

Aus der Klinik für Ophthalmologie

(Direktor: Prof. Dr. J. Roider)

im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Apikale Effekte bei basolateraler Aktivierung des retinalen Pigmentepithels  
vor dem Hintergrund der altersbedingten Makuladegeneration**

- Inauguraldissertation -

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von:

**LAURA TERHEYDEN**

aus Mainz

Kiel, 2022

1. Berichterstatter\*in: Prof. Dr. Alexa Karina Klettner

2. Berichterstatter\*in: Prof. Dr. Dr. Janka Held-Feindt

Tag der mündlichen Prüfung: 15.03.2023

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 29.11.2022

gez.: Prof. Dr. Alexa Karina Klettner

Vorsitzende der Prüfungskommission

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	I
I. Abkürzungsverzeichnis .....	IV
1. Einleitung .....	1
1.1. Altersbedingte Makuladegeneration .....	1
1.1.1. Gesellschaftlicher Kontext .....	1
1.1.2. Anatomische Grundlagen .....	2
1.1.3. Klinische Präsentation der AMD .....	5
1.1.4. Ätiologie der AMD .....	9
1.1.5. Immunregulation der Retina .....	10
1.1.6. Toll-like-Rezeptoren .....	13
1.1.7. Zytokine .....	18
1.2. Fragestellung der Arbeit .....	20
2. Material und Methoden .....	21
2.1. Material .....	21
2.1.1. Geräte und Instrumente .....	21
2.1.2. Chemikalien .....	23
2.1.3. Lösungen .....	24
2.1.4. Antikörper .....	25
2.1.5. ELISA-Kits .....	25
2.1.6. Biologische Materialien .....	25
2.1.7. Verbrauchsmaterialien .....	26
2.2. Methoden .....	27
2.2.1. Modelle .....	27
2.2.2. Zell-/Organkulturen .....	28
2.2.2.1. Herstellung einer RPE-Zellkultur .....	28
2.2.2.2. Herstellung einer Organkultur .....	30
2.2.2.3. Zellkultur undifferenzierter SH-SY5Y-Zellen .....	31
2.2.3. Qualitätssicherung der Barriere .....	32
2.2.3.1. TEER-Messung bei RPE-Transwell-Zellkulturen .....	32
2.2.3.2. Nachweis der Dichte der Ussing-Kammern mit Brilliantblau G .....	34
2.2.4. Stimulation der Zellkulturen .....	35
2.2.4.1. Stimulation der RPE-Transwell-Zellkulturen .....	35

2.2.4.2. Stimulation der Organkulturen .....	36
2.2.4.3. Stimulation der SH-SY5Y-Zellen .....	36
2.2.5. Färbeverfahren .....	37
2.2.5.1. Nachweis der Zelltoxizität durch den MTT-Assay .....	37
2.2.5.2. Calceinfärbung .....	38
2.2.5.3. Immunfluoreszenzfärbung .....	39
2.2.6. Enzyme-linked Immunosorbent Assay .....	41
2.2.7. Statistische Auswertung .....	41
3. Ergebnisse .....	42
3.1. Qualitätssicherung der Versuche .....	42
3.1.1. MTT-Assay für RPE-Transwell-Platten 24 Stunden nach Stimulation .....	42
3.1.2. Calceinfärbung .....	43
3.1.3. Nachweis der Dichte der Ussing-Kammern mit Brilliantblau G .....	43
3.2. Untersuchungen zur Integrität der Barriere .....	43
3.2.1. TEER- Messungen .....	43
3.2.2. Immunfluoreszenzfärbung .....	44
3.3. Untersuchungen der apikalen und basalen Zytokin-Sekretion im ELISA .....	48
3.3.1. ELISA der RPE-Überstände nach 24-stündiger Stimulation .....	48
3.3.1.1. TNF- $\alpha$ .....	48
3.3.1.2. IL-6 .....	49
3.3.1.3. IL-1 $\beta$ .....	51
3.3.2. ELISA der Organkultur-Überstände nach 24-stündiger Stimulation .....	52
3.3.2.1. TNF- $\alpha$ .....	52
3.3.2.2. IL-6 .....	53
3.3.2.3. IL-1 $\beta$ .....	53
3.4. Versuche mit neuronalen Zellen .....	54
3.4.1. MTT-Assay für SH-SY5Y-Zellen stimuliert mit RPE-Überständen nach 24 Stunden .....	54
3.4.2. MTT-Assay für SH-SY5Y-Zellen stimuliert mit Organkultur-Überständen nach 24 Stunden .....	55
4. Diskussion .....	56
5. Zusammenfassung .....	61
6. Literaturverzeichnis .....	63
7. Anhang .....	78
7.1. Abbildungsverzeichnis .....	78

7.2. Tabellenverzeichnis.....	79
7.3. Selbstständigkeitserklärung.....	79
7.4. Danksagung.....	80
7.5. Veröffentlichungen.....	81
7.5.1. Zeitschriftenartikel.....	81
7.5.2. Kongressbeiträge .....	81

## I. Abkürzungsverzeichnis

AIDS	Erworbenes Immunschwäche-Syndrom
AMD	Altersbedingte Makuladegeneration
APC	Antigen-präsentierende Zelle
AREDS	<i>Age-Related Eye Disease-Study</i> (Studie zu altersbedingten Augenerkrankungen)
ARM	Altersbedingte Makulopathie
ARPE	Zelllinie adulten retinalen Pigmentepithels
ATP	Adenosintriphosphat
BrM	Bruch'sche Membran
BRS	Blut-Retina-Schranke
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
C5	Komplementfaktor 5
CEP	Carboxyethylpyrrol
CFH	Komplementfaktor H
CNTF	Ziliärer neurotrophischer Faktor
CNV	Choroidale Neovaskularisation
CMV	Cytomegalievirus
co	Kontrolle
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COX	Cyclooxygenase
DAMP	<i>Damage associated molecular pattern</i> (Schaden-assoziierte molekulare Muster)
DMSO	Dimethylsulfoxid

DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> (Zellkulturmedium)
dsRNA	doppelsträngige Ribonucleinsäure
dt.	deutsch
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest)
FAS-L	Fas-Ligand
FCS	Fetales Kälberserum
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
h	Stunde
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IRAK	Interleukin-1-Rezeptor-assoziierte Kinase
IRF	Interferon-regulierender Faktor
Ko	Kontrolle
l	Liter
LRR	Leucinreiche Wiederholungen
LPS	Lipopolysaccharide (Ligand für TLR 4)
MAL	<i>MyD88 adaptor like</i> (MyD88 Adaptor ähnlich)
MCP	Monozyten chemo-attraktives Protein
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MMP	Matrixmetalloproteinasen
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> (Boten-Ribonucleinsäure)

MTT	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) 2,5 diphenyltetrazoliumbromid
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NFκB	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i> (Nukleärer Faktor 'Kappa-Leichtketten-Erweiterer' aktivierter B-Zellen)
NLRP	<i>NACHT, LRR and PYD domains-containing protein</i> (NACHT-, LRR- und PYD-Domänen-enhaltendes Protein)
OCT	Optische Kohärenztomographie
OK	Organkultur
p	probabilitas (Signifikanzwert)
PAM2CSK4	Diacyliertes Pam2CSK4 (Ligand für TLR 2/6)
PAM3CSK4	Triacyliertes Pam3CSK4 (Ligand für TLR 2/1)
PAMP	<i>Pathogen associated molecular pattern</i> (Pathogen-assoziierte molekulare Muster)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEDF	Pigmentepithel-abgeleiteter Faktor
PE/ST	Penicillin/Streptomycin
POLY I:C	Polyinosinsäure:Polycytidylsäure (Ligand für TLR 3)
POS	Photorezeptor-Außensegmente
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i> (Mustererkennungsrezeptor)
RPE	Retinales Pigmentepithel
RPM	<i>Rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (Eigenname Zellkulturmedium)



RSV	Respiratorisches Synzytial-Virus
sICAM	Lösliches interzelluläres Adhäsionsmolekül
TC	<i>Tissue culture</i> (Zellkultur)
TEER	<i>Transepithelial electrical resistance</i> (Transepithelialer elektrischer Widerstand)
TGF- $\beta$	<i>Transforming Growth Factor Beta</i> (Umwandelnder Wachstumsfaktor Beta)
TIMP	Gewebeinhibitoren von Metalloproteinasen
TIR	Toll/Interleukin-1-Rezeptor
TJ	<i>Tight Junctions</i> (Schlussleiste)
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF	Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziiierter Faktor
TRAM	TRIF-bezogenes Adaptermolekül
TRIF	<i>TIR domain containing adaptor inducing interferon</i> (TIR-Domäne-enhaltendes Adaptor-induzierendes Interferon)
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VEGF-R	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor-Rezeptor
VSV	Vesikuläres Stomatitis-Virus
WARMGS	<i>Wisconsin age-related maculopathy grading system</i> (Einteilungssystem der altersbedingten Makulopathie nach Wisconsin)
ZO	Zonula occludens

# **1. Einleitung**

## **1.1. Altersbedingte Makuladegeneration**

### **1.1.1. Gesellschaftlicher Kontext**

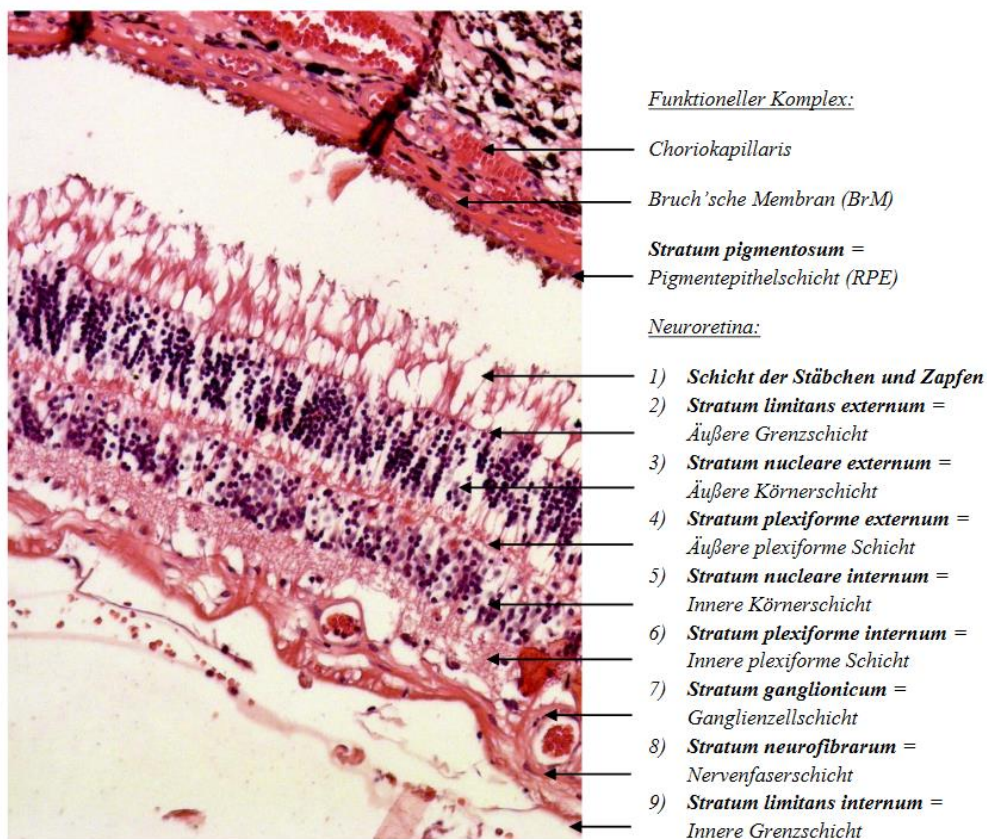
Durch den exponentiell zunehmenden demographischen Wandel leiden immer mehr Menschen in unserer Gesellschaft an altersabhängigen Erkrankungen wie der altersbedingten Makuladegeneration (AMD) (Zhao et al. 2019). Deshalb werden die Ausgaben in der Augenheilkunde vor allem durch die neuen Therapieoptionen der AMD in den nächsten Jahren immer weiter steigen (Ambati et al. 2013; Schrader 2006). In einer globalen Studie wurde abgeschätzt, dass im Jahre 2020 weltweit etwa 196 Millionen Menschen von der AMD betroffen sind, mit einem voraussichtlichen Anstieg auf 288 Millionen Menschen im Jahre 2040 (Wong et al. 2014). Insgesamt sei die AMD mit Kosten von insgesamt 343 Milliarden US \$ für das weltweite Gesundheitswesen verbunden (AMD Alliance International 2010). In Deutschland sind derzeit etwa 7,5 Millionen Menschen von einer Form der AMD betroffen, wobei bereits bei 20 % der über 65-Jährigen und 35 % der über 75-Jährigen die Frühform festzustellen ist und sich etwa 1 % der 65-Jährigen und 5 % der über 75-Jährigen schon im Endstadium befinden (Korb et al. 2014). Symptome der Erkrankung sind ein grauer Schatten in Blickrichtung, das sogenannte „Zentralskotom“, und im Falle von Netzhautödemen eine Verzerrung der betrachteten Objekte, sogenannte „Metamorphopsien“, die mit dem Amsler-Gitter bereits früh diagnostiziert werden können (Grehn, 2019). Für den Alltag des Patienten kann dies eine herabgesetzte Lesefähigkeit, schlechtere Gesichtserkennung und Fahruntüchtigkeit bedeuten (Ambati 2013). Im ungünstigen Verlauf kann auch der komplette Sehverlust eintreten. Mit einem Anteil von 50 % und einer Inzidenz von 5000 Neuerkrankten pro Jahr stellt die AMD die häufigste Ursache für Erblindung dar, die nach deutschen Kriterien durch einen Visus von unter 0,02 definiert wird (Korb et al. 2014). Dabei ist von großer Bedeutung, dass dem Sehvermögen ein hoher Wert an Lebensqualität zugeschrieben wird. Ein Maß dafür ist die *Time-Trade-Off*-Methode, nach der Patienten mit einem Visus von 0,67-0,4 auf 19 %, diejenigen mit einem Visus von 0,1-0,05 auf 48 % und Blinde sogar auf 60 % ihrer Lebenszeit verzichten würden, wenn sie dafür eine Technologie erhielten, die ihnen bis zum Lebensende ein 100 %iges Sehvermögen ermöglichte. Die ermittelten Werte des durch den Sehverlust erlebten Leidensdrucks wurden mit denen von anderen Krankheitsbildern verglichen. Es ergab sich, dass die AMD-Patienten im Anfangsstadium schon ähnlich unter den Seheinschränkungen litten wie Patienten mit Kolonkarzinom unter Chemotherapie, später im

Krankheitsverlauf wie Aids-Patienten unter opportunistischen Erkrankungen und im Endstadium wie unter den Folgen eines schweren Schlaganfalls (Knauer und Pfeiffer 2008). Dabei kommt erschwerend hinzu, dass der alternde Mensch ohnehin sehr vulnerabel ist. So können die fehlenden Seheindrücke beispielsweise zusätzlich noch eine Verschlechterung der kognitiven Leistungsfähigkeit herbeiführen (Harrabi et al. 2015). Aus den wenigen Behandlungsoptionen und dem noch unvollständigen Verständnis der Pathogenese resultiert die Notwendigkeit, tiefere Einblicke in das Erkrankungsgeschehen zu erlangen und daraus bestenfalls Heilungskonzepte zu entwickeln, die schon frühzeitig ansetzen und dem Patienten eine lange Teilhabe mit uneingeschränkter Lebensqualität ermöglichen können. Dies soll die Grundlage für diese Arbeit sein.

### **1.1.2. Anatomische Grundlagen**

Der lichtempfindliche Teil der Retina wird als Pars optica retinae bezeichnet und besteht aus zwei evolutionär unterschiedlich entwickelten Schichten, die locker aufeinanderliegen und durch den Augeninnendruck und die Pumpleistung des retinalen Pigmentepithels (RPE) zusammengehalten werden. Das äußere Blatt, das Stratum pigmentosum, wird durch das RPE repräsentiert, während sich das innere Blatt, das Stratum nervosum, aus einem Komplex aus Photorezeptoren, Interneuronen und Gliazellen zusammensetzt (Abb. 1) (Schünke et al., 2012). Innerhalb der temporalen Gefäßarkaden am hinteren Pol befindet sich ein rundes Gebiet, welches aufgrund der hohen Konzentrationen an gelben Xanthophyll-Karotin-Pigmenten wie Lutein und Zeaxanthin den Namen *Macula lutea* (dt. gelber Fleck) erhalten hat (Kanski, 2012). Die Makula enthält die Fovea centralis, den Ort des schärfsten Sehens, durch den die optische Achse verläuft. Hier befindet sich durch Verlagerung der inneren Retina-Schichten an den Rand eine trichterförmige Einstülpung in der Netzhaut, sodass das einfallende Licht im Zentrum der Fovea centralis, der sogenannten Foveola, beinahe direkt auf die Photorezeptoren treffen kann. Bei den Photorezeptoren handelt es sich um spezialisierte Neurone, die Licht in biochemische Signale umwandeln können (Ambati et al. 2013). Die Lichtsignale werden über komplexe Verschaltungen mit weiteren Neuronen verarbeitet und über den Nervus opticus schließlich an das Gehirn weitergeleitet. Es wird bei den Photorezeptoren zwischen Stäbchen- und Zapfenzellen unterschieden. In der Fovea finden sich fast ausschließlich dicht gepackte Zapfenzellen, die lediglich per Diffusion über die Bruch'sche Membran (BrM) von der Choriokapillaris versorgt werden. Dies steht im Gegensatz zur äußeren Makula und der umliegenden Retina, wo das Verhältnis der Stäbchenzellen wieder zunimmt und die Äste der Arteria centralis retinae die äußeren Schichten der Retina mitversorgen (Lüllmann-Rauch

2012). Während die etwa 120 Mio. Stäbchenzellen mit ihrer hohen Lichtempfindlichkeit vor allem auf das Sehen bei Dunkelheit spezialisiert sind, zeichnen sich die etwa 6 Mio. Zapfenzellen durch ihre hohe Auflösungsfähigkeit aus und sind damit vor allem für das Erkennen von Farb- und Helligkeitsunterschieden am Tage zuständig. Dabei teilen sich die Photorezeptoren in zwei Segmente auf, die lediglich über ein Zilium miteinander verbunden sind, durch welches der gesamte Stofftransport erfolgt. Während das Innensegment vor allem die metabolischen Aufgaben der Zelle erfüllt, sind die Außensegmente für die Lichtreaktion verantwortlich. Die Außensegmente werden von den Photorezeptoren selbst erneuert und enthalten das lichtempfindliche Sehpigment *Rhodopsin* (Opsin und Retinal), welches in Biomembranen eingebaut ist. Die Membranscheibchen werden proximal abgeworfen und schließlich vom RPE phagozytiert und abgebaut (Lüllmann-Rauch 2012).



**Abbildung 1.:** Histologischer Schnitt durch die Retina eines enukleierten menschlichen Bulbus in HE-Färbung. Fixationsbedingt hat sich die Neuroretina vom Pigmentepithel abgelöst. (Foto: Laura Terheyden, mit freundlicher Genehmigung von Herrn Prof. Roider, Direktor der Universitätsaugenklinik Kiel, Bezeichnungen nach Lüllmann-Rauch 2012)

Das RPE bildet mit der BrM und der Choriokapillaris eine funktionelle Einheit (Abb. 1), deren feine Abstimmung der einzelnen Partner essentiell für den intakten Sehvorgang und bei der AMD beeinträchtigt ist (Bhutto und Luty 2012; Klettner et al. 2015).

Bei der Choriokapillaris handelt es sich um ein flaches, sehr dichtes Kapillarbett, dessen Basallaminae die Unterseite der BrM bilden. Die Kapillaren sind hier weitlumig und gefenstert, damit die Nährstoffe optimal in Richtung der Retina hindurchdiffundieren können (Lüllmann-Rauch 2012). Zu beachten ist, dass die Choroidea durch ihren hohen Blutfluss das am besten perfundierte Gewebe des menschlichen Körpers darstellt (Curcio et al. 2010). Dies dient neben dem gesteigerten Stoffwechselproduktransport auch dem Herunterkühlen der durch das absorbierte Licht erhitzten retinalen Strukturen (Parver et al. 1980).

Die BrM bildet als extrazelluläre Matrix eine ebene Unterlage für die RPE-Zellen und gleichzeitig auch die Außenwand der Choriokapillaris, durch die Nährstoffe aus dem Blut zur Retina hindurchdiffundieren können. Eingerahmt durch die beiden jeweiligen Basallaminae, enthält sie ein zentrales Netz aus elastischen Fasern, welches von außen und innen von Kollagenfibrillen umspannt wird (Lüllmann-Rauch 2012). Die Aufrechterhaltung der Elastizität und Permeabilität wird durch ein reges Zusammenspiel aus Matrixmetalloproteinasen (MMP) und *Tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMP) gewährleistet. Im Alter kommt es jedoch durch ein zunehmendes Ungleichgewicht der Aktivität der beiden Enzyme zu einem verminderten Umsatz und einer daraus resultierenden Verdickung der Membran. Diese wird zusätzlich durch die Ablagerungen von Lipoproteinen und Amyloid in der Basallamina des RPE gefördert, die sich schließlich über die Zeit zu Drusen entwickeln können (Miller 2013). Mit der zunehmenden Verdickung fällt jedoch die Diffusion kleinerer löslicher Substanzen über die BrM immer schwerer, was zu einem zunehmenden Untergang der zu versorgenden Strukturen in der Retina führen kann (Hillenkamp et al. 2004).

Das RPE ist eine Einzelzellschicht aus kubischen Zellen mit einem hohen Melanosomengehalt. Während die RPE-Zellen basal fest mit der BrM verbunden sind, umfassen sie apikal locker mit ihren Mikrovilli die Photorezeptor-Außensegmente. Das in den Melanosomen enthaltene Pigment Melanin bewahrt die Photorezeptoren vor Streulicht (Lüllmann-Rauch 2012). Es handelt sich bei den RPE-Zellen um hochpolarisierte Zellen, die basal und apikal unterschiedliche Funktionen ausüben können (Klettner et al. 2015). Die Polarität und Barrierefunktion wird durch die enge apikale Verschnürung der Interzellularräume über die *Tight Junctions* (TJ) erreicht, die dafür sorgen, dass jegliche Substanz die RPE-Zelle selbst passieren muss, bevor sie aus dem Blut an die Photorezeptoren gelangt und umgekehrt (Campbell und Humphries 2012). Der transepitheliale Transport wird durch die hohe apikale Ausstattung mit Natrium-Kalium-ATPasen aufgebaut, welche einen starken Gradienten über dem Epithel aufbauen. Dadurch können wichtige Nährstoffe wie Vitamin A und Glucose über

das Epithel zu den Photorezeptoren transportiert und deren Abfallstoffe wieder an das Blut abgegeben werden. Der spannungsabhängige Ionentransport sorgt für die Erregbarkeit der Photorezeptoren und Wasser wird aus dem subretinalen Raum gepumpt, was die Anheftung der beiden Gewebe gewährleistet (Strauss 2005). Zudem ist das RPE beim Sehzyklus aktiv an der Umwandlung von all-trans-Retinol in das lichtempfindliche 11-cis-Retinal beteiligt (Strauss 2005). Darüber hinaus sezerniert das RPE aktiv Proteine mit protektiven Eigenschaften für die Photorezeptoren und die Choriokapillaris. Während Faktoren wie der *Fibroblast Growth Factor* (FGF) und der *Ciliary Neurotrophic Factor* (CNTF) vor allem nach Zellschäden ausgeschüttet werden, werden der *Pigment-epithelium Derived Factor* (PEDF) und der *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) konstitutiv exprimiert (Strauss 2005; Klettner et al. 2015). Es ist außerdem auch aktiv an der Immunabwehr beteiligt, was in Abschnitt 1.1.5. näher ausgeführt wird (Klettner, 2015).

### **1.1.3. Klinische Präsentation der AMD**

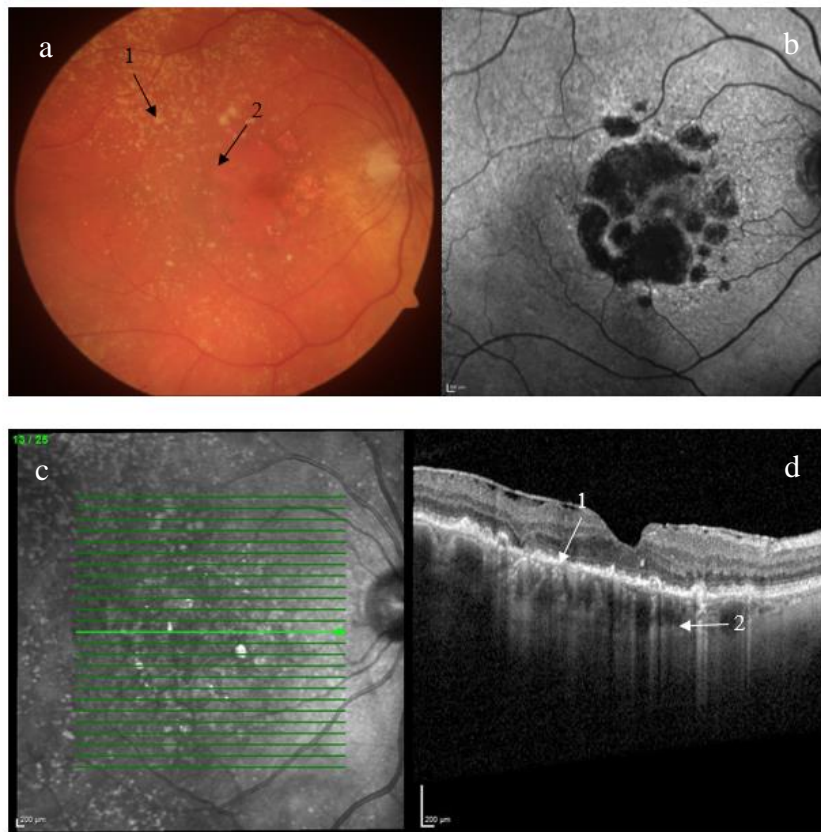
Nach der internationalen Klassifikation, dem *Wisconsin Age-Related Maculopathy Grading System* (WARMGS), zeigen sich die ersten Anzeichen der Erkrankung durch die Entstehung sogenannter Drusen, die bereits in der funduskopischen Untersuchung am Augenhintergrund imponieren. Diese werden meist von Hypo- oder Hyperpigmentierungen begleitet, wobei bisher nur die Hyperpigmentierungen als negative Prognosemarker herangezogen werden (Abalem et al. 2019). Dieser Zustand wird zunächst noch als frühe *Age Related Maculopathy* (ARM) definiert. Bei den Drusen handelt es sich um weiß-gelbliche extrazelluläre Ablagerungen hyalinen Materials zwischen RPE und BrM. Sie werden in „harte“ und „weiche“ Drusen eingeteilt (Grehn, 2019). Während die kleinen, harten Drusen meist nicht-pathologische altersbedingte Veränderungen darstellen, werden die unscharf begrenzten deutlich größeren weichen Drusen mit dem Risiko des Fortschreitens der AMD zu den späten Formen in Verbindung gebracht, was im Falle des Verschmelzens zu weitflächigen Ablösungen des RPE führen kann (Miller 2013). Neben harten und weichen Drusen ist die AMD auch mit retikulären Drusen, netzartigen gelblichen Verflechtungen im subretinalen Raum assoziiert, die wesentlich mit den fortgeschritteneren Stadien der AMD verknüpft sind und eine gliale und monozytäre Beteiligung aufweisen (Rabiolo et al. 2017). Die Zusammensetzung der Drusen aus vor allem Apolipoproteinen, Vitronectin, Komplementfaktoren und peroxidierten Lipiden spricht darüber hinaus für ein immungesteuertes Geschehen (Crabb 2014; Curcio et al. 2010; Curcio et al. 2011; Hageman et al. 2001). Insgesamt stören die Drusen die Integrität des funktionellen Komplexes aus Netzhaut, BrM und Choriokapillaris, welcher, wie im vorherigen Unterkapitel bereits

erwähnt, notwendig für den intakten Sehvorgang ist (Bhutto und Luty 2012). Ist der funktionelle Komplex an einer Stelle beeinträchtigt, wird dieser Zustand schließlich als späte AMD bezeichnet und ist durch eine atrophische oder neovaskuläre Makuladegeneration gekennzeichnet (Bhutto und Luty 2012). Diese beiden Endstadien bilden die Grundlage für die Einteilung der AMD in eine trockene und eine feuchte Form.

Die feuchte Form der AMD ist mit 10 % die seltenere Form, schreitet jedoch in den meisten Fällen wesentlich schneller fort. Die Ursache liegt in einem Verlust der choriokapillären Gefäße, beispielsweise durch Stenosierung oder Entzündungsreize, was eine Gewebhypoxie herbeiführt und die Entstehung von Drusen befördert (Bhutto und Luty 2012). Infolge der verminderten Durchblutung wird VEGF vom RPE freigesetzt, welches das Hindurchwachsen choroidaler Gefäßschlingen stimuliert, um wieder mehr Sauerstoff in das Gewebe zu bringen. Da diese Gefäßneubildungen, die auch als choroidale Neovaskularisationen (CNV) bezeichnet werden, sehr instabil sind, können sie großflächige Einblutungen und seröse Netzhautablösungen verursachen, die später als fibrovaskuläre Membranen imponieren und im Endstadium zu einer scheibenförmigen fibrösen Narbe führen können. Diese wurde in Begleitung von kranzförmig angeordneten Lipidexsudationen im alten Sprachgebrauch als Junius-Kuhnt-Makulopathie bezeichnet. Die pathologischen Gefäßneubildungen können optimal mithilfe der Fluoreszenzangiographie zur Darstellung gebracht werden (Grehn, 2019). Bei der feuchten Form der AMD kam der entscheidende Durchbruch für eine wirksame Therapie mit der Entdeckung des VEGF-A als auslösendem Faktor für die CNV. Für diesen Faktor wurden spezielle Inhibitoren entwickelt, die durch regelmäßige intravitreale Applikation zu einer signifikanten Rückbildung der CNV und damit Erhaltung und Verbesserung des Sehvermögens führen (Miller et al. 2013). Bei den Inhibitoren handelt es sich um *Biologicals*, d.h. rekombinant hergestellte Antikörper/-fragmente, bzw. Fusionsproteine, welche die Interaktion zwischen VEGF-A und seinen retinalen Rezeptoren (VEGF-R-1 und 2) verhindern (Klettner, 2014). Die derzeit für die Behandlung der AMD in Europa und den USA zugelassenen Medikamente sind Ranibizumab (Lucentis®) und Aflibercept (Eylea®), die eine vergleichbare Wirksamkeit zeigen, wobei Aflibercept seltener verabreicht werden muss und bei speziellen Indikationen vorzuziehen ist (Heier et al. 2012; Park et al. 2017; Zhang et al. 2017). Bevacizumab (Avastin®) ist offiziell zwar für onkologische Indikationen zugelassen, wird jedoch aufgrund der deutlich niedrigeren Kosten, hohen Verfügbarkeit und in der CATT- und IVAN-Studie gezeigten gleichwertigen Wirksamkeit zu Ranibizumab auch bei der AMD im

*off-label-use* eingesetzt (Solomon et al. 2016). Damit sind die VEGF-Inhibitoren derzeit der Gold-Standard in der Behandlung der feuchten Form der AMD.

Die mit 85-90 % wesentlich häufiger auftretende trockene Form zeichnet sich durch eine langsam fortschreitende Degeneration der Photorezeptoren durch eine Überlastung des retinalen Pigmentepithels und konsekutive Akkumulation von Stoffwechselprodukten in Form von Drusen im Alter aus (Abb. 2a) (Grehn, 2019). Die Veränderungen münden schließlich in die Bildung eines atrophischen Areals, in dem bereits die größeren Aderhautgefäße zu sehen sein können, welches als geographische Atrophie bezeichnet wird. Am besten können diese Areale in der Autofluoreszenz-Bildgebung dargestellt werden, da hier das RPE, das normalerweise autofluoreszierendes Lipofuszin enthält, untergeht und die zurückbleibende Stelle dadurch hypofluoreszent imponiert (Abb. 2b) (Ly et al. 2017).



**Abbildung 2:** Untersuchungen des rechten Auges einer 79-jährigen Kieler Patientin mit geographischer Atrophie bei trockener AMD. a) Funduskopisches Bild mit Drusen (1) und geographischer Atrophie (2) im Bereich der Makula, b) Autofluoreszenz-Fundus mit großflächigem hypofluoreszentem Atrophieareal, c) OCT-Fundus mit Angabe der Position des Netzhautanschnittes durch grünen Pfeil, d) OCT der Makula auf Höhe der Fovea centralis mit zahlreichen Drusen (1) zwischen BrM und RPE und choroidaler Schallverstärkung (2) durch Pigmentepithelatrophie (aus dem Bildarchiv der Universitätsaugenklinik Kiel, mit freundlicher Genehmigung der Verwendung des Bildmaterials durch den Direktor Herrn Prof. Roider).



