al. 2010; Klettner et al. 2014b; Aboul Naga et al. 2015). Zudem wurde für Aflibercept und Bevacizumab eine Interaktion mit den Funktionen des RPE nachgewiesen (Klettner et al. 2014b), weshalb sie in dieser Studie weiter untersucht werden sollten. Eine Limitation dieser Studie ist die kontinuierliche Stimulation des RPE mit den VEGF-Inhibitoren. In den vorliegenden Versuchen wurden die Medikamente zweimal wöchentlich in das Zellmedium verabreicht, um in der Zellkultur eine Langzeitapplikation nachzuahmen. Dieser Ansatz spiegelt die klinische Verabreichung, die in ein- bis zweimonatigen Abständen oder je nach Bedarf intravitreal erfolgt, nicht wider. Dennoch ist es in Hinblick auf die begrenzte Überlebensdauer von Zellkulturen eine sinnvolle Herangehensweise, um die Folgen einer Langzeitapplikation zu erforschen.

Die Stimulation mit AMD-relevanten proinflammatorischen Mediatoren dient als Ansatz, um einen Teil der AMD-Pathogenese nachzuahmen und deren Einfluss genauer zu bestimmen. Die normale Zellalterung und oxidativer Stress als weitere Komponenten der AMD wurden in diesem Modell nicht berücksichtigt. Auch die Stimulation durch LPS, Poly I:C und TNF $\alpha$  über vier Wochen reicht als Modell für die langzeitige Inflammation im Rahmen der AMD nicht aus. Dennoch unterscheiden sich die Effekte nach vier Wochen von einer kurz- bis mittelfristigen Stimulation. Die Entzündungsmediatoren wurden nicht nach kurzer Stimulationszeit entfernt und durch frisches Medium ersetzt, sondern blieben für das RPE als durchgehender proinflammatorischer Stimulus erhalten. Zudem bieten die drei unterschiedlichen getesteten Konzentrationen pro Mediator eine Möglichkeit der Differenzierung zwischen der Stärke des proinflammatorischen Stimulus. Allerdings bleibt die Limitation, dass die in vitro eingesetzten Konzentrationen nicht mit denen im Auge von AMD-Patienten gleichzusetzen sind und auch die Interaktion mit weiteren pro- oder antiinflammatorischen Faktoren sowie den umliegenden Zellen fehlt.

## 4.2 Diskussion der Ergebnisse

### 4.2.1 TGF- $\beta$ 1 Sekretion

*Transforming Growth Factor* (TGF)- $\beta$  ist ein wichtiges multifunktionelles und protektives Zytokin in der Aufrechterhaltung des Immunprivilegs und wichtiger Zellfunktionen (Detrick und Hooks 2010). Es sind die drei Isoformen TGF- $\beta$ 1,  $\beta$ 2 und  $\beta$ 3 bekannt, die wiederum unterschiedliche Signalwege aktivieren können. Vom humanen RPE werden TGF- $\beta$ 1 und  $\beta$ 2 exprimiert (Tosi et al. 2018). Die Effekte von TGF- $\beta$  sind pleiotrop und werden derzeit kontrovers diskutiert. Für den Einfluss auf die Angiogenese gibt es sowohl Hinweise für eine pro- als auch eine antiangiogenetische Wirkung (Tosi et al. 2018).

Ein besonderes Forschungsinteresse liegt zudem in der protektiven, entzündungsregulierenden Wirkung von TGF- $\beta$ . In Kapitel 1.2.3.7. wurde bereits auf den immunsuppressiven und hemmenden Effekt von TGF- $\beta$  auf Mikroglia und T-Zellen eingegangen (Klettner 2015b). Einige Studien deuten darauf hin, dass TGF- $\beta$ 1 im Gehirn auf viele lebensbedrohliche Ereignisse wie Ischämie/Hypoxie, Amyloid- $\beta$  Ablagerungen und oxidative Schäden neuroprotektiv wirkt (Tosi et al. 2018). Insbesondere im Rahmen der Alzheimer Erkrankung weisen sowohl in vivo als auch in vitro Studien auf diese schützenden Effekte hin. So zeigten beispielsweise Shen et al. in einem Rattenmodell, dass Amyloid- $\beta$ 1-42-induzierte Neuroinflammation und kognitive Defizite durch eine intrazerebroventrikuläre TGF- $\beta$ 1 Injektion abgeschwächt werden konnten. Dabei hatte TGF- $\beta$  sowohl auf die pro- und antiinflammatorischen Zytokine als auch auf die Aktivität von Mikroglia einen protektiven Einfluss (Shen et al. 2014).

Aufgrund der protektiven und immunsuppressiven Wirkung wurde in dieser Studie der Fokus auf TGF- $\beta$ 1 gelegt und die Sekretion von primären RPE Zellen unter Inflammation und Anti-VEGF Therapie mittels ELISA untersucht. Die Untersuchung mittels ELISA ist eine etablierte Methode und für die Bestimmung von sezernierten Enzymen gut geeignet (Engvall und Perlmann 1971; van Weemen und Schuurs 1971). Sie ist einer Bestimmung mittels Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) überlegen, da von der gemessene messenger Ribonukleinsäure (mRNA) in der RT-PCR nicht abgeleitet werden kann, ob auch alles transkribiert und vor allem sezerniert wurde.

Das primäre porcine RPE sezernierte zu jedem Zeitpunkt TGF- $\beta$ 1. Die kurz-, mittel- oder langfristige Stimulation mit proinflammatorischen Mediatoren und/oder den VEGF-Inhibitoren Aflibercept oder Bevacizumab führte zu keiner signifikanten Veränderung der Sekretion von TGF- $\beta$ 1. Das RPE scheint daher TGF- $\beta$ 1 in vitro unabhängig von Inflammation und VEGF-Inhibitoren zu sezernieren und dabei diese wichtige, neuroprotektive Funktion zu erhalten (Klettner et al. 2020).

Es gibt keine vergleichbaren in vitro Studien zum Einfluss von Aflibercept oder Bevacizumab auf die TGF- $\beta$  Konzentration. Im Kammerwasser von AMD-Patienten nahm die TGF- $\beta$ 1 Konzentration unter der einjährigen Therapie mit Aflibercept oder Ranibizumab ab (Yuan 2019). Andere Studien wiesen eine erhöhte TGF- $\beta$ 1 Konzentration im Kammerwasser von unbehandelten nAMD-Patienten nach, die auch nach dreifacher, monatlicher Therapie mit Ranibizumab signifikant erhöht blieb (Tosi et al. 2017).

Für die tägliche Stimulation mit TNF $\alpha$  zeigten Touhami et al., dass TGF- $\beta$ 1 vermehrt exprimiert wurde. Anders als in der vorliegenden Studie erfolgte die Applikation jedoch täglich statt zweimal wöchentlich und TGF- $\beta$ 1 wurde mittels RT-PCR und nicht mittels ELISA bestimmt (Touhami et al. 2018). Welches Modell die Konzentration von TNF $\alpha$  in vivo besser simulieren kann, ist unklar.

Die Rolle von TGF- $\beta$  in der AMD bleibt kontrovers und bedarf weiterer Untersuchungen in vitro und in vivo. Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass das RPE auch unter potenziell schädlichen Bedingungen wie Inflammation oder VEGF-Inhibition das immunsuppressive TGF- $\beta$ 1 sezerniert. Aufgrund der Interaktion mit anderen Zellen (Mikroglia, T-Lymphozyten) könnten Modelle, die diesen Ansatz berücksichtigen, weitere Erkenntnisse bringen.

#### 4.2.2 Phagozytose von Photorezeptoraußensegmenten

Photorezeptoren schilfern regelmäßig alte oder beschädigte Außensegmente ab, die vom RPE phagozytiert werden (Strauss 2005). Die Phagozytose ist daher eine wichtige Aufgabe des RPE für die Aufrechterhaltung des Sehens. Bestimmte Formen der Retinitis pigmentosa werden durch die Unfähigkeit der Phagozytose von Photorezeptoraußensegmenten durch das RPE verursacht, was zu einer progredienten Dystrophie der Netzhaut mit Nachtblindheit und Gesichtsfeldeinengungen führt (Strauss 2005). Im Rahmen der AMD kann eine eingeschränkte Phagozytose zur Bildung von Ablagerungen und Steigerung des oxidativen Stresses führen (Strauss 2005).

In dieser Studie wurde die Phagozytosefähigkeit des RPE mit der Methode von Klettner et al. (2011) untersucht. Durch die Opsonierung von Latexkügelchen mit Photorezeptoraußensegmenten werden die Vorteile eines physiologischen Aufnahmeproduktes (Photorezeptoraußensegmente) und der definierten Größe und guten Zählbarkeit von FITC-gelabelten Latexkügelchen kombiniert. Es ist damit eine einfache und günstige Methode, um die Phagozytose zu quantifizieren (Klettner et al. 2011). Im Vergleich dazu wurden unbehandelte Latexkügelchen auch nach sechs Stunden Inkubationszeit kaum vom RPE aufgenommen (Klettner et al. 2011). Eine direkte Markierung der Außensegmente mit einem Immunfluoreszenzfarbstoff ist dagegen in der Durchführung und Auswertung deutlich aufwendiger und teurer. Für die hier verwendete Methode werden lediglich eine Zentrifuge und ein einfaches Fluoreszenzmikroskop benötigt. Die nicht aufgenommenen Kügelchen können rausgewaschen werden

und haben keinen Einfluss auf die Auswertung (Klettner et al. 2011). Um zu überprüfen, ob die Zellen die VEGF-Inhibitoren intrazellulär aufgenommen haben, wurde zusätzlich ein Antikörper gegen Anti-human-IgG getestet. Alle Bilder wurden mit einer Software ausgewertet, die alle Kügelchen und Zellkerne erkannt und gezählt hat.