In der optischen Kohärenztomographie (OCT) (Abb. 2c und d) können die Drusen im Anschnitt durch die Makula sehr gut dargestellt werden. Außerdem tritt im Bereich von Atrophiearealen eine choroidale Schallverstärkung auf, die durch den Verlust von Licht absorbierendem Pigment und die Verdünnung der äußeren Netzhautschichten, einschließlich der äußeren Körnerschicht, erklärbar ist (Schmitz-Valckenberg et al. 2014).

Für die trockene AMD gibt es derzeit noch keine wirksame Therapie (Nebbioso et al. 2019). Ein Therapieansatz wurde in der *Age-Related Eye Disease-Study* (AREDS) mit einem Ernährungskonzept aus unterschiedlichen antioxidativen Bestandteilen entwickelt, bei denen es sich um eine Kombination aus Vitamin C und E, Betakarotin und Zink handelt, die den Patienten von der Entwicklung hinweisender AMD-spezifischer Veränderungen an verabreicht wurde. Es zeigte sich, dass diese Therapie das Risiko des Übergangs in die fortgeschrittene AMD bei 25 % der Patienten über einen Zeitraum von 10 Jahren signifikant reduzieren konnte, wobei jedoch am ehesten das Fortschreiten in die neovaskuläre Form verhindert werden konnte (Chew et al. 2013). Da bei Rauchern mit der Einnahme von Betakarotin ein erhöhtes Risiko für Lungenkrebs nachgewiesen wurde, empfiehlt es sich, dieses besonders bei den betreffenden Patienten durch Lutein und Zeaxanthin zu ersetzen (Omenn et al. 1996; Chew et al. 2014). Die Gabe von Omega-3-Fettsäuren erwies sich ebenfalls als vorteilhaft für ein langsames Fortschreiten der AMD, sowohl für die Entwicklung der geographischen Atrophie als auch der CNV (SanGiovanni et al. 2009). Da die Nahrungsergänzung nur bei 25 % der Patienten über einen längeren Zeitraum zu einer Verlangsamung des Fortschreitens und einer Verbesserung der Sehschärfe führte, wird diese besonders Patienten mit intermediärer oder fortgeschrittener AMD empfohlen, ist jedoch als alleinige Behandlung der AMD nicht ausreichend und sollte nur als Ergänzung betrachtet werden.

Aus diesem bedenklichen Mangel an Therapiemöglichkeiten ergibt sich die zunehmende Relevanz, die zugrunde liegenden Pathomechanismen der Entstehung der geographischen Atrophie immer besser zu verstehen und im besten Falle ein Zielprotein ähnlich dem VEGF-A zu extrahieren, welches als therapeutischer Angriffspunkt dienen kann. Diesbezüglich befinden sich derzeit bereits zahlreiche Medikamente in der klinischen Erprobung, welche vor allem in die Komplementkaskade, die inflammatorischen und oxidativen Mechanismen, den Sehzyklus oder die choroidale Perfusion eingreifen sollen (Hanus et al. 2016). Ebenso sind neuroprotektive Faktoren derzeit von zentralem Interesse (Nebbioso et al. 2019). Als besonders erfolgsversprechend könnte sich die Stammzelltherapie erwiesen, bei der zugrunde gehende RPE-Zellen durch humane embryonale oder induzierte pluripotente Stammzellen ersetzt

werden und zur Regeneration der Photorezeptoren beitragen können (Hanus et al. 2016). Überdies gehört die Gentherapie zum aktuellen Bestand der Forschung, um die Risiken der intravitrealen Injektionen zu minimieren. Hierbei sollen Genabschnitte über spezielle Vektoren in das Auge injiziert werden, um die Therapeutika autolog herstellen zu lassen (Moore et al. 2017).

Aus dieser Vielfalt an Angriffspunkten ergibt sich die Tendenz, den Patienten in Zukunft sehr individuelle Therapiekonzepte zukommen lassen zu können, wobei jedoch auch die Realisierbarkeit wegen der Kostenfrage bei einer solch häufig auftretenden Volkserkrankung bedacht werden muss.

#### **1.1.4. Ätiologie der AMD**

Die AMD ist eine multifaktorielle, genetisch komplexe Erkrankung, deren zugrunde liegende Mechanismen noch nicht abschließend geklärt sind.

Das Alter ist mit Abstand der größte Risikofaktor für die Entwicklung einer AMD (Fritsche et al. 2014). Da die Retina für den Energieumsatz beim Sehzyklus den höchsten Sauerstoffbedarf im Körper aufweist, ist sie viel oxidativem Stress ausgesetzt. Durch die abnehmende Effizienz im Abbau der Photorezeptor-Außensegmente im alternden RPE entsteht Lipofuszin als Ablagerungsprodukt, welches durch Lichtanregung reaktive Sauerstoffspezies freisetzen kann (Sparrow und Boulton 2005; Beatty et al. 2000). Dies kann an diesen Stellen im Körper die Bedingungen für chronische Entzündungszustände schaffen, die allgemein auch bei anderen modernen chronischen Alterserkrankungen wie dem Diabetes mellitus oder der Atherosklerose zu finden sind (Curcio, 2010).

Medzhitov beschreibt diese reaktive Immunantwort des Körpers auf Alterungsvorgänge im Gewebe, die als Zustand zwischen basaler Homöostase und akuter Inflammation einzuordnen ist, als Para-Inflammation. Anders als bei der klassischen Inflammation, die vor allem durch eine Infektion oder Gewebeverletzung ausgelöst wird, findet die Para-Inflammation bereits bei endogenem Gewebestress oder einer Gewebefehlfunktion statt, um die Gewebekomplexität und seine Funktionalität aufrechtzuerhalten (Medzhitov 2008). Hier werden unter anderem mRNA nekrotischer Zellen oder modifizierte Lipide frei, die von *Pattern Recognition Receptors* (PRR) wie den Toll-like-Rezeptoren (TLR) erkannt werden. Diese wiederum lösen vor allem im RPE inflammatorische Mechanismen wie die Sekretion von Komplementfaktoren und Zytokinen, die Aktivierung von Mikroglia und eine höhere Durchlässigkeit der Blut-Retina-Schranke aus. Besteht dieser Zustand durch die natürlichen Alterungsprozesse jedoch für eine längere Zeit, entsteht eine dauerhafte niedrigschwellige Inflammation, die im Laufe der Zeit für die AMD-

typischen Veränderungen verantwortlich sein könnte. Dieser Verlauf kann in der Pathogenese der AMD durch Genpolymorphismen im Komplement, Umweltfaktoren wie dem Rauchen oder auch chronische Infektionen mit beispielsweise Herpesviren oder Chlamydien noch begünstigt, verstärkt und beschleunigt werden (Forrester und Xu 2012).

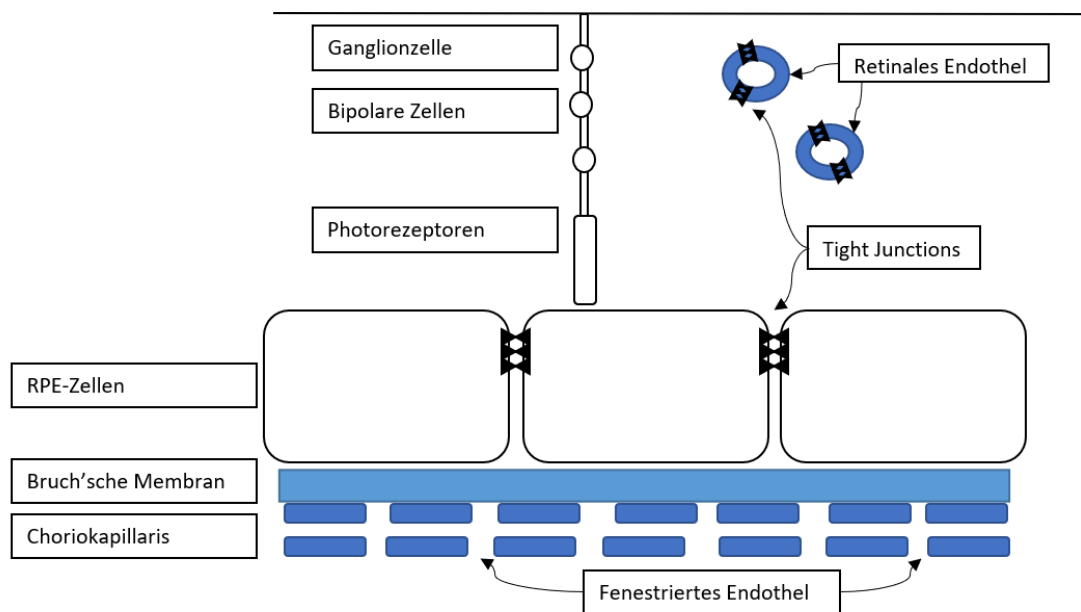
Für die Ausprägung der pathologischen Veränderungen spielt die genetische Suszeptibilität eine wichtige Rolle. In Familien- und Zwillingsstudien konnte gezeigt werden, dass die Gene einen Einfluss von 46 bis zu 71 % für das Auftreten der Erkrankung haben (Seddon et al. 2005a). Die stärkste Evidenz für eine erhöhte AMD-Anfälligkeit wurde auf der chromosomalen Region 1q31 gefunden (Cameron et al. 2007). Dieser Genlocus kodiert den Komplementfaktor H (CFH), der im Falle einer Variante im Allel Y402H einen bedeutenden Risikofaktor für die Entstehung der AMD darstellt (Klein et al. 2005). Im europäischen Raum tragen mindestens 30 % der Bevölkerung eine Kopie dieses Risikoallels (Sofat et al. 2012). Als zweiter wesentlicher genetischer Risikofaktor wurde der Locus LOC 387715 auf dem Gen 10q26 identifiziert, bei dem ein starker Zusammenhang des Auftretens der AMD bei gleichzeitiger Raucheranamnese festgestellt werden konnte (Rivera et al. 2005, Schmidt et al. 2006). Genetische Untersuchungen der TLR ergaben eine Assoziation zwischen dem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer AMD und der Genvariante rs4986790 des TLR 4 in der europäischen Bevölkerung und neuerdings auch einen Zusammenhang zwischen der Variante rs5743708 des TLR 2 in der türkischen Bevölkerung (Zarepari et al. 2005; Güven et al. 2016). Weiterhin wurde die Assoziation zwischen der Variante rs3775291 des TLR 3 und der Entwicklung einer AMD gefunden, konnte allerdings bisher nur für die europäische Bevölkerung nachgewiesen werden, nicht jedoch für die asiatische Bevölkerung (Ma et al. 2016).

### **1.1.5. Immunregulation der Retina**

Entwicklungsgeschichtlich geht die Retina aus dem neuroektodermalen Augenbecher hervor (Lüllmann-Rauch 2012). Dementsprechend ist sie wie das Gehirn eine immunprivilegierte Zone. Dieses 1961 von P. B. Medawar im Rahmen seiner Transplantationsforschungen entdeckte Phänomen besagt, dass an gewissen Stellen im Körper wie dem hier betrachteten Auge über eine Reihe von fein austarierten Mechanismen eine Toleranz gegenüber fremden Antigenen generiert wird, sodass beispielsweise Transplantate nicht abgestoßen werden (Streilein 1995; Medawar 1961). Darüber hinaus schützt das Immunprivileg die retinalen Strukturen vor den schädlichen Auswirkungen einer Immunantwort, da es sich bei diesen um nicht-regenerationsfähige Elemente handelt. Dabei sind als die drei wesentlichen Mechanismen

die fehlende Lymphdrainage, die Blut-Retina-Schranke und die aktive immunsuppressive Beteiligung des RPE zu nennen.

Die Blut-Retina-Schranke (BRS) besteht aus einer inneren und einer äußeren Komponente. Während die innere BRS ähnlich zur Blut-Hirn-Schranke durch das Endothel der retinalen Blutgefäße gebildet wird, formt das RPE die äußere BRS und reguliert den Übergang von Flüssigkeiten und Nährstoffen von der Choroidea in den subretinalen Raum und verhindert das Eindringen von Immunzellen (Abb. 3).



**Abbildung 3:** Blut-Retina-Schranke. Diese setzt sich aus einer äußeren Komponente, den Tight Junctions zwischen den RPE-Zellen, und einer inneren Komponente, den Tight Junctions der intraretinalen Gefäße, zusammen. Modifiziert nach: „Good news-bad news: The Yin and Yang of immune privilege in the eye” (Forrester und Xu 2012)

Diese selektive Diffusion von Molekülen wird vor allem durch die TJ ermöglicht, die essenziell für die Aufrechterhaltung der retinalen Homöostase sind (Campbell and Humphries, 2012). Bei den 1963 elektronenmikroskopisch entdeckten TJ handelt es sich um Verschlusskontakte, welche die benachbarten Plasmamembranen am apikalen Zellpol miteinander verknüpfen und damit einerseits die parazelluläre Diffusion steuern können und andererseits die apikal-basale Polarität der Zellen aufrechterhalten (Farquhar und Palade 1963, Shin et al. 2006). Sie sind in erster Linie aus den Transmembranproteinen Occludin und Claudin sowie den Adaptorproteinen Zonula occludens-1, -2 und -3 (ZO-1, -2 und -3), die sie mit dem Zytoskelett verknüpfen, zusammengesetzt (Naylor et al. 2019). Ein Maß für den parazellulären Ionenstrom ist der transepitheliale elektrische Widerstand (*Transepithelial Electrical Resistance*; TEER)

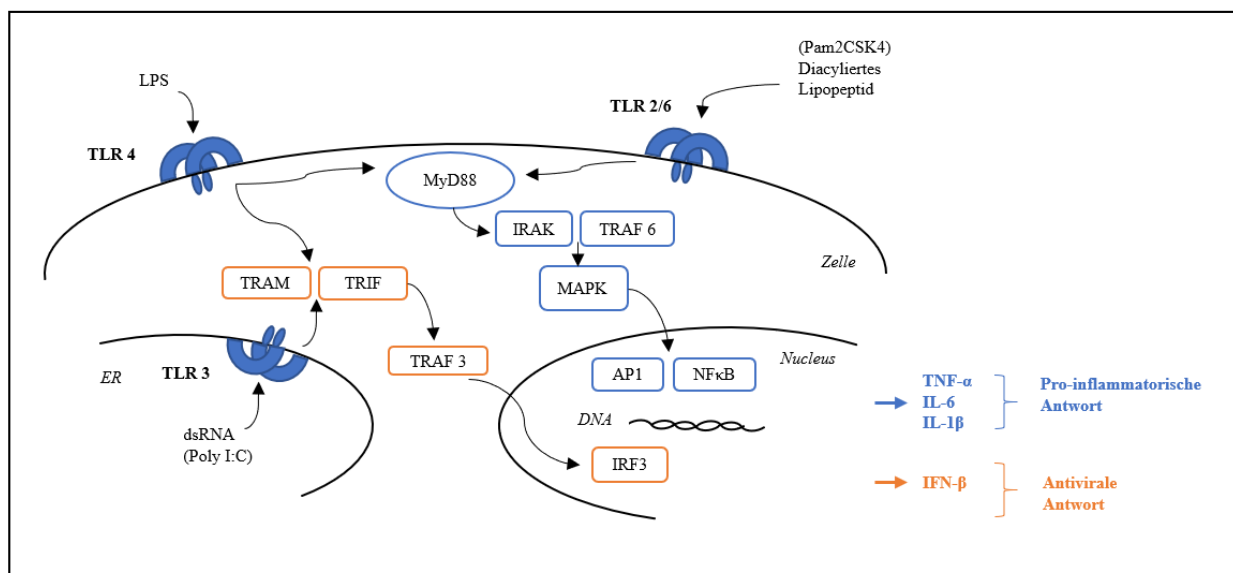
(Rizzolo 2007). In einer Studie wurde herausgefunden, dass eine Überexpression von Occludin in MDCK II Zellen von Hühnern zu einem Anstieg des TEER und konsekutiv zu einer verringerten parazellulären Permeabilität führt (Feldman et al. 2005, Naylor et al. 2019). Die Dynamik der TJ legt nahe, dass die BRS keinen festen Schutzwall bildet und sich über die Erhöhung der Permeabilität den Bedürfnissen der Retina anpassen kann (Rizzolo 2007). Dies kann auch die Gefahr bergen, zu gewissen Pathologien beizutragen. So tragen Veränderungen in der Integrität der äußeren BRS entscheidend zur Entstehung der AMD bei (Cunha-Vaz, 2011). In einer Studie wurde entdeckt, dass Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) in Kombination mit Lipopolysacchariden (LPS) einen Abfall des TEER induziert, was zusätzlich durch den *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) potenziert wird und für ein Auflockern der Barriere unter Inflammation spricht (Zech et al. 1998). Makrophagen und dendritische Zellen befinden sich normalerweise in der Choroidea. Bei einem Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke können sie jedoch in die Retina einwandern und dort die Krankheit beeinflussen (Ambati, 2013).

Weiterhin ist das RPE über mehrere Mechanismen auch aktiv an der Aufrechterhaltung des Immunprivilegs beteiligt. Im Wesentlichen besteht seine Aufgabe darin, das adaptive Immunsystem, also die Aktivierung und Einwanderung von Lymphozyten und Antikörpern in die Retina, zu unterdrücken und über angeborene Immunmechanismen wie den Mikroglia, TLR und dem Komplementsystem das Gewebe gegenüber schädlichen Stimuli zu schützen und zu verteidigen (Klettner, 2015). Die Immunsuppression geschieht vor allem über die aktive Sekretion löslicher Faktoren wie den *Transforming Growth Factor* (TGF- $\beta$ ), Somatostatin, Thrombospondin und *Pigment Epithelium Derived Factor* (PEDF) (Zamiri et al. 2005). Es konnte sogar gezeigt werden, dass das RPE auch direkt mit T-Zellen interagieren kann, indem es unter pro-inflammatorischer Stimulation mit IFN- $\gamma$  die Expression des *Major Histocompatibility Complexes* (MHC) vom Typ I und II hochreguliert und darüber selbst als *Antigene Presenting Cell* (APC) Antigene präsentieren kann (Percopo et al. 1990). Allerdings verhindert das Milieu aus löslichen Faktoren eine Aktivierung der T-Zellen, die vielmehr in die Apoptose oder einen anergischen Zustand gedrängt oder vor allem über TGF- $\beta$  zu regulatorischen T-Zellen transformiert werden (Klettner, 2015). Es kann jedoch über PRR wie den TLR und dem *NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3-Inflammasome* (NLRP3-Inflammasom) auch pro-inflammatorisch reagieren, was in den Abschnitten 1.1.6. und 1.1.7. noch näher ausgeführt wird.

### 1.1.6. Toll-like-Rezeptoren

Der Nachweis von TLR in *Drosophila* im Jahre 1996 und in der Folge auch im Menschen war eine herausragende Entdeckung, für die Hoffmann, Beutler und Steinman 2011 den Nobelpreis der Physiologie und Medizin erhielten (Braunstein et al. 2018). Während das Toll-Protein zunächst für die Differenzierung des *Drosophila*-Embryos in seine ventralen und dorsalen Strukturen bekannt war, zeigte sich außerdem, dass der Toll-Signalweg ebenfalls der Auslöser der antimykotischen Immunantwort in *Drosophila* war (Morisato und Anderson 1994; Lemaitre et al. 1996). Im Jahre 1997 konnte der Toll-Signalweg auch im menschlichen Genom nachgewiesen werden, der über den *Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells-Pathway* (NF $\kappa$ B-Signalweg) sowohl über die Zytokine Interleukin (IL)-1, -6 und -8 eine direkte pro-inflammatorische Antwort initiierte als auch über den Faktor B7 das adaptive Immunsystem zu aktivieren schien (Medzhitov et al. 1997). Da diese Immunantwort durch die Bindung gewisser *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs) ausgelöst wird, werden sie zur Familie der PRR gezählt. Eine neuere Erkenntnis ist, dass die TLR auch auf Störungen der Homöostase in Form von endogenen Liganden wie beispielsweise oxidierten Lipiden oder Lipoproteinen reagieren können, die vor allem bei zellulärem Stress und nekrotischem Zelltod freigesetzt werden und als *Damage-Associated Molecular Patterns* (DAMPs) bezeichnet werden (Mulfaul et al. 2018). Die PRR sind Teil unseres unter dem evolutionären selektiven Druck entwickelten angeborenen Immunsystems. Für diese erfolgreiche evolutionäre Entwicklung spielten die zwei folgenden Faktoren eine wichtige Rolle: Erstens mussten die PAMPs molekulare Strukturen sein, die für das Überleben der Mikroben essenziell waren, sodass sie durch eine Mutation schließlich nicht nur vom TLR erkannt worden, sondern daran zugrunde gegangen wären. Eine derart lebenswichtige Struktur impliziert gleichzeitig, dass sie in einer großen Gruppe von Pathogenen vorzufinden ist. Ein Beispiel dafür ist das LPS, das in allen Gram-negativen Bakterien vorkommt. Ein Rezeptor, der dieses identifiziert, könnte demnach gleich alle Gram-negativen Bakterien erkennen. Zweitens mussten es Strukturen sein, die verschieden waren von den körpereigenen Antigenen, um einen Autoimmunangriff zu verhindern (Medzhitov und Janeway 1997). Unter diesen Voraussetzungen haben sich im Laufe der Zeit die TLR im Menschen entwickelt, von denen bisher 10 genetische Subgruppen bekannt sind, die sich jeweils auf die Erkennung hochspezialisierter molekularer Muster unterschiedlicher Pathogene spezialisiert haben. Die TLR werden sowohl von Immunzellen wie Makrophagen, dendritischen Zellen, B- und spezifischen T-Zellen, also auch von Nicht-Immunzellen wie Fibroblasten und Epithelzellen exprimiert. Diese Expression ist jedoch nicht statisch, sondern die Anzahl an TLR kann schnell als Antwort auf Pathogene, Zytokine und

Umweltstress angepasst werden (Akira et al. 2006). Die TLR werden nach Lokalisation und Liganden in zwei große Hauptgruppen unterteilt. Während sich die TLR 1, 2, 4, 5, 6 und 11 in der äußeren Zellmembran befinden und überwiegend mikrobielle Membranbestandteile erkennen, liegen die TLR 3, 7, 8 und 9 in intrazellulären Vesikeln wie dem Endoplasmatischen Retikulum, Endosomen, Lysosomen oder Endolysosomen vor und sind auf die Erkennung mikrobieller Nukleinsäuren spezialisiert (Kawai und Akira 2010). Obwohl sich die meisten TLR als Homodimere zusammenlegen, formt der TLR 2 Heterodimere mit TLR 1 und TLR 6 und erweitert damit das Spektrum an molekularen Strukturen von Pathogenen und auch des Wirts, die hier binden können. Während der TLR 2/1-Heterodimer auf Triacyllipopeptide reagiert, erkennt der TLR 2/6-Heterodimer Diacyllipopeptide (Tartey und Takeuchi 2017). Molekularbiologisch gehören die TLR zu den Typ-I-Transmembran-Proteinen mit einer Hufeisen-förmigen extrazellulären Domäne für die Ligandenbindung, die aus *Leucine-Rich-Repeats* (LRR) besteht, und einer zytoplasmatischen Domäne für die Signaltransduktion, die im Aufbau der des humanen IL-1-Rezeptors gleicht und als Toll/IL-1-Rezeptor (TIR)-Domäne bezeichnet wird (Medzhitov et al. 1997). Dockt ein PAMP oder DAMP an den TLR an, werden die Homo- oder Heterodimere aktiv und setzen eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang, die im Zellkern mündet und hier die Expression pro-inflammatorischer Zytokine veranlasst (Abb. 4).



**Abbildung 4:** Darstellung der ableitenden Signalwege durch Stimulation der in dieser Arbeit untersuchten TLR 2, 3 und 4. Während der eine Pathway (blau) über MyD88 die MAPK und NFκB aktiviert und dadurch die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine für die bakterielle Abwehr induziert, leitet der andere Pathway (orange) die Signale über TRAM und induziert die Transkription von Interferonen zur Verhinderung einer Virusreplikation. Modifiziert nach: „Targeting Toll-Like Receptors for Cancer“ (Braunstein et al. 2018).

Dabei werden zwei große Signalwege voneinander unterschieden, die jeweils unterschiedlich von den TLR angesteuert werden. Diese sollen anhand der Signaltransduktion des TLR 4 erläutert werden, da dieser beide Wege nutzt. Zusätzlich zu seiner Funktion der Erkennung Gram-negativer Bakterien, wurde sein Einsatz in der Abwehr einiger viraler Erreger wie dem *Respiratory Syncytial Virus* (RSV) und dem *Vesicular Stomatitis Virus* (VSV) entdeckt (Kurt-Jones et al. 2000; Georgel et al. 2007). Der erste und am meisten angesteuerte Signalweg reagiert in erster Linie auf bakterielle Liganden und erfolgt über das TIR-Adaptorprotein MyD88, an welches noch das *MyD88-adaptor-like* (Mal)-Protein gekoppelt ist. Dieser TLR 4/Mal/MyD88-Komplex wird in der Plasmamembran geformt. Von hier aus werden die Signale über die *IL-1R-Associated Kinases* (IRAKs) und den *TNFR-associated Factor-6* (TRAF-6) weitergeleitet, welche die *Mitogen-Activated Protein-Kinases* (MAPKs) aktivieren. Diese aktiviert wiederum die Transkriptionsfaktoren NFκB und AP-1 im Zellkern, was zu der Induktion der Proteinbiosynthese pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF-α, IL-6 und Interleukin-1β (IL-1β) führt. Die spezielle inflammatorische Antwort zeigt sich bei den Patienten in Form der klassischen Entzündungssymptome *Rubor*, *Dolor*, *Tumor*, *Calor* und *Functio laesa* und geht auf zellulärer Ebene mit der Rekrutierung von Entzündungszellen, Ausschüttung von Zytokinen, Vasodilatation und erhöhter Zellpermeabilität einher. Der zweite Signalweg wird vor allem durch virale Liganden ausgelöst und beginnt mit der Anlagerung des Adaptorproteins *TIR Domain-Containing Adaptor-Inducing Interferon-β* (TRIF) und dem zugehörigen *TRIF-Related Adaptor Molecule* (TRAM). Der TLR 4/TRAM/TRIF-Komplex wird in der Endosomen-Membran geformt und leitet die Signale über den *TNFR-Associated Factor 3* (TRAF3) weiter, um den Transkriptionsfaktor *IFN Regulatory Factor-3* (IRF-3) zu aktivieren. IRF-3 wandert ebenfalls in den Zellkern, verursacht jedoch im Gegensatz zum zuerst beschriebenen Signalweg die Induktion des Zytokins Interferon-β (IFN-β), welches sich hemmend auf die Virusreplikation auswirkt (Mulfaul et al. 2018). Der zweite Signalweg ist besonders für den TLR 3 wichtig, da er darüber auf Herpesinfektionen, wie sie beispielsweise durch Cytomegalieviren (CMV) ausgelöst werden, reagieren kann (Tabeta et al. 2004).

Verschiedene Studien geben den Hinweis darauf, dass chronische systemische Infektionen beispielsweise durch *Chlamydia pneumoniae*, CMV oder Herpesviren inflammatorische Prozesse in der alternden Retina noch verstärken (Robman et al. 2005; Miller et al. 2004; Mukhamed'ianova et al. 2014). Unter diesem Aspekt wurden die Wirkungen von PAMPs auf die RPE-Zellen näher in das Zentrum der AMD-Forschung genommen (Brosig et al. 2015). In einer *polymerase chain reaction* (PCR)-Analyse von RPE-Zellen konnte die Genexpression für



die TLR 1-7, 9 und 10 erfolgreich nachgewiesen werden. Davon wurden am häufigsten TLR 1 und 3 exprimiert. Die Proteinexpression für TLR 2, 3, und 4 konnte durch die Behandlung mit *polyinosinic:polycytidylic acid* (Poly I:C) oder IFN- $\gamma$  gesteigert werden (Kumar et al. 2004). Im Folgenden sollen die TLR, die in dieser Arbeit untersucht wurden, näher vorgestellt werden.

Wie bereits erwähnt, heterodimerisiert TLR 2 normalerweise mit TLR 1 oder TLR 6. Während beide Heterodimere Mykoplasmen erkennen, bindet der TLR 2/1-Heterodimer zusätzlich triacylierte Lipopeptide (Pam3CSK4) Gram-negativer Bakterien, der TLR 2/6-Heterodimer hingegen diacylierte Lipopeptide (Pam2CSK4) Gram-positiver Bakterien (Kawai und Akira 2010). In einer Studie wurde entdeckt, dass einige der CNV-Proben von AMD-Patienten *Chlamydia pneumoniae* enthielten, die Kontroll-Proben ohne AMD jedoch nicht, was auf eine Beteiligung der durch das Pathogen hervorgerufenen pro-inflammatorischen Wirkung und pro-angiogenen Zytokine in der Pathogenese der AMD hindeutet (Kalayoglu et al. 2005). Daraufhin konnte gezeigt werden, dass *Chlamydia pneumoniae* über die TLR 2-Aktivierung des RPE eine CNV auslösen kann, was auf eine Involvierung des Rezeptors in die Pathogenese der feuchten AMD hinweist (Fujimoto et al. 2010).

Ebenso konnte durch Stimulation des TLR 3 eine Hochregulation der VEGF-Sekretion durch das RPE festgestellt werden, wie sie bei der feuchten Form der AMD auftritt. Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass die Stimulation des TLR 3 durch doppelsträngige Ribonucleinsäure (dsRNA) zu einer MAPK-vermittelten Degeneration des RPE führte, wie sie für die geographische Atrophie typisch ist (Klettner et al. 2013a). Dieser Effekt wurde ebenfalls in einer anderen Studie beobachtet, in der die Aktivierung des Wildtyp-TLR 3 durch Poly I:C eine Apoptose der RPE-Zellen auslöste, während die Rezeptorvariante rs3775291 des TLR 3 sogar vor der Entwicklung einer geographischen Atrophie schützte (Yang et al. 2008). Der schützende Effekt durch den Polymorphismus könnte sich dadurch erklären lassen, dass die Variante des TLR 3 eine geringere Bindungskapazität für dsRNA zeigte (Zhou et al. 2011). Normalerweise wird durch die Erkennung von dsRNA oder das Analogon Poly I:C am TLR 3 über die Ausschüttung zytotoxischer Zytokine die Apoptose der Zelle ausgelöst, um eine weitere Ausbreitung der Infektion zu verhindern (Alexopoulou et al. 2001). Allerdings wurde in einer weiteren Studie gezeigt, dass die Injektion von dsRNA, eine Komponente der Drusen, in den subretinalen Raum eine Nekrose des RPE hervorruft (Murakami et al. 2014). Dies würde dafür sprechen, dass auch die von sterbenden RPE-Zellen endogen freigesetzte dsRNA als DAMP die TLR 3 von Nachbarzellen weiter stimulieren und zu einer großflächigen retinalen Degeneration führen könnte, wie es bei der geographischen Atrophie beobachtet werden kann

(Kaneko et al. 2011). Zusätzlich zum zytotoxischen Effekt und der Bildung von VEGF reagierte das RPE auf die TLR 3-Stimulation mit der Sekretion zahlreicher Zytokine wie dem *Monocyte Chemo-Attractant Protein-1* (MCP-1), IL-6, IL-8 und IFN- $\beta$  und dem *soluble intercellular adhesion molecule-1* (sICAM-1) und induzierte dadurch inflammatorische Veränderungen im RPE (Kumar et al. 2004; Ebihara et al. 2007). Nachfolgend wurde die Wirkung des TLR 3 auf Blutmonozyten und Mikroglia in den Fokus genommen. In Bezug auf die Monozyten kann kein pro-inflammatorischer Effekt festgestellt werden. Vielmehr induziert das RPE unter TLR 3-Stimulation in den Monozyten weiterhin einen anti-angiogenen Phänotyp durch Induktion des *Fas ligand* (FasL) und die Herunterregulation der Cyclooxygenase-2 (Cox-2), um das Immunprivileg aufrechtzuerhalten (Hettich et al. 2014). Auf die retinalen Mikroglia wirkt das durch TLR 3 stimulierte RPE hingegen deutlich pro-inflammatorisch, indem es die Aktivierung der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6, IL-1 $\beta$  und des Enzyms Cox-2 induziert. Dies deutet also auf eine mögliche Kommunikation zwischen RPE und Mikroglia hin, die im Rahmen systemischer Infektionen zu einer Aktivierung der Mikroglia führen kann (Klettner et al. 2014). In einer Studie zur Diabetischen Makulopathie wurde der Effekt dieser Kommunikation auf die Integrität der Blut-Retina-Schranke untersucht. Dabei wurde entdeckt, dass ein erhöhter IL-6-Spiegel RPE-Zellen zur Produktion von VEGF-A anregt, welches die Rekrutierung von Mikroglia fördert. In den Mikroglia wiederum bewirkt das IL-6 unter anderem die Induktion von TNF- $\alpha$ , welches im RPE den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B aktiviert und infolgedessen zu einer Reduktion an ZO-1 Protein und damit Auflockerung der äußeren Blut-Retina-Schranke führt (Jo et al. 2019).

Wie schon erwähnt, ist der TLR 4 der erste beschriebene TLR und neben den bereits erwähnten viralen Erregern hauptsächlich für die Erkennung von LPS in den Zellwänden Gram-negativer Bakterien zuständig (Poltorak 1998). In Hinblick auf die AMD-Forschung wurde entdeckt, dass der TLR 4 mit dem auf der Zellmembran exprimierten Komplementfaktor 5a (C5a)-Rezeptor interagiert und auf eine Aktivierung hin mit der Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie beispielsweise IL-6 und IL-1 $\beta$  reagiert (Zhu et al. 2015). Eine weitere Studie zeigt, dass der vom RPE gebundene TLR 4 auf die Exposition mit humanen *Photoreceptor Outer Segments* (POS) hin transmembranöse metabolische und Calcium-Signale aussendet und so eine wichtige Rolle bei der Entzündungsreaktion durch den altersbedingt gestörten Photorezeptor-Abbau bei der AMD spielen kann (Kindzelskii et al. 2004).

### 1.1.7. Zytokine

Der Begriff Zytokin leitet sich von den beiden altgriechischen Wörtern „κύτος“ und „κίνησις“ ab, was übersetzt Zellbewegung bedeutet und auf ihre Hauptaufgabe während einer Inflammation hindeutet, andere Zellen an den Ort einer Infektion zu mobilisieren (Morris et al. 2018). Zytokine sind kleine Proteine (von etwa 25 kDa), die als Zellmediatoren eine Schlüsselrolle für die Hämatopoese, das Immunsystem, die Tumorgenese, die Homöostase sowie die Zelldifferenzierung und das Zellwachstum spielen und aufgrund ihrer zahlreichen Einsatzgebiete als *pleiotrop* bezeichnet werden (Detrick, 2018). Sie werden auf einen aktivierenden Reiz hin von verschiedenen Zelltypen im Körper freigesetzt und können entweder auf die Zelle selbst (autokrin), auf benachbarte Zellen (parakrin) oder auch auf entfernt liegende Zellen (endokrin) wirken. Aufgrund ihrer Strukturen können sie in folgende Familien eingeteilt werden: die IL-1-Familie, die Hämatopoetinsuperfamilie, die Interferone und die TNF-Familie (Murphy und Weaver 2018). Für das Immunsystem sind sie im Falle eines Angriffs durch einen Erreger als Botenstoffe zwischen den beteiligten Immunzellen zur Orchestrierung einer koordinierten Immunantwort von entscheidender Bedeutung und können hier eine sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Wirkung ausüben (Detrick, 2018).

Wie schon in den vorherigen Absätzen erwähnt, ist das RPE ein bedeutender Akteur der Immunregulation und beeinflusst in der Retina durch seine eigene Zytokin-Produktion in entscheidendem Maße die immunologischen Vorgänge. Neben der Sekretion anti-inflammatorischer Zytokine zur Aufrechterhaltung des Immunprivilegs, auf die in diesem Abschnitt nicht mehr weiter eingegangen werden soll, können durch Gefahrensignale aktivierte TLR auf RPE-Zellen über den NFκB-Signalweg pro-inflammatorische Zytokine wie TNF-α, IL-6 und IL-1β freisetzen, welche in dieser Arbeit untersucht wurden und im Folgenden näher beschrieben werden sollen.

Bereits im Jahre 1985 konnte der TNF erfolgreich in Mäusen isoliert und in einem Experiment gezeigt werden, dass dieser in entscheidendem Maße für die Pathogenese des LPS-induzierten Schocks verantwortlich war (Beutler et al. 1985a; Beutler et al. 1985b). Da die Mäuse in dem Experiment durch TNF-Antigene vor den letalen Folgen des Endotoxins von *E. coli*-Bakterien geschützt waren, brachte diese Erkenntnis die pharmazeutischen Unternehmen dazu, TNF mit therapeutischer Intention zu neutralisieren (Beutler 2009). Die Neutralisierung von TNF zeigt sich auch heute noch als die wirksamste Therapie von spezifischen chronischen Erkrankungen, wie beispielsweise in der Behandlung von Morbus Crohn-Patienten mit den monoklonalen TNF-α-Antikörpern Infliximab oder Adalimumab. Wie zuvor erwähnt, aktiviert der TLR 4

durch Bindung von LPS den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B, der daraufhin die Bildung des pro-inflammatorischen Zytokins TNF- $\alpha$  induziert (Medzhitov et al. 1997). Der gleiche Mechanismus konnte ebenfalls bei den RPE-Zellen durch Bindung der PAMPs LPS und Poly I:C an ihren jeweiligen TLR nachgewiesen werden (Ebihara et al. 2007). TNF- $\alpha$  wiederum kann an die entsprechenden TNF-Rezeptoren binden, die den Zelltod induzieren oder den NF $\kappa$ B-Signalweg in anderen Zellen aktivieren und eine Inflammation befeuern (Beutler 2009). Überdies wurde entdeckt, dass TNF- $\alpha$  durch Induktion großer Mengen an VEGF auch an der Entstehung von CNV beteiligt ist, wie sie bei der feuchten Form der AMD zu finden sind (Nagineeni et al. 2012). Es konnte sogar nachgewiesen werden, dass die Gabe von TNF- $\alpha$ -Antikörpern das Auftreten von CNV nach Laser-Schädigung bei Mäusen signifikant verringerte (Shi et al. 2006). Leider konnten für diese Form der Therapie beim Menschen bisher noch keine Erfolge erzielt werden (Oliveira Dias et al. 2011).

Neben seiner Funktion B- und T-Zellen der adaptiven Immunantwort zu stimulieren, zeigte IL-6 auch breite Effekte auf akute und chronische Inflammation bis hin zu vaskulären Erkrankungen, weshalb dieses Zytokin ebenfalls in den Mittelpunkt der klinischen Forschung gerückt ist (Detrick und Hooks 2020). Mit dem monoklonalen IL-6-Antikörper Tocilizumab beispielsweise wurde ein Durchbruch in der Behandlung der schwer verlaufenden Rheumatoiden Arthritis erzielt. RPE-Zellen reagieren auf andere Zytokine wie IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IFNs sowie TLR-Stimulation mit der Produktion großer Mengen an IL-6 (Nagineeni et al. 2000). Ein erhöhter IL-6-Spiegel wird auch in der okulären Flüssigkeit von Patienten mit feuchter AMD beobachtet, was mit einem Fortschreiten der Erkrankung assoziiert ist (Seddon 2005b). Außerdem konnte gezeigt werden, dass LPS die Produktion von IL-6 in der RPE-Zelle induziert und über einen autokrinen Feedback-Mechanismus toxisch auf die Zelle wirkt (Leung et al. 2009). Insofern könnte IL-6 im Zusammenhang mit akuter und chronischer Inflammation sowohl in der Pathogenese der feuchten als auch der trockenen AMD eine wichtige Rolle spielen (Ambati et al. 2013).

Die Wirkung des IL-1 $\beta$  ist im Kontext der AMD-Forschung vor allem im Zusammenhang mit dem NLRP3-Inflammasom beschrieben worden (Ambati et al. 2013). Es konnte gezeigt werden, dass die NLRP3-Inflammasom-Stimulation und Sekretion des Effektor-Zytokins IL-1 $\beta$  die VEGF-Sekretion im RPE und damit die Entstehung von CNV beförderte (Marneros 2013). Diese Hypothese konnte durch ein Rattenmodell unterstützt werden, indem durch den IL-1-Rezeptor-Antagonist Anakinra Laser-induzierte CNV signifikant reduziert wurden (Olson et al. 2009). Außerdem konnte festgestellt werden, dass über längere Zeit mit IL-1 $\beta$  stimulierte

*Arising RPE* (ARPE)-19-Zellen einen erniedrigten TEER und eine herunterregulierte Occludin-Synthese aufweisen, was für einen Einbruch der Barrierefunktion unter chronischer Inflammation spricht und ebenfalls mit den AMD-typischen Veränderungen in Verbindung gebracht werden kann (Abe et al. 2003). Das NLRP3-Inflammasom ist ein Proteinkomplex, der durch Zellstress formierte DAMPs wie beispielsweise *Carboxyethylpyrrole-Adducted-Proteins* (CEP) aktiviert wird und schließlich über die Caspase 1 das IL-1 $\beta$  in seine aktive Form überführt (Celkova et al. 2015; Ambati et al. 2013). Für diese Aufgabe müssen die Inflammasome jedoch zunächst voraktiviert werden, was beispielsweise durch PRR wie den TLR 2 über den NF $\kappa$ B-Signalweg geschieht (Bauernfeind et al. 2009).

## **1.2. Fragestellung der Arbeit**

Das Retinale Pigmentepithel ist als Schnittstelle zwischen Choroidea und Retina von entscheidender Bedeutung für die Pathogenese der AMD. Es bildet mit seinen *Tight Junctions* die Blut-Retina-Schranke und sichert das Immunprivileg des Auges. Das RPE liegt polarisiert vor und unterscheidet sich apikal und basal in seinem Sekretionsverhalten. Werden von basal mikrobielle Gefahrenstoffe aus dem Blut herangetragen, werden diese von Toll-like-Rezeptoren erkannt und pro-inflammatorische Signale sowohl an die Retina als auch ins Blut zurück abgegeben.

In dieser Arbeit wurde in zwei Modellsystemen, der primären RPE-Transwell-Zellkultur und der Organkultur, anhand der Stimulation der TLR 2, 3 und 4 untersucht,

- a) ob die Integrität der Barrierefunktion durch den pro-inflammatorischen Stimulus beschädigt wird,
- b) ob eine Zytokin-Ausschüttung angeregt wird und, ob diese sich basal und apikal unterscheidet,
- c) ob eine Zelltoxizität der apikalen Überstände auf die neuronalen Zellen nachgewiesen werden kann.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Geräte und Instrumente

*Tabelle 1: Auflistung der Geräte und Instrumente mit Angabe des Namens und Firmensitzes des Herstellers*

<b>Gerät/Instrument</b>	<b>Firma</b>	<b>Firmensitz</b>
Autoklav Varioklav®	HP Medizintechnik GmbH	Oberschleißheim, DE
Biofuge Fresco 17, Heraeus Instruments	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, MA, USA
Brutschränke (Heracell Vios 160i)	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, MA, USA
Chalazionzange (Hermle 784)	Hermle AG	Tuttlingen, DE
Eismaschine AF 80	Scotsman Ice	Mailand, IT
ELISA-Reader (ELx800)	BioTek Instruments GmbH	Bad Friedrichshall, DE
EVOM2	World Precision Instruments Inc.	Sarasota, FL, USA
Feinwaage (analytisch)	Sartorius AG	Göttingen, DE
Gefrierschränke - 20 °C - Schrank - 80 °C - Schrank	Liebherr GmbH Sanyo Denki K.K.	Kirchdorf, DE Moriguchi, JP
Heizplatte	Medax GmbH	Neumünster, DE
Inkubationsschüttler	Infors AG	Einsbach, DE
Kameras - AxioCam MRc 5 - AxioCam MRm	Carl Zeiss AG Carl Zeiss AG	Jena, DE Jena, DE
Kanüle Sterican®	B. Braun AG	Melsungen, DE
Kühlschränke	Liebherr GmbH	Kirchdorf, DE
Mikroskope - ApoTome.2 - Fluoreszenzmikroskop - Lichtmikroskop Axiovert 100	Carl Zeiss AG Carl Zeiss AG Carl Zeiss AG	Jena, DE Jena, DE Jena, DE

Modifizierte Ussing-Kammern	Technische Fakultät, CAU Kiel	Kiel, DE
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG	Lauda-Königshofen, DE
Photometer (Genesys 10 Bio)	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, MA, USA
Pinzetten (anatomisch; gerade und gebogen)	Bausch und Lomb GmbH	Berlin, DE
Pipetten <ul style="list-style-type: none"> <li>- Research (10 µl, 100 µl, 1000 µl)</li> <li>- Finnpiquette (10 µl, 100 µl, 1000 µl)</li> <li>- Transferpipette® S8 (100 µl)</li> </ul>	Eppendorf AG  Thermo Fisher Scientific Inc.  Brand GmbH	Hamburg, DE  Waltham, MA, USA  Wertheim, DE
Pipettus (Pipetboy 2)	Integra Biosciences GmbH	Biebertal, DE
Saugpumpe <ul style="list-style-type: none"> <li>- Vacusafe</li> <li>- Vacusip</li> </ul>	Integra Biosciences GmbH Integra Biosciences GmbH	Biebertal, DE Biebertal, DE
Scheren <ul style="list-style-type: none"> <li>- Enukleationsschere</li> <li>- Federschere</li> </ul>	Bausch & Lomb GmbH Karl Storz SE & Co. KG	Berlin, DE Tuttlingen, DE
STX2-Elektrode	World Precision Instruments Inc.	Sarasota, FL, USA
Vortexer	Erich Eydram KG	Kiel, DE
Wasserbad (1086)	GFL GmbH	Burgwedel, DE
Zellkulturwerkbank (Safe 2020)	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, MA, USA
Zentrifuge <ul style="list-style-type: none"> <li>- Sorvall ST 40</li> <li>- Biofuge Fresco 17, Heraeus Instruments</li> </ul>	Thermo Fisher Scientific Inc.  Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, MA, USA Waltham, MA, USA

### 2.1.2. Chemikalien

Tabelle 2: Auflistung der Chemikalien mit Angabe des Namens und Firmensitzes des Herstellers

Chemikalie	Firma	Firmensitz
2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperatiny]-ethansulfonat (HEPES)	Merck Biochrom GmbH	Darmstadt, DE
(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) 2,5 diphenyltetrazolium-bromid (MTT)	Sigma-Aldrich GmbH	Steinheim, DE
Aqua bidest (Ampuwa Spüllösung)	Fresenius Kabi AG	Bad Homburg, DE
Betaisodona	Mundipharma GmbH	Limburg, DE
Biotase	Biochrom GmbH	Berlin, DE
Bovines Serum Albumin (BSA)	Serva Electrophoresis GmbH	Heidelberg, DE
Brilliantblau G	Fluoron GmbH	Ulm, DE
Calcein Acetoxymethyl	AnaSpec Inc.	Fremont, CA, USA
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich GmbH	Steinheim, DE
<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> (DMEM)	HyClone®, Fisher Scientific GmbH	Schwerte, DE
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
Eindeckmedium Fluoromount G (DAPI)	Southern Biotech, Biozol GmbH	Eching, DE
Fetales Kälberserum (FCS, 10 %)	Linaris GmbH	Dossenheim, DE
Formaldehyd (37 % Lsg.)	Merck KGaA	Darmstadt, DE
Ham's F12 + L-Glutamine	Fisher Scientific GmbH	Schwerte, DE
Höchstfarbstoff (33258 Fluorescent Dye)	Amersham Biosciences GmbH	Freiburg, DE
Kollagen A	Merck KGaA	Darmstadt, DE
Lipopolysaccharid (LPS aus e. coli O55 : B5)	Sigma-Aldrich GmbH	Steinheim, DE



Natriumchlorid (NaCl) 0,9 %	Fresenius Kabi AG	Bad Homburg, DE
Nicht-essentielle Aminosäuren (NEA-100x)	Merck KGaA	Darmstadt, DE
Pam2CSK4	Tocris Bio-Techne GmbH	Bristol, UK
<i>Phosphate Buffered Saline</i> (PBS)	Merck KGaA	Darmstadt, DE
Penicillin/Streptomycin (Pe/St)	Biochrom GmbH	Berlin, DE
Polyinosin-/-cytidylsäure (Poly I:C)	Tocris Bio-Techne GmbH	Bristol, UK
Roti®-Immunoblock	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (RPMI)-1640 Medium	Merck Biochrom GmbH	Darmstadt, DE
Triton X 100	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
Trypanblau	Serva GmbH	Heidelberg, DE
Trypsin	PAN-Biotech GmbH	Aidenbach, DE
Trypsin-Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	PAN-Biotech GmbH	Aidenbach, DE

### 2.1.3. Lösungen

Tabelle 3: Auflistung der Lösungen mit Angabe ihrer Zusammensetzung

Lösung	Zusammensetzung
MTT-Lösung	90 % DMEM HyClone ohne Phenolrot, 10 % MTT
Zellkulturmedium RPE	DMEM HyClone mit Phenolrot, 10 % FCS, 1 % Pe/St, 1,1 % Sodium Pyruvat 100 mM, 2,5 % Hepes 1M, 1 % Nicht-essentielle Aminosäuren (NEA, 100x)

Zellkulturmedium Organkulturen	1:1 DMEM ohne Phenolrot und Ham's F12, 10 % FCS, 1 % Pe/St, 0,2 % Calciumchlorid, 0,04 % Taurin 100 µM
Zellkulturmedium SH-SY5Y-Zellen (Neuro-Medium)	RPML, 10 % FCS, 1 % Pe/St

#### 2.1.4. Antikörper

Tabelle 4: Auflistung der Antikörper mit Angabe des Namens und Firmensitzes des Herstellers

Antikörper	Firma	Firmensitz
Alexa Fluor 555 (IgG goat anti-rabbit, 2 mg/ml)	Thermo Fisher Scientific Inc.	Rockford, IL, USA
<i>Occludin Polyclonal Antibody</i> (IgG, rabbit, 0,25 mg/ml)	Thermo Fisher Scientific Inc.	Rockford, IL, USA

#### 2.1.5. ELISA-Kits

Tabelle 5: Auflistung der ELISA-Kits mit Angabe des Namens und Firmensitzes des Herstellers

ELISA-Kit	Firma	Firmensitz
<i>TNF-α Porcine Quantikine ELISA Kit</i>	R&D Systems Inc.	Minneapolis, MN, USA
<i>IL-6 Porcine ELISA Kit</i>	R&D Systems Inc.	Minneapolis, MN, USA
<i>IL-1β Porcine ELISA Kit</i>	R&D Systems Inc.	Minneapolis, MN, USA

#### 2.1.6. Biologische Materialien

Tabelle 6: Auflistung der biologischen Materialien mit Angabe von Herkunftsstätte und -ort

Biologisches Material	Herkunftsstätte und -ort
Schweineaugen	Hof Steffen in Muxall, Schlachtbetrieb Loepthien in Jevenstedt und Landschlachtereie Neidhardt in Holtsee, DE
SH-SY5Y-Zellen	Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, DE

### 2.1.7. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 7: Auflistung der Verbrauchsmaterialien mit Angabe des Namens und Firmensitzes des Herstellers

Verbrauchsmaterial	Firma	Firmensitz
Deckgläschen	Th. Geyer GmbH	Renningen, DE
Eppendorf-Reaktionsgefäße		
- 1,5 ml	Sarstedt AG	Nürnberg, DE
- 2 ml	Eppendorf AG	Hamburg, DE
Falcon-Röhrchen 50 ml	Sarstedt AG	Nürnberg, DE
Küvetten	Brand GmbH	Wertheim, DE
Objektträger Assistent	Hecht GmbH	Sondheim/Rhön, DE
Parafilm® M	Bemis Company Inc.	Oshkosh, WI, USA
Pasteurpipetten		
- Glaspipetten (Absolute®)	Th. Geyer GmbH	Renningen, DE
- Plastik-Pipetten	Ratiolab GmbH	Dreieich, DE
Pipetten-Spitzen	Sarstedt AG	Nürnberg, DE
Serologische Pipetten	Sarstedt AG	Nürnberg, DE
Skalpelle	Feather® Safety Razor Co. Ltd.	Osaka, JP
Spritze (1 ml, BD Discardit II)	B. Braun AG	Melsungen, DE
TC-Inserts (12-Wells, 0,4 µm, transparent)	Sarstedt AG	Nürnberg, DE
Zellkulturflaschen		
- 25 cm <sup>3</sup>	TPP®, Merck KGaA	Darmstadt, DE
- 75 cm <sup>3</sup>	Sarstedt AG	Nürnberg, DE
Zellkulturplatte 12-Wells	TPP®, Merck KGaA	Darmstadt, DE
Zellkulturplatte 24-Wells	Sarstedt AG	Nürnberg, DE
Zellkulturplatte 96-Wells	Sarstedt AG	Nürnberg, DE

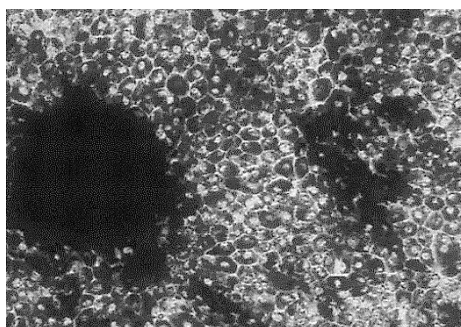
## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Modelle

Um die genauen Pathomechanismen der AMD verstehen zu können, werden geeignete Modellsysteme benötigt. Mausmodelle haben sich in der Vergangenheit als eher ungeeignet erwiesen, die menschliche Erkrankungssituation der AMD getreu wiederzugeben und es gibt aktuell einen starken Druck der Gesellschaft, Tierversuche zu reduzieren. Aus diesen Gründen bietet sich das Schweineauge an, das einerseits durch die starke anatomische Ähnlichkeit zum menschlichen Auge und andererseits als Nebenprodukt der Ernährungsindustrie aus den ethischen Aspekten für die Verwendung in der Retinaforschung sehr gut geeignet ist (Schnichels et al. 2021). Für die vorliegende Arbeit wurden deshalb Schweineaugen verwendet.

Das RPE liegt „in vivo“ polarisiert vor (Klettner et al. 2015; Strauss 2005). Deshalb wurden sowohl die RPE-Transwell-Zellkultur als auch die Organkultur als Modelle ausgewählt, da beide Verfahren eine Trennung in ein apikales und ein basales Kompartiment ermöglichen.

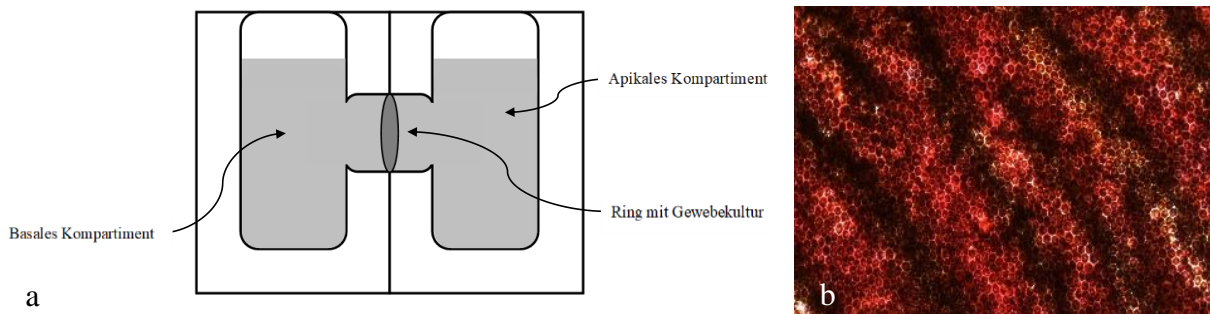
Primäre Zellkulturen kommen der „in vivo“-Situation generell näher als Zelllinien, was auch auf RPE-Zellen zutrifft (Schnichels et al. 2021). Bei diesem Modell ergibt sich allerdings die Schwierigkeit, den Grad der Differenzierung des Epithels aufrechtzuerhalten, da die Zellen durch die Präparation aus ihrem natürlichen Zellverband gerissen werden. Um eine ausreichende Differenzierung zu gewährleisten, wurde deshalb auf die Ausbildung eines kopfsteinpflasterartigen Aussehens der Zellschicht (Abb. 5), die Beurteilung der Tight Junctions durch Immunfluoreszenzfärbung und die Messung eines ausreichend hohen transepithelialen Widerstandes geachtet (Klettner 2020a).



**Abbildung 5:** Lichtmikroskopische Photographie einer unbehandelten Primären RPE-Zellkultur auf einer Transwellplatte an Tag 22 kurz vor Stimulation in 20-facher Vergrößerung. Das kopfsteinpflasterartige Aussehen der Zellen spricht für die gelungene Ausbildung einer Epithelzellschicht und die starke Pigmentierung als Marker für eine sehr gute Differenzierung.

Für die Trennung in ein basales und ein apikales Kompartiment und die Messung des TEER wurden Transwell-Systeme verwendet, die genaue Ausführung wird im Folgenden noch näher erläutert.

Das zweite Verfahren neben der Transwell-RPE-Zellkultur war das Organkultur-Modell, das den anatomischen Gegebenheiten der Blut-Retina-Schranke noch näher kam, da hier die Zellen im noch vorhandenen Gewebeverband explantiert wurden (Schnichels et al. 2021). Dieses Gewebe bestand aus den drei Schichten Choroidea, Bruch'sche Membran und RPE. Es wurde nach Treumer präpariert und in modifizierten Ussing-Kammern kultiviert (Treumer et al. 2012). Hierbei handelt es sich um ein System, das aus zwei ineinander verschraubbaren Kammern besteht (Abb. 6a). In diesen befindet sich jeweils ein Hohlzylinder, der von apikal zugänglich und zu der anderen Kammer hin über ein rundes Fenster geöffnet ist. In diese Öffnung kann ein Ring mit Gewebekultur eingespannt werden (Abb. 6b), der eine Trennwand zwischen den beiden Kompartimenten bildet. So kann, genau wie im vorherigen Transwell-Modell, auf der basalen Seite initiiert werden, wie pro-inflammatorische Reize aus dem Systemkreislauf zum Auge gelangen und im apikalen Kompartiment erfasst werden, wie die RPE-Zellen darauf reagieren.



**Abbildung 6:** Organkulturmodell. a) Querschnitt durch eine Ussing-Kammer, b) Lichtmikroskopische Photographie einer frisch präparierten Organkultur vor der Einspannung in die Ussing-Kammer in 10-facher Vergrößerung.

## 2.2.2. Zell-/Organkulturen

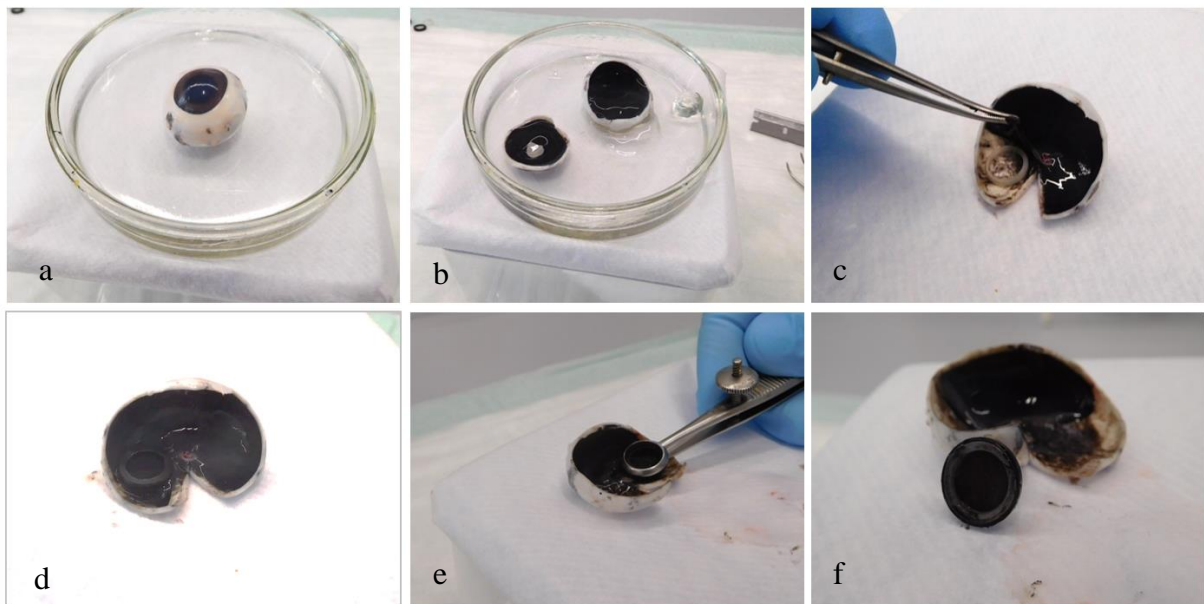
### 2.2.2.1. Herstellung einer RPE-Zellkultur

Für die Präparation wurden aus einer von drei regionalen Schlachtereien Schweineaugen der morgendlichen Schlachtung zur Verfügung gestellt. Diese wurden unter beständiger Kühlung geliefert und in einem Zeitfenster von maximal vier Stunden nach Organentnahme verwendet (Wiencke et al. 2003; Klettner und Roider 2008). Zunächst wurden die porcinen Bulbi mithilfe einer Schere und Pinzette vom umgebenden Muskel- und Bindegewebe befreit (Abb. 7a) und für 5-10 Min. in gekühlte Betaisodona-Lösung gegeben. Im Anschluss an die Desinfektion

wurden sie in ein ebenfalls auf Eis stehendes, mit NaCl-Lösung gefülltes Becherglas transferiert. Die Bulbi wurden dann auf Höhe der Ora serrata mit einem Skalpell aufgeschnitten und der vordere Augenabschnitt gänzlich entfernt (Abb. 7b). Nach Ausschwemmen des Glaskörpers eröffnete sich der Blick auf den hinteren Augenabschnitt, der eine Schale bildete und von innen mit Retina ausgekleidet ist. Diese Augenschalen wurden mit auf 37 °C erwärmtes PBS befüllt und die Neuroretina mithilfe zweier Pinzetten vorsichtig abgelöst und verworfen. Das PBS wurde abgenommen und die Augenschalen zunächst in einer gedeckelten Petri-Schale gesammelt. Hierbei wurde eine minimale Menge von 14 Augen verwendet, um im weiteren Experimentverlauf ein gutes Überleben der Zellen auf den Transwells und bestmögliche TEER-Messwerte zu erzielen. Daraufhin wurden die Augenschalen mit Trypsin-Lösung (0,25 % Trypsin in PBS) befüllt und 10 Minuten lang bei 5 %iger Begasung mit CO<sub>2</sub>, 37 °C und einem pH von 7,4 im Brutschrank inkubiert. Diese Einstellungen des Brutschranks waren über alle Experimente konstant und werden im weiteren Verlauf dieser Arbeit vorausgesetzt. Im Anschluss wurde das Trypsin abgenommen, durch Trypsin-EDTA (0,25 % Trypsin + 0,02 % EDTA in PBS) ersetzt und wiederum 45 Minuten lang im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die RPE-Zellen durch vorsichtiges, mehrfaches Auf- und Abpipettieren der Lösung vom Augenhintergrund abgelöst und in zwei Zentrifugationsröhrchen mit vorgewärmten Zellkultur-Medium gesammelt. Diese wurden, während einer zweimaligen Zentrifugation von je 5 Minuten bei 800 Umdrehungen pro Minute (rpm), ineinander überführt und nach Abnahme des Überstandes und gründlicher Resuspension auf 12 ml mit RPE-Medium aufgefüllt, sodass je 1 ml der Zellsuspension in jedes Insert gegeben werden konnte. Bei den Inserts handelte es sich um vorgefertigte Einsätze der Firma Sarstedt, die auf 12-Well-*Tissue Culture* (TC)-Platten über kleine Haken in die Wells eingehängt wurden, sodass das untere Kompartiment trotzdem noch über einen Randspalt zu erreichen war. Die Inserts bestanden aus einem runden Polystyrolkörper, dessen Boden durch eine semipermeable Membran mit einer Porengröße von 0,4 µm Durchmesser gebildet wurde. Durch die TC-Behandlung der Membran konnten die Zellen auf dieser optimal anhaften und eine Zellschicht ausbilden, die sowohl von basal als auch von apikal aus erreichbar war. Das untere Kompartiment wurde mit 1,5 ml reinen RPE-Mediums befüllt. Für die Kultivierung wurden die Platten schließlich im Brutschrank gelagert. Das Medium wurde zwei Mal in der Woche gewechselt, indem das alte vorsichtig abgesaugt und durch je 1 ml frischen RPE-Mediums im Insert und 1,5 ml im unteren Kompartiment ausgetauscht wurde.