In der vorliegenden Studie führte keiner der getesteten VEGF-Inhibitoren nach kurz-, mittel- oder langfristiger Stimulation zu einer signifikanten Änderung der Phagozytoserate. Im Gegensatz dazu, zeigten Klettner et al. nach einmaliger Gabe von Aflibercept oder Bevacizumab eine Reduktion der Phagozytose (Klettner et al. 2010; Klettner et al. 2014b). Es wurde zwar das gleiche Protokoll für die Untersuchung der Phagozytose verwendet, allerdings wurde bei Klettner et al. (2010 und 2014b) nicht unpassagiertes, primäres RPE sondern Zellen aus der zweiten Passage verwendet, die Gabe erfolgte bei einwöchiger Stimulation nur einmalig und bei der Auswertung wurde zwischen Zellen mit und ohne intrazellulärem VEGF-Inhibitor unterschieden (Klettner et al. 2010; Klettner et al. 2014b). Sheu et al. untersuchten die Phagozytose mittels Durchflusszytometrie und fanden nur nach einer 48-stündigen Stimulation mit Bevacizumab eine Abnahme der Phagozytose von ARPE-19 Zellen. Aflibercept hatte hingegen keinen Einfluss (Sheu et al. 2015). Die Ergebnisse bleiben demnach für eine kurzfristige Stimulation mit VEGF-Inhibitoren kontrovers, wohingegen die mittel- und langfristige Stimulation durch Bevacizumab und Aflibercept keinen Einfluss auf die Phagozytose zu haben scheint und das RPE diese wichtige Funktion weiterhin aufrechterhalten kann.

Die kurzfristige Stimulation mit LPS hatte keinen Einfluss auf die Phagozytose. Nach einwöchiger Exposition des RPE mit LPS nahm die Phagozytoserate signifikant ab. Die langfristige Stimulation führte zu einem gegenteiligen Ergebnis mit einer signifikanten Zunahme der Phagozytose im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Effekte von LPS auf die Phagozytose des RPE scheinen durch die Ko-Stimulation mit Aflibercept noch weiter verstärkt worden zu sein. Nach 24-stündiger Stimulation mit LPS war die Phagozytoserate geringer als die Kontrolle, was allerdings erst in Kombination mit Aflibercept signifikant wurde. Ebenso führte die kombinierte Stimulation mit allen getesteten LPS-Konzentrationen über eine Woche zu einer Abnahme der Phagozytose. Genauso wie für LPS allein, zeigte sich auch für die langfristige, kombinierte Stimulation eine Steigerung der Phagozytose. Aflibercept scheint sowohl die kurz- und mittelfristige Reduktion als auch die langfristige Steigerung der Phagozytose durch die TLR-4 Aktivierung zu intensivieren. Die Kombination von Bevacizumab mit LPS zeigte hingegen ähnliche Ergebnisse wie LPS allein.

Der TLR-4 hat eine besondere Rolle in der Phagozytose, da es endogene Proteine binden kann und bei der Erkennung und Verarbeitung von Photorezeptoraußensegmenten involviert ist (Kindzelskii et al. 2004; Kohno et al. 2013). Versuche in *knock-out* Mäusen deuten darauf hin, dass Proteine aus

abgeschilferten Photorezeptoraußensegmenten über die Aktivierung von TLR-4 zu einer Chemokinproduktion und Rekrutierung von Mikroglia und Makrophagen in den subretinalen Raum führen (Kohno et al. 2013). Interessanterweise führt die Bindung von Photorezeptoraußensegmenten an den TLR-4 auch zu einer Zunahme von reaktiven Sauerstoffmetaboliten (Kindzelskii et al. 2004). Wie in Kapitel 1.3.2. bereits erwähnt, haben sowohl Inflammation als auch die Zunahme von oxidativem Stress einen Einfluss auf die Entwicklung einer AMD. Im Zusammenhang mit diesen Erkenntnissen weisen die Ergebnisse der vorliegenden Studie darauf hin, dass die Aktivierung des TLR-4 durch LPS zwar mittelfristig zu einer Einschränkung der Phagozytose führt, aber die langfristige TLR-4-Aktivierung die Phagozytoserate steigert. Von den erhobenen Daten kann jedoch nicht abgeleitet werden, ob dieser Effekt protektiv ist oder die gesteigerte Aktivierung mit einer gesteigerten pro-inflammatorischen Kaskade mit vermehrter Zytokinfreisetzung einhergeht. Klettner et al. wiesen eine Zunahme der Il-6 und Il-8 Sekretion nach langfristiger LPS-Stimulation nach, die durch Aflibercept oder Bevacizumab weiter gesteigert wurde (Klettner et al. 2020; Winkelmann 2020). Weitere Untersuchungen werden benötigt, um die Rolle und Folgen der TLR-4 Aktivierung bei der Phagozytose zu klären. Neue Erkenntnisse könnten auch im Hinblick auf die Pathophysiologie der AMD von Relevanz sein.

Die Phagozytose wurde durch den TLR-3 Agonisten Poly I:C oder das Zytokin TNF $\alpha$  unabhängig vom Messzeitpunkt kaum beeinflusst. Lediglich für die höchste getestete Konzentration von Poly I:C (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) und die niedrigste von TNF $\alpha$  (12,5  $\text{ng}/\text{ml}$ ) zeigte sich nach 24 Stunden Stimulation eine signifikante Abnahme der Phagozytose. Auch die Ko-Stimulation mit den VEGF-Inhibitoren führte kaum zu Veränderungen der Phagozytose gegenüber der Stimulation mit Poly I:C oder TNF $\alpha$  allein.

Vereinbar mit diesen Ergebnissen führte die kurzfristige Stimulation von Mikroglia mit Poly I:C oder Überständen von RPE, die mit Poly I:C aktiviert wurden, in zwei unabhängigen Phagozytose-Assays zu keiner signifikanten Veränderung der Phagozytoserate (Klettner et al. 2014a). Auch die Ergebnisse von Ebihara et al. sind mit den vorliegenden Daten vereinbar. Ebihara et al. untersuchten die Phagozytose von Fluorescein-konjugierten Partikeln aus E. coli in ARPE-19 Zellen nach 24-stündiger Stimulation mit Poly I:C. Dabei führte nur eine der getesteten Konzentrationen (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) zu einem milden Anstieg der Phagozytose (Ebihara et al. 2007).

Für die Stimulation mit TNF $\alpha$  zeigten Touhami et al. übereinstimmende Ergebnisse. Die tägliche Exposition mit TNF $\alpha$  über zehn Tage hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Phagozytosefähigkeit von primären RPE Zellen (Touhami et al. 2018). Daher scheint die Phagozytose auch unter langfristiger bzw. wiederholter TNF $\alpha$ -Stimulation mit acht- bis zehnmaliger Applikation aufrechterhalten zu werden.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die VEGF-Inhibitoren, Poly I:C oder TNF $\alpha$  weder allein noch in Kombination einen signifikanten Einfluss auf die Phagozytose haben. Die TLR-4 Aktivierung mit LPS zeigte hingegen einen signifikanten Einfluss auf die Phagozytose, die durch eine kurz- oder mittelfristige Stimulation reduziert, langfristig jedoch gesteigert wurde. Aflibercept verstärkte diese Effekte von LPS. Da der TLR-4 in die Phagozytose involviert ist, können weitere Versuche bei der Erforschung von der Ursache und Folgen dieser Ergebnisse helfen.

#### 4.2.3 Wundheilung

Die Wundheilung verläuft typischerweise in drei sich überlappenden Phasen: der Entzündung, der Gewebeformation und der Umbauphase. Für den korrekten Ablauf ist eine feine Abstimmung mit den umliegenden Zellen über Zell-Zell-Kontakte oder Zytokine erforderlich (Kent und Sheridan 2003). Insbesondere für Hautwunden gibt es zahlreiche Studien zu Störfaktoren, zu denen auch Inflammation und ein hohes Lebensalter gehören (Guo und Dipietro 2010). Im RPE können kleine Defekte von umliegenden Zellen gedeckt werden. Bei größeren Defekten müssen peripher liegende Zellen zu der Wunde migrieren und den Zellverlust ersetzen (Del Priore et al. 2002). Wenn verletztes Gewebe nicht adäquat ersetzt wird, kann es zu fibrotischen Umbau mit Narbenbildung kommen. Da Narben häufig mit einem Sehverlust einhergehen, ist die Aufrechterhaltung der Wundheilung des RPE wichtig für das Sehen (Kent und Sheridan 2003).

Um zu überprüfen, ob proinflammatorische Mediatoren oder VEGF-Inhibitoren diese Funktion beeinflussen, wurde in dieser Studie ein *Scratch-Assay* durchgeführt. Der *Scratch-Assay* ist eine einfache, etablierte und ökonomische Methode, um gerichtete Zellmigration in vitro zu untersuchen (Rodriguez et al. 2005). Dennoch bleibt die Limitation, dass das Verhalten des RPE in vitro nicht auf die Situation in vivo übertragen werden kann.

Der Einfluss der VEGF-Inhibitoren auf die Wundheilung scheint vernachlässigbar. Nur nach 24-stündiger Stimulation mit Bevacizumab zeigte sich am 1. Messtag eine transiente Einschränkung der Wundheilung. Diese Ergebnisse sind vereinbar mit dem aktuellen Stand der Literatur. Klettner et al. zeigten eine Reduktion der Wundheilung nach einmaliger Gabe von Bevacizumab (Klettner et al. 2010; Klettner et al. 2014b) und die kurzfristiger Stimulation von ARPE-19 Zellen mit Bevacizumab führte ebenfalls zu einer moderaten Senkung der Proliferation (Spitzer et al. 2007). Saenz-de-Viteri et al. konnten hingegen in stündlichen Untersuchungen über einen Zeitraum von 72 Stunden keinen signifikanten Einfluss von Bevacizumab, Aflibercept oder Ranibizumab auf die Wundheilung von ARPE-19 Zellen nachweisen (Saenz-de-Viteri et al. 2016). Auf die Wundheilung von Endothelzellen hat das Serum von mit Bevacizumab behandelten Patienten ebenfalls keinen Einfluss (Brostjan et al. 2008).