### 2.2.2.2. Herstellung einer Organkultur

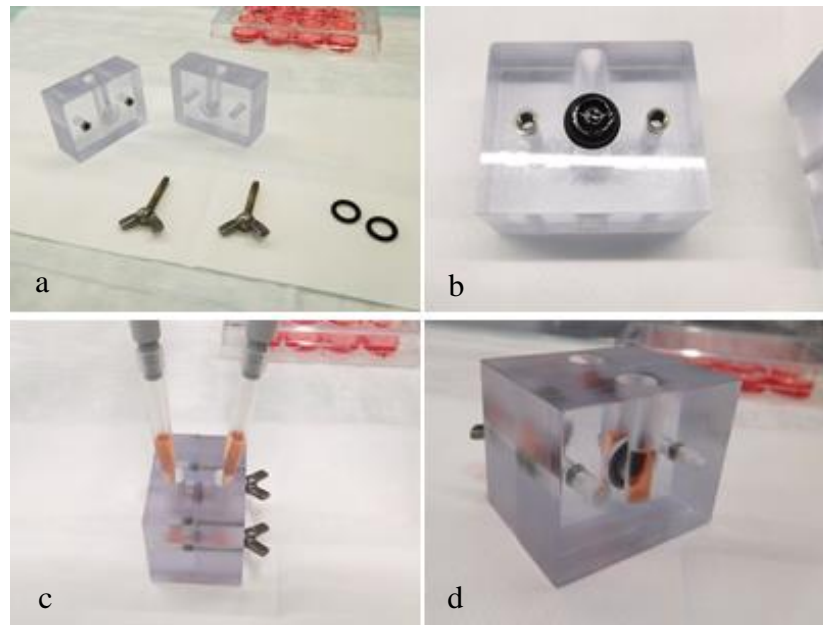
Die Schritte der Präparation des Gewebes bis zur Entfernung von vorderem Augenabschnitt und Glaskörper sind identisch mit denen in Punkt 2.2.2.1. beschrieben. Im Anschluss wurde zunächst die Sklera bis zum Sehnervenaustritt eingeschnitten und die Choroidea mit Retina von dieser Schnittkante mit einer kleinen Pinzette gegriffen. Von hier aus wurde das Gewebe dann vorsichtig abgezogen und die Verbindungen zur Sklera mit einer feinen Präparierschere durchtrennt. Sobald genug Fläche zur Verfügung stand, wurde ein weißer Ring unter der Choroidea platziert (Abb. 7c) und das Gewebe großzügig und ohne Zug darübergelegt. Dann wurde die Retina abgezogen und der schwarze Ring auf Höhe des weißen Ringes auf das Gewebe gelegt (Abb. 7d). Dieser Ringkomplex wurde so lange mit der Chalazion-Zange aufeinandergedrückt und festgehalten (Abb. 7e), bis die beiden Ringe ineinander einrasteten und das umliegende Gewebe mit der Schere fein abgetrennt werden konnte (Abb. 7f).



**Abbildung 7:** Herstellung eines Organkulturringes. a) Porciner Bulbus, von Muskelgewebe befreit und desinfiziert, b) Entlang der Ora serrata eröffneter porciner Bulbus, von links nach rechts: vorderer Augenabschnitt, hinterer Augenabschnitt, Linse, c) Mit der Pinzette angehobene Retina und darunter gelegter weißer Ring, d) Über den weißen Ring gestülptes, von Neuroretina befreites RPE mit locker aufgelegtem schwarzem Ring, e) Zusammendrücken des weißen und schwarzen Ringes mit der Chalazionzange, f) Herausgetrennter und gesäuberter fertiger Ring.

Die fertigen Ringe wurden dann in mit Organkultur-Medium gefüllten und mithilfe einer Wärme-Platte auf 37 °C beheizten 12-Well-Platten bis zur Weiterverwendung gesammelt. Nach einer optischen Beurteilung unter dem Lichtmikroskop und photographischen Dokumentation wurden die Ringe in die Ussing-Kammern eingespannt (Abb. 8a und b). Die beiden Kompartimente wurden daraufhin simultan mithilfe zweier Eppendorf-Pipetten mit je 1,1 ml

Medium befüllt (Abb. 8c und d). Dabei wurde auf ein identisches Volumen und ein gleichmäßiges Einfüllen geachtet, um einem einseitigen Druck auf das Gewebe entgegenzusteuern. Dann wurden die beiden Öffnungen mit Parafilm® abgedichtet, in den mit einer feinen Kanüle kleine Löcher eingestanzt wurden, um eine ausreichende Belüftung zu gewährleisten. Im Anschluss an die Fertigung der Kammern wurden sie zunächst 24 Stunden lang im Brutschrank kultiviert, um Störfaktoren in der Sekretion des RPE, die an dem Tag durch den Präparationsstress entstanden sein könnten, zu minimieren.



**Abbildung 8:** Einspannen des Organkulturrings in die Ussing-Kammer. a) Einzelbestandteile der Ussing-Kammer, b) Positionierung des Organkulturrings über der Öffnung der einen Kammerhälfte auf schwarzem Gummiring, c) Simultane Eingabe des Organkulturmediums in die fertig verschraubte Ussing-Kammer, d) Seitenansicht der fertig gestellten Ussing-Kammer. Veröffentlicht in “Basolateral activation with TLR agonists induces polarized cytokine release and reduces barrier function in RPE *in vitro*” (Terheyden et al. 2021).

### 2.2.2.3. Zellkultur undifferenzierter SH-SY5Y-Zellen

Für den Nachweis neurotoxischer Effekte der aus den RPE-Transwell- und Organkultur-Versuchen gewonnenen Überständen wurden diese auf undifferenzierte SH-SY5Y-Zellen gegeben. Diese entstammen einer humanen Neuroblastom-Zelllinie und entsprechen undifferenziert unreifen katecholaminergen Neuronen (Kovalevich und Langford 2013). Sie sollen in dieser Arbeit als Modell für die neuronalen Zellen der Retina fungieren, um zu untersuchen, ob die Stimulation der TLR eine mögliche Degeneration der Neuroretina verursachen könnte, die im MTT nachgewiesen werden kann (Waseem et al. 2017).



Die Zellkulturen wurden in TC25-Zellkulturflaschen mit 7 ml Neuro-Medium angelegt und zwei Mal in der Woche im Verhältnis 1:8 gesplittet. Für die Aussaat wurden die vorgesehenen 24-Well-Platten zunächst mit Kollagen beschichtet, um ein kontrolliertes Wachstum und eine optimale Zelladhäsion zu gewährleisten. Dafür wurde Collagen A im Verhältnis 1:3 mit PBS verdünnt und 330 µl davon in jedes Well gegeben. Während die beschichteten Platten 30 Minuten lang im Brutschrank inkubierten, wurden die SH-SY5Y-Zellen ausgezählt. Zunächst wurde hierbei das Medium aus den Zellkulturflaschen verworfen, kurz mit PBS gespült und schließlich 1 ml Biotase hineingegeben. Nach etwa einminütiger Inkubation im Brutschrank konnten die Zellen dann unter Spülen mit etwas Neuro-Medium von der Flaschenhinterwand abgelöst und in ein Zentrifugationsröhrchen mit 15 ml Neuro-Medium transferiert werden. Dieses wurde dann 5 Minuten lang bei 900 rpm zentrifugiert, das überschüssige Medium verworfen und das Pellett in 1 ml Neuro-Medium gründlich resuspendiert. Davon wurden 20 µl abgenommen, im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau gemischt und mit der Neubauer Zählkammer die enthaltene Zellanzahl bestimmt. Diese wurde auf den 1 ml im Zentrifugationsröhrchen hochgerechnet und mit Medium aufgefüllt, sodass pro Well 300.000 Zellen auf der 24-Well-TC-Platte ausgesät werden konnten.

Für die Organkultur-Überstände wurden 96-Well-Platten ohne Kollagenbeschichtung verwendet. Die Kultivierung und Auszählung der Zellen liefen jedoch identisch ab. In jedes Well wurden schließlich 100 µl à 10.000 Zellen gegeben, wobei die Randwells frei blieben und lediglich mit 100 µl reinen Neuro-Mediums befüllt wurden, um einen Randeffekt zu vermeiden.

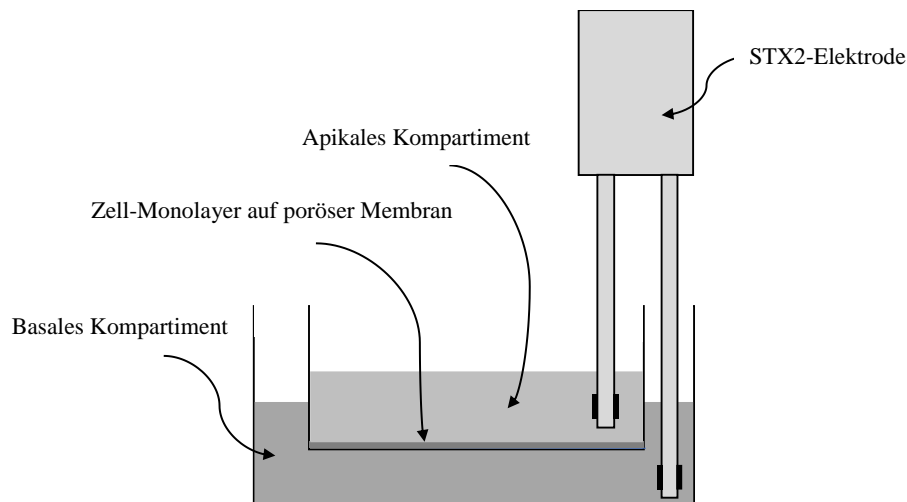
### **2.2.3. Qualitätssicherung der Barriere**

#### **2.2.3.1. TEER-Messung bei RPE-Transwell-Zellkulturen**

Die Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER) ist ein weit etabliertes und hoch sensitives Verfahren zur Beurteilung der Barrierefunktion von einschichtigen Epithelien, indem sie die Funktion der *Tight Junctions* quantitativ erfassen kann (Srinivasan et al. 2015). Demnach sollte hiermit untersucht werden, ob die Stimulation der TLR im RPE eine Auswirkung auf die Integrität der Blut-Retina-Schranke haben könnte, wie es schon in einem vorherigen Versuchsaufbau der gleichen Art erfolgreich für VEGF nachgewiesen wurde (Miura et al. 2010b).

Für die Messungen wurde das Gerät EVOM2 (Epithelial Voltohmmeter) der Marke World Precision Instruments (WPI) mit zugehöriger STX2- „Chopstick“-Elektrode verwendet. Diese Elektrode besteht aus zwei Köpfen, die zeitgleich in die zwei verschiedenen Kompartimente

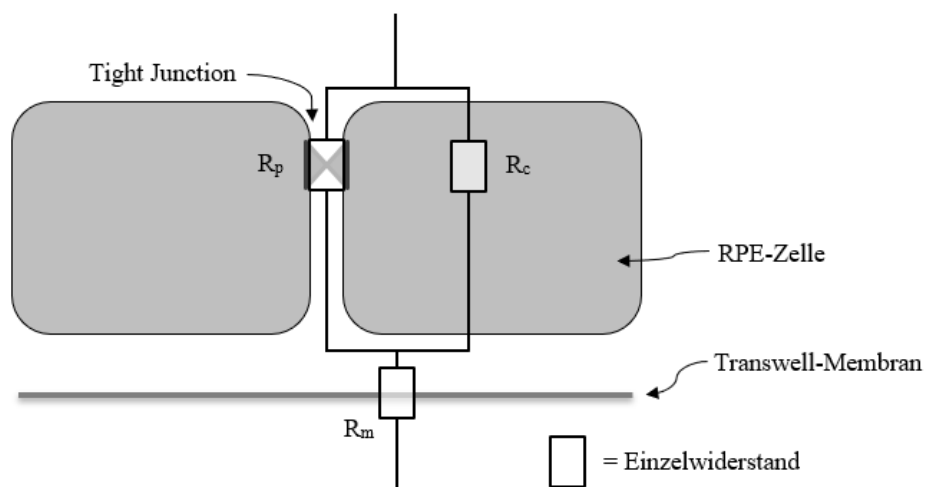
eingeführt werden können (Abb. 9). Die äußeren Elektrodenplaques messen dann jeweils das an sie abgegebene Spannungssignal ( $U$ ) und die inneren die über die beiden Medien wandernde Stromstärke ( $I$ ), wodurch der Widerstand ( $R$ ) über die Epithelschicht nach dem Ohm'schen Gesetz  $R=U/I$  berechnet werden kann.



**Abbildung 9:** Querschnitt durch ein Transwell mit Darstellung der STX2-Elektrode, die mit dem Messgerät EVOM2 verbunden ist.

Allerdings muss hierbei berücksichtigt werden, dass sich der Gesamtwiderstand aus mehreren parallel und in Serie geschalteten Einzelwiderständen zusammensetzt (Abb. 10):

- a) zellulärer Widerstand ( $R_c$ ) über die apikale und basale Zellmembran
- b) parazellulärer Widerstand über die *Tight Junctions* ( $R_p$ )
- c) Widerstand der Transwell-Membran ( $R_m$ ).



**Abbildung 10:** Darstellung der Einzelwiderstände: parazellulärer Widerstand ( $R_p$ ), zellulärer Widerstand ( $R_c$ ) und Widerstand der Transwellmembran ( $R_m$ ) im RPE-Transwell-Modell.

Mithilfe der beiden Kirchhoff'schen Gesetze ergibt sich folgende Formel zur Ermittlung des Gesamtwiderstandes:

$$R_{ges} = R_b + \frac{R_p \cdot R_c}{R_c + R_p}$$

Da der zelluläre Widerstand ( $R_c$ ) und der Widerstand der Basalmembran ( $R_b$ ) als konstant angenommen werden können, ist die Höhe des Gesamtwiderstandes vom parazellulären Widerstand ( $R_p$ ) entscheidend abhängig: Sind die *Tight Junctions* dicht, ist der Gesamtwiderstand hoch, sind sie undicht, so ist der Gesamtwiderstand niedrig (Claude und Goodenough 1973). Zu Beginn einer neuen Charge von Transwell-Inserts wurde vor der Zellaussaat in reinem RPE-Medium von jedem Well der Leerwert, also der Widerstand über der Transwell-Membran ( $R_m$ ), bestimmt, der schließlich gemittelt und für diese Arbeit als feststehender Wert eingesetzt wurde. Um den RPE-Zellen nach der Aussaat genügend Zeit zu geben, auf den Transwell-Platten anzuwachsen, wurde erst nach einem Minimum von fünf Tagen mit den Messungen begonnen. Diese wurden im Anschluss zwei Mal pro Woche unmittelbar vor dem Mediumwechsel durchgeführt, um Störfaktoren durch diesen zu vermeiden. Unmittelbar vor und nach der Messung einer Platte wurden die Elektroden in 70 %ige Ethanol-Lösung eingetaucht, um das Einschleppen von Keimen zu verhindern, und im Anschluss mit sterilem Aqua bidestillata gespült. Für die Ermittlung stabiler Werte galten die Voraussetzungen, dass beide Elektrodenköpfe tief genug in die jeweiligen Medien eingetaucht und ruhig gehalten wurden. Der endgültige Messwert wurde dann über die folgende Formel ermittelt, indem noch der Leerwert und die Membranfläche einberechnet wurden (Srinivasan et al. 2015):

$$TEER = (Messwert - Leerwert) (\Omega) \cdot Membranfläche (cm^2).$$

Nach einer Kultivierung der Zellen von durchschnittlich 18 Tagen und einem stabilen TEER ( $140,8 \pm 55,4 \Omega \cdot cm^2$ ) waren die Zellen bereit für die Stimulation ihrer TLR.

#### **2.2.3.2. Nachweis der Dichte der Ussing-Kammern mit Brilliantblau G**

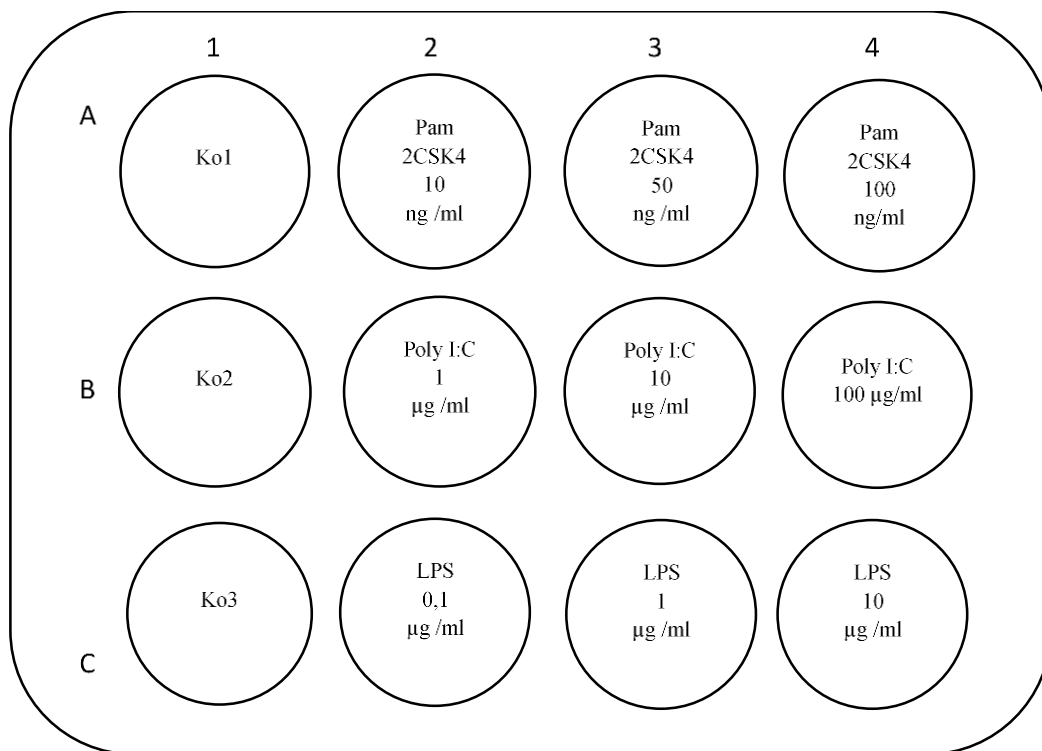
Um neben der optischen Beurteilung noch eine objektive Quantifizierung der Durchlässigkeit der Ringe zu haben, wurde dem frischen Medium auf der basolateralen Seite am dritten Experimenttag noch 30  $\mu$ l der Lösung Brilliant Peel, die den Farbstoff Brilliantblau G enthielt, beigelegt. So konnte untersucht werden, ob der Farbstoff innerhalb der 24-stündigen Inkubation im Brutschrank in das apikale Kompartiment übergetreten war. Hierfür wurden die

Farbstoffkonzentrationen am nächsten Tag sowohl basal als auch apikal bei  $\lambda = 584 \text{ nm}$  gegen eine mitgelaufene Medium-Kontrolle photometrisch bestimmt, sodass eine Aussage über die Dichte von Ring und Kammer und damit indirekt auch über die Qualität der Barriere getroffen werden konnte.

## 2.2.4. Stimulation der Zellkulturen

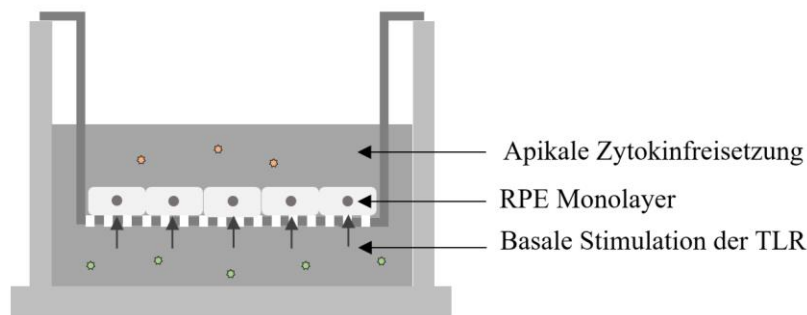
### 2.2.4.1. Stimulation der RPE-Transwell-Zellkulturen

Für die basale Stimulation der RPE-Zellen wurden die Stimulanzen der entsprechenden Toll-like-Rezeptoren in warmem RPE-Medium gelöst. Dabei wurde Pam2CSK4 als TLR 2-Agonist (Kawai und Akira 2010) in den Konzentrationen 10, 50 und 100 ng/ml, Polyinosin/-cytidylsäure (Poly I:C) als TLR 3-Agonist (Yang et al. 2008) in den Konzentrationen 1, 10 und 100 µg/ml und das Lipopolysaccharid (LPS) als TLR 4-Agonist (Poltorak 1998) in den Konzentrationen 0,1, 1 und 10 µg/ml in RPE-Medium angesetzt. Dann wurde das Medium aus den unteren Wells abgenommen und nach einem vorher festgelegten Schema (Abb. 11) durch je 1,5 ml der jeweiligen Ansätze ersetzt. Zum Ausschluss von Störfaktoren wurden die Positionen bei jedem Versuch neu verteilt. Für jeden Ansatz lief eine Kontrolle (Ko) mit, die mit reinem RPE-Medium befüllt wurde.



**Abbildung 11:** Schematische Darstellung zur Stimulation der RPE-Transwell-Platten.

Im Anschluss daran wurde auch das apikale Medium erneuert und die Platte für 24 h im Brutschrank gelagert (Abb. 12). Danach wurden umgehend die Überstände abgenommen und direkt durch die gleiche Menge warmen RPE-Mediums ersetzt. Darin konnte eine abschließende TEER-Messung durchgeführt werden, um daran abzulesen, wie sich die Integrität des Epithels über die Stimulation hinweg verändert hat. Die abgenommenen Überstände wurden 15 Minuten lang bei 13.000 rpm zentrifugiert, steril in Eppendorfer Mikroreaktionsgefäße übergeführt und bis zur Weiterverwendung bei -20 °C eingefroren.



**Abbildung 12:** Schematische Darstellung eines Transwell-Filter-Systems während der 24-stündigen Inkubation. Basal werden TLR-Stimulanzen (grün) hinzugegeben, woraufhin das RPE basal und apikal Zytokine (orange) sezerniert. Für die Übersicht wurden hier beispielhaft nur die apikalen Zytokine dargestellt, die in dieser Arbeit von zentralem Interesse waren.

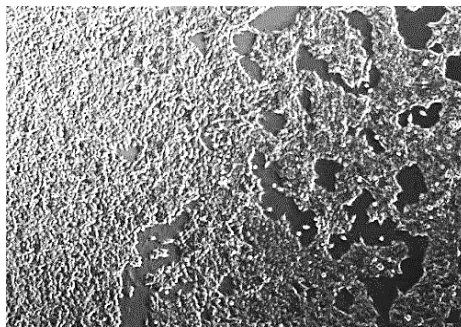
#### 2.2.4.2. Stimulation der Organkulturen

Nach 24-stündiger Inkubation der Ussing-Kammern konnte mit der Stimulation der TLR begonnen werden. Dabei wurde zunächst das alte Medium gleichmäßig mithilfe zweier Eppendorf-Pipetten aus beiden Kompartimenten der Kammern abgenommen. Simultan zur Versorgung der apikalen Seite mit 1,1 ml Organkulturmedium wurde die basale Seite jeweils mit 1,1 ml eines der Stimulanzen Pam2CSK4 für den TLR 2 in den Konzentrationen 50 oder 100 ng/ml, Poly I:C für den TLR 3 in den Konzentrationen 10 oder 100 µg/ml und die Lipopolysaccharide für den TLR 4 in den Konzentrationen 1 oder 10 µg/ml oder reinen Organkulturmediums für die Kontrolle befüllt. Nach 24-stündiger Inkubation im Brutschrank wurden die Überstände wieder simultan abgenommen, bei 13.000 rpm zentrifugiert, von Zellbestandteilen befreit und bei -20 °C vorübergehend eingefroren.

#### 2.2.4.3. Stimulation der SH-SY5Y-Zellen

Die RPE-Transwell- und Organkultur-Überstände wurden zunächst etwa eine halbe Stunde lang bei 37 °C aufgetaut. Währenddessen wurde für jede Probe eine in Stimulanz und Konzentration entsprechende Kontrolle in RPE-, beziehungsweise Organkulturmedium angesetzt. Nachdem die angezüchteten SH-SY5Y-Zellen unter dem Lichtmikroskop auf eine

Konfluenz von etwa 85 % und flächendeckende Zelladhäsion geprüft worden waren (Abb. 13), wurde das Neuro-Medium vorsichtig unter Kippen der Platte abpipettiert und schließlich 400 µl je RPE-Überstand oder Kontrolle, beziehungsweise 100 µl je Organkultur-Überstand oder Kontrolle vom vorderen Well-Rand hineinlaufen gelassen. Während auf den 24-Well-Platten nur jeweils ein TLR-Agonist eines Experiments gegen die jeweilige Kontrolle aufgetragen werden konnte, konnten auf den 96-Well-Platten gleich alle drei TLR-Agonisten eines Experiments parallel zu einem Kontroll-Experiment getestet werden, während noch eine Platte mit zwei weiteren Kontroll-Experimenten angelegt wurde. Allerdings musste bei den 96-Well-Platten beachtet werden, die jeweiligen Konzentrationen für Pam2CSK4, Poly I:C, LPS und Medium-Kontrolle in Dreifach-Bestimmung aufzutragen. Da die Rand-Wells unverändert blieben, um einen Randeffekt zu vermeiden, wurden lediglich die verbleibenden Wells dazwischen noch mit reinem Neuro- und Organkultur-Medium befüllt, um deren Effekte auf die Zellen ebenfalls zu untersuchen. Alle Platten wurden im Anschluss an die Stimulation 24 Stunden lang im Brutschrank inkubiert.



**Abbildung 13:** SH-SY5Y-Zellkultur in Neuro-Medium vor Stimulation unter dem Lichtmikroskop in 10-facher Vergrößerung. Links im Bild ist eine 100 %ige Konfluenz zu sehen, während auf der rechten Seite noch freie Flächen zu erkennen sind, in denen die Zellen mit kleinen Ausläufern aufeinander zuwachsen.

## **2.2.5. Färbeverfahren**

### **2.2.5.1. Nachweis der Zelltoxizität durch den MTT-Assay**

Der MTT-Assay ist ein Nachweisverfahren für die metabolische Aktivität der Zellen, wodurch der Anteil noch lebender Zellen nach der Stimulation im Vergleich zu einer Kontrolle bestimmt wird und damit ein zelltoxischer Effekt durch die Stimulanzen nachgewiesen werden kann (Mosmann 1983). Der MTT-Assay wurde bei den RPE-Transwell-Zellkulturen und bei den SH-SY5Y-Zellkulturen angewendet, wobei die Protokolle in einzelnen Schritten voneinander abwichen und im Folgenden erläutert werden.

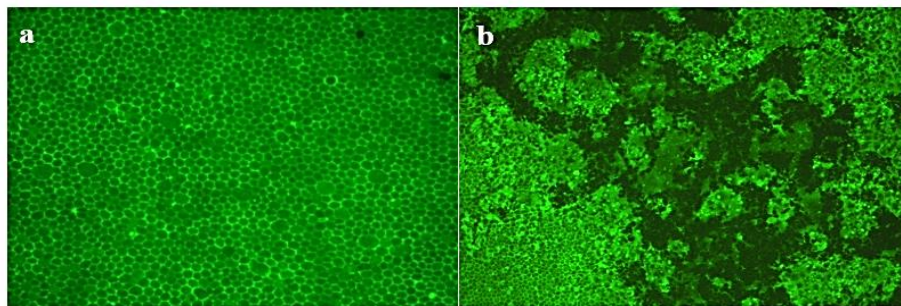
Für den MTT-Assay bei den RPE-Transwell-Zellkulturen wurden die RPE-Zellen im Anschluss an den Stimulationsversuch zunächst zwei Mal mit PBS gewaschen und dann 350 µl MTT-Lösung in jedes Well gegeben. Für die MTT-Lösung wurde das Salz (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) 2,5 diphentyltetrazoliumbromid im Verhältnis 1:10 mit DMEM-Medium ohne Phenolrot gemischt. Im Laufe der zweistündigen Inkubation im Brutschrank wurde das wasserlösliche gelbe Tetrazolium-Salz in den lebendigen Zellen durch NAD(P)H-abhängige intrazelluläre Enzyme zu dem wasserunlöslichen blau-violetten Formazan reduziert. Zum Nachweis wurde dieses Reaktionsprodukt in DMSO gelöst (Twentyman und Luscombe 1987). Dafür wurde das MTT wieder abgenommen und 350 µl DMSO auf die Wells gegeben. Während einer 5-minütigen Schüttelinkubation bei 200 rpm wurde eine 96-Well-Platte vorbereitet, bei der zu Anfang 2 Blanks mit je 150 µl DMSO und dann für jede entsprechende Probe zwei Wells mit je 100 µl DMSO befüllt wurden. Diese 100 µl wurden mit 50 µl der Probe gut durchmischt, sodass im Anschluss die Farbstoffintensitäten für jedes Well bei  $\lambda = 550$  nm im ELISA-Reader exakt ausgemessen werden konnten.

Für die Färbung der SH-SY5Y-Zellkulturen wurden 250 µl der MTT-Lösung auf jedes Well der 24-Well-Platte gegeben und es gab einen Zwischenschritt im Protokoll, um auch die abgelösten Zellen nachweisen zu können. Dabei wurden die MTT-Überstände, statt verworfen zu werden, zunächst pro Well in einzelnen Eppendorfer Mikroreaktionsgefäßen gesammelt, die dann bei 13.000 rpm 5 Minuten lang zentrifugiert wurden. Die Überstände wurden im Anschluss vorsichtig abgesaugt und verworfen und das Pellet in 150 µl DMSO gelöst. Daraufhin wurde alles wieder in die entsprechenden Wells zurück pipettiert und der MTT nach dem im vorherigen Absatz beschriebenen Schema zu Ende geführt. Bei den Organkulturüberständen wurden je 10 µl der vorbereiteten MTT-Lösung direkt in jedes Well und die Blanks gegeben. Nach einer zweieinhalbstündigen Inkubation im Brutschrank wurde das Zellkulturmedium abpipettiert und umgehend durch 100 µl DMSO ersetzt. Anschließend wurden die Platten für 5 Minuten bei 200 rpm in den Schüttelinkubator gestellt und bei  $\lambda = 550$  nm im ELISA-Reader ausgelesen.

#### **2.2.5.2. Calceinfärbung**

Calcein wird mit einem Acetoxymethylester durch die Zellmembran transportiert und durch eine Esterase in aktives Calcein umgewandelt, das Calcium binden kann. Dies resultiert in einer starken grünen Fluoreszenz, die nur bei lebenden Zellen auftritt, da abgestorbene Zellen über keine aktiven Esterasen verfügen (Neri et al. 2001).

Da für die Organkulturen über die gesamte Kultivierungsdauer von 76 Stunden eine stabile Qualität gewährleistet sein musste, wurde die Calceinfärbung als Nachweis der Intaktheit des Gewebes zum Ende des Experimentes angewendet. Nur die Ringe, die eine abschließende Zellviabilität von über 90 % aufwiesen, wurden in die hier vorliegende Arbeit aufgenommen (Abb. 14a), während Ringe mit weniger als 90 % Zellviabilität ausscheiden mussten (Abb. 14b). Zunächst wurde der Raum abgedunkelt und Calcein im Verhältnis 1:250 mit warmem Organkultur-Medium gemischt und in einer 12-Well-Platte vorgelegt. In diese Wells wurden dann die Ringe übergeführt und 30 Minuten lang im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurden diese zwei Mal mit PBS gewaschen und dann unter Fluoreszenzlicht bei  $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$  497/517 beurteilt (Klettner et al. 2013b).



**Abbildung 14:** Lichtmikroskopische Photographien zweier Calcein-gefärbter Organkulturen zum Vergleich in 10-facher Vergrößerung. a) Intakte Organkultur. Der Vitalitätsanteil lag bei >90 %, also wurde das Explantat in das Experiment aufgenommen. b) Beschädigte Organkultur. Dieses Präparat musste aufgrund eines Einrisses ausscheiden.