Andererseits reduzierte die kurzfristige Exposition von Bevacizumab die Wundheilung kornealer Epithelzellen, während Aflibercept und Ranibizumab keinen signifikanten Einfluss darauf zeigten (Kang et al. 2016). Klettner et al. konnten zudem einen dosisabhängigen Einfluss von Aflibercept auf die Wundheilung zeigen (Klettner et al. 2014b). Die dabei eingesetzte, signifikante Konzentration war allerdings doppelt so hoch wie in der vorliegenden Studie (500 µg/ml versus 250 µg/ml). Da es sich in beiden Fällen um in vitro Studien handelt, bleibt fraglich, welche Konzentration in vivo das RPE von nAMD-Patienten erreicht und beeinflusst. Im Gegensatz dazu zeigten Cillà et al. eine Steigerung der RPE-Migration nach 24-stündiger Stimulation mit Aflibercept (Cillà et al. 2020). Für eine langfristige Stimulation gibt es weder für Aflibercept noch für Bevacizumab vergleichbare Daten. Insgesamt ist der Einfluss der VEGF-Inhibitoren auf die in vitro Wundheilung gering, wobei Bevacizumab, im Gegensatz zu Aflibercept, einen transienten negativen Einfluss zeigte. Die langfristige Stimulation scheint in vitro nicht schädlich für die Wundheilung des RPE zu sein.

LPS führte nur nach mittel- und langfristiger Stimulation zu einer beschleunigten Wundheilung in der frühen Phase. Am 2. Messtag relativierte sich dieser Effekt. Vergleichbar mit dem in Kapitel 4.2.2. beschriebenen Effekt von LPS allein und LPS in Kombination mit Aflibercept auf die Phagozytose, scheint Aflibercept auch den Effekt von LPS auf die Wundheilung zu verstärken, denn durch die Ko-Stimulation war die Wundheilung auch noch am 2. Messtag signifikant beschleunigt. Die Ko-Stimulation mit Bevacizumab führte nur nach vierwöchiger Stimulation zu einer signifikanten Beschleunigung der Wundheilung und minderte den Effekt von LPS nach einwöchiger Stimulation.

Die kurz- und mittelfristige Stimulation mit Poly I:C führte nur zu einzelnen Veränderungen der Wundheilung, die auch durch die Ko-Stimulation mit den VEGF-Inhibitoren keinen eindeutigen Einfluss zeigten. Es gibt keine vergleichbaren Studien zur Wundheilung unter Poly I:C und VEGF-Inhibitoren.

TNF $\alpha$  hatte nur nach einwöchiger Stimulation einen geringen Einfluss auf die Wundheilung, der durch die Kombination mit Aflibercept etwas verstärkt wurde. Interessanterweise führte die kurzzeitige Kombination von allen getesteten TNF $\alpha$ -Konzentrationen mit Bevacizumab zu einer signifikanten Abnahme der Wundheilung, die auch am 2. Messtag noch signifikant war. Weder für TNF $\alpha$  allein noch in Kombination mit Aflibercept wurde die Wundheilung nach 24-stündiger Stimulation beeinflusst. Das könnte darauf hindeuten, dass TNF $\alpha$  den kurzfristigen negativen Effekt von Bevacizumab intensiviert. Die Langzeitstimulation mit TNF $\alpha$  hatte sowohl allein als auch mit den VEGF-Inhibitoren keinen Einfluss auf die Wundheilung.

Zusammenfassend hatte von den VEGF-Inhibitoren nur Bevacizumab einen kurzfristigen, transienten Einfluss auf die Wundheilung ohne einen signifikanten Langzeiteffekt. Von den untersuchten Entzündungsmediatoren führte die langfristige Stimulation mit LPS eher zu einer Beschleunigung und

Poly I:C eher zu einer Verlangsamung der Wundheilung. Der Einfluss von TNF $\alpha$  war nur in Kombination mit Bevacizumab reduzierend, während die mittelfristige Stimulation allein oder in Kombination eher beschleunigend wirkte. TNF $\alpha$  und Poly I:C zeigten keine Langzeiteffekte auf die Wundheilung. Die Wundheilung in vitro kann jedoch nur bedingt auf die Situation in vivo übertragen werden, weshalb eine Verallgemeinerung der Daten schwierig bleibt.

#### 4.2.4 RPE65 Expression

Die Sinneswahrnehmung mit den Photorezeptoren erfordert die regelmäßige Wiederaufarbeitung des dafür notwendigen Sehpigmentes (Strauss 2005). RPE65 ist eines der erforderlichen Enzyme für die Isomerisation von all-*trans*-Retinolsäure zurück zum photosensitiven 11-*cis*-Retinal (Redmond et al. 1998). In einem transgenen Mausmodell, bei dem das RPE65-Gen ausgeschaltet wurde, zeigten sich die Photorezeptoraußensegmente deutlich kürzer und desorganisiert (Redmond et al. 1998). Die Relevanz von RPE65 für den Sehzyklus und das Sehen wird zudem durch die vielen verschiedenen retinalen Erkrankungen deutlich, die durch Mutationen im RPE65-Gen hervorgerufen werden können (Thompson und Gal 2003; Kiser 2021). Eine dieser Erkrankungen ist die Leber'sche kongenitale Amaurose, für die mittlerweile eine RPE65-Gen-basierte Therapie in Europa zugelassen ist und erfolgreich durchgeführt wird (Fenner et al. 2021; European Medicines Agency (EMA) 2018).

Da RPE65 RPE-spezifisch und obligat für das Recycling des Sehpigments ist (Redmond et al. 1998), wird es in vielen Experimenten als Surrogat-Parameter für den Sehzyklus verwendet. In dieser Studie wurde die Expression von RPE65 im Western Blot gemessen, da es die geeignetste Methode zur Proteinbestimmung und etabliert ist. In anderen Studien wurde zum Teil nur die Menge der mRNA bestimmt. Allerdings kann aus dem mRNA Gehalt nicht mit Sicherheit darauf geschlossen werden, ob auch die gesamte mRNA zum Enzym transkribiert wird.

Die kurz- und mittelfristige Stimulation mit Aflibercept oder Bevacizumab hatte keinen Einfluss auf den RPE65 Gehalt. Aflibercept zeigte auch nach langfristiger Stimulation keine Veränderung, wohingegen die vierwöchige Exposition mit Bevacizumab zu einer deutlichen Reduktion von RPE65 führte. Aboul Naga et al. vermuten einen Zusammenhang mit dem Motorprotein Myosin 7a, da Bevacizumab, aber nicht Aflibercept, es benötigt, um intrazellulär transportiert zu werden (Aboul Naga et al. 2015). An der lichtabhängigen Translokation von RPE65 ist Myosin 7a ebenfalls beteiligt (Lopes et al. 2011). Daher könnte hier ein Zusammenhang mit der Bevacizumab-induzierten Reduktion von RPE65 bestehen. Allerdings ist Myosin 7a auch am Transport von Phagosomen, Lysosomen und Melanosomen im RPE beteiligt (Aboul Naga et al. 2015). Wie bereits in Kapitel 4.2.2. beschrieben, konnte in der vorliegenden Studie kein signifikanter Einfluss von Bevacizumab auf die Phagozytose nachgewiesen

werden, weshalb die Erklärung der RPE65-Reduktion über eine Überladung von Myosin 7a nicht auszureichend scheint. Der genaue Mechanismus sollte daher in weiteren Experimenten untersucht werden. Zudem könnten Patientenstudien hilfreich sein, um die Relevanz dieses Effektes auch in vivo zu erforschen.

Unter den Entzündungsmediatoren hatte insbesondere die Langzeit-Stimulation mit LPS einen negativen Einfluss auf den RPE65 Gehalt. Wie schon bei der Phagozytose und der Wundheilung hatte die Ko-Stimulation von LPS mit Aflibercept einen kumulativen, reduzierenden Effekt auf den RPE65 Gehalt nach kurz- und langfristiger Stimulation. In Kombination mit Bevacizumab zeigte sich ebenfalls eine signifikante Reduktion nach kurzfristiger Stimulation. Interessanterweise war die Reduktion von RPE65 nach vierwöchiger Ko-Stimulation von LPS und Bevacizumab nicht signifikant, was an der hohen Standardabweichung liegen könnte.

Die TLR-3 Aktivierung mit Poly I:C zeigte nur einen kurzfristigen und transienten Einfluss auf den RPE65 Gehalt, der sich auch durch die Kombination mit den VEGF-Inhibitoren nicht veränderte. Weder für LPS noch für Poly I:C gibt es vergleichbare Untersuchungen.

Die kurz- und mittelfristige Stimulation mit TNF $\alpha$  hatte keinen signifikanten Einfluss auf den RPE65 Gehalt. Dahingegen führte die langfristige Stimulation mit TNF $\alpha$  sowohl allein als auch in der Kombination mit den VEGF-Inhibitoren zu einer massiven, dosisabhängigen Reduktion bis hin zu einem vollständigen Verlust von RPE65. Durch die Kombination mit Bevacizumab, welches nach alleiniger, vierwöchiger Stimulation ebenfalls eine signifikante Reduktion bedingte, führte sogar die geringste getestete TNF $\alpha$ -Konzentration zu einer signifikanten Abnahme von RPE65. Der negative Einfluss scheint sich in diesem Fall noch weiter zu potenzieren. Diese Befunde bekräftigen bereits bestehende Daten zum Einfluss von Inflammation auf RPE65. Kutty et al. zeigten eine dosisabhängige Reduktion der mRNA von RPE65 nach kurzfristiger Inkubation mit proinflammatorischen Zytokinen wie TNF $\alpha$ , die durch die Kombination von mehreren Zytokinen intensiviert wurde (Kutty et al. 2016). In den Versuchen von Touhami et al. führte die tägliche TNF $\alpha$  Exposition über zehn Tage zu einer Abnahme der RPE65-Transkription (Touhami et al. 2018). Ob und in welcher Form sich dieser Verlust von RPE65 auch in vivo bemerkbar macht, ist noch unklar. Die vielen RPE65-Mutationen, die zu unterschiedlichen Augenerkrankungen führen können, geben allerdings klare Hinweise auf die Relevanz von RPE65 für die Aufrechterhaltung des Sehens (Kiser 2021).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass TNF $\alpha$  nicht nur im Rahmen seiner zentralen Rolle in der Immunantwort (Parameswaran und Patial 2010) und der CNV-Induktion (Ferrara et al. 2003), sondern auch durch seinen negativen Einfluss auf die Zellfunktionen des RPE zu der Pathogenese der AMD beitragen könnte. Diese Vermutung wird durch den positiven Einfluss von intravitreal verabreichten

TNF $\alpha$ -Inhibitoren bei AMD-Patienten mit Begleiterkrankungen oder Nicht-Ansprechen auf VEGF-Inhibitoren bestärkt (Wang et al. 2011) und könnte ein Anlass sein, die aktuelle Therapie, die nur an der Anti-Angiogenese ansetzt, zu überdenken und erweitern.