### 2.2.5.3. Immunfluoreszenzfärbung

Neben den TEER-Messungen war die Immunfluoreszenzfärbung von Occludin ein weiteres Nachweisverfahren für die Veränderungen der TJ, die durch die Stimulation verursacht worden sein konnten. Die beiden Transmembranproteine Occludin und Claudin bilden gemeinsam die apikalen Verschlusskontakte (TJ) für die Versiegelung des Interzellularspalts zwischen den RPE-Zellen und bestimmen dabei maßgeblich die Barrierefunktion des Epithels (Lüllmann-Rauch 2012). Demnach diente die Immunfluoreszenzfärbung der optischen Analyse der durch TLR-Stimulation hervorgerufenen Effekte auf die Blut-Retina-Schranke. Dabei wurde das Verfahren nach Miura angewendet, das in einzelnen Punkten noch von den Organkulturen auf RPE-Transwell-Versuche angepasst wurde (Miura et al. 2010a). Alle Schritte fanden an einer offenen Arbeitsbank bei Raumtemperatur statt. Direkt nach der letzten TEER-Messung des Stimulationsversuchs wurden die Zellen im Transwell-Insert 15 Minuten lang in 0,5 ml 4 %iger Formaldehyd-Lösung fixiert. Im Anschluss wurden sie drei Mal mit PBS gewaschen und dann mit Triton X 100, das zu einem Anteil von 5 % in Aqua bidestillata gelöst wurde, 15 Minuten



lang permeabilisiert. Dieser Prozess wurde daraufhin durch 1 %ige BSA-Lösung, die am Tag zuvor in PBS angesetzt und über Nacht bei 4 °C gekühlt worden war, 20 Minuten lang blockiert. Währenddessen wurde der Primärantikörper im Verhältnis 1:100 in einer Lösung aus 2,5 %igem Triton X, das in der zuvor verwendeten 1 %igen BSA-Lösung gelöst wurde, angesetzt. Davon wurden schließlich 150 µl in jedes Well gegeben und die Platten bei 4 °C über Nacht in absoluter Dunkelheit gelagert. Die Schritte am darauffolgenden Tag wurden unter lichtgeschützten Bedingungen durchgeführt. Zuerst wurde der Roti-Immunoblock im Verhältnis 1:10 in Aqua bidestillata verdünnt und darin der Sekundärantikörper *Alexa Fluor 555 anti-rabbit* im Verhältnis 1:1000 und der Fluoreszenzantikörper Hoechst für die Kernfärbung im Verhältnis 1:500 gelöst. Von diesem Ansatz wurden nach dreimaligem Waschen der Zellen in PBS wieder 150 µl in die Wells gegeben und die Platten 60 Minuten lang in einer abgedunkelten Kammer inkubiert. Danach folgte wieder ein zweimaliger Waschvorgang mit PBS. Für das Eindecken auf Objektträgern musste zunächst die jeweilige Membran mit ihren aufliegenden Zellen mit einem feinen Skalpell aus dem Polystyrol-Körper des Transwell-Inserts herausgeschnitten werden. Dann wurde die Membran mit der Zellseite nach oben auf einen bereitliegenden Objektträger transferiert, zwei Tropfen des Eindeckmediums Fluoromount-G auf die Zellen gegeben und ein Deckgläschen darüber gezogen. Im Anschluss wurden die Objektträger noch 24 Stunden lang lichtgeschützt getrocknet, bis diese unter dem Fluoreszenz-Mikroskop begutachtet werden konnten.

Die Immunfluoreszenzfärbung der Organkulturen diente der Ergänzung der RPE-Transwell-Experimente, um die Veränderungen des Occludins in beiden Modellen zu vergleichen. Zunächst wurde jeder einzelne Organkultur-Ring aus seiner Ussing-Kammer mit der schwarzen Seite nach oben in ein eigenes Well mit 1 ml Organkultur-Medium auf einer 24-Well-Platte überführt. Darin folgten dann die weiteren Schritte, wie sie zuvor für die RPE-Transwell-Versuche beschrieben wurden. Es wurden lediglich zwei Anpassungen für die Organkulturen aufgrund des größeren Volumenbedarfs vorgenommen: Die Wells wurden stets mit 1 ml der entsprechenden Flüssigkeiten gefüllt und die Auftropfmenge der Antikörper betrug 600 µl. Für den Transfer der Organkultur auf den Objektträger musste der Ring zunächst in seine zwei Anteile auseinandergelöst werden, damit das Gewebe vorsichtig mithilfe zweier feiner Pinzetten vom weißen Ring heruntergezogen werden konnte. Die restlichen Schritte entsprachen wieder dem zuvor beschriebenen Protokoll.

Die Auswertung der Immunfluoreszenzbilder erfolgte einerseits durch den Vergleich der gemessenen Intensitäten, welche zuvor im Bezug auf die jeweilige Belichtungszeit der Bilder

normalisiert worden waren, und andererseits semiquantitativ. Bei diesem zweiten Verfahren wurde unter Unkenntnis der jeweiligen Behandlung bei jedem Bild prozentual die Klarheit der Zellgrenzen und der intrazelluläre Occludingehalt beurteilt.

#### **2.2.6. Enzyme-linked Immunosorbent Assay**

Um die Konzentrationen der durch Stimulation freigesetzten pro-inflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-1 $\beta$  in den RPE- und Organkultur-Überständen zu messen, wurde der *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) angewendet. Bei diesem Verfahren handelte es sich um einen quantitativen Nachweis der durch Antikörper detektierten Proteine (Lin 2015). Die spezifischen monoklonalen Antikörper lagen schon vorbeschichtet auf 96-Well-Platten vor und banden nach Gabe der Überstände zunächst ihre Zielproteine. Daraufhin wurde ein weiterer spezifischer monoklonaler Antikörper mit einer daran gekoppelten Peroxidase hinzugegeben, der wiederum an das gleiche Zielprotein band. Nach gründlichem Auswaschen der ungebundenen Antikörper wurde schließlich eine Substratlösung hinzugefügt, die durch die gebundenen Enzyme in blaue Reaktionsprodukte gespalten wurde. Durch Hinzugabe der Stopp-Lösung ergab sich dann ein gelber Farbumschlag, dessen Farbintensität mit der Proteinkonzentration korrelierte und photometrisch bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 450 \text{ nm}$  gemessen werden konnte.

#### **2.2.7. Statistische Auswertung**

Alle Experimente wurden mindestens drei Mal mit jeweils eigener Kontrolle unabhängig voneinander wiederholt, um die statistische Signifikanz zu ermitteln. Alle Berechnungen dieser Arbeit wurden mithilfe des Excel-Programms der Software Microsoft Office 365 ProPlus und der Statistik-Software GraphPad Prism7.0 durchgeführt. Für den Vergleich mehrerer Gruppen wurde der nicht-parametrische, nicht-gepaarte *Kruskal-Wallis Test* verwendet. Im Falle einer Signifikanz wurde diese mithilfe des nicht-parametrischen, nicht-gepaarten *Mann-Whitney U Tests* überprüft. Die Ausnahme bildeten die TEER-Experimente und die Messungen der basalen und apikalen Zytokinsekretion, da hier zwei Gruppen direkt miteinander verglichen wurden. In diesen Fällen wurde der nicht-parametrische, gepaarte *Wilcoxon Matched-Pairs Signed Rank Test* durchgeführt. Bei einem p-Wert gleich oder kleiner als 0.05 (5 %) wurde das Ergebnis als signifikant angenommen. In den Graphen wurden Mittelwert und Standardabweichung dargestellt.

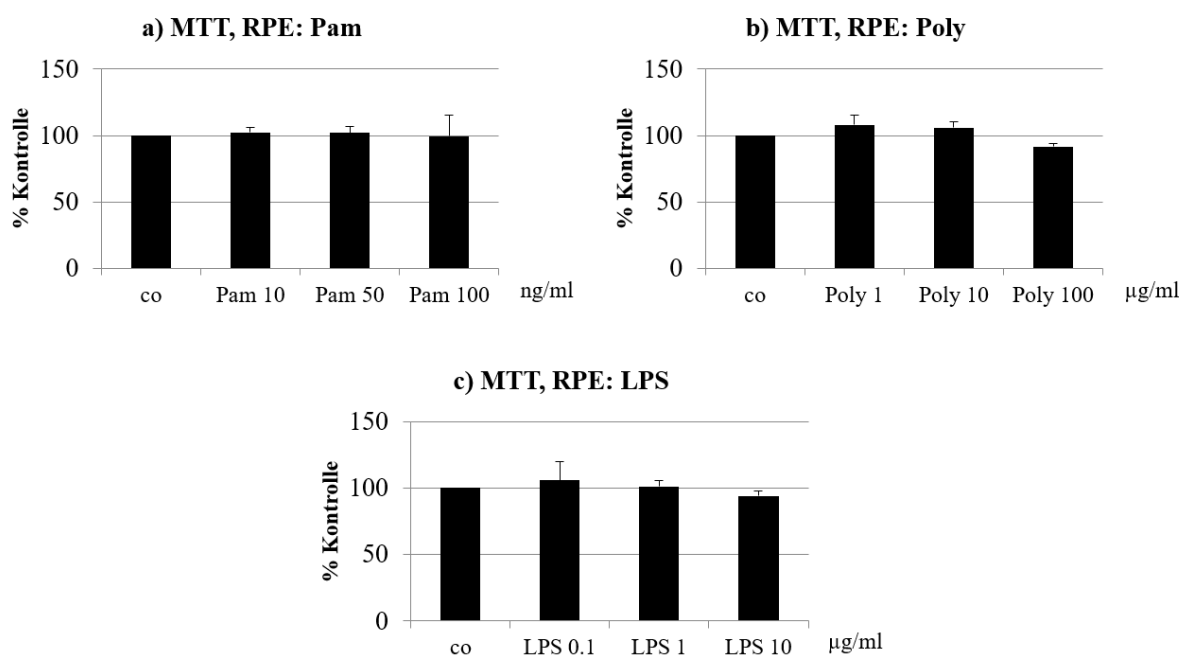
### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Qualitätssicherung der Versuche

Um die Qualität der Versuche gewährleisten zu können, wurden einerseits für das RPE-Transwell-Modell der MTT-Assay, andererseits für die Organkulturen die Calceinfärbung und die Färbung mit Brilliantblau G angewendet, welche im Methodenteil (2.2.) bereits erläutert wurden.

##### 3.1.1. MTT-Assay für RPE-Transwell-Platten 24 Stunden nach Stimulation

Um zu erkennen, ob die Stimulanzien einen Einfluss auf das Zellüberleben haben, wurde nach 24-stündiger Stimulation der primären RPE-Zellen mit den TLR-Agonisten Pam2CSK4, Poly I:C und LPS nach der abschließenden TEER-Messung direkt der MTT-Assay angewendet. Keine der untersuchten Stimulanzien hatte einen signifikanten Effekt auf die Zellviabilität der RPE-Zellen ( $p < 0,05$ ) (Abb. 15a-c).



**Abbildung 15:** Zellviabilität der primären RPE-Zellen nach 24-stündiger Stimulation mit den TLR-Agonisten Pam (a), Poly I:C (b) und LPS (c); X-Achse: Konzentration der jeweiligen Stimulanz in 1 ml RPE-Medium. Y-Achse: Zellviabilität in Prozent % (Kontrolle [co]= 100 %). Keine der untersuchten Stimulanzien hat die Zellviabilität der RPE-Zellen signifikant reduziert ( $n=3$ ). Die Signifikanz wurde mithilfe des Kruskal-Wallis Tests berechnet. Veröffentlicht in “Basolateral activation with TLR agonists induces polarized cytokine release and reduces barrier function in RPE in vitro” (Terheyden et al. 2021).

### **3.1.2. Calceinfärbung**

Da Calcein nur von lebenden Zellen aufgenommen werden kann, diente die Färbung als idealer Nachweis für die Qualität der Organkulturen. Nur die Explantate mit einem abschließenden Vitalitätsanteil von  $> 90 \%$  wurden für die vorliegende Arbeit verwendet. Der prozentuale Anteil dieser Präparate in Bezug auf alle präparierten Gewebe lag bei  $51,1 \%$ .

### **3.1.3. Nachweis der Dichte der Ussing-Kammern mit Brilliantblau G**

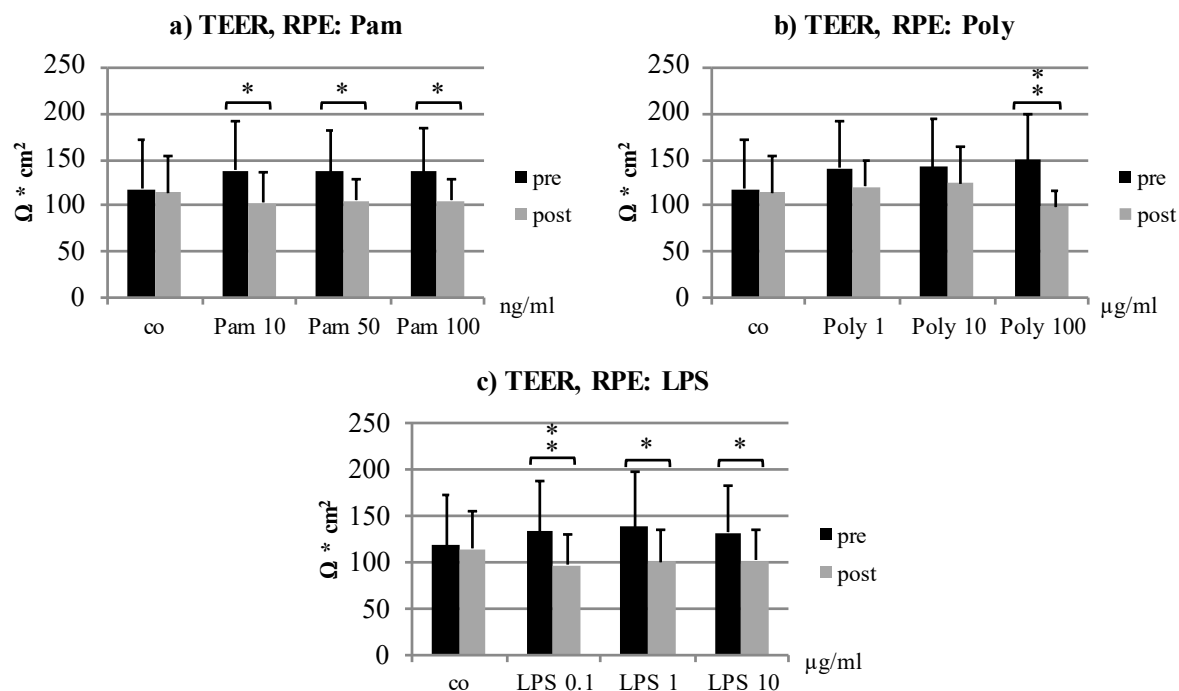
Um die Dichte der Ussing-Kammern zu prüfen, wurde dem basalen Kompartiment Brilliantblau G-Farbstoff hinzugefügt und nach 24 h gemessen, ob der Farbstoff in das apikale Kompartiment übergetreten war. In  $13,33 \%$  aller durchgeführten Experimente konnte überhaupt Farbstoff im apikalen Kompartiment nachgewiesen werden. Bei dem Experiment mit dem höchsten gemessenen Wert waren  $2,84 \%$  des Farbstoffes übergetreten. Es kann also angenommen werden, dass die Dichte der Kammern für die Versuche ausreichend gewährleistet war. Während bei  $93,48 \%$  der in die Studie aufgenommenen Gewebekulturen kein Brilliantblau G-Farbstoff im apikalen Kompartiment nachgewiesen werden konnte, lag dieser Wert bei den ausgeschiedenen Gewebekulturen nur bei  $76,1 \%$ . Insofern kann dieser Test zusätzlich als Beurteilungsfaktor hinzugezogen werden, um die subjektive optische Bewertung der Calceinversuche auch objektiv zu quantifizieren.

## **3.2. Untersuchungen zur Integrität der Barriere**

### **3.2.1. TEER- Messungen**

Die Aufrechterhaltung der Blut-Retina-Schranke ist eine der Hauptfunktionen des RPE. Die Barrierefunktion wurde mithilfe von TEER-Messungen bestimmt.

Nach 24-stündiger Stimulation mit dem TLR-Agonisten Pam2CSK4 ergab sich ein signifikanter Abfall des TEER in allen getesteten Konzentrationen (Abb. 16a). Poly I:C hingegen zeigte nur in der höchsten Konzentration ( $100 \mu\text{g/ml}$ ) eine signifikante Reduktion des TEER (Abb. 16b). Unter der Stimulation mit LPS wiederum wurde in allen untersuchten Konzentrationen eine signifikante Verringerung des TEER verzeichnet (Abb. 16c) ( $p < 0,05$ ).



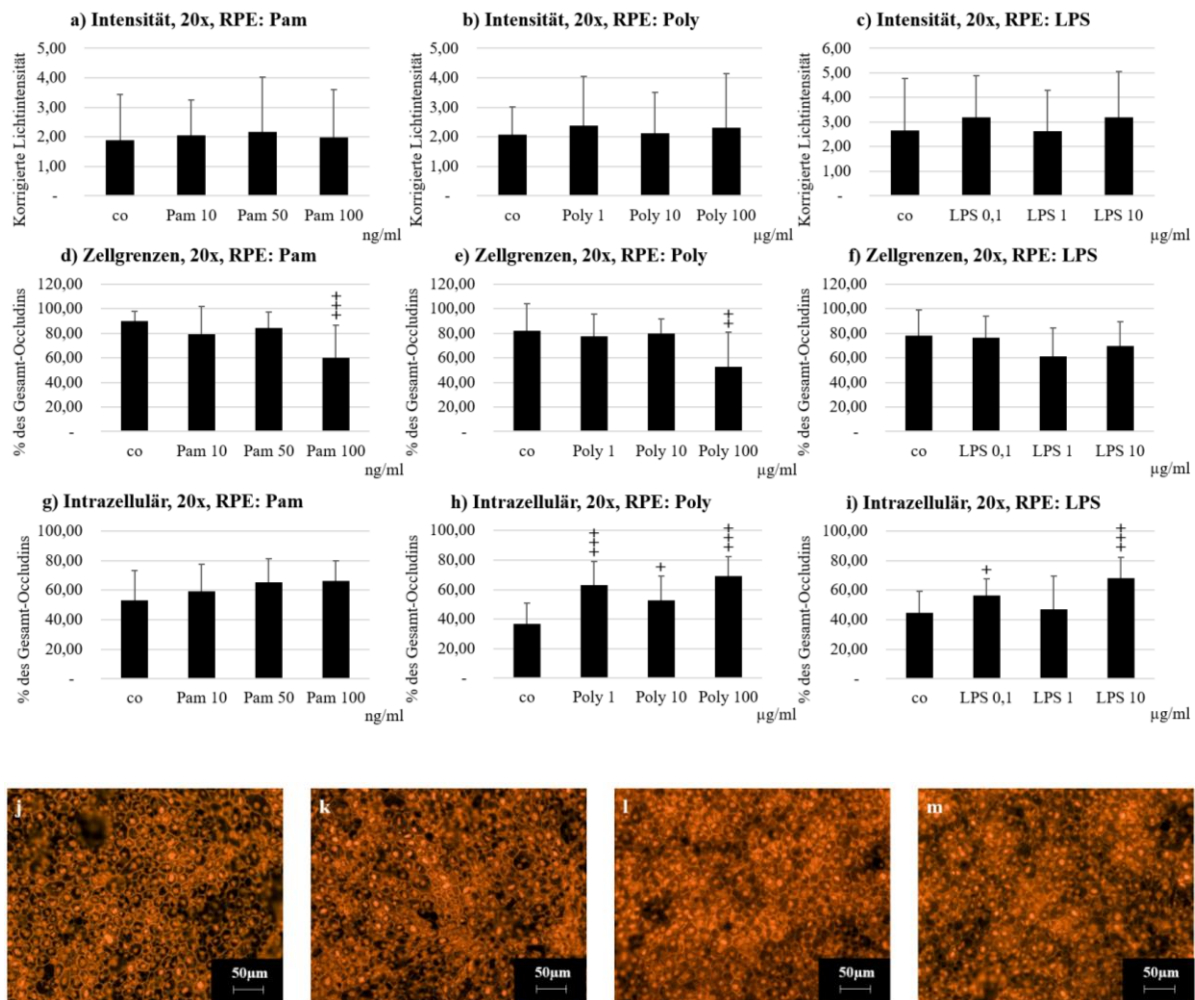
**Abbildung 16:** Transepithelialer Widerstand (TEER) der primären RPE-Zellen vor (pre) und nach (post) 24-stündiger Stimulation mit den TLR-Agonisten Pam2CSK4 (a), Poly I:C (b) und LPS (c); X-Achse: Konzentration der jeweiligen Stimulanz in 1 ml RPE-Medium. Y-Achse: TEER in  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  nach der Formel:  $\text{TEER} = (\text{Messwert} - \text{Leerwert}) (\Omega) \cdot \text{Membranfläche} (\text{cm}^2)$ . Pam und LPS führten in allen Konzentrationen eine signifikante Reduktion des TEER herbei, Poly I:C hingegen nur in der Konzentration 100  $\mu\text{g/ml}$  ( $n=5$ ). Signifikanzen wurden mit dem Wilcoxon matched-pairs signed rank test zum Vergleich vor und nach Stimulation berechnet. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ . Veröffentlicht in “Basolateral activation with TLR agonists induces polarized cytokine release and reduces barrier function in RPE in vitro” (Terheyden et al. 2021).

### 3.2.2. Immunfluoreszenzfärbung

Da der TEER von der Integrität der TJ entscheidend abhängig ist, sollte anhand der Immunfluoreszenzfärbung des TJ-Proteins Occludin der Frage nachgegangen werden, ob sich die zelluläre Lokalisation des Occludins nach inflammatorischer Stimulation der RPE-Zellen in Analogie zu den in 3.2.1. erhobenen Ergebnissen sichtbar verändert. Die Färbung wurde sowohl an RPE-Zellkulturen als auch an Organkulturen durchgeführt. Von jedem Experiment wurden je fünf Bilder in 20- und fünf Bilder in 63-facher Vergrößerung aufgenommen und in die Auswertung eingeschlossen. Die in den Abbildungen aufgeführten Bilder zeigen beispielhaft das verwendete Bildmaterial, auf dem die gefärbten RPE-Transwell-Zellkulturen und Organkulturen zu sehen sind (Abb. 17j-m, 18j-m, 19d-g, 20d-g).

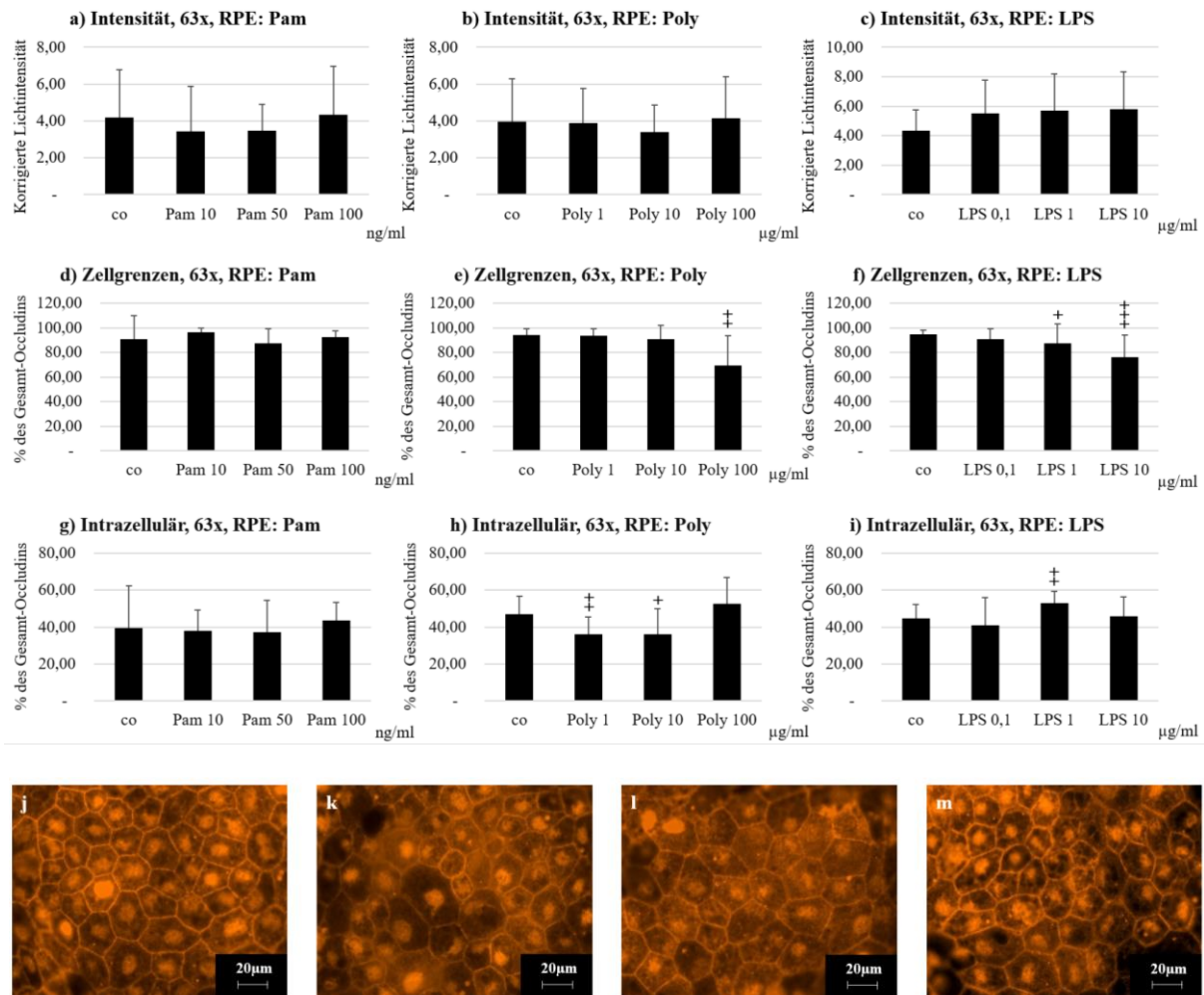
Zur Auswertung der Bilder wurde zunächst von jedem Bild die Intensität der Occludin-Expression bestimmt und durch die jeweilige Belichtungszeit dividiert, um die Ergebnisse

vergleichbar zu machen. Allein auf den Bildern der mit dem TLR-Agonisten Poly I:C stimulierten Organkulturen in 20-facher Vergrößerung konnte eine signifikante Änderung der Intensität der Occludin-Expression nachgewiesen werden, bei den anderen Bildanalysen wurde keine signifikante Änderung der Intensität festgestellt (Abb. 17a-c, 18a-c, 19a und 20a) ( $p < 0,05$ ).



**Abbildung 17:** Immunfluoreszenzfärbung der primären RPE-Zellkulturen nach 24-stündiger Stimulation mit TLR-Agonisten. 20-fache Vergrößerung unter dem Immunfluoreszenz-Mikroskop, a-c) Keiner der TLR-Agonisten hatte einen Einfluss auf die Intensität des Occludinsignals. d-f) Semiquantitative Auswertung der Klarheit der Zellgrenzen. Unter Pam (100 ng/ml) (d) und Poly I:C (100 µg/ml) (e) veränderte sich die Verteilung des Occludins an den Zellgrenzen signifikant. g-i) Semiquantitative Auswertung des intrazellulären Occludingehaltes. Die intrazelluläre Verteilung des Occludins wurde durch Stimulation mit Poly I:C in allen Konzentrationen (h) und LPS (0,1 und 10 µg/ml) (i) signifikant verändert. j-m) Beispielfbilder - j) Kontrolle k) Pam2CSK4 (100 ng/ml), l) Poly I:C (100 µg/ml), m) LPS (10 µg/ml). Die Signifikanz wurde mit dem Kruskal-Wallis Test und dem Mann-Whitney U Test ausgewertet. + =  $0,01 > p < 0,05$ ; ++ =  $0,001 > p < 0,01$ ; +++ =  $p < 0,001$ . Veröffentlicht in "Basolateral activation with TLR agonists induces polarized cytokine release and reduces barrier function in RPE in vitro" (Terheyden et al. 2021).

Als zweites Verfahren wurde die optische Bildauswertung als semiquantitative Analyse angewandt, um dabei einerseits die Klarheit der Zellgrenzen und andererseits den intrazellulären Occludingehalt prozentual zu einer vorher als 100 % festgelegten Kontrolle einzuschätzen.

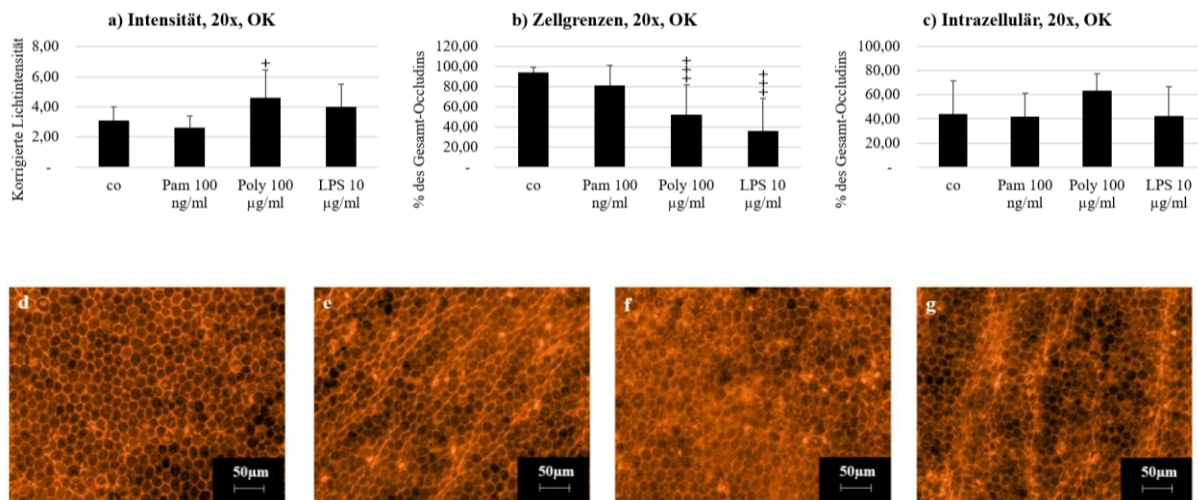


**Abbildung 18:** Immunfluoreszenzfärbung der primären RPE-Zellkulturen nach 24-stündiger Stimulation mit TLR-Agonisten. 63-fache Vergrößerung unter dem Immunfluoreszenz-Mikroskop, a-c) Keiner der TLR-Agonisten hatte einen Einfluss auf die Intensität des Occludinsignals. d-f) Semiquantitative Auswertung der Klarheit der Zellgrenzen. Unter Poly I:C (100 µg/ml) (e) und LPS (1 und 10 µg/ml) (f) veränderte sich die Verteilung des Occludins an den Zellgrenzen signifikant. g-i) Semiquantitative Auswertung des intrazellulären Occludingehaltes. Die intrazelluläre Verteilung des Occludins wurde durch Stimulation mit Poly I:C (1 und 10 µg/ml) (h) und LPS (1 µg/ml) (i) signifikant verändert. j-m) Beispielbilder - j) Kontrolle, k) Pam2CSK4 (100 ng/ml), l) Poly I:C (100 µg/ml), m) LPS (10 µg/ml). Die Signifikanz wurde mit dem Kruskal-Wallis Test und dem Mann-Whitney U Test ausgewertet. + = 0,01 > p < 0,05; ++ = 0,001 > p < 0,01; +++ = p < 0,001. Veröffentlicht in "Basolateral activation with TLR agonists induces polarized cytokine release and reduces barrier function in RPE in vitro" (Terheyden et al. 2021).

In der primären RPE-Zellkultur änderte sich die Klarheit der Zellgrenzen signifikant in 20-facher Vergrößerung für Pam2CSK4 (100 ng/ml) und Poly I:C (100 µg/ml) (Abb. 17d-f) und



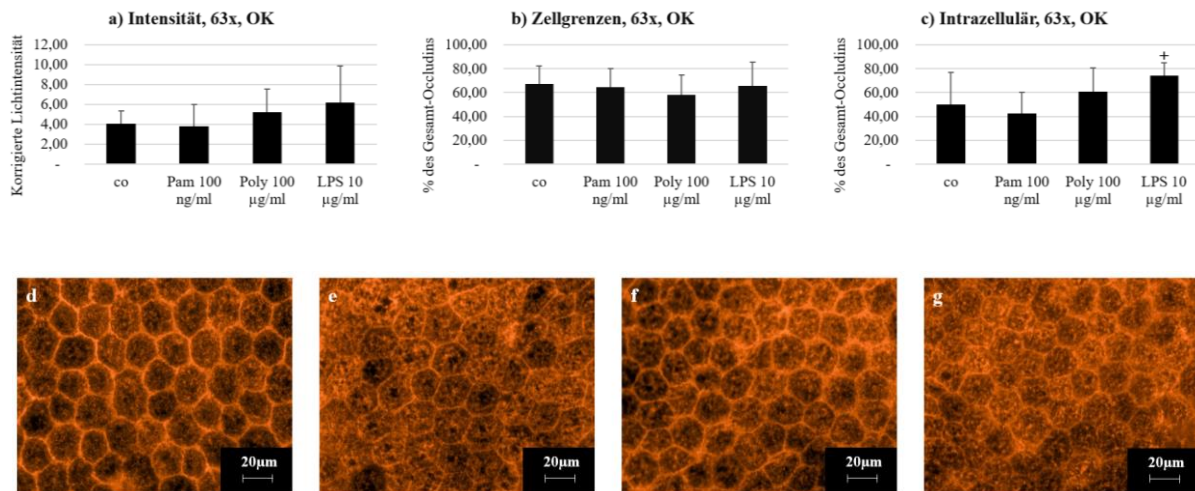
in 63-facher Vergrößerung sowohl für Poly I:C (100 µg/ml) als auch LPS (1 und 10 µg/ml) (Abb. 18d-f) ( $p < 0,05$ ). Ein signifikanter Anstieg des intrazellulären Occludingehalts wurde in 20-facher Vergrößerung für Poly I:C in allen getesteten Konzentrationen und LPS (0,1 und 10 µg/ml) (Abb. 17g-i) und in 63-facher Vergrößerung ausschließlich für Poly I:C (1 und 10 µg/ml) und LPS (1 µg/ml) nachgewiesen (Abb. 18g-i) ( $p < 0,05$ ).



**Abbildung 19:** Immunfluoreszenzfärbung der Organkulturen nach 24-stündiger Stimulation mit TLR-Agonisten. 20-fache Vergrößerung unter dem Immunfluoreszenz-Mikroskop, a) Unter Poly I:C (100 µg/ml) änderte sich die Intensität des Occludinsignals signifikant. b) Semiquantitative Auswertung der Klarheit der Zellgrenzen. Unter Poly I:C (100 µg/ml) und LPS (10 µg/ml) veränderte sich die Verteilung des Occludins an den Zellgrenzen signifikant. c) Semiquantitative Auswertung des intrazellulären Occludingehaltes. Keiner der TLR-Agonisten hatte einen Einfluss auf die intrazelluläre Verteilung des Occludins. d-g) Beispielfotos - d) Kontrolle, e) Pam2CSK4 (100 ng/ml), f) Poly I:C (100 µg/ml), g) LPS (10 µg/ml). Die Signifikanz wurde mit dem Kruskal-Wallis Test und dem Mann-Whitney U Test ausgewertet. + =  $p < 0,05$ ; +++ =  $p < 0,001$ . Veröffentlicht in "Basolateral activation with TLR agonists induces polarized cytokine release and reduces barrier function in RPE in vitro" (Terheyden et al. 2021).

Bei den Organkulturen konnte in 20-facher Vergrößerung ein signifikanter Abfall der Klarheit der Zellgrenzen für Poly I:C (100µg/ml) und LPS (10µg/ml) festgestellt werden (Abb. 19b), in 63-facher Vergrößerung hingegen für keine der Stimulanzen (Abb. 20b) ( $p < 0,05$ ). Während bei den Bildern in 20-facher Vergrößerung keine signifikante Änderung der intrazellulären Occludinverteilung zu verzeichnen war (Abb. 19c), zeigte sich diese in 63-facher Vergrößerung für LPS (10 µg/ml) (Abb. 20c) ( $p < 0,05$ ).





**Abbildung 20:** Immunfluoreszenzfärbung der Organkulturen nach 24-stündiger Stimulation mit TLR-Agonisten. 63-fache Vergrößerung unter dem Immunfluoreszenz-Mikroskop, a) Keiner der TLR-Agonisten hatte einen Einfluss auf die Intensität des Occludinsignals. b) Semiquantitative Auswertung der Klarheit der Zellgrenzen. Keiner der TLR-Agonisten hatte einen Einfluss auf die Verteilung des Occludins an den Zellgrenzen c) Semiquantitative Auswertung des intrazellulären Occludingehaltes. Die intrazelluläre Verteilung des Occludins änderte sich allein durch Stimulation mit LPS 10 µg/ml signifikant. d-g) Beispielbilder – d) Kontrolle, e) Pam2CSK4 (100 ng/ml), f) Poly I:C (100 µg/ml), g) LPS (10 µg/ml). Die Signifikanz wurde mit dem Kruskal-Wallis Test und dem Mann-Whitney U Test ausgewertet. + =  $p < 0,05$ . Veröffentlicht in “Basolateral activation with TLR agonists induces polarized cytokine release and reduces barrier function in RPE in vitro” (Terheyden et al. 2021).

### 3.3. Untersuchungen der apikalen und basalen Zytokin-Sekretion im ELISA

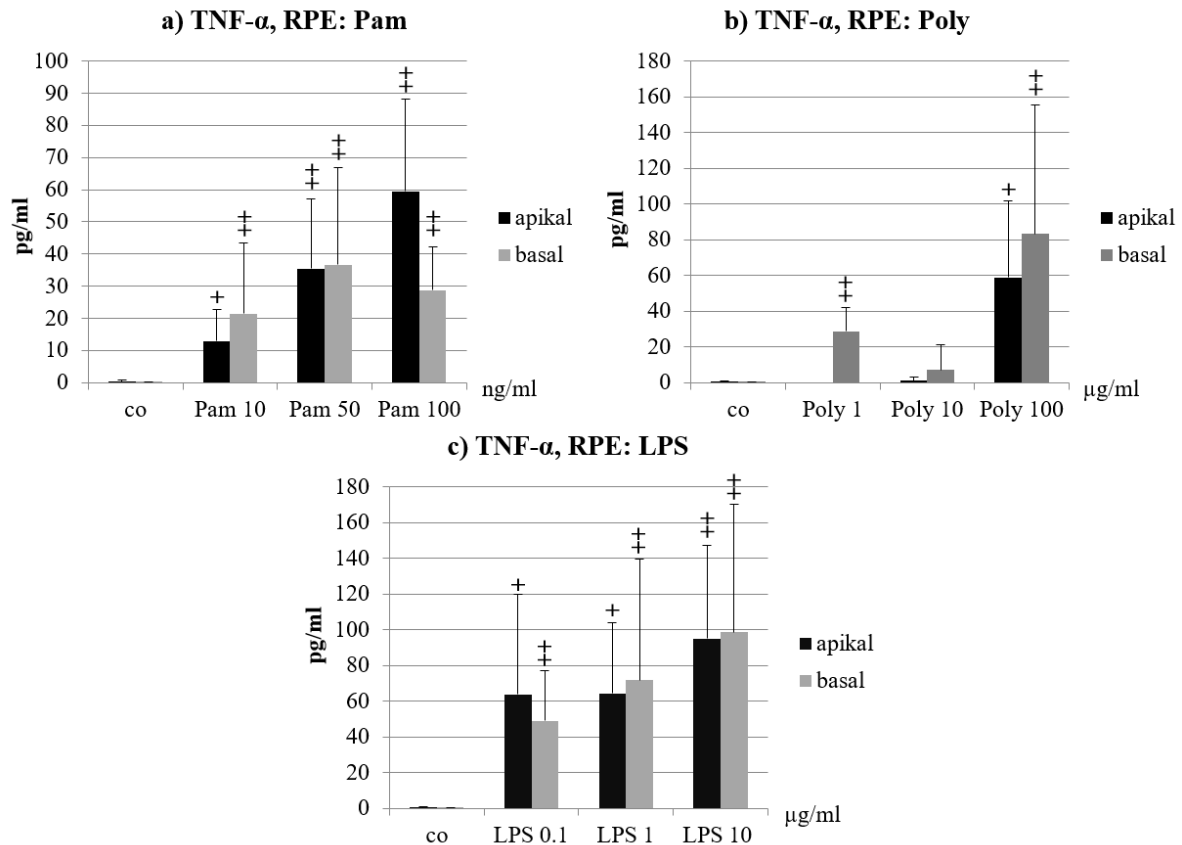
Im folgenden Abschnitt wurden die apikalen und basalen Überstände der RPE-Zellen sowohl aus den primären RPE-Transwell-Kulturen als auch den Organkulturen nach 24-stündiger basolateraler Stimulation mit Pam2CSK4, Poly I:C und LPS auf die Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-1 $\beta$  hin untersucht.

#### 3.3.1. ELISA der RPE-Überstände nach 24-stündiger Stimulation

##### 3.3.1.1. TNF- $\alpha$

TNF- $\alpha$  wurde weder apikal (Mittelwert = 0,268 pg/ml) noch basal (Mittelwert = 0,05 pg/ml) konstitutiv von den RPE-Zellen ausgeschüttet. Pam2CSK4 induzierte apikal und basal in allen getesteten Konzentrationen (10, 50 und 100 ng/ml) eine signifikante Erhöhung von TNF- $\alpha$  (Abb. 21a), apikal für die Konzentration 10 ng/ml mit einer Signifikanz von  $p < 0,05$ , in allen anderen Konzentrationen sowohl apikal als auch basal mit einer Signifikanz von  $p < 0,01$ . Der Unterschied zwischen basal und apikal war nicht signifikant. Poly I:C induzierte apikal nur in der Konzentration 100 µg/ml ( $p < 0,05$ ), basal hingegen in den Konzentrationen 1 und 100 µg/ml TNF- $\alpha$  (Abb. 21b) ( $p < 0,01$ ). Der Unterschied zwischen basal und apikal war ebenfalls nicht signifikant. LPS induzierte apikal und basal in allen getesteten Konzentrationen (0,1, 1

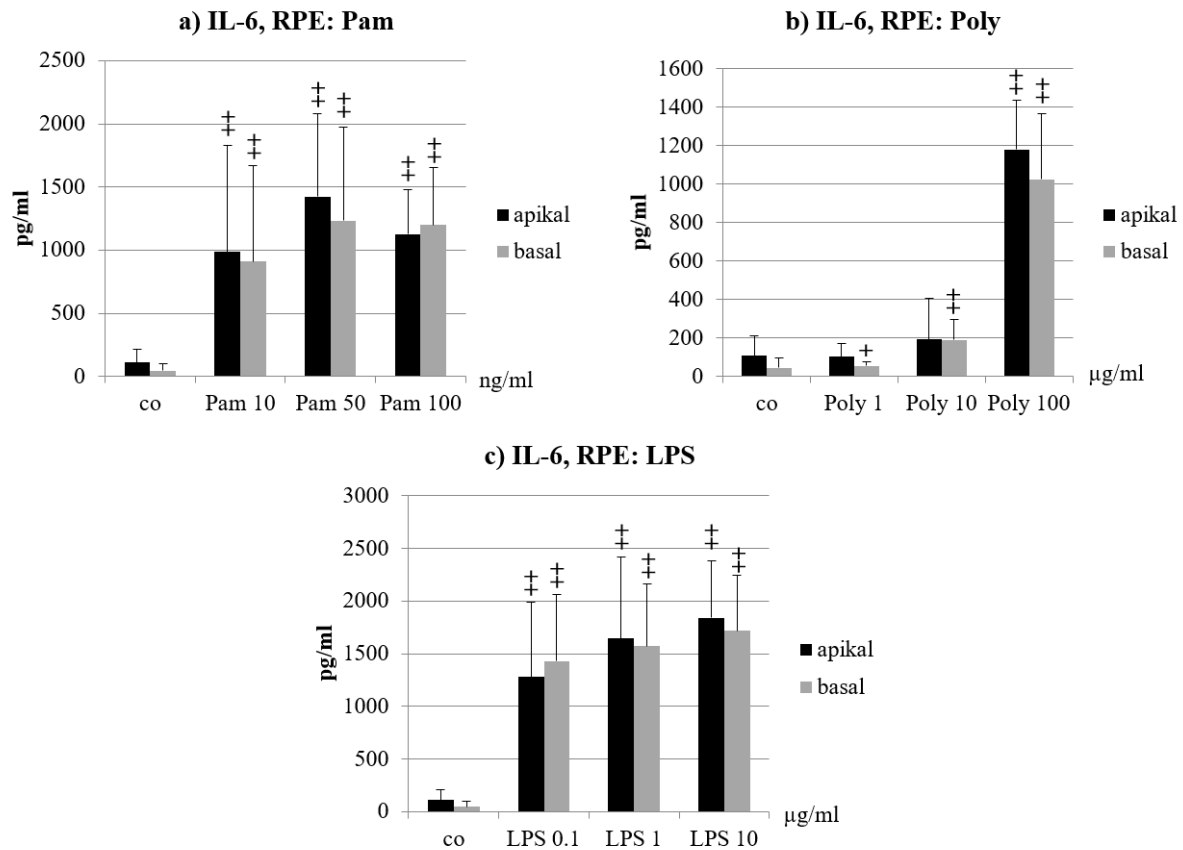
und 10 µg/ml) signifikant TNF-α (Abb. 21c), apikal für die Konzentrationen 0,1 und 1 µg/ml mit einer Signifikanz von  $p < 0,05$ , apikal in der Konzentration 10 µg/ml und basal für alle getesteten Konzentrationen mit einer Signifikanz von  $p < 0,01$ . Es waren keine signifikanten Unterschiede zwischen basaler und apikaler Sekretion festzustellen.



**Abbildung 21:** Apikale und basale Sekretion des Zytokins TNF-α von primären RPE-Zellen nach 24-stündiger Stimulation mit TLR-Agonisten. X-Achse: Konzentration der jeweiligen Stimulanz pro ml RPE-Medium. Y-Achse: Konzentration von TNF-α pro ml. TNF-α wurde apikal und basal durch Pam (a) und LPS (c) in allen getesteten Konzentrationen induziert, während Poly I:C (b) die basale Sekretion bei 1 und 100 µg/ml und die apikale Sekretion nur bei 100 µg/ml induzierte. Es gab keine Unterschiede zwischen basaler und apikaler Sekretion ( $n=5$ ). Signifikanzen wurden mit dem Kruskal-Wallis Test, dem Mann-Whitney U Test,  $+ = p < 0,05$ ;  $++ = p < 0,01$ , verglichen mit der Kontrolle, und dem Wilcoxon matched-pairs signed rank test für den Vergleich zwischen apikal und basal berechnet. Veröffentlicht in "Basolateral activation with TLR agonists induces polarized cytokine release and reduces barrier function in RPE in vitro" (Terheyden et al. 2021).

### 3.3.1.2. IL-6

Unstimulierte RPE-Zellen sezernierten apikal (Mittelwert = 108,998 pg/ml) und basal (Mittelwert = 44,813 pg/ml) kleine Mengen an IL-6. Pam2CSK4 induzierte sowohl apikal als auch basal in allen getesteten Konzentrationen (10, 50 und 100 ng/ml) signifikant die Ausschüttung von IL-6 (Abb. 22a) ( $p < 0,01$ ). Hierbei war zwischen der apikalen und basalen Sekretion kein signifikanter Unterschied festzustellen.



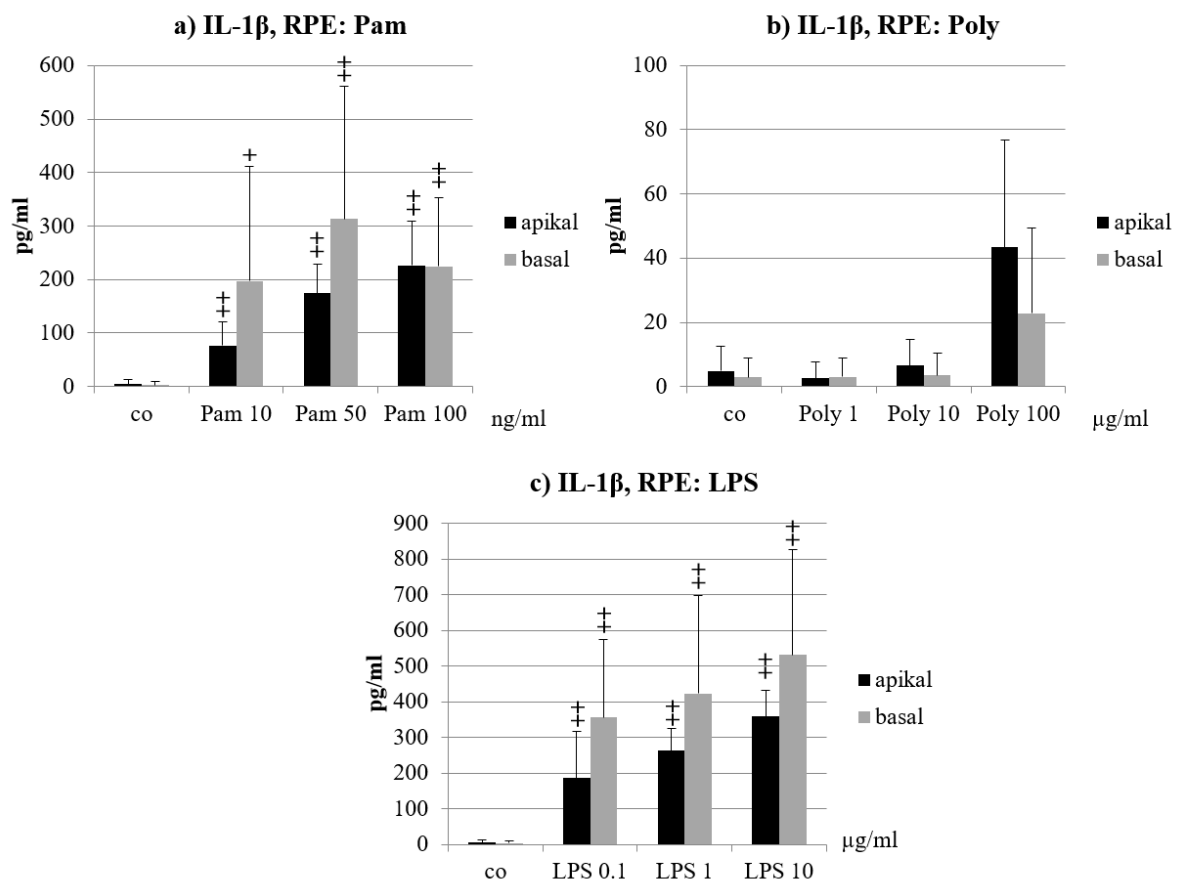
**Abbildung 22:** Apikale und basale Sekretion des Zytokins IL-6 von primären RPE-Zellen nach 24-stündiger Stimulation mit TLR-Agonisten. X-Achse: Konzentration der jeweiligen Stimulanz pro ml RPE-Medium. Y-Achse: Konzentration von IL-6 pro ml. IL-6 wurde durch die Stimulation mit Pam (a) und LPS (c) basal und apikal in allen Konzentrationen signifikant ausgeschüttet. Poly I:C induzierte basal in allen Konzentrationen die Sekretion von IL-6, während die apikale Sekretion allein durch 100 µg/ml induziert wurde (b). Es gab keine Unterschiede zwischen basaler und apikaler Sekretion (n=5). Signifikanzen wurden mit dem Kruskal-Wallis Test, dem Mann-Whitney U Test, + =  $p < 0,05$ ; ++ =  $p < 0,01$ , verglichen mit der Kontrolle, und dem Wilcoxon matched-pairs signed rank test für den Vergleich zwischen apikal und basal berechnet. Veröffentlicht in "Basolateral activation with TLR agonists induces polarized cytokine release and reduces barrier function in RPE in vitro" (Terheyden et al. 2021).

Poly I:C induzierte sowohl basal als auch apikal klar konzentrationsabhängig IL-6. Auf apikaler Seite wurde nur in der Konzentration 100 µg/ml ( $p < 0,05$ ), basal in allen getesteten Konzentrationen (1, 10 und 100 µg/ml) signifikant IL-6 sezerniert (Abb. 22b), für die Konzentration 1 µg/ml mit einer Signifikanz von  $p < 0,05$ , für die Konzentrationen 10 und 100 µg/ml mit einer Signifikanz von  $p < 0,01$ . Zwischen apikaler und basaler Sekretion war dabei ebenfalls kein signifikanter Unterschied nachweisbar, bemerkenswert ist jedoch, dass die Sekretion bei 100 µg/ml bedeutend stärker induziert wurde im Vergleich zu den beiden niedrigeren Konzentrationen. LPS induzierte sowohl basal als auch apikal in allen getesteten Konzentrationen (0,1, 1 und 10 µg/ml) signifikant große Mengen von IL-6 (Abb. 22c)

( $p < 0,01$ ). Es gab auch hier keinen signifikanten Unterschied zwischen basaler und apikaler Sekretion.

### 3.3.1.3. IL-1 $\beta$

IL-1 $\beta$  wurde nur in kaum nachweisbaren Mengen von den unstimulierten RPE-Zellen apikal (Mittelwert = 4,819 pg/ml) und basal (Mittelwert = 2,940 pg/ml) sezerniert.



**Abbildung 23:** Apikale und basale Sekretion des Zytokins IL-1 $\beta$  von primären RPE-Zellen nach 24-stündiger Stimulation mit TLR-Agonisten. X-Achse: Konzentration der jeweiligen Stimulanz pro ml RPE-Medium. Y-Achse: Konzentration von IL-1 $\beta$  pro ml. IL-1 $\beta$  wurde apikal und basal durch Pam (a) und LPS (c) in allen Konzentrationen induziert, nicht jedoch durch Poly I:C (b). Es gab keine Unterschiede zwischen basaler und apikaler Sekretion ( $n=5$ ). Signifikanzen wurden mit dem Kruskal-Wallis Test, dem Mann-Whitney U Test,  $+ = p < 0,05$ ;  $++ = p < 0,01$ , verglichen mit der Kontrolle, und dem Wilcoxon matched-pairs signed rank test für den Vergleich zwischen apikal und basal berechnet. Veröffentlicht in "Basolateral activation with TLR agonists induces polarized cytokine release and reduces barrier function in RPE in vitro" (Terheyden et al. 2021).

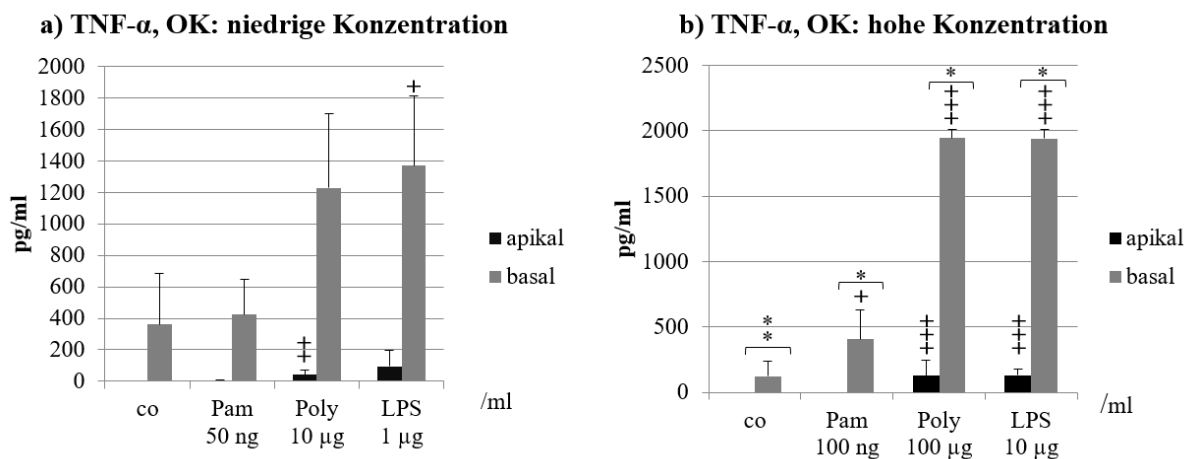
Pam2CSK4 induzierte apikal und basal eine signifikante Steigerung der IL-1 $\beta$ -Sekretion in allen der getesteten Konzentrationen (10, 50 und 100 ng/ml) (23a). Bis auf die basale Sekretion in der Konzentration 10 ng/ml mit einer Signifikanz von  $p < 0,05$  lag die Signifikanz apikal und basal in allen Konzentrationen bei  $p < 0,01$ . Die Stimulation mit Poly I:C zeigte hingegen keinen signifikanten Einfluss auf die IL-1 $\beta$ -Sekretion der RPE-Zellen (23b) ( $p < 0,05$ ). LPS

induzierte sowohl basal als auch apikal in allen getesteten Konzentrationen (0,1, 1 und 10 µg/ml) die Sekretion von IL-1β (Abb. 23c) ( $p < 0,01$ ). Bei keinem der TLR-Agonisten war ein signifikanter Unterschied zwischen basaler und apikaler Sekretion feststellbar.

### 3.3.2. ELISA der Organkultur-Überstände nach 24-stündiger Stimulation

#### 3.3.2.1. TNF-α

Bei den unstimulierten Organkulturen konnte ausschließlich auf der basalen Seite eine Sekretion von TNF-α festgestellt werden (MW = 216,330 pg/ml). Pam2CSK4 induzierte in der Konzentration 50 ng/ml weder apikal noch basal eine signifikante Erhöhung von TNF-α, wohingegen in der Konzentration 100 ng/ml nur apikal kein Effekt zu sehen, jedoch basalseits ein signifikanter Anstieg zu verzeichnen war (Abb. 24a und b) ( $p < 0,05$ ).



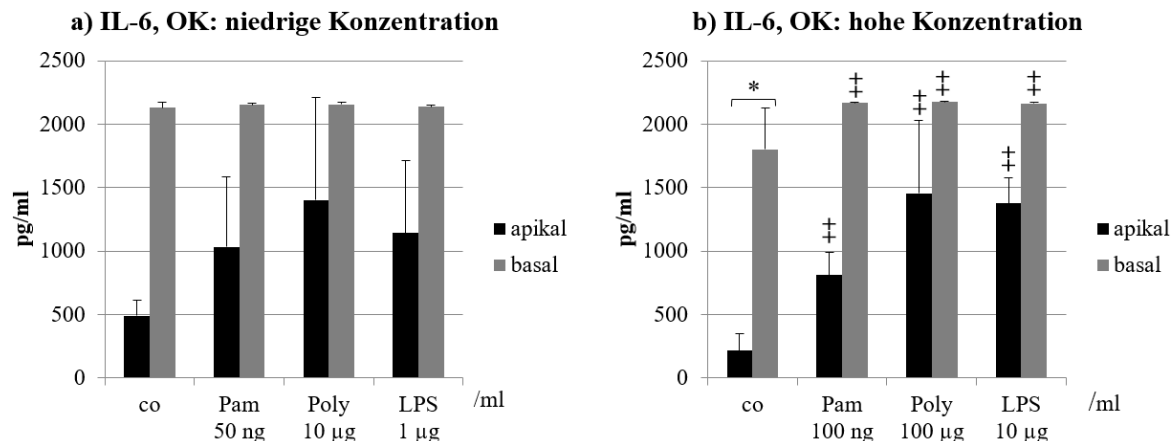
**Abbildung 24:** Apikale und basale Zytokinsekretion von TNF-α der Organkulturen nach 24-stündiger Stimulation mit TLR-Agonisten in je niedriger (a) und hoher Konzentration (b). X-Achse: Konzentration der jeweiligen Stimulanz pro ml RPE-Medium. Y-Achse: Konzentration von TNF-α pro ml. In unbehandelten Organkulturen wurden nur geringe Mengen von TNF-α auf der basalen Seite ausgeschüttet. In der niedrigen Konzentration wurde die TNF-α-Sekretion nur durch Poly I:C apikal und LPS basal induziert. In der hohen Konzentration hingegen induzierten Poly I:C und LPS apikal und basal die TNF-α-Sekretion signifikant, Pam nur basal. Die Unterschiede zwischen basaler und apikaler Sekretion sind statistisch signifikant ( $n=6$ ). Die Signifikanzen wurden mit dem Kruskal-Wallis Test und dem Mann-Whitney U Test berechnet. \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ ; + =  $p < 0,05$ , ++ =  $p < 0,01$ ; +++ =  $p < 0,001$ . Veröffentlicht in "Basolateral activation with TLR agonists induces polarized cytokine release and reduces barrier function in RPE in vitro" (Terheyden et al. 2021).

Poly I:C induzierte in der Konzentration 10 µg/ml nur apikal ( $p < 0,01$ ), jedoch in der Konzentration 100 µg/ml sowohl apikal als auch basal signifikant TNF-α (Abb. 24a und b) ( $p < 0,001$ ). LPS induzierte in der Konzentration 1 µg/ml nur basal einen signifikanten Anstieg von TNF-α ( $p < 0,05$ ), in der Konzentration 10 µg/ml hingegen sowohl apikal als auch basal (Abb. 24a und b) ( $p < 0,001$ ). Während in der jeweils niedrigeren Konzentration keine

Unterschiede zwischen basaler und apikaler Sekretion festzustellen waren (Abb. 24a), waren diese in der höheren Konzentration für alle TLR-Agonisten signifikant ( $p < 0,05$ ), auch für die unbehandelte Kontrolle mit einer Signifikanz von  $p < 0,01$  (Abb. 24b).

### 3.3.2.2. IL-6

Die unbehandelten Organkulturen sezernierten konstitutiv apikal (MW= 341,418 pg/ml) und basal (MW= 1917,899 pg/ml) IL-6 mit deutlicher Betonung der basalen Seite (Abb. 25a und b). Während in der niedrigeren Konzentration bei keinem der TLR-Agonisten eine signifikante Induktion der IL-6-Sekretion zu sehen war, wurde diese in der höheren Konzentration durch alle Stimulanzen sowohl apikal als auch basal signifikant induziert (Abb. 25a und b) ( $p < 0,01$ ). Ein signifikanter Unterschied zwischen apikaler und basaler Sekretion zeigte sich lediglich bei den Experimenten der höheren Konzentration für die Kontrolle (Abb. 25b) ( $p < 0,01$ ).



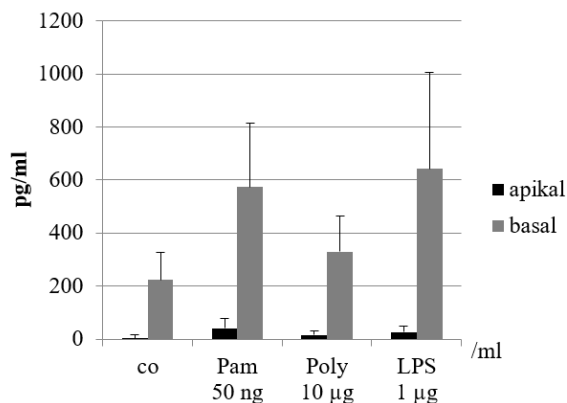
**Abbildung 25:** Apikale und basale Zytokinsekretion von IL-6 der Organkulturen nach 24-stündiger Stimulation mit TLR-Agonisten in je niedriger (a) und hoher Konzentration (b). X-Achse: Konzentration der jeweiligen Stimulanz pro ml RPE-Medium. Y-Achse: Konzentration von IL-6 pro ml. IL-6 wurde in unbehandelten Organkulturen konstitutiv basal sezerniert. Pam, Poly I:C und LPS induzierten nur in der höheren Konzentration sowohl apikal als auch basal die Sekretion von IL-6. Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen apikaler und basaler Sekretion. Die Signifikanzen wurden mit dem Kruskal-Wallis Test und dem Mann-Whitney U Test berechnet. \* =  $p < 0,05$ ; ++ =  $p < 0,01$ . Veröffentlicht in "Basolateral activation with TLR agonists induces polarized cytokine release and reduces barrier function in RPE in vitro" (Terheyden et al. 2021).

### 3.3.2.3. IL-1 $\beta$

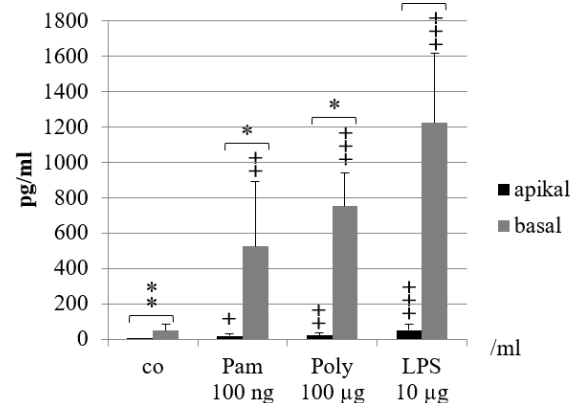
IL-1 $\beta$  wurde konstitutiv von den RPE-Zellen apikal (3,823 pg/ml) und basal (MW= 116,424 pg/ml) sezerniert, allerdings lag auch hier die Betonung deutlich auf der basalen Seite (Abb. 26a und b). In Analogie zu den Ergebnissen in 3.3.2.2. wurde auch hier in der niedrigeren Konzentration durch keinen der drei TLR-Agonisten eine signifikante Ausschüttung von IL-1 $\beta$  induziert, wohingegen sich bei der höheren Konzentration für alle Stimulanzen sowohl basal als auch apikal ein signifikanter Anstieg der IL-1 $\beta$ -Sekretion zeigte (Abb. 26a und b), apikal

für Pam2CSK4 mit einer Signifikanz von  $p < 0,05$ , für Poly I:C mit einer Signifikanz von  $p < 0,01$  und für LPS sogar mit einer Signifikanz von  $p < 0,001$ , basal für Pam2CSK4 mit einer Signifikanz von  $p < 0,01$  und für Poly I:C und LPS mit einer Signifikanz von  $p < 0,001$ . Während in der niedrigeren Konzentration keine Unterschiede zwischen apikaler und basaler Sekretion festzustellen waren, waren diese in der höheren Konzentration sowohl bei der Kontrolle ( $p < 0,01$ ) als auch bei allen der durch TLR-Agonisten stimulierten Organkulturen signifikant ( $p < 0,05$ ) (Abb. 26a und b).