Die erhobenen Daten verdeutlichen zudem, wie wichtig es ist, auch Zellkulturversuche über einen längeren Zeitraum durchzuführen. Sowohl für Bevacizumab als auch für LPS und TNF $\alpha$  war die Reduktion von RPE65 erst nach vierwöchiger Stimulation signifikant reduziert. Auch wenn ein vierwöchiges Modell die Umstände einer lebenslangen, unheilbaren Erkrankung nicht nachahmen kann, unterscheiden sich die Auswirkung dennoch von einer akuten Entzündung.

Zusammenfassend zeigte sich ein gravierender negativer Langzeiteffekt auf den RPE65 Gehalt durch Bevacizumab, LPS und TNF $\alpha$ , der durch die Kombination von Entzündungsmediatoren und VEGF-Inhibitoren zum Teil noch verstärkt wurde. Aflibercept führte nur in Kombination mit LPS zu einer Reduktion von RPE65.

### 4.3 Fazit

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Funktionsfähigkeit des RPE unter Anti-VEGF Therapie, unter proinflammatorischen Einflüssen sowie unter der Kombination aus beidem beeinträchtigt wurde. Die Stimulation mit Aflibercept hatte kaum Einfluss auf die RPE Funktionen, wohingegen Bevacizumab zumindest einen transienten Effekt auf die Wundheilung hatte und zu einer deutlichen Senkung der RPE65 Expression nach langfristiger Stimulation führte. Damit scheint Aflibercept in Hinblick auf den Einfluss auf die RPE-Funktionsfähigkeit in vitro besser zu sein als Bevacizumab. Da Bevacizumab zudem keine Zulassungsstudie für den intravitrealen Gebrauch hat, sollte, falls sich diese Ergebnisse auch in vivo bestätigen lassen, der Einsatz von Bevacizumab nur nach einer fundierten Risiko-Nutzen-Abwägung erfolgen.

Von den Entzündungsmediatoren hatte LPS den größten Einfluss auf die Phagozytose, der mit der Involvierung des TLR-4 an der Phagozytose zu tun haben könnte. Ansonsten hatte Inflammation eher einen transienten Einfluss auf Phagozytose und Wundheilung und einen gravierenden negativen Langzeiteffekt auf den RPE65 Gehalt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Verlust von RPE65 eine Folge von Inflammation, vor allem beim chronischen Fortbestehen, sein kann. Dabei zeigte sich insbesondere für die langfristige Stimulation mit TNF $\alpha$  eine dosisabhängige Reduktion, die bis zum vollständigen Verlust von RPE65 führte. In Kombination mit Bevacizumab aggravierte sich dieser Effekt noch weiter. Die erhobenen Daten deuten außerdem auf einen kumulativen Effekt von Aflibercept und LPS für Phagozytose, Wundheilung und RPE65 Expression hin. Andere Kombinationen führten nur zu

transienten Veränderungen. Da alle Daten in vitro erhoben wurden, können die Ergebnisse nicht direkt auf die Patienten übertragen werden. Daher ist es wichtig, die Hinweise auf Funktionseinschränkungen durch Inflammation und VEGF-Inhibitoren auch in vivo zu überprüfen. Wenn Inflammation auch in vivo zu einem Funktionsverlust des RPE und daraus folgend zu einer Verschlechterung der Physiologie und einer Aggravation der Pathologie führt, könnte das für die Patienten bedeuten, dass trotz der Inhibition von VEGF ein wesentlicher Teil der Pathologie der AMD nicht therapiert wird. Zudem zeigen die Langzeitstudien deutlich, dass es im Laufe der Anti-VEGF Therapie zu einer Atrophieentwicklung mit einer Abnahme der Sehschärfe kommt. Da es sich bei der AMD um eine unheilbare Krankheit mit einer meist lebenslangen Therapie handelt, ist eine umfangreiche und möglichst präventive Therapie umso wichtiger. Diese sollte vor allem darauf ausgerichtet sein, die noch vorhandenen und funktionsfähigen Zellen zu erhalten und schädliche Einflüsse zu minimieren.

Weitere Untersuchungen der Funktionalität des RPE unter VEGF-Inhibitoren sollten einen besonderen Fokus auf den Sehzyklus legen, da hier der größte negative Einfluss durch die Langzeitbehandlung mit Bevacizumab und Entzündungsmediatoren beobachtet wurde. In dieser Studie wurde nur ein beteiligtes Enzym getestet, daher könnte die Untersuchung der anderen Proteine weitere Erkenntnisse liefern und die bestehenden Daten weiter stützen. Zudem könnten Messungen der RPE65 Expression am Patienten durchgeführt werden, um die Relevanz in vivo zu bestimmen und gegebenenfalls ein geeignetes Funktionsmonitoring in die Therapie zu etablieren. Da der aktuelle Goldstandard der nAMD-Behandlung nur die Neovaskularisation berücksichtigt, könnten Therapieergänzungen die anti-inflammatorisch wirken, wie beispielsweise der im kleinen Rahmen getestete Einsatz von TNF $\alpha$ -Inhibitoren, hilfreich bei der Erforschung einer bestmöglichen Therapie sein.

Außerdem könnten weitere Untersuchungen zum kumulativen Effekt der TLR-4-Aktivierung zusammen mit Aflibercept, der in dieser Studie für die Wundheilung, Phagozytose und die RPE65 Expression beobachtet wurde, zu einem besseren Verständnis der Interaktion der angeborenen Immunität mit den VEGF-Inhibitoren führen. Dabei ist insbesondere der Einfluss auf die Phagozytose noch unklar, weshalb weitere Versuche beispielsweise zur Zytokinfreisetzung durch die Phagozytose von Photorezeptoraußensegmenten unter dem Einfluss von LPS und Aflibercept weitere Erkenntnisse bringen könnten.

Zusammenfassend haben Inflammation, VEGF-Inhibitoren und die Kombination aus beidem zumindest transiente Einflüsse auf wichtige Zellfunktionen des RPE. Darunter ist insbesondere der negative Langzeiteffekt auf die RPE65 Expression hervorzuheben. Die Daten könnten darauf hindeuten, dass eine Übertherapie vermieden werden sollte, um die Funktionsfähigkeit des RPE zu erhalten. Ob und in welcher Form sich diese Ergebnisse auch bei AMD-Patienten widerspiegeln, sollte in weiteren

Langzeitstudien erforscht werden. Generell bleibt bei den erhobenen Daten die Limitation, dass die Ergebnisse nicht direkt auf den Menschen übertragen werden können und das Modell nur einen Teilaspekt der Komplexität der AMD erreicht.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

---

Die altersbedingte Makuladegeneration (AMD) ist die häufigste Ursache für Erblindung älterer Menschen in den Industrienationen und eine chronische, unheilbare Erkrankung. Der intravitreale Einsatz von VEGF-Inhibitoren hat die Therapie der neovaskulären AMD revolutioniert und das Sehen von vielen Betroffenen verbessert. Dennoch müssen die Injektionen häufig wiederholt werden, es entstehen hohe Kosten für das Gesundheitssystem und es gibt deutliche Hinweise auf eine Atrophieentwicklung nach langjähriger Anti-VEGF Therapie. Die genaue Ursache dieser Atrophie ist noch unklar. Da das Überleben der Photorezeptoren vom retinalen Pigmentepithel (RPE) abhängig ist, sollte die Funktionsfähigkeit des RPE unbedingt aufrechterhalten werden. Die Auswirkungen der VEGF-Inhibitoren auf das RPE sind auf zellulärer Ebene noch nicht vollständig verstanden und berücksichtigen meistens nur einen kurzen Zeitraum. Zudem werden die Beeinträchtigungen von AMD-relevanten Veränderungen wie Ablagerungen, ein verminderter Transport, oxidativer Stress und vor allem Inflammation häufig nicht mit einbezogen.

Deshalb sollten in dieser Arbeit die Einflüsse und Langzeiteffekte von VEGF-Inhibitoren und Inflammation auf die Funktionalität des RPE untersucht werden. Dafür wurden RPE Zellen aus Schweineaugen präpariert und als primäre Zellkultur für die Versuche verwendet. Das RPE wurde mit Aflibercept oder Bevacizumab und/oder den Entzündungsmediatoren Lipopolysaccharid (LPS, TLR-4 Agonist), Polyinosinsäure:Polycytidylsäure (Poly I:C, TLR-3 Agonist) oder dem Zytokin TNF $\alpha$  für 24 Stunden, sieben Tage oder vier Wochen stimuliert. Anschließend wurde der Einfluss der Medikamente und Entzündungsmediatoren auf wichtige Zellfunktionen getestet. Die Sekretion des immunsuppressiven TGF- $\beta$ 1 wurde mittels ELISA, die Phagozytose von Photorezeptoraußensegmenten in einem Phagozytoseassay, die Wundheilung in einem *Scratch-Assay* und die RPE65 Expression (als Surrogatparameter für den Sehzyklus) nach Zellyse mittels Western Blot bestimmt.

Weder Inflammation noch Anti-VEGF Therapie hatten einen Einfluss auf die Sekretion des immunsuppressiven TGF- $\beta$ 1. Für die Wundheilung und Phagozytose zeigten sich nur transiente Einflüsse der Stimulanzen und deren Kombinationen, die Unterschiede zwischen einer kurz- oder langfristigen Stimulation zeigten. Die TLR-4 Aktivierung führte nach kurz-/mittelfristiger Stimulation eher zu einer Reduktion und nach langfristiger Stimulation zu einer Steigerung der Phagozytose, die durch die Ko-Stimulation mit Aflibercept noch verstärkt wurde. Inflammation und Bevacizumab hatten einen starken, negativen Einfluss auf die RPE65 Expression nach langfristiger Stimulation. Dabei führte insbesondere TNF $\alpha$  zu einer dosisabhängigen Reduktion bis hin zum vollständigen Verlust von RPE65.

Die erhobenen Daten zeigen die Diskrepanz zwischen einer kurz- oder langfristigen Stimulation. Dabei ist die hier durchgeführte vierwöchige Stimulation nur ein Ansatz, um sich der in vivo Situation bei

AMD-Patienten anzunähern. Insbesondere die Ergebnisse zur RPE65 Expression deuten darauf hin, dass das chronische Fortbestehen von Entzündung einen negativen Einfluss auf RPE Funktionen hat. Auch die VEGF-Inhibitoren haben zumindest transiente Einflüsse, die für Bevacizumab etwas ausgeprägter als für Aflibercept scheinen. In Hinblick auf die Kombination von Inflammation und VEGF-Inhibition bedarf der kumulative Effekt von LPS und Aflibercept sowie der kumulative Einfluss von Bevacizumab und Inflammation auf den Sehzyklus weitere Klärung.

Da Inflammation und VEGF-Inhibitoren, zwei relevante Aspekte der neovaskulären AMD, gravierende Effekte auf Proteine des Sehzyklus und zumindest transiente Effekte auf die Phagozytose und Wundheilung zeigen, deutet diese Studie darauf hin, dass eine Übertherapie in jedem Fall vermieden werden sollte, um die Funktionsfähigkeit des RPE zu erhalten. Zudem könnte ein Funktionsmonitoring in vivo bei der Patientenversorgung nützlich sein und helfen, die Entwicklung einer Atrophie besser zu verstehen. Es bedarf somit weiterer Forschung, um die Funktionen des RPE auch in vivo zu erforschen und weitere Langzeitfolgen der Therapie in Kombination mit AMD-relevanten Veränderungen zu untersuchen.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

---

- Abokyi, Samuel; To, Chi-Ho; Lam, Tim T.; Tse, Dennis Y. (2020): Central Role of Oxidative Stress in Age-Related Macular Degeneration: Evidence from a Review of the Molecular Mechanisms and Animal Models. In: *Oxidative medicine and cellular longevity* (Feb), S. 1–19. DOI: 10.1155/2020/7901270.
- Aboul Naga, Shereen Hassan; Dithmer, Michaela; Chitadze, Guranda; Kabelitz, Dieter; Lucius, Ralph; Roeder, Johann; Klettner, Alexa (2015): Intracellular pathways following uptake of bevacizumab in RPE cells. In: *Experimental Eye Research* 131, S. 29–41. DOI: 10.1016/j.exer.2014.12.010.
- An, Eunkyung; Gordish-Dressman, Heather; Hathout, Yetrib (2008): Effect of TNF-alpha on human ARPE-19-secreted proteins. In: *Molecular vision* 14, S. 2292–2303.
- Bergmann, M.; Schütt, F.; Holz, F. G.; Kopitz, J. (2004): Inhibition of the ATP-driven proton pump in RPE lysosomes by the major lipofuscin fluorophore A2-E may contribute to the pathogenesis of age-related macular degeneration. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18 (3), S. 562–564. DOI: 10.1096/fj.03-0289fje.
- Bhutto, Imran; Luty, Gerard (2012): Understanding age-related macular degeneration (AMD): relationships between the photoreceptor/retinal pigment epithelium/Bruch's membrane/choriocapillaris complex. In: *Molecular aspects of medicine* 33 (4), S. 295–317. DOI: 10.1016/j.mam.2012.04.005.
- Borchers, Laura; Roeder, Johann; Klettner, Alexa (2021): Differences in Uptake and Intracellular Fate between Bevacizumab and Aflibercept after Repetitive Long-Term Treatment in the Retinal Pigment Epithelium. In: *Ophthalmic research* 64 (3), S. 369–388. DOI: 10.1159/000511960.
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Analytical biochemistry* 72, S. 248–254. DOI: 10.1006/abio.1976.9999.
- Brandl, Caroline; Zimmermann, Martina E.; Günther, Felix; Barth, Teresa; Olden, Matthias; Schelter, Sabine C. et al. (2018): On the impact of different approaches to classify age-related macular degeneration: Results from the German AugUR study. In: *Scientific reports* 8 (1), S. 8675. DOI: 10.1038/s41598-018-26629-5.
- Brinkmann, Anna; Winkelmann, Katrin; Käckenmeister, Tom; Roeder, Johann; Klettner, Alexa (2021): Effect of long-term anti-VEGF treatment on viability and function of RPE cells. In: *Current eye research*. DOI: 10.1080/02713683.2021.1931344.
- Brostjan, Christine; Gebhardt, Kristina; Gruenberger, Birgit; Steinrueck, Verena; Zommer, Halina; Freudenthaler, Harald et al. (2008): Neoadjuvant treatment of colorectal cancer with bevacizumab: the perioperative angiogenic balance is sensitive to systemic thrombospondin-1 levels. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14 (7), S. 2065–2074. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4081.
- Chakravarthy, Usha; Harding, Simon P.; Rogers, Chris A.; Downes, Susan M.; Lotery, Andrew J.; Culliford, Lucy A.; Reeves, Barnaby C. (2013): Alternative treatments to inhibit VEGF in age-related choroidal neovascularisation: 2-year findings of the IVAN randomised controlled trial. In: *The Lancet* 382 (9900), S. 1258–1267. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)61501-9.

- Chen, Li; Bai, Yujing; Zhao, Min; Jiang, Yanrong (2016): TLR4 inhibitor attenuates amyloid- $\beta$ -induced angiogenic and inflammatory factors in ARPE-19 cells: Implications for age-related macular degeneration. In: *Molecular medicine reports* 13 (4), S. 3249–3256. DOI: 10.3892/mmr.2016.4890.
- Chen, Mei; Luo, Chang; Zhao, Jiawu; Devarajan, Gayathri; Xu, Heping (2019): Immune regulation in the aging retina. In: *Progress in retinal and eye research* 69, S. 159–172. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2018.10.003.
- Chirco, K. R.; Sohn, E. H.; Stone, E. M.; Tucker, B. A.; Mullins, R. F. (2017): Structural and molecular changes in the aging choroid: implications for age-related macular degeneration. In: *Eye (London, England)* 31 (1), S. 10–25. DOI: 10.1038/eye.2016.216.
- Cillà, Stefano de; Farruggio, Serena; Cocomazzi, Grazia; Mary, David; Alkabes, Micol; Rossetti, Luca et al. (2020): Aflibercept and Ranibizumab Modulate Retinal Pigment Epithelial Cells Function by Acting on Their Cross Talk with Vascular Endothelial Cells. In: *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 54 (2), S. 161–179. DOI: 10.33594/000000212.
- Del Priore, Lucian V.; Kuo, Ya-Hui; Tezel, Tongalp H. (2002): Age-related changes in human RPE cell density and apoptosis proportion in situ. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 43 (10), S. 3312–3318.
- Detrick, Barbara; Hooks, John J. (2010): Immune regulation in the retina. In: *Immunologic research* 47 (1-3), S. 153–161. DOI: 10.1007/s12026-009-8146-1.
- Detrick, Barbara; Hooks, John J. (2020): The RPE Cell and the Immune System. In: Alexa Karina Klettner und Stefan Dithmar (Hg.): *Retinal Pigment Epithelium in Health and Disease*. Cham: Springer International Publishing, S. 101–114.
- Dietzel, M.; Farwick, A.; Hense, H-W (2010): Genetik und Risikofaktoren der exsudativen AMD. In: *Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft* 107 (12), S. 1103–1108. DOI: 10.1007/s00347-010-2141-8.
- DOG, Retinologische Gesellschaft, BVA (2020): Stellungnahme der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft (DOG), der Retinologischen Gesellschaft und des Berufsverbandes der Augenärzte Deutschlands (BVA). Anti-VEGF-Therapie bei der neovaskulären altersabhängigen Makuladegeneration. In: *Der Ophthalmologe* (117), S. 746–754. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1007/s00347-020-01117-2>.
- Ebihara, Nobuyuki; Chen, Lizhong; Tokura, Tomoko; Ushio, Hiroko; Iwatsu, Minoru; Murakami, Akira (2007): Distinct functions between toll-like receptors 3 and 9 in retinal pigment epithelial cells. In: *Ophthalmic research* 39 (3), S. 155–163. DOI: 10.1159/000103235.
- Eckert, Werner A.; Kartenbeck, Jürgen (1997): *Proteine: Standardmethoden der Molekular- und Zellbiologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Engvall, Eva; Perlmann, Peter (1971): Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. In: *Immunochemistry* 8 (9), S. 871–874. DOI: 10.1016/0019-2791(71)90454-X.
- European Medicines Agency (EMA) (2017): Zusammenfassung des EPAR für die Öffentlichkeit - Avastin, Bevacizumab (EMA/302947). Online verfügbar unter [https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/avastin-epar-summary-public\\_de.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/avastin-epar-summary-public_de.pdf), zuletzt geprüft am 24.03.2022.