**a) IL-1 $\beta$ , OK: niedrige Konzentration**



**b) IL-1 $\beta$ , OK: hohe Konzentration**

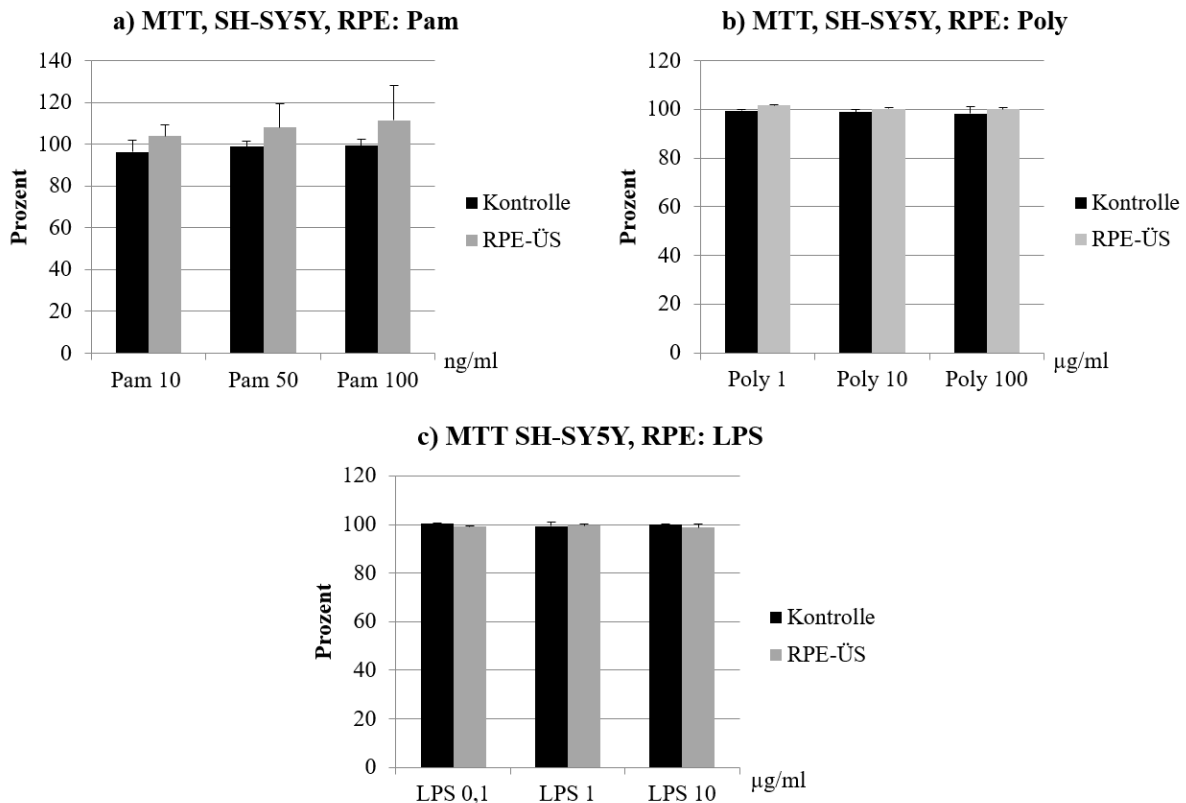


**Abbildung 26:** Apikale und basale Zytokinsekretion von IL-1 $\beta$  der Organkulturen nach 24-stündiger Stimulation mit TLR-Agonisten in je niedriger (a) und hoher Konzentration (b). X-Achse: Konzentration der jeweiligen Stimulanz pro ml RPE-Medium. Y-Achse: Konzentration von IL-1 $\beta$  pro ml. In den unbehandelten Organkulturen wurden kleine Mengen von IL-1 $\beta$  basal sezerniert. Nur in der höheren Konzentration induzierten Pam, Poly I:C und LPS die Sekretion signifikant apikal und basal mit deutlicher Betonung der basalen Sekretion. Die Unterschiede zwischen basaler und apikaler Sekretion sind statistisch signifikant ( $n=6$ ). Die Signifikanzen wurden mit dem Kruskal-Wallis Test und dem Mann-Whitney U Test berechnet. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; + =  $p < 0,05$ ; ++ =  $p < 0,01$ ; +++ =  $p < 0,001$ . Veröffentlicht in "Basolateral activation with TLR agonists induces polarized cytokine release and reduces barrier function in RPE in vitro" (Terheyden et al. 2021).

### 3.4. Versuche mit neuronalen Zellen

#### 3.4.1. MTT-Assay für SH-SY5Y-Zellen stimuliert mit RPE-Überständen nach 24 Stunden

Neben dem ELISA wurde der andere Teil der apikalen Überstände, die nach 24-stündiger Stimulation des primären RPE mit den TLR-Agonisten Pam2CSK4, Poly I:C und LPS gewonnen worden waren, auf undifferenzierte SH-SY5Y-Zellen gegeben und nach 24 Stunden ein MTT-Assay angewandt. Über dieses Verfahren sollte der Einfluss der apikalen Überstände auf neuronale Zellen getestet werden, um über dieses Modell auf die Zelltoxizität für die Photorezeptoren schließen zu können. Es stellte sich heraus, dass keiner der Überstände einen signifikanten Einfluss auf das Überleben der SH-SY5Y-Zellen hatte ( $p < 0,05$ ) (Abb. 27a-c).

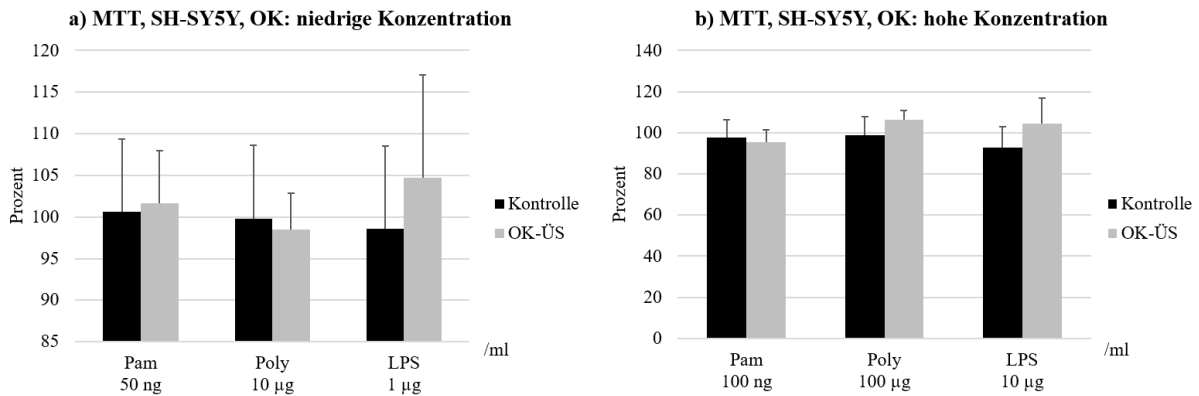


**Abbildung 27:** MTT-Assay der SH-SY5Y-Zellkulturen nach 24-stündiger Stimulation mit RPE-Überständen (RPE-ÜS), welche aus den Versuchen gewonnen wurden, in denen das RPE 24 h lang mit a) Pam2CSK4, b) Poly I:C und c) LPS, stimuliert worden war, und zugehörigen Kontrollen; X-Achse: Konzentration der Stimulanzen in 1ml RPE-Medium. Y-Achse: Zellviabilität in Prozent % (Kontrolle [co]= 100 %). Keine der untersuchten Stimulanzen hat die Zellviabilität der RPE-Zellen signifikant reduziert (n=3). Die Signifikanz wurde mithilfe des Kruskal-Wallis Tests und des Mann-Whitney U Tests berechnet. Veröffentlicht in “Basolateral activation with TLR agonists induces polarized cytokine release and reduces barrier function in RPE in vitro” (Terheyden et al. 2021).

### 3.4.2. MTT-Assay für SH-SY5Y-Zellen stimuliert mit Organkultur-Überständen nach 24 Stunden

Ebenfalls wurden die apikalen Organkultur-Überstände, die nach 24-stündiger Inkubation der Geweberinge unter Stimulation mit den TLR-Agonisten Pam2CSK4, Poly I:C und LPS in niedrigerer und höherer Konzentration abgenommen worden waren, auf undifferenzierte SH-SY5Y-Zellen gegeben und nach 24-stündiger Inkubation im MTT-Assay die Zellviabilität bestimmt. Auch hier konnten weder bei der niedrigeren Konzentration (Abb. 28a) noch bei der höheren Konzentration (Abb. 28b) signifikante Veränderungen der Zellviabilität der SH-SY5Y durch die Überstände festgestellt werden ( $p < 0,05$ ).





**Abbildung 28:** MTT-Assay der SH-SY5Y-Zellkulturen nach 24-stündiger Stimulation mit Organkultur-Überständen (OK-ÜS), welche aus den Versuchen gewonnen wurden, in denen die Organkulturen 24 h lang mit TLR-Agonisten in je niedriger (a) und hoher Konzentration (b) stimuliert worden waren, und zugehörigen Kontrollen; X-Achse: Konzentration der Stimulanzien in 1ml RPE-Medium. Y-Achse: Zellviabilität in Prozent % (Kontrolle [co]= 100 %). Keine der untersuchten Stimulanzien hat die Zellviabilität der RPE-Zellen signifikant reduziert (n=3). Die Signifikanz wurde mithilfe des Kruskal-Wallis Tests und des Mann-Whitney U Tests berechnet. Veröffentlicht in “Basolateral activation with TLR agonists induces polarized cytokine release and reduces barrier function in RPE in vitro” (Terheyden et al. 2021).

#### 4. Diskussion

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen der Stimulation der Toll-like-Rezeptoren 2, 3 und 4 auf porcines retinale Pigmentepithel in Hinblick auf seine Barrierefunktion, die Polarisierung der Zytokinsekretion sowie schließlich auch sein Einfluss auf die neuronale Zellviabilität untersucht. Als Modelle wurden zum einen primäre RPE-Zellen, die für die Kultivierung nicht passagiert wurden, und zum anderen Organkulturen verwendet. Beide Zellkulturen wurden aus dem Schweineauge präpariert. Das Schweineauge eignet sich gut als Modell für das menschliche Auge und ist ihm generell ähnlicher als zum Beispiel das Auge von Nagetieren. Besonders in Bezug auf die Netzhaut kommt die Anatomie des Schweineauges der des menschlichen Auges sehr nahe, da Schweine im Gegensatz zu Mäusen tagaktiv sind und deshalb mit einem Sehstreifen ausgestattet sind, der eine hohe Zapfendichte aufweist (Guduric-Fuchs et al. 2009; Hendrickson und Hicks 2002; Middleton 2010). Da die RPE-Zellen und Organkulturen aus Augen von genetisch heterogenen Schweinen, die in nicht-sterilen Umgebungsbedingungen aufgewachsen waren, präpariert wurden, kann die Standardabweichung höher sein, als wenn Zelllinien oder Inzucht-Mausstämme verwendet worden wären. Andererseits bilden sie durch ihre Heterogenität deutlich besser die lebensnahen Bedingungen ab (Hettich et al. 2014).

Ein Fokus dieser Arbeit war die Untersuchung der Barrierefunktion des RPE. Dazu wurden primäre RPE-Zellen so lange auf Transwell-Platten kultiviert, bis sich ein stabiler TEER eingestellt hatte. Der durchschnittliche Wert für einen stabilen Wert lag hier bei  $140.8 \pm 55.4 \Omega \cdot \text{cm}^2$ , was sich innerhalb des Rahmens der TEER-Messwerte bewegt, die auch für adulte menschliche RPE-Zellen bereits publiziert worden sind (Quinn und Miller 1992). Dabei ist zu bemerken, dass fetale RPE Zellen weitaus höhere TEER-Messwerte erzielen können (Rizzolo 2014). Jedoch bilden diese die Situation einer ausgewachsenen RPE-Zellschicht, die jahrelangen inflammatorischen Schäden im Kontext der AMD ausgesetzt war, nicht gut ab (Klettner 2020a). Zudem zeigten sich in der Immunfluoreszenzfärbung des Occludins der primären RPE-Zellen deutliche Zellgrenzen, was auf eine funktionstüchtige Barriere hindeutet. Weiterhin wurden nur primäre Zellen ohne Passagierung verwendet. Diese zeigen eine weitaus höhere Pigmentierung und RPE-Morphologie als passagierte RPE-Zellen (Klettner 2020a). Darüber hinaus verändert sich das Sekretionsmuster der Zytokine im Laufe der Passagierung, weshalb für die Ermittlung von Zytokinen der Gebrauch von unpassagierten Zellen empfohlen wird (Klettner 2020a; Cao et al. 2013). Im Gegensatz zu den primären RPE-Zellkulturen enthalten Organkulturen noch die Bruch'sche Membran und die Choroidea und kommen dadurch der „in vivo“-Situation näher. Außerdem verhindert die Kultivierung der ganzen Organkultur-Explantate eine Ablösung der RPE-Zellschicht aus dem natürlichen Gewebekomplex. Dadurch werden die Barriereigenschaften während der Präparation nicht gestört. Sowohl die Kultivierung von RPE-Zellen auf Transwell-Platten als auch von Organkulturen in Ussing-Kammern ermöglicht eine Unterscheidung zwischen apikaler und basaler Sekretion (Treumer et al. 2012; Klettner et al. 2015).

Unstimulierte primäre RPE-Zellen sezernierten geringe Mengen von  $\text{TNF-}\alpha$ , IL-6 und IL-1 $\beta$ . Die Organkulturen hingegen zeigten eine deutliche Sekretion von IL-6 auf der basalen, jedoch nicht auf der apikalen Seite. Bei den primären RPE-Zellen induzierten sowohl Pam als auch LPS alle der drei untersuchten Zytokine  $\text{TNF-}\alpha$ , IL-6 und IL-1 $\beta$  in allen getesteten Konzentrationen, wobei IL-6 am stärksten induziert wurde ( $> 1000 \text{ pg/ml}$ ), IL-1 $\beta$  in einem geringeren Umfang (zwischen  $100$  und  $200 \text{ pg/ml}$ ) und  $\text{TNF}\alpha$  in einem noch niedrigeren Ausmaß ( $< 100 \text{ pg/ml}$ ). Poly I:C erreichte nur in der höchsten Konzentration, die untersucht wurde, ähnliche Mengen an IL-6 und  $\text{TNF-}\alpha$ , während bei IL-1 $\beta$  sogar eine signifikante Induktion gänzlich ausblieb. Bei den primären RPE-Zellkulturen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen basaler und apikaler Sekretion festgestellt werden. Bei den Organkultur-Experimenten wurden zwei Konzentrationen getestet. In der jeweils niedrigeren Konzentration

zeigten sich ausschließlich für die TNF- $\alpha$ -Sekretion apikal unter Stimulation mit Poly I:C und basal mit LPS signifikante Ergebnisse. Es waren keine Unterschiede zwischen apikaler und basaler Sekretion festzustellen. In der jeweils höheren Konzentration induzierten alle TLR-Agonisten sowohl apikal als auch basal große Mengen an IL-6. Die Sekretion von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  wurde überwiegend auf der basalen und zu einem geringeren Ausmaß auch auf der apikalen Seite durch alle TLR-Agonisten induziert. Allein Pam induzierte in der höheren Konzentration auf der apikalen Seite keine TNF- $\alpha$ -Sekretion. Die Unterschiede zwischen apikaler und basaler Sekretion waren in den höheren Konzentrationen im Gegensatz zu den niedrigeren getesteten Konzentrationen für alle TLR-Agonisten signifikant. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen zeigt eine Studie, die im Handel erwerbliche primäre menschliche RPE-Zellen und die ARPE-19-Zelllinie verwendet hat, eine überwiegend apikale Sekretion von IL-1 $\beta$  (Mohr et al. 2015). Jedoch wurde die inflammatorische Antwort hierbei nicht durch Aktivierung der TLR, sondern durch Aktivierung des Inflammasoms induziert. Obwohl es dort nicht genau beschrieben wird, ist es sehr wahrscheinlich, dass die Stimulation auf der apikalen Seite, und nicht - wie in dieser Arbeit - von der basalen Seite aus stattfand. Eine Inflammasom-Aktivierung auf der apikalen Seite des RPE induziert sehr wahrscheinlich eine andere Polarisierung der Zytokinausschüttung als die basale TLR-Stimulation. Dies steht im Einklang mit einer Studie, welche die Sekretion von IL-6 und IL-8 nach apikaler und basaler Stimulation mit IL-1 $\beta$  untersuchte und zeigte, dass die basale Stimulation eine stärkere Sekretion auf der basalen Seite induzierte (Holtkamp et al. 1998).

RPE-Zellen antworten auf pro-inflammatorische Aktivierung mit der Sekretion von Zytokinen. Die genaue Verteilung und der Grad der Sekretion hängen von dem schädigenden Ereignis ab (Kumar et al. 2004; Paeng et al. 2015; Wörnle et al. 2011; Planck et al. 1992). Es ist interessant, dass die basal stimulierten Organkulturen vor allem auf der basalen Seite reagierten. Zudem war die Antwort für die verschiedenen getesteten Zytokine unterschiedlich - während IL-6 auch auf der apikalen Seite induziert wurde, wurden IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  überwiegend auf der basalen Seite induziert. Die basale Antwort der Organkulturen kann mit der Seite der Stimulation zusammenhängen, wobei eine basale Stimulation eine stärkere basale Antwort induzieren kann (Holtkamp et al. 1998). Es kann jedoch auch ein Versuch des RPE sein, die inflammatorische Antwort zu regulieren, um sich selbst und die Retina zu schützen. Sowohl IL-1 $\beta$  als auch TNF- $\alpha$  gelten als neurotoxisch, vor allem im geschädigten Gewebe (Viviani et al. 2004). IL-6 andererseits kann sowohl neurotoxische als auch neuroprotektive Wirkungen auf die Retina haben (Leibinger et al. 2013; Sappington et al. 2006; Heo et al. 2018). Dies steht im Einklang

mit vorausgegangenen Studien, welche die Bemühungen des RPE betrachten, die inflammatorische Antwort in Kommunikation mit Mikroglia und Makrophagen zu regulieren, wobei das RPE einerseits eine differenzierte pro-inflammatorische Antwort in den Mikroglia induziert (Klettner et al. 2014) und andererseits einen dämpfenden Effekt auf die Makrophagen ausübt (Hettich et al. 2014). Das RPE ist stark in die Regulation der pro-inflammatorischen Antwort in der Retina involviert, wo es ein Gleichgewicht zwischen der effektiven Immunantwort auf das Gefahrensignal und der Notwendigkeit, das retinale Gewebe vor einer Schädigung durch die Inflammation zu schützen, herzustellen versucht.

Wie oben ausgeführt wurde, kann diese polarisierte Antwort nur in Organkulturen, nicht aber in den primären RPE-Zellkulturen gefunden werden. Dies könnte durch eine mangelnde Barrierefunktion und die Unfähigkeit der primären RPE-Zellen, eine polarisierte Zytokinausschüttung zu entwickeln, erklärt werden. Wie oben ausgeführt, war der TEER jedoch für adulte RPE-Zellen adäquat und die Occludinfärbung lässt auf funktionierende *Tight Junctions* schließen (Quinn und Miller 1992). Darüber hinaus konnte eine polarisierte Sekretion von IL-6 bereits bei Zellen mit einem weitaus niedrigeren TEER ( $20 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ) nachgewiesen werden (Holtkamp et al. 1998). Die wahrscheinlichste Erklärung für den Unterschied der polarisierten Sekretion zwischen primären RPE-Zellkulturen und Organkulturen ist die Interaktion von RPE und Choroidea in der Organkultur, welche die Zellen dazu befähigen kann, auf eine Weise, welche der „in vivo“-Situation ähnelt, zu reagieren (Klettner und Miura 2019). Jedoch muss auch erwogen werden, dass die Choroidea Zelltypen enthält, die auf die TLR-Stimulation reagieren. Choroidale Melanozyten und choroidale endotheliale Zellen exprimieren ebenfalls TLR (Cioanca et al. 2018; Stewart et al. 2015) und Makrophagen können im choroidalen Gewebe präsent sein (Chen et al. 2009). Der Einfluss der Choroidea auf die inflammatorischen Antworten des RPE und die Beteiligung der choroidalen Zellen hinsichtlich der inflammatorischen Antwort sind interessante Themen, die in weiteren Studien noch näher untersucht werden sollten. Unsere Daten zeigen die Bedeutung der Interaktion von dreidimensionalem Gewebe, besonders, wenn es zur Orchestrierung der Gewebeantworten kommt.

Es konnten keine zytotoxischen Effekte der RPE-Überstände auf die SH-SY5Y-Zellen gefunden werden, was in Übereinstimmung mit der bereits vorgeschlagenen Theorie ist, dass das RPE versucht, die Retina selbst unter inflammatorischen Bedingungen zu schützen. Es sollte darauf hingewiesen werden, dass die Wirkungen von IL- $1\beta$  als auch TNF- $\alpha$  von der Dauer des Stimulus abhängen. Dabei kann die Langzeit-Stimulation durchaus mit neurotoxischen Effekten einhergehen, während in dieser Arbeit durchgehend nur für 24 Stunden stimuliert

wurde (Song et al. 2013; Chao und Hu 1994). Daher könnten Langzeit-Wirkungen von den in dieser Arbeit erhobenen Ergebnissen abweichen. Zudem muss darauf hingewiesen werden, dass die in dieser Arbeit verwendeten SH-SY5Y-Zellen zwar neuronalen Charakter haben, jedoch undifferenziert den echten Neuronen in den Eigenschaften nicht so ähnlich sind wie ausdifferenzierte SH-SY5Y-Zellen. An dieser Stelle wären weitere Experimente nötig, um eine Ausdifferenzierung der SH-SY5Y zu etablieren, die den Zelleigenschaften der Photorezeptoren am nächsten käme, um die Versuche daran erneut zu erproben und die Aussage zu validieren.

Weiterhin zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die pro-inflammatorische Stimulation mit TLR-Agonisten die Barrierefunktion der RPE-Zellen beeinträchtigt und einen Einfluss auf die Occludin-Verteilung haben kann. Diese Daten stehen im Einklang mit bereits veröffentlichten Daten, welche die Reduktion des TEER in ARPE-19-Zellen zeigen, welche mit LPS behandelt wurden (Chen et al. 2017). Dennoch wurde dem Aspekt der Barrierefunktion nach TLR-Stimulation bisher nur wenig Beachtung geschenkt. Bemerkenswert ist, dass auch für TNF- $\alpha$  gezeigt werden konnte, dass es den TEER von RPE-Zellen reduziert (Peng et al. 2012; Touhami et al. 2018; Klettner et al. 2020b). TNF- $\alpha$  wird durch die getesteten TLR-Agonisten induziert, was darauf schließen lässt, dass TNF- $\alpha$  an den TEER-Veränderungen beteiligt sein kann. Interessant ist jedoch, dass über TNF- $\alpha$  berichtet wird, es erreiche nur die besagten Effekte, wenn es apikal appliziert werde. Es wirke zudem unabhängig vom Occludin (Peng et al. 2012) oder reduziere die Occludin-Expression (Touhami et al. 2018). Deshalb ist eine Beteiligung von TNF- $\alpha$  an den TEER-Veränderungen möglich, aber es könnten auch noch andere Mechanismen involviert sein. Weitere Forschung wird benötigt, die exakten Mediatoren und *Pathways* aufzudecken, welche die Barrierefunktion nach TLR-Aktivierung beeinflussen können. Eine Behinderung der Barrierefunktion des RPE kann große Folgen für die Netzhaut nach sich ziehen. Die äußere Blut-Retina-Schranke reguliert den Austausch von Metaboliten und Abfallprodukten zwischen der Choroidea und den Photorezeptoren (Runkle und Antonetti 2011). Weiterhin ist die Blut-Retina-Schranke wichtig für die Aufrechterhaltung des Immunprivilegs der Netzhaut und schützt die Netzhaut vor einem ungewollten Eindringen aus der systemischen Zirkulation (Stein-Streilein 2013). Eine aufgebrochene Barriere kann den regulierten Austausch zwischen Choroidea und Photorezeptoren unterbrechen. Außerdem kann dies die Einwanderung von Leukozyten aus dem Blut in die Netzhaut erleichtern, was die inflammatorischen Antworten und retinale Degeneration noch verstärken kann (Xu et al. 2005). Die AMD steht im Zusammenhang mit einer Störung der Blut-Retina-Schranke. Die Veränderung der Barriere durch pro-inflammatorische Aktivierung kann ein wichtiger Faktor

für das Fortschreiten der Erkrankung sein (Cunha-Vaz et al. 2011). Weitere Forschung ist gerechtfertigt, um den Einfluss der TLR-Aktivierung auf die Barrierefunktion aufzuklären. Über den Fokus auf das Occludin hinaus sollte der Einfluss der TLR-Aktivierung auf weitere TJ-Proteine wie ZO-1 oder Claudin-19 untersucht und sowohl die Lokalisation als auch die Proteinexpression betrachtet werden. Zudem sollten die Folgen für den Molekül- und Medikamenten-Transport (wie zum Beispiel anti-VEGF-Medikamente in Hinblick auf die AMD) über die Barriere weiter aufgeklärt werden. Weiterhin sollten die Mechanismen des Barrierebruchs untersucht werden. Zum Beispiel wäre es interessant herauszufinden, wie der Beitrag spezifischer Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-6 dazu ist, indem diese spezifisch geblockt werden.

In dieser Studie wurde der Stimulus auf der basalen Seite des RPE appliziert, um die systemische Inflammation zu simulieren. Die Daten unterstützen die Hypothese, dass systemische Inflammation zu einer Entwicklung der AMD beitragen kann (Cheung und Wong 2014; Rozing et al. 2020), da die basalen (korrespondierend zu der Seite der Choroidea) pro-inflammatorischen Stimuli eine pro-inflammatorische Zytokin-Ausschüttung im RPE und einen Aufbruch der RPE-Barrierefunktion induzieren. Diese Ergebnisse werden durch eine kürzlich erschienene „in vivo“-Studie unterstützt, die zeigt, dass eine systemische Virusinfektion die Expression von Chemokinen und Komplementfaktoren im RPE-Choroidea-Komplex ändern kann (Faber et al. 2019).

## **5. Zusammenfassung**

Die AMD ist die häufigste Ursache für einen Sehverlust älterer Menschen in unseren Industrienationen. Die Entstehung der AMD ist multifaktoriell bedingt und noch nicht abschließend geklärt. Neben einer gewissen genetischen Suszeptibilität spielen vor allem Entzündungsreize und die Immunantwort des Körpers darauf eine entscheidende Rolle im Krankheitsgeschehen der AMD und dem Fortschreiten der Erkrankung. Auf molekularer Ebene gibt es TLR, durch die RPE-Zellen Gefahrensignale mikrobieller Art oder Abbauprodukte von Zellstress erkennen und durch Zytokinsekretion eine pro-inflammatorische Antwort auslösen können. Da das RPE polarisiert vorliegt, war das Ziel dieser Arbeit, die Verhältnisse des Retina-Choroidea-Komplexes nachzubilden und die Effekte einer basalen TLR-Stimulation der RPE-Zellen auf die apikale Reaktion hin zu untersuchen, um weiter zu erforschen, welche Effekte eine systemische Infektion oder inflammatorische Stimuli aus dem Blut auf das innere Milieu der Retina haben und damit als Ursache für die AMD infrage kommen könnten. Dafür wurden

primäre RPE-Zellkulturen und Organkulturen aus Schweineaugen präpariert. Die primären RPE-Zellen wurden auf Transwell-Platten kultiviert, die Organkulturen in Ussing-Kammern eingespannt, welche beide eine klare Trennung zwischen apikalem und basalem Medium herstellten. So konnten basal die TLR mit den Agonisten Pam2CSK4 für TLR 2, Poly I:C für TLR 3 und LPS für TLR 4 24 Stunden lang stimuliert und die Effekte auf die apikale und basale Sekretion der Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-1 $\beta$ , die Auswirkungen auf die Barrierefunktion sowie die neuronale Zelltoxizität der apikalen Überstände für die jeweiligen Stimulanzen genauer betrachtet werden. Die Zytokine wurden mittels ELISA bestimmt und die Barrierefunktion über die Messung des TEER und eine Immunfluoreszenzfärbung des Occludins getestet. Als Modell für die neuronalen Zellen wurden SH-SY5Y-Zellen kultiviert, den apikalen Überständen für 24 Stunden ausgesetzt und schließlich im MTT-Assay das Überleben der Zellen bestimmt. In unseren Experimenten stellte sich ein klarer Unterschied der Zytokinsekretion zwischen den primären RPE-Zellkulturen und den Organkulturen heraus. Während sich bei den primären RPE-Zellkulturen zwar eine signifikante Sekretion aller getesteten Zytokine durch die TLR-Stimulation beidseits induzieren ließ, konnte ein Unterschied zwischen basaler und apikaler Sekretion und damit eine polarisierte Ausschüttung nur bei den Organkulturen nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass die Choroidea die Immunantwort des RPE entscheidend beeinflusst und deshalb in künftige Experimente stets mit eingebunden werden sollte, wenn die Interaktionen des RPE mit den umliegenden Geweben betrachtet werden. Interessant war auch, dass bei den Organkulturen die Sekretion überwiegend basal ausgelöst wurde. Ein Unterschied zeigte sich hier bei den Zytokinen für IL-6, welches auch apikal ausgeschüttet wurde, während TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  vor allem basal sezerniert wurden. Dies spricht für einen Selbstschutzmechanismus des RPE und eine feine Regulation der Immunantwort, da TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  neurotoxische Effekte haben können, wohingegen IL-6 eher neuroprotektive Eigenschaften aufweist. Dies spiegelt sich auch in den Ergebnissen wider, da die apikalen Überstände in dem betrachteten Zeitraum von 24 Stunden keinerlei neurotoxische Wirkung auf die SH-SY5Y hatten. Allerdings ist es möglich, dass sich die Langzeiteffekte anders verhalten, wofür weitere Studien mit einem ausgedehnteren Zeitraum notwendig sind. Weiterhin konnten wir zeigen, dass die TLR-Stimulation bei den primären RPE-Zellkulturen einen Abfall des TEER und in beiden RPE-Modellen eine Umverteilung des Occludins bewirkt. Diese Erkenntnisse könnten als Erklärung für die bereits beobachtete Störung der Blut-Retina-Schranke bei der AMD dienen. Die auslösenden Zytokine oder die TLR selbst könnten daher als pharmakologische Angriffspunkte geeignet sein, um ein Fortschreiten der Erkrankung aufzuhalten. Hier ist jedoch noch weitere

Forschung in Form von „in vivo“-Versuchen und Langzeitstimulationen notwendig, um die genauen, zugrunde liegenden Pathomechanismen der inflammatorischen Effekte auf die äußere Blut-Retina-Schranke zu enthüllen.

## 6. Literaturverzeichnis

Abalem, Maria Fernanda; Omari, Amro A.; Schlegel, Dana; Khan, Naheed W.; Jayasundera, Thiran (2019): Macular hyperpigmentary changes in ABCA4-Stargardt disease. In: *International journal of retina and vitreous* 5, S. 9. DOI: 10.1186/s40942-019-0160-4.

Abe, T.; Sugano, E.; Saigo, Y.; Tamai, M. (2003): Interleukin-1beta and Barrier Function of Retinal Pigment Epithelial Cells (ARPE-19). Aberrant Expression of Junctional Complex Molecules. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 44 (9). DOI: 10.1167/iovs.02-0867.

Akira, Shizuo; Uematsu, Satoshi; Takeuchi, Osamu (2006): Pathogen Recognition and Innate Immunity. In: *Cell* 124 (4), S. 783–801. DOI: 10.1016/j.cell.2006.02.015.

Alexopoulou, Lena; Holt, Agnieszka Czopik; Medzhitov, Ruslan; Flavell, Richard A. (2001): Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- $\kappa$ B by Toll-like receptor 3. In: *Nature* 413 (6857), S. 732–738. DOI: 10.1038/35099560.

Ambati, Jayakrishna; Atkinson, John P.; Gelfand, Bradley D. (2013): Immunology of age-related macular degeneration. In: *Nature reviews. Immunology* 13 (6), S. 438–451. DOI: 10.1038/nri3459.

AMD Alliance International (2010): First-Ever Estimates of Global Cost of Vision Loss Reported Today, <https://www.aa.com.tr/en/archive/amd-alliance-international-first-ever-estimates-of-global-cost-of-vision-loss-reported-today/423006>.

Bauernfeind, Franz G.; Horvath, Gabor; Stutz, Andrea; Alnemri, Emad S.; MacDonald, Kelly; Speert, David et al. (2009): Cutting Edge. NF- $\kappa$ B Activating Pattern Recognition and Cytokine Receptors License NLRP3 Inflammasome Activation by Regulating NLRP3 Expression. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 183 (2), S. 787–791. DOI: 10.4049/jimmunol.0901363.