European Medicines Agency (EMA) (2018): An overview of Luxturna (voretigene neparovec) (EMA/823783). Online verfügbar unter [https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/luxturna-epar-medicine-overview\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/luxturna-epar-medicine-overview_en.pdf), zuletzt geprüft am 24.03.2022.

European Medicines Agency (EMA) (2020): Beovu (brolocizumab) medicine overview (EMA/44111). Online verfügbar unter [https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/beovu-epar-medicine-overview\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/beovu-epar-medicine-overview_en.pdf), [ema.europa.eu/medicines/human/EPAR/beovu](https://www.ema.europa.eu/medicines/human/EPAR/beovu), zuletzt geprüft am 24.03.2022.

Faber, Carsten; Jehs, Tina; Juel, Helene Baek; Singh, Amardeep; Falk, Mads Krüger; Sørensen, Torben Lykke; Nissen, Mogens Holst (2015): Early and exudative age-related macular degeneration is associated with increased plasma levels of soluble TNF receptor II. In: *Acta ophthalmologica* 93 (3), S. 242–247. DOI: 10.1111/aos.12581.

Fenner, Beau J.; Tan, Tien-En; Barathi, Amutha Veluchamy; Tun, Sai Bo Bo; Yeo, Sia Wey; Tsai, Andrew S. H. et al. (2021): Gene-Based Therapeutics for Inherited Retinal Diseases. In: *Frontiers in genetics* 12, S. 794805. DOI: 10.3389/fgene.2021.794805.

Ferrara, Napoleone; Gerber, Hans-Peter; LeCouter, Jennifer (2003): The biology of VEGF and its receptors. In: *Nature medicine* 9 (6), S. 669–676. DOI: 10.1038/nm0603-669.

Franceschi, C.; Bonafè, M.; Valensin, S.; Olivieri, F.; Luca, M. de; Ottaviani, E.; Benedictis, G. de (2000): Inflamm-aging. An Evolutionary Perspective on Immunosenescence. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 908, S. 244–254. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb06651.x.

Franceschi, Claudio; Campisi, Judith (2014): Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. In: *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* 69 Suppl 1. DOI: 10.1093/gerona/glu057.

Gallenga, Carla Enrica; Parmeggiani, Francesco; Costagliola, Ciro; Sebastiani, Adolfo; Gallenga, Pier Enrico (2014): Inflammaging: should this term be suitable for age related macular degeneration too? In: *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]* 63 (2), S. 105–107. DOI: 10.1007/s00011-013-0684-2.

Grisanti, Salvatore; Guidry, Clyde (1995): Transdifferentiation of retinal pigment epithelial cells from epithelial to mesenchymal phenotype. In: *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 36 (2), S. 391–405. Online verfügbar unter <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7531185/>.

Grossniklaus, Hans E.; Ling, Jun X.; Wallace, Timothy M.; Dithmar, Stefan; Lawson, Diane H.; Cohen, Cynthia et al. (2002): Macrophage and retinal pigment epithelium expression of angiogenic cytokines in choroidal neovascularization. In: *Molecular vision* 8, S. 119–126.

Grunwald, Juan E.; Daniel, Ebenezer; Huang, Jiayan; Ying, Gui-Shuang; Maguire, Maureen G.; Toth, Cynthia A. et al. (2014): Risk of geographic atrophy in the comparison of age-related macular degeneration treatments trials. In: *Ophthalmology* 121 (1), S. 150–161. DOI: 10.1016/j.ophtha.2013.08.015.

Guo, S.; Dipietro, L. A. (2010): Factors affecting wound healing. In: *Journal of dental research* 89 (3), S. 219–229. DOI: 10.1177/0022034509359125.

Heier, Jeffrey S.; Brown, David M.; Chong, Victor; Korobelnik, Jean-Francois; Kaiser, Peter K.; Nguyen, Quan Dong et al. (2012): Intravitreal aflibercept (VEGF trap-eye) in wet age-related macular degeneration. In: *Ophthalmology* 119 (12), S. 2537–2548. DOI: 10.1016/j.ophtha.2012.09.006.

- Jonas, Jost B. MD; Cheung, Chui Ming Gemmy MD; Panda-Jonas, Songhomitra M. D. (2017): Updates on the Epidemiology of Age-Related Macular Degeneration. In: *Asia-Pacific Journal of Ophthalmology* 11 (6), S. 493–497. DOI: 10.22608/APO.2017251.
- Kang, Seungbum; Choi, Hyunsu; Rho, Chang Rae (2016): Differential Effects of Bevacizumab, Ranibizumab, and Aflibercept on the Viability and Wound Healing of Corneal Epithelial Cells. In: *Journal of ocular pharmacology and therapeutics : the official journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics* 32 (10), S. 671–676. DOI: 10.1089/jop.2016.0094.
- Kauppinen, Anu; Paterno, Jussi J.; Blasiak, Janusz; Salminen, Antero; Kaarniranta, Kai (2016): Inflammation and its role in age-related macular degeneration. In: *Cell Mol Life Sci.* May (73), S. 1765–1786. DOI: 10.1007/s00018-016-2147-8.
- Kent, David; Sheridan, Carl (2003): Choroidal neovascularization: a wound healing perspective. In: *Molecular vision* 9, S. 747–755.
- Kindzelskii, Andrei L.; Elnor, Victor M.; Elnor, Susan G.; Yang, Dongli; Hughes, Bret A.; Petty, Howard R. (2004): Toll-like receptor 4 (TLR4) of retinal pigment epithelial cells participates in transmembrane signaling in response to photoreceptor outer segments. In: *The Journal of general physiology* 124 (2), S. 139–149. DOI: 10.1085/jgp.200409062.
- Kiser, Philip D. (2021): Retinal pigment epithelium 65 kDa protein (RPE65): An update. In: *Progress in retinal and eye research*, S. 101013. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2021.101013.
- Klettner, Alexa (2015a): Altersabhängige Makuladegeneration (AMD). Biologie und Behandlung. In: *Medizinische Monatsschrift für Pharmazeuten* 38 (7), 258-64; quiz 265-6.
- Klettner, Alexa (2015b): The Retinal Pigment Epithelium in the Immune Regulation in: Recent advances in eye research; Editor: Adelle Hogarth. The Retinal Pigment Epithelium in the Immune Regulation. New York: Nova Science Publishers Inc (Eye research developments). Online verfügbar unter <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&scope=site&db=nlebk&AN=928700>.
- Klettner, Alexa; Brinkmann, Anna; Winkelmann, Katrin; Käckenmeister, Tom; Hildebrandt, Julia; Roider, Johann (2020): Effect of long-term inflammation on viability and function of RPE cells. In: *Experimental Eye Research* 200, S. 108214. DOI: 10.1016/j.exer.2020.108214.
- Klettner, Alexa; Hamann, Timothy; Schlüter, Karen; Lucius, Ralph; Roider, Johann (2014a): Retinal pigment epithelium cells alter the pro-inflammatory response of retinal microglia to TLR-3 stimulation. In: *Acta ophthalmologica* 92 (8), S. 621–629. DOI: 10.1111/aos.12472.
- Klettner, Alexa; Kauppinen, Anu; Blasiak, Janusz; Roider, Johann; Salminen, Antero; Kaarniranta, Kai (2013a): Cellular and molecular mechanisms of age-related macular degeneration: from impaired autophagy to neovascularization. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 45 (7), S. 1457–1467. DOI: 10.1016/j.biocel.2013.04.013.
- Klettner, Alexa; Koinzer, Stefan; Meyer, Tim; Roider, Johann (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. In: *Acta ophthalmologica* 91 (3), S. 211–218. DOI: 10.1111/aos.12031.
- Klettner, Alexa; Möhle, Friederike; Lucius, Ralph; Roider, Johann (2011): Quantifying FITC-labeled latex beads opsonized with photoreceptor outer segment fragments: an easy and inexpensive method of investigating phagocytosis in retinal pigment epithelium cells. In: *Ophthalmic research* 46 (2), S. 88–91. DOI: 10.1159/000323271.

- Klettner, Alexa; Möhle, Friederike; Roeder, Johann (2010): Intracellular bevacizumab reduces phagocytotic uptake in RPE cells. In: *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie* 248 (6), S. 819–824. DOI: 10.1007/s00417-010-1317-x.
- Klettner, Alexa; Roeder, Johann (2008): Comparison of bevacizumab, ranibizumab, and pegaptanib in vitro: efficiency and possible additional pathways. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 49 (10), S. 4523–4527. DOI: 10.1167/iops.08-2055.
- Klettner, Alexa; Roeder, Johann (2009): Treating Age-Related Macular Degeneration – Interaction of VEGF-Antagonists with their Target. In: *Mini Rev Med Chem* (9), S. 1127–1135.
- Klettner, Alexa; Roeder, Johann (2021): Retinal Pigment Epithelium Expressed Toll-like Receptors and Their Potential Role in Age-Related Macular Degeneration. In: *International journal of molecular sciences* 22 (16), S. 8387. DOI: 10.3390/ijms22168387.
- Klettner, Alexa; Tahmaz, Nihat; Dithmer, Michaela; Richert, Elisabeth; Roeder, Johann (2014b): Effects of aflibercept on primary RPE cells: toxicity, wound healing, uptake and phagocytosis. In: *The British journal of ophthalmology* 98 (10), S. 1448–1452. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2014-305105.
- Klettner, Alexa Karina (2020): Retinal Pigment Epithelium Cell Culture. In: Alexa Karina Klettner und Stefan Dithmar (Hg.): *Retinal Pigment Epithelium in Health and Disease*. Cham: Springer International Publishing, S. 295–305.
- Klettner, Alexa Karina; Kruse, Marie-Luise; Meyer, Tim; Wesch, Daniela; Kabelitz, Dieter; Roeder, Johann (2009): Different properties of VEGF-antagonists: Bevacizumab but not Ranibizumab accumulates in RPE cells. In: *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie* 247 (12), S. 1601–1608. DOI: 10.1007/s00417-009-1136-0.
- Kohno, Hideo; Chen, Yu; Kevany, Brian M.; Pearlman, Eric; Miyagi, Masaru; Maeda, Tadao et al. (2013): Photoreceptor proteins initiate microglial activation via Toll-like receptor 4 in retinal degeneration mediated by all-trans-retinal. In: *The Journal of biological chemistry* 288 (21), S. 15326–15341. DOI: 10.1074/jbc.M112.448712.
- Kumar, Matam Vijay; Nagineni, Chandrasekharam N.; Chin, Marian S.; Hooks, John J.; Detrick, Barbara (2004): Innate immunity in the retina: Toll-like receptor (TLR) signaling in human retinal pigment epithelial cells. In: *Journal of neuroimmunology* 153 (1-2), S. 7–15. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2004.04.018.
- Kutty, R. Krishnan; Samuel, William; Boyce, Kaifa; Cherukuri, Aswini; Duncan, Todd; Jaworski, Cynthia et al. (2016): Proinflammatory cytokines decrease the expression of genes critical for RPE function. In: *Molecular vision* 22, S. 1156–1168.
- Lopes, Vanda S.; Gibbs, Daniel; Libby, Richard T.; Aleman, Tomas S.; Welch, Darcy L.; Lillo, Concepción et al. (2011): The Usher 1B protein, MYO7A, is required for normal localization and function of the visual retinoid cycle enzyme, RPE65. In: *Human molecular genetics* 20 (13), S. 2560–2570. DOI: 10.1093/hmg/ddr155.
- Lu, Ming; Kuroki, Masatoshi; Amano, Shiro; Tolention, Michael; Keough, Karen; Kim, Ivana et al. (1998): Advanced Glycation End Products Increase Retinal Vascular Endothelial Growth Factor Expression. In: *J. Clin. Invest.* (101), S. 1219–1224.
- Lüllmann-Rauch, Renate; Paulsen, Friedrich (2012): *Taschenlehrbuch Histologie*. Kapitel 5 & 26. 4. Auflage. Stuttgart: Thieme.

- Maguire, Maureen G.; Martin, Daniel F.; Ying, Gui-Shuang; Jaffe, Glenn J.; Daniel, Ebenezer; Grunwald, Juan E. et al. (2016): Five-Year Outcomes with Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Treatment of Neovascular Age-Related Macular Degeneration: The Comparison of Age-Related Macular Degeneration Treatments Trials. In: *Ophthalmology* 123 (8), S. 1751–1761. DOI: 10.1016/j.ophtha.2016.03.045.
- Marmorstein, Alan D. (2001): The Polarity of the Retinal Pigment Epithelium. In: *Traffic* (2), S. 867–872. DOI: 10.1034/j.1600-0854.2001.21202.x.
- Marshall, J. (1987): The ageing retina: physiology or pathology. In: *Eye (London, England)* 1 (Pt 2), S. 282–295. DOI: 10.1038/eye.1987.47.
- Martin, Daniel F.; Maguire, Maureen G.; Fine, Stuart L.; Ying, Gui-Shuang; Jaffe, Glenn J.; Grunwald, Juan E. et al. (2012): Ranibizumab and bevacizumab for treatment of neovascular age-related macular degeneration: two-year results. In: *Ophthalmology* 119 (7), S. 1388–1398. DOI: 10.1016/j.ophtha.2012.03.053.
- Miller, Joan W.; Le Couter, Jennifer; Strauss, Erich C.; Ferrara, Napoleone (2013): Vascular endothelial growth factor a in intraocular vascular disease. In: *Ophthalmology* 120 (1), S. 106–114. DOI: 10.1016/j.ophtha.2012.07.038.
- Nickla, Debora L.; Wallman, Josh (2010): The multifunctional choroid. In: *Progress in retinal and eye research* 29 (2), S. 144–168. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2009.12.002.
- Parameswaran, Narayanan; Patial, Sonika (2010): Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Signaling in Macrophages. In: *Critical reviews in eukaryotic gene expression* 20 (2), S. 87–103.
- Patel, Amit K.; Hackam, Abigail S. (2013): Toll-like receptor 3 (TLR3) protects retinal pigmented epithelium (RPE) cells from oxidative stress through a STAT3-dependent mechanism. In: *Molecular immunology* 54 (2), S. 122–131. DOI: 10.1016/j.molimm.2012.11.005.
- Puddu, Alessandra; Sanguineti, Roberta; Durante, Arianna; Nicolò, Massimo; Viviani, Giorgio L. (2012): Vascular endothelial growth factor-C secretion is increased by advanced glycation end-products: possible implication in ocular neovascularization. In: *Molecular Vision* 2012 (18), S. 2509–2517. Online verfügbar unter <<http://www.molvis.org/molvis/v18/a262>>.
- Redmond, T. M.; Yu, S.; Lee, E.; Bok, D.; Hamasaki, D.; Chen, N. et al. (1998): Rpe65 is necessary for production of 11-cis-vitamin A in the retinal visual cycle. In: *Nature genetics* 20 (4), S. 344–351. DOI: 10.1038/3813.
- Risau, Werner (1997): Mechanisms of angiogenesis. In: *Nature* 386, S. 671–674. DOI: 10.1038/386671a0.
- Rodriguez, Luis G.; Wu, Xiaoyang; Guan, Jun-Lin (2005): Wound-healing assay. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 294, S. 23–29. DOI: 10.1385/1-59259-860-9:023.
- Rofagha, Soraya; Bhisitkul, Robert B.; Boyer, David S.; Sadda, Srinivas R.; Zhang, Kang (2013): Seven-year outcomes in ranibizumab-treated patients in ANCHOR, MARINA, and HORIZON: a multicenter cohort study (SEVEN-UP). In: *Ophthalmology* 120 (11), S. 2292–2299. DOI: 10.1016/j.ophtha.2013.03.046.
- Sadda, Srinivas R.; Guymer, Robyn; Monés, Jordi M.; Tufail, Adnan; Jaffe, Glenn J. (2020): Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Use and Atrophy in Neovascular Age-Related Macular Degeneration. In: *Ophthalmology* (127), S. 648–659. DOI: 10.1016/j.ophtha.2019.11.010.

Saenz-de-Viteri, Manuel; Fernández-Robredo, Patricia; Hernández, María; Bezunartea, Jaione; Reiter, Nicholas; Recalde, Sergio; García-Layana, Alfredo (2016): Single- and repeated-dose toxicity study of bevacizumab, ranibizumab, and aflibercept in ARPE-19 cells under normal and oxidative stress conditions. In: *Biochemical pharmacology* 103, S. 129–139. DOI: 10.1016/j.bcp.2015.12.017.

Sanchez, Irene; Martin, Raul; Ussa, Fernando; Fernandez-Bueno, Ivan (2011): The parameters of the porcine eyeball. In: *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 249 (4), S. 475–482. DOI: 10.1007/s00417-011-1617-9.

Schmidt-Erfurth, Ursula; Chong, Victor; Loewenstein, Anat; Larsen, Michael; Souied, Eric; Schlingemann, Reinier et al. (2014): Guidelines for the management of neovascular age-related macular degeneration by the European Society of Retina Specialists (EURETINA). In: *The British journal of ophthalmology* 98 (9), S. 1144–1167. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2014-305702.

Schnichels, Sven; Paquet-Durand, François; Löscher, Marina; Tsai, Teresa; Hurst, José; Joachim, Stephanie C.; Klettner, Alexa (2021): Retina in a dish: Cell cultures, retinal explants and animal models for common diseases of the retina. In: *Progress in retinal and eye research* 81, S. 100880. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2020.100880.

Schrader, W. F. (2006): Altersbedingte Makuladegeneration: Sozioökonomische Zeitbombe in der alternden Gesellschaft. In: *Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft* 103 (9), S. 742–748. DOI: 10.1007/s00347-006-1418-4.

Schünke, Michael; Schulte, Erik; Schumacher, Udo (2012): Kopf, Hals und Neuroanatomie. 123 Tabellen. 3., überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme (Prometheus).

Schwesinger, Catherine; Yee, Charles; Rohan, Richard M.; Jousen, Antonia M.; Fernandez, Antonio; Meyer, Tobias N. et al. (2001): Intrachoroidal Neovascularization in Transgenic Mice Overexpressing Vascular Endothelial Growth Factor in the Retinal Pigment Epithelium. In: *The American Journal of Pathology* 158 (3), S. 1161–1172. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64063-1.

Seagle, Brandon-Luke L.; Rezai, Kourous A.; Kobori, Yasuhiro; Gasyana, Elzbieta M.; Rezaei, Kasra A.; Norris, James R. (2005): Melanin photoprotection in the human retinal pigment epithelium and its correlation with light-induced cell apoptosis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (25), S. 8978–8983. DOI: 10.1073/pnas.0501971102.

Shen, Wei-Xing; Chen, Jia-Hui; Lu, Jian-Hua; Peng, Yu-Ping; Qiu, Yi-Hua (2014): TGF- $\beta$ 1 protection against A $\beta$ 1-42-induced neuroinflammation and neurodegeneration in rats. In: *International journal of molecular sciences* 15 (12), S. 22092–22108. DOI: 10.3390/ijms151222092.

Sheu, Shwu-Jiuan; Chao, Yung-Mei; Liu, Ni-Chun; Chan, Julie Y. H. (2015): Differential effects of bevacizumab, ranibizumab and aflibercept on cell viability, phagocytosis and mitochondrial bioenergetics of retinal pigment epithelial cell. In: *Acta ophthalmologica* 93 (8), S. 631–643. DOI: 10.1111/aos.12745.

Spitzer, Martin S.; Yoeruek, Efdal; Sierra, Ana; Wallenfels-Thilo, Barbara; Schraermeyer, Ulrich; Spitzer, Bernhard et al. (2007): Comparative antiproliferative and cytotoxic profile of bevacizumab (Avastin), pegaptanib (Macugen) and ranibizumab (Lucentis) on different ocular cells. In: *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 245 (12), S. 1837–1842. DOI: 10.1007/s00417-007-0568-7.

Spraul, Christoph W.; Lang, Gabriele E.; Grossniklaus, Hans E.; Lang, Gerhard K. (1998): Characteristics of drusen and changes in Bruch's membrane in eyes with age-related macular

degeneration. Histological study. In: *Der Ophthalmologe* 95 (2), S. 73–79. DOI: 10.1007/s003470050240.

Stahl, Andreas (2020): The diagnosis and treatment of age-related macular degeneration. In: *Dtsch Arztebl Int* (117), S. 513–520. DOI: 10.3238/arztebl.2020.0513.

Strauss, Olaf (2005): The retinal pigment epithelium in visual function. In: *Physiological reviews* 85 (3), S. 845–881. DOI: 10.1152/physrev.00021.2004.

Sugino, I. K.; Wang, H.; Zarbin, M. A. (2003): Age-related macular degeneration and retinal pigment epithelium wound healing. In: *Mol Neurobiol* (28), S. 177–194. DOI: 10.1385/MN:28:2:177.

Sura, Amol A.; Chen, Ling; Messinger, Jeffrey D.; Swain, Thomas A.; McGwin, Gerald; Freund, K. Bailey; Curcio, Christine A. (2020): Measuring the Contributions of Basal Lamina Deposit and Bruch's Membrane in Age-Related Macular Degeneration. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 61 (13), S. 19. DOI: 10.1167/iovs.61.13.19.

Terao, Akira; Apte-Deshpande, Anjali; Dousman, Linda; Morairty, Stephen; Eynon, Barrett P.; Kilduff, Thomas S.; Freund, Yvonne R. (2002): Immune response gene expression increases in the aging murine hippocampus. In: *Journal of neuroimmunology* 132 (1-2), S. 99–112. DOI: 10.1016/S0165-5728(02)00317-x.

Terheyden, Laura; Roeder, Johann; Klettner, Alexa (2021): Basolateral activation with TLR agonists induces polarized cytokine release and reduces barrier function in RPE in vitro. In: *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 259 (2), S. 413–424. DOI: 10.1007/s00417-020-04930-2.

Thompson, Debra A.; Gal, Andreas (2003): Vitamin A metabolism in the retinal pigment epithelium: genes, mutations, and diseases. In: *Progress in retinal and eye research* 22 (5), S. 683–703. DOI: 10.1016/S1350-9462(03)00051-X.

Tosi, Gian Marco; Caldi, Elena; Neri, Giovanni; Nuti, Elisabetta; Marigliani, Davide; Baiocchi, Stefano et al. (2017): HTRA1 and TGF- $\beta$ 1 Concentrations in the Aqueous Humor of Patients With Neovascular Age-Related Macular Degeneration. In: *Invest Ophthalmol Vis Sci.* (58), S. 162–167. DOI: 10.1167/iovs.16-20922.

Tosi, Gian Marco; Orlandini, Maurizio; Galvagni, Federico (2018): The Controversial Role of TGF- $\beta$  in Neovascular Age-Related Macular Degeneration Pathogenesis. In: *International journal of molecular sciences* 19 (11), S. 3363. DOI: 10.3390/ijms19113363.

Touhami, Sara; Beguier, Fanny; Augustin, Sébastien; Charles-Messance, Hugo; Vignaud, Lucile; Nandrot, Emeline F. et al. (2018): Chronic exposure to tumor necrosis factor alpha induces retinal pigment epithelium cell dedifferentiation. In: *Journal of neuroinflammation* 15 (1), S. 85. DOI: 10.1186/s12974-018-1106-8.

Unsal, Erkan; Cubuk, Mehmet Ozgur (2018): The outcomes of aflibercept therapy in patients with age-related macular degeneration resistant to bevacizumab or ranibizumab. In: *Journal of current ophthalmology* 30 (4), S. 337–342. DOI: 10.1016/j.joco.2018.07.002.

van Weemen, B. K.; Schuur, A.H.W.M. (1971): Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. In: *FEBS Letters* 15 (3), S. 232–236. DOI: 10.1016/0014-5793(71)80319-8.

Wang, Haibo; Han, Xiaokun; Wittchen, Erika S.; Hartnett, M. Elizabeth (2016): TNF- $\alpha$  mediates choroidal neovascularization by upregulating VEGF expression in RPE through ROS-dependent  $\beta$ -catenin activation. In: *Molecular vision* 22, S. 116–128.

Wang, Y.; Wang, V. M.; Chan, C-C (2011): The role of anti-inflammatory agents in age-related macular degeneration (AMD) treatment. In: *Eye (London, England)* 25 (2), S. 127–139. DOI: 10.1038/eye.2010.196.

Wiencke, Anne Katrine; Kiilgaard, Jens Folke; Nicolini, Jair; Bundgaard, Magnus; Röpke, Carsten; La Cour, Morten (2003): Growth of cultured porcine retinal pigment epithelial cells. In: *Acta ophthalmologica Scandinavica* 81 (2), S. 170–176. DOI: 10.1034/j.1600-0420.2003.00030.x.

Wing, Gleen L.; Blanchard, G. C.; Weiter, J. J. (1978): The topography and age relationship of lipofuscin concentration in the retinal pigment epithelium. In: *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 17 (7), S. 601–607.

Winkelmann, Katrin (2020): Anti-VEGF Therapie unter Entzündungsparametern - Auswirkungen auf Zellvitalität und Zytokinsekretion im retinalen Pigmentepithel.

Wolfram, Christian; Schuster, Alexander K.; Elflein, Heike M.; Nickels, Stefan; Schulz, Andreas; Wild, Philipp S. et al. (2019): The Prevalence of Visual Impairment in the Adult Population. In: *Deutsches Arzteblatt international* 116 (17), S. 289–295. DOI: 10.3238/arztebl.2019.0289.

Xu, Heping; Chen, Mei; Forrester, John V. (2009): Para-inflammation in the aging retina. In: *Progress in retinal and eye research* 28 (5), S. 348–368. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2009.06.001.

Yuan, Jianshu (2019): Role of inflammatory factors in the effects of aflibercept or ranibizumab treatment for alleviating wet age-associated macular degeneration. In: *Experimental and therapeutic medicine* 17 (5), S. 4249–4258. DOI: 10.3892/etm.2019.7427.

Zhu, Yi; Dai, Bingling; Li, Yongguo; Peng, Hui (2015): C5a and toll-like receptor 4 crosstalk in retinal pigment epithelial cells. In: *Molecular vision* 21, S. 1122–1129.

## 7 PUBLIKATIONEN

---

Klettner, Alexa; **Brinkmann, Anna**; Winkelmann, Katrin; Käckenmeister, Tom; Hildebrandt, Julia; Roider, Johann (2020): Effect of long-term inflammation on viability and function of RPE cells.

In: *Experimental Eye Research* November 2020; 200, S. 108214; Epub 6. September 2020. PMID: 32898511. DOI: 10.1016/j.exer.2020.108214.

**Brinkmann, Anna**; Winkelmann, Katrin; Käckenmeister, Tom; Roider, Johann; Klettner, Alexa (2021): Effect of long-term anti-VEGF treatment on viability and function of RPE cells.

In: *Current eye research* Januar 2022; 47(1): S. 127-134; Epub 6. Juni 2021; PMID: 33998943. DOI: 10.1080/02713683.2021.1931344.

## 8 DANKSAGUNG

---

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen danken, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Prof. Dr. Alexa Klettner die mir dieses Thema überlassen hat und mir zu jedem Zeitpunkt der Anfertigung motivierend, unterstützend, freundlich und mit einem herausragenden Fachwissen zur Seite stand. Auch möchte ich für die vielen guten und stets zielführenden Gespräche und die schnellen Korrekturen danken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Roider für die Möglichkeit, diese Dissertation an der Klinik für Ophthalmologie anfertigen zu können.

Außerdem möchte ich mich bei Andrea Hethke, Serap Luick und Monika Marquard für die fachkompetente und geduldige Einarbeitung und Zusammenarbeit im Labor bedanken. Für die praktische Unterstützung bei der Durchführung meiner Experimente gilt mein Dank insbesondere Kathinka-Gesine Winter. Die Atmosphäre im Labor war immer sehr angenehm und familiär, so dass die Arbeit viel Freude bereitet hat.

Für die finanzielle Förderung bedanke ich mich herzlich bei der Jackstädt-Stiftung.

Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Volker Hagen von M-Imaging für die Programmierung und Bereitstellung des Skriptes zur Auswertung der Immunfluoreszenzbilder.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, Martin und Ulrike Brinkmann, die mich in all meinen Entscheidungen unterstützt und mir das Medizinstudium und diese Dissertation überhaupt erst ermöglicht haben. Ihre bedingungslose Fürsorge und die liebevolle und vielseitige Unterstützung haben mir bei der Fertigstellung dieser Arbeit sehr geholfen. Meiner Schwester Lisa Marie Brinkmann danke ich von Herzen für ihre sprachliche Begabung, ihren Fleiß und die Genauigkeit beim Korrekturlesen. Meinem Bruder Hannes Peter Brinkmann danke ich für seine fröhliche Art, die mich immer aufgemuntert hat.

Ich möchte mich bei meinen Freunden und Freundinnen und meinen Hauskreisen bedanken, die mich im Gebet begleitet und moralisch unterstützt haben. Ihr Zuspruch und Rückhalt haben mir viel Kraft gegeben und mir dabei geholfen mein Studium und diese Dissertation zu meistern.

Zum Schluss möchte ich mich bei meinem Freund Niels Piesch bedanken, der alle Höhen und Tiefen dieser Arbeit miterlebt hat und mir dabei immer liebevoll, geduldig und einfühlsam zur Seite stand.

## 9 ERKLÄRUNG ZUM SELBSTÄNDIGEN VERFASSEN DER ARBEIT

---

Hiermit versichere ich, Anna Sophie Brinkmann, geboren am 25.03.1996 in Zeven, 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 gefunden 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.

Ahrensburg, den 18.05.2022

---

Anna Sophie Brinkmann