Beatty, S.; Koh, H.; Phil, M.; Henson, D.; Boulton, M. (2000): The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. In: *Survey of ophthalmology* 45 (2), S. 115–134.

Beutler, B.; Greenwald, D.; Hulmes, J. D.; Chang, M.; Pan, Y.-C. E.; Mathison, J. et al. (1985a): Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. In: *Nature* 316 (6028), S. 552–554. DOI: 10.1038/316552a0.

Beutler, B.; Milsark, I.; Cerami, A. (1985b): Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. In: *Science* 229 (4716), S. 869–871. DOI: 10.1126/science.3895437.



- Beutler, Bruce A. (2009): TLRs and innate immunity. In: *Blood* 113 (7), S. 1399–1407. DOI: 10.1182/blood-2008-07-019307.
- 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.
- Braunstein, Marc J.; Kucharczyk, John; Adams, Sylvia (2018): Targeting Toll-Like Receptors for Cancer Therapy. In: *Target Oncol* 13 (5), S. 583–598. DOI: 10.1007/s11523-018-0589-7.
- Brosig, Anton; Kuhrt, Heidrun; Wiedemann, Peter; Kohen, Leon; Bringmann, Andreas; Hollborn, Margrit (2015): Gene expression regulation in retinal pigment epithelial cells induced by viral RNA and viral/bacterial DNA. In: *Molecular vision* 21, S. 1000–1016.
- Cameron, D. Joshua; Yang, Zhenglin; Gibbs, Daniel; Chen, Haoyu; Kaminoh, Yuuki; Jorgensen, Adam et al. (2007): HTRA1 variant confers similar risks to geographic atrophy and neovascular age-related macular degeneration. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 6 (9), S. 1122–1125. DOI: 10.4161/cc.6.9.4157.
- Campbell, Matthew; Humphries, Peter (2012): The blood-retina barrier. Tight junctions and barrier modulation. In: *Advances in experimental medicine and biology* 763, S. 70–84.
- Cao, Sijia; Walker, Gregory B.; Wang, Xuefeng; Cui, Jing Z.; Matsubara, Joanne A. (2013): Altered cytokine profiles of human retinal pigment epithelium: oxidant injury and replicative senescence. In: *Molecular vision* 19, S. 718–728.
- Celkova, Lucia; Doyle, Sarah; Campbell, Matthew (2015): NLRP3 Inflammasome and Pathobiology in AMD. In: *JCM* 4 (1), S. 172–192. DOI: 10.3390/jcm4010172.
- Chao, C. C.; Hu, S. (1994): Tumor necrosis factor- $\alpha$  potentiates glutamate neurotoxicity in human fetal brain cell cultures. In: *Developmental neuroscience* 16 (3-4), S. 172–179. DOI: 10.1159/000112104.
- Chen, Chen; Guo, Danni; Lu, Guohua (2017): Wogonin protects human retinal pigment epithelium cells from LPS-induced barrier dysfunction and inflammatory responses by regulating the TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway. In: *Molecular medicine reports* 15 (4), S. 2289–2295. DOI: 10.3892/mmr.2017.6252.
- Chen, Wei; Hu, Xiaofeng; Zhao, Li; Li, Shang; Lu, Hong (2009): Expression of toll-like receptor 4 in uvea-resident tissue macrophages during endotoxin-induced uveitis. In: *Molecular vision* 15, S. 619–628.
- Cheung, C. M. G.; Wong, T. Y. (2014): Is age-related macular degeneration a manifestation of systemic disease? New prospects for early intervention and treatment. In: *Journal of internal medicine* 276 (2), S. 140–153. DOI: 10.1111/joim.12227.
- Chew, Emily Y.; Clemons, Traci E.; Agrón, Elvira; Sperduto, Robert D.; SanGiovanni, John Paul; Kurinij, Natalie; Davis, Matthew D. (2013): Long-term effects of vitamins C and E,  $\beta$ -carotene, and zinc on age-related macular degeneration: AREDS report no. 35. In: *Ophthalmology* 120 (8), 1604–11.e4. DOI: 10.1016/j.ophtha.2013.01.021.

- Chew, Emily Y.; Clemons, Traci E.; SanGiovanni, John Paul; Danis, Ronald P.; Ferris, Frederick L.; Elman, Michael J. et al. (2014): Secondary analyses of the effects of lutein/zeaxanthin on age-related macular degeneration progression: AREDS2 report No. 3. In: *JAMA ophthalmology* 132 (2), S. 142–149. DOI: 10.1001/jamaophthalmol.2013.7376.
- Cioanca, Adrian V.; McCluskey, Peter J.; Eamegdool, Steven S.; Madigan, Michele C. (2018): Human choroidal melanocytes express functional Toll-like receptors (TLRs). In: *Experimental eye research* 173, S. 73–84. DOI: 10.1016/j.exer.2018.04.014.
- Claude, P.; Goodenough, D. A. (1973): Fracture faces of zonulae occludentes from "tight" and "leaky" epithelia. In: *The Journal of cell biology* 58 (2), S. 390–400.
- Crabb, John W. (2014): The proteomics of drusen. In: *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 4 (7), a017194. DOI: 10.1101/cshperspect.a017194.
- Cunha-Vaz, José; Bernardes, Rui; Lobo, Conceição (2011): Blood-retinal barrier. In: *European journal of ophthalmology* 21 Suppl 6, S3-9. DOI: 10.5301/EJO.2010.6049.
- Curcio, Christine A.; Johnson, Mark; Huang, Jiahn-Dar; Rudolf, Martin (2010): Apolipoprotein B-containing lipoproteins in retinal aging and age-related macular degeneration. In: *Journal of lipid research* 51 (3), S. 451–467. DOI: 10.1194/jlr.R002238.
- Curcio, Christine A.; Johnson, Mark; Rudolf, Martin; Huang, Jiahn-Dar (2011): The oil spill in ageing Bruch membrane. In: *The British journal of ophthalmology* 95 (12), S. 1638–1645. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2011-300344.
- 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*. 1st ed. 2020. Cham: Springer International Publishing, S. 101–114.
- 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 Res* 39 (3), S. 155–163. DOI: 10.1159/000103235.
- Faber, Carsten; Juel, Helene Bæk; Jensen, Benjamin Anderschou Holbech; Christensen, Jan Pravsgaard; Prause, Jan Ulrik; Thomsen, Allan Randrup; Nissen, Mogens Holst (2019): Chemokine Expression in Murine RPE/Choroid in Response to Systemic Viral Infection and Elevated Levels of Circulating Interferon- $\gamma$ . In: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 60 (1), S. 192–201. DOI: 10.1167/iovs.18-25721.
- Farquhar, M. G.; Palade, G. E. (1963): Junctional complexes in various epithelia. In: *The Journal of cell biology* 17, S. 375–412. DOI: 10.1083/jcb.17.2.375.
- Feldman, Gemma J.; Mullin, James M.; Ryan, Michael P. (2005): Occludin: structure, function and regulation. In: *Advanced Drug Delivery Reviews* 57 (6), S. 883–917. DOI: 10.1016/j.addr.2005.01.009.
- Forrester, John V.; Xu, Heping (2012): Good news-bad news. The Yin and Yang of immune privilege in the eye. In: *Frontiers in immunology* 3, S. 338. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00338.

- Fritsche, Lars G.; Fariss, Robert N.; Stambolian, Dwight; Abecasis, Gonçalo R.; Curcio, Christine A.; Swaroop, Anand (2014): Age-related macular degeneration. Genetics and biology coming together. In: *Annual review of genomics and human genetics* 15, S. 151–171. DOI: 10.1146/annurev-genom-090413-025610.
- Fujimoto, T.; Sonoda, K. H.; Hijioka, K.; Sato, K.; Takeda, A.; Hasegawa, E. et al. (2010): Choroidal Neovascularization Enhanced by Chlamydia Pneumoniae via Toll-like Receptor 2 in the Retinal Pigment Epithelium. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 51 (9). DOI: 10.1167/iovs.09-4464.
- Georgel, Philippe; Jiang, Zhengfan; Kunz, Stefan; Janssen, Edith; Mols, Johann; Hoebe, Kasper et al. (2007): Vesicular stomatitis virus glycoprotein G activates a specific antiviral Toll-like receptor 4-dependent pathway. In: *Virology* 362 (2), S. 304–313. DOI: 10.1016/j.virol.2006.12.032.
- Grehn, F. (2019): Augenheilkunde, 32. Auflage, Springer Verlag, Berlin, S. 336-339.
- Guduric-Fuchs, Jasenka; Ringland, Laura J.; Gu, Ping; Dellett, Margaret; Archer, Desmond B.; Cogliati, Tiziana (2009): Immunohistochemical study of pig retinal development. In: *Molecular vision* 15, S. 1915–1928.
- Güven, M.; Batar, B.; Mutlu, T.; Bostancı, M.; Mete, M.; Aras, C.; Ünal, M. (2016): Toll-Like Receptors 2 and 4 Polymorphisms in Age-Related Macular Degeneration. In: *Current eye research* 41 (6). DOI: 10.3109/02713683.2015.1067326.
- Hageman, G. S.; Luthert, P. J.; Victor Chong, N. H.; Johnson, L. V.; Anderson, D. H.; Mullins, R. F. (2001): An integrated hypothesis that considers drusen as biomarkers of immune-mediated processes at the RPE-Bruch's membrane interface in aging and age-related macular degeneration. In: *Progress in retinal and eye research* 20 (6), S. 705–732.
- Hanus, Jakub; Zhao, Fangkun; Wang, Shusheng (2016): Current therapeutic developments in atrophic age-related macular degeneration. In: *The British journal of ophthalmology* 100 (1), S. 122–127. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2015-306972.
- Harrabi, Hanen; Kergoat, Marie-Jeanne; Rousseau, Jacqueline; Boisjoly, Hélène; Schmaltz, Heidi; Moghadaszadeh, Solmaz et al. (2015): Age-related eye disease and cognitive function. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 56 (2), S. 1217–1221. DOI: 10.1167/iovs.14-15370.
- 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.
- Hendrickson, Anita; Hicks, David (2002): Distribution and density of medium- and short-wavelength selective cones in the domestic pig retina. In: *Experimental eye research* 74 (4), S. 435–444. DOI: 10.1006/exer.2002.1181.

Heo, Jeong Hoon; Yoon, Jung Ae; Ahn, Eun Kyung; Kim, Hyun; Urm, Sang Hwa; Oak, Chul Oh et al. (2018): Intraperitoneal administration of adipose tissue-derived stem cells for the rescue of retinal degeneration in a mouse model via indigenous CNTF up-regulation by IL-6. In: *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 12 (3), e1370-e1382. DOI: 10.1002/term.2522.

Hettich, Christin; Wilker, Sebastian; Mentlein, Rolf; Lucius, Ralph; Roider, Johann; Klettner, Alexa (2014): The retinal pigment epithelium (RPE) induces FasL and reduces iNOS and Cox2 in primary monocytes. In: *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 252 (11), S. 1747–1754. DOI: 10.1007/s00417-014-2742-z.

Hillenkamp, Jost; Hussain, Ali A.; Jackson, Timothy L.; Cunningham, Joanna R.; Marshall, John (2004): The influence of path length and matrix components on ageing characteristics of transport between the choroid and the outer retina. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 45 (5), S. 1493–1498.

Holtkamp, G. M.; van Rossem, M.; Vos, A. F. de; Willekens, B.; Peek, R.; Kijlstra, A. (1998): Polarized secretion of IL-6 and IL-8 by human retinal pigment epithelial cells. In: *Clinical and experimental immunology* 112 (1), S. 34–43. DOI: 10.1046/j.1365-2249.1998.00560.x.

Jo, Dong Hyun; Yun, Jang-Hyuk; Cho, Chang Sik; Kim, Jin Hyoung; Kim, Jeong Hun; Cho, Chung-Hyun (2019): Interaction between microglia and retinal pigment epithelial cells determines the integrity of outer blood-retinal barrier in diabetic retinopathy. In: *Glia* 67 (2), S. 321–331. DOI: 10.1002/glia.23542.

Kalayoglu, Murat V.; Bula, Deisy; Arroyo, Jorge; Gragoudas, Evangelos S.; D’Amico, Donald; Miller, Joan W. (2005): Identification of Chlamydia pneumoniae within human choroidal neovascular membranes secondary to age-related macular degeneration. In: *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 243 (11), S. 1080–1090. DOI: 10.1007/s00417-005-1169-y.

Kaneko, Hiroki; Dridi, Sami; Tarallo, Valeria; Gelfand, Bradley D.; Fowler, Benjamin J.; Cho, Won Gil et al. (2011): DICER1 deficit induces Alu RNA toxicity in age-related macular degeneration. In: *Nature* 471 (7338), S. 325–330. DOI: 10.1038/nature09830.

Kanski, J. J., Bowling, B. (2012): *Klinische Ophthalmologie*, Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München, S. 651.

Kawai, Taro; Akira, Shizuo (2010): The role of pattern-recognition receptors in innate immunity. Update on Toll-like receptors. In: *Nat Immunol* 11 (5), S. 373–384. DOI: 10.1038/ni.1863.

Kindzelskii, Andrei L.; Elner, Victor M.; Elner, 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: *Journal of General Physiology* 124 (2), S. 139–149. DOI: 10.1085/jgp.200409062.

- Klein, Robert J.; Zeiss, Caroline; Chew, Emily Y.; Tsai, Jen-Yue; Sackler, Richard S.; Haynes, Chad et al. (2005): Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. In: *Science (New York, N.Y.)* 308 (5720), S. 385–389. DOI: 10.1126/science.1109557.
- 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/iovs.08-2055.
- Klettner, Alexa; Koinzer, Stefan; Meyer, Tim; Roeder, Johann (2013a): 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), e211-e218. DOI: 10.1111/aos.12031.
- Klettner, Alexa; Westhues, Daniel; Lassen, Jens; Bartsch, Sofia; Roeder, Johann (2013b): Regulation of constitutive vascular endothelial growth factor secretion in retinal pigment epithelium/choroid organ cultures. P38, nuclear factor kappaB, and the vascular endothelial growth factor receptor-2/phosphatidylinositol 3 kinase pathway. In: *Molecular vision* 19, S. 281–291.
- Klettner, Alexa; Hamann, Timothy; Schlüter, Karen; Lucius, Ralph; Roeder, Johann (2014): Retinal pigment epithelium cells alter the pro-inflammatory response of retinal microglia to TLR-3 stimulation. In: *Acta ophthalmologica* 92 (8), e621-9. DOI: 10.1111/aos.12472.
- Klettner, Alexa; Kaya, Leyla; Flach, Janina; Lassen, Jens; Treumer, Felix; Roeder, Johann (2015): Basal and apical regulation of VEGF-A and placenta growth factor in the RPE/choroid and primary RPE. In: *Molecular vision* 21, S. 736–748.
- Klettner, Alexa; Miura, Yoko (2019): Porcine RPE/Choroidal Explant Cultures. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1834, S. 109–118. DOI: 10.1007/978-1-4939-8669-9\_8.
- Klettner, Alexa Karina (2020a): Retinal Pigment Epithelium Cell Culture. In: Alexa Karina Klettner (Hg.): *Retinal Pigment Epithelium in Health and Disease*. Cham: Springer International Publishing, S. 295–305.
- Klettner, Alexa; Brinkmann, Anna; Winkelmann, Katrin; Kückenmeister, Tom; Hildebrandt, Julia; Roeder, Johann (2020b): 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.
- Knauer, Christine; Pfeiffer, Norbert (2008): The value of vision. In: *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie* 246 (4), S. 477–482. DOI: 10.1007/s00417-007-0668-4.
- Korb, Christina A.; Kottler, Ulrike B.; Wolfram, Christian; Hoehn, René; Schulz, Andreas; Zwiener, Isabella et al. (2014): Prevalence of age-related macular degeneration in a large European cohort. Results from the population-based Gutenberg Health Study. In: *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie* 252 (9), S. 1403–1411. DOI: 10.1007/s00417-014-2591-9.

- Kovalevich, Jane; Langford, Dianne (2013): Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1078, S. 9–21. DOI: 10.1007/978-1-62703-640-5\_2.
- 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.
- Kurt-Jones, Evelyn A.; Popova, Lana; Kwinn, Laura; Haynes, Lia M.; Jones, Les P.; Tripp, Ralph A. et al. (2000): Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. In: *Nat Immunol* 1 (5), S. 398–401. DOI: 10.1038/80833.
- Leibinger, M.; Müller, A.; Gobrecht, P.; Diekmann, H.; Andreadaki, A.; Fischer, D. (2013): Interleukin-6 contributes to CNS axon regeneration upon inflammatory stimulation. In: *Cell death & disease* 4 (4), e609. DOI: 10.1038/cddis.2013.126.
- Lemaitre, Bruno; Nicolas, Emmanuelle; Michaut, Lydia; Reichhart, Jean-Marc; Hoffmann, Jules A. (1996): The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette *spätzle*/Toll/cactus Controls the Potent Antifungal Response in *Drosophila* Adults. In: *Cell* 86 (6), S. 973–983. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80172-5.
- Leung, Kar Wah; Barnstable, Colin J.; Tombran-Tink, Joyce (2009): Bacterial endotoxin activates retinal pigment epithelial cells and induces their degeneration through IL-6 and IL-8 autocrine signaling. In: *Molecular immunology* 46 (7), S. 1374–1386. DOI: 10.1016/j.molimm.2008.12.001.
- Lin, Alice V. (2015): Indirect ELISA. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1318, S. 51–59. DOI: 10.1007/978-1-4939-2742-5\_5.
- Lüllmann-Rauch, R. (2012): Taschenlehrbuch Histologie, 4. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, S. 40, S. 602, S. 610/611, S. 617–623.
- Ly, Angelica; Nivison-Smith, Lisa; Assaad, Nagi; Kalloniatis, Michael (2017): Fundus Autofluorescence in Age-related Macular Degeneration. In: *Optometry and Vision Science* 94 (2), S. 246–259. DOI: 10.1097/OPX.0000000000000997.
- Ma, Li; Tang, Fang Yao; Chu, Wai Kit; Young, Alvin L.; Brelen, Marten E.; Pang, Chi Pui; Chen, Li Jia (2016): Association of toll-like receptor 3 polymorphism rs3775291 with age-related macular degeneration. A systematic review and meta-analysis. In: *Sci Rep* 6 (1), e106. DOI: 10.1038/srep19718.
- Marneros, Alexander G. (2013): NLRP3 Inflammasome Blockade Inhibits VEGF-A-Induced Age-Related Macular Degeneration. In: *Cell Reports* 4 (5), S. 945–958. DOI: 10.1016/j.celrep.2013.08.002.
- Medawar, P. B. (1961): Immunological tolerance. In: *Nature* 189, S. 14–17.
- Medzhitov, Ruslan (2008): Origin and physiological roles of inflammation. In: *Nature* 454 (7203), S. 428–435. DOI: 10.1038/nature07201.

- Medzhitov, Ruslan; Janeway, Charles A. (1997): Innate Immunity. The Virtues of a Nonclonal System of Recognition. In: *Cell* 91 (3), S. 295–298. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80412-2.
- Medzhitov, Ruslan; Preston-Hurlburt, Paula; Janeway, Charles A. (1997): A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. In: *Nature* 388 (6640), S. 394–397. DOI: 10.1038/41131.
- Middleton, Sheldon (2010): Porcine ophthalmology. In: *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice* 26 (3), S. 557–572. DOI: 10.1016/j.cvfa.2010.09.002.
- Miller, Daniel M.; Espinosa–heidmann, Diego G.; Legra, Jessica; Dubovy, Sander R.; Sünner, Ivan J.; Sedmak, Daniel D. et al. (2004): The association of prior cytomegalovirus infection with neovascular age-related macular degeneration. In: *American journal of ophthalmology* 138 (3), S. 323–328. DOI: 10.1016/j.ajo.2004.03.018.
- Miller, Joan W. (2013): Age-related macular degeneration revisited--piecing the puzzle. The LXIX Edward Jackson memorial lecture. In: *American journal of ophthalmology* 155 (1), 1-35.e13. DOI: 10.1016/j.ajo.2012.10.018.
- 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.
- Miura, Y.; Klettner, A.; Noelle, B.; Hasselbach, H.; Roeder, J. (2010a): Change of Morphological and Functional Characteristics of Retinal Pigment Epithelium Cells during Cultivation of Retinal Pigment Epithelium-Choroid Perfusion Tissue Culture. In: *Ophthalmic Res* 43 (3), S. 122–133. DOI: 10.1159/000252979.
- Miura, Yoko; Klettner, Alexa; Roeder, Johann (2010b): VEGF antagonists decrease barrier function of retinal pigment epithelium in vitro. Possible participation of intracellular glutathione. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 51 (9), S. 4848–4855. DOI: 10.1167/iovs.09-4699.
- Mohr, Lena K. M.; Hoffmann, Andrea V.; Brandstetter, Carolina; Holz, Frank G.; Krohne, Tim U. (2015): Effects of Inflammasome Activation on Secretion of Inflammatory Cytokines and Vascular Endothelial Growth Factor by Retinal Pigment Epithelial Cells. In: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 56 (11), S. 6404–6413. DOI: 10.1167/iovs.15-16898.
- Moore, Nicholas A.; Bracha, Peter; Hussain, Rehan M.; Morral, Nuria; Ciulla, Thomas A. (2017): Gene therapy for age-related macular degeneration. In: *Expert opinion on biological therapy* 17 (10), S. 1235–1244. DOI: 10.1080/14712598.2017.1356817.
- Morisato, Donald; Anderson, Kathryn V. (1994): The spätzle gene encodes a component of the extracellular signaling pathway establishing the dorsal-ventral pattern of the Drosophila embryo. In: *Cell* 76 (4), S. 677–688. DOI: 10.1016/0092-8674(94)90507-X.
- Morris, Rhiannon; Kershaw, Nadia J.; Babon, Jeffrey J. (2018): The molecular details of cytokine signaling via the JAK/STAT pathway. In: *Protein Science* 27 (12), S. 1984–2009. DOI: 10.1002/pro.3519.

- Mosmann, Tim (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. Application to proliferation and cytotoxicity assays. In: *Journal of Immunological Methods* 65 (1-2), S. 55–63. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.
- Mukhamed'ianova, ASH; Aznabaev, R. A.; Aznabaeva, A. F. (2014): [Clinical and Immunological Factors of the Onset and Development of Age-Related Macular Degeneration]. In: *Vestnik oftalmologii* 130 (3). Online verfügbar unter <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25098114/>.
- Mulfaul, Kelly; Rhatigan, Maedbh; Doyle, Sarah (2018): Toll-Like Receptors and Age-Related Macular Degeneration. In: *Advances in experimental medicine and biology* 1074, S. 19–28. DOI: 10.1007/978-3-319-75402-4\_3.
- Murakami, Y.; Matsumoto, H.; Roh, M.; Giani, A.; Kataoka, K.; Morizane, Y. et al. (2014): Programmed necrosis, not apoptosis, is a key mediator of cell loss and DAMP-mediated inflammation in dsRNA-induced retinal degeneration. In: *Cell Death Differ* 21 (2), S. 270–277. DOI: 10.1038/cdd.2013.109.
- Murphy, K., Weaver, C. (2018): Janeway Immunologie, Springer-Verlag GmbH, Springer Spektrum, Berlin, S.132
- Nagineni, C. N.; Detrick, B.; Hooks, J. J. (2000): Toxoplasma Gondii Infection Induces Gene Expression and Secretion of Interleukin 1 (IL-1), IL-6, Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, and Intercellular Adhesion Molecule 1 by Human Retinal Pigment Epithelial Cells. In: *Infection and immunity* 68 (1). DOI: 10.1128/iai.68.1.407-410.2000.
- Nagineni, Chandrasekharam N.; Kommineni, Vijay K.; William, Abitha; Detrick, Barbara; Hooks, John J. (2012): Regulation of VEGF expression in human retinal cells by cytokines. Implications for the role of inflammation in age-related macular degeneration. In: *J. Cell. Physiol.* 227 (1), S. 116–126. DOI: 10.1002/jcp.22708.
- Naylor, Aisling; Hopkins, Alan; Hudson, Natalie; Campbell, Matthew (2019): Tight Junctions of the Outer Blood Retina Barrier. In: *International Journal of Molecular Sciences* 21 (1). DOI: 10.3390/ijms21010211.
- Nebbioso, Marcella; Lambiase, Alessandro; Cerini, Alberto; Limoli, Paolo Giuseppe; La Cava, Maurizio; Greco, Antonio (2019): Therapeutic Approaches with Intravitreal Injections in Geographic Atrophy Secondary to Age-Related Macular Degeneration: Current Drugs and Potential Molecules. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. Online verfügbar unter <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/7/1693/htm>, zuletzt aktualisiert am 04.04.2019, zuletzt geprüft am 28.04.2019.
- Neri, S.; Mariani, E.; Meneghetti, A.; Cattini, L.; Facchini, A. (2001): Calcein-acetyoxymethyl cytotoxicity assay. Standardization of a method allowing additional analyses on recovered effector cells and supernatants. In: *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 8 (6), S. 1131–1135. DOI: 10.1128/CDLI.8.6.1131-1135.2001.



- Oliveira Dias, J. R. de; Rodrigues, E. B.; Maia, M.; Magalhaes, O.; Penha, F. M.; Farah, M. E. (2011): Cytokines in neovascular age-related macular degeneration. Fundamentals of targeted combination therapy. In: *British Journal of Ophthalmology* 95 (12), S. 1631–1637. DOI: 10.1136/bjo.2010.186361.
- Olson, Jeffrey L.; Courtney, Robert J.; Rouhani, Behnaz; Mandava, Naresh; Dinarello, Charles A. (2009): Intravitreal Anakinra Inhibits Choroidal Neovascular Membrane Growth in a Rat Model. In: *Ocular Immunology and Inflammation* 17 (3), S. 195–200. DOI: 10.1080/09273940802710705.
- Omenn, G. S.; Goodman, G. E.; Thornquist, M. D.; Balmes, J.; Cullen, M. R.; Glass, A. et al. (1996): Risk factors for lung cancer and for intervention effects in CARET, the Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial. In: *Journal of the National Cancer Institute* 88 (21), S. 1550–1559. DOI: 10.1093/jnci/88.21.1550.
- Paeng, Sung Hwa; Park, Won Sun; Jung, Won-Kyo; Lee, Dae-Sung; Kim, Gi-Young; Choi, Yung Hyun et al. (2015): YCG063 inhibits *Pseudomonas aeruginosa* LPS-induced inflammation in human retinal pigment epithelial cells through the TLR2-mediated AKT/NF- $\kappa$ B pathway and ROS-independent pathways. In: *International journal of molecular medicine* 36 (3), S. 808–816. DOI: 10.3892/ijmm.2015.2266.
- Park, Dae Hyun; Sun, Hae Jung; Lee, Sung Jin (2017): A comparison of responses to intravitreal bevacizumab, ranibizumab, or aflibercept injections for neovascular age-related macular degeneration. In: *International ophthalmology* 37 (5), S. 1205–1214. DOI: 10.1007/s10792-016-0391-4.
- Parver, L. M.; Auker, C.; Carpenter, D. O. (1980): Choroidal blood flow as a heat dissipating mechanism in the macula. In: *American journal of ophthalmology* 89 (5), S. 641–646.
- Peng, Shaomin; Gan, Geliang; Rao, Veena S.; Adelman, Ron A.; Rizzolo, Lawrence J. (2012): Effects of proinflammatory cytokines on the claudin-19 rich tight junctions of human retinal pigment epithelium. In: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53 (8), S. 5016–5028. DOI: 10.1167/iovs.11-8311.
- Percopo, C. M.; Hooks, J. J.; Shinohara, T.; Caspi, R.; Detrick, B. (1990): Cytokine-mediated activation of a neuronal retinal resident cell provokes antigen presentation. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 145 (12), S. 4101–4107.
- Planck, S. R.; Dang, T. T.; Graves, D.; Tara, D.; Ansel, J. C.; Rosenbaum, J. T. (1992): Retinal pigment epithelial cells secrete interleukin-6 in response to interleukin-1. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 33 (1), S. 78–82. Online verfügbar unter <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1370441/>.
- Poltorak, A. (1998): Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice. Mutations in Tlr4 Gene. In: *Science* 282 (5396), S. 2085–2088. DOI: 10.1126/science.282.5396.2085.
- Quinn, R. H.; Miller, S. S. (1992): Ion transport mechanisms in native human retinal pigment epithelium. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 33 (13), S. 3513–3527.

- Rabiolo, Alessandro; Sacconi, Riccardo; Cicinelli, Maria Vittoria; Querques, Lea; Bandello, Francesco; Querques, Giuseppe (2017): Spotlight on reticular pseudodrusen. In: *Clinical ophthalmology (Auckland, N.Z.)* 11, S. 1707–1718. DOI: 10.2147/OPTH.S130165.
- Rivera, Andrea; Fisher, Sheila A.; Fritsche, Lars G.; Keilhauer, Claudia N.; Lichtner, Peter; Meitinger, Thomas; Weber, Bernhard H. F. (2005): Hypothetical LOC387715 is a second major susceptibility gene for age-related macular degeneration, contributing independently of complement factor H to disease risk. In: *Human molecular genetics* 14 (21), S. 3227–3236. DOI: 10.1093/hmg/ddi353.
- Rizzolo, Lawrence J. (2007): Development and Role of Tight Junctions in the Retinal Pigment Epithelium. In: *International review of cytology* 258, S. 195–234. DOI: 10.1016/S0074-7696(07)58004-6.
- Rizzolo, Lawrence J. (2014): Barrier properties of cultured retinal pigment epithelium. In: *Experimental eye research* 126, S. 16–26. DOI: 10.1016/j.exer.2013.12.018.
- Robman, Luba; Mahdi, Olaimatu; McCarty, Catherine; Dimitrov, Peter; Tikellis, Gabriella; McNeil, John et al. (2005): Exposure to Chlamydia pneumoniae Infection and Progression of Age-related Macular Degeneration. In: *American Journal of Epidemiology* 161 (11), S. 1013–1019. DOI: 10.1093/aje/kwi130.
- Roizing, Maarten P.; Durhuus, Jon A.; Krogh Nielsen, Marie; Subhi, Yousif; Kirkwood, Thomas Bl; Westendorp, Rudi Gj; Sørensen, Torben Lykke (2020): Age-related macular degeneration: A two-level model hypothesis. In: *Progress in retinal and eye research* 76, S. 100825. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2019.100825.
- Runkle, E. Aaron; Antonetti, David A. (2011): The blood-retinal barrier: structure and functional significance. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 686, S. 133–148. DOI: 10.1007/978-1-60761-938-3\_5.
- SanGiovanni, John Paul; Agrón, Elvira; Meleth, A. Dhananjayan; Reed, George F.; Sperduto, Robert D.; Clemons, Traci E.; Chew, Emily Y. (2009): {omega}-3 Long-chain polyunsaturated fatty acid intake and 12-y incidence of neovascular age-related macular degeneration and central geographic atrophy. AREDS report 30, a prospective cohort study from the Age-Related Eye Disease Study. In: *The American journal of clinical nutrition* 90 (6), S. 1601–1607. DOI: 10.3945/ajcn.2009.27594.
- Sappington, Rebecca M.; Chan, Matilda; Calkins, David J. (2006): Interleukin-6 protects retinal ganglion cells from pressure-induced death. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 47 (7), S. 2932–2942. DOI: 10.1167/iovs.05-1407.
- Schmidt, Silke; Hauser, Michael A.; Scott, William K.; Postel, Eric A.; Agarwal, Anita; Gallins, Paul et al. (2006): Cigarette smoking strongly modifies the association of LOC387715 and age-related macular degeneration. In: *American journal of human genetics* 78 (5), S. 852–864. DOI: 10.1086/503822.
- Schmitz-Valckenberg, S., Fleckenstein, M., Göbel, A. P., Lindner, M., von Strachwitz, C., Holz, F. G. (2014): Geographische Atrophie: Differentialdiagnose, Verlauf und aktuelle Therapieansätze. *Z. prakt. Augenheilkunde*, 35, S. 278

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, M., Schulte, E., Schumacher, U., Voll, M., Wesker, K. (2012): Prometheus Lernetlas der Anatomie, Kopf-Hals und Neuroanatomie, 3. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, S. 162.

Seddon, Johanna M.; Cote, Jennifer; Page, William F.; Aggen, Steven H.; Neale, Michael C. (2005a): The US twin study of age-related macular degeneration. Relative roles of genetic and environmental influences. In: *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)* 123 (3), S. 321–327. DOI: 10.1001/archopht.123.3.321.

Seddon, Johanna M. (2005b): Progression of Age-Related Macular Degeneration. In: *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)* 123 (6), S. 774. DOI: 10.1001/archopht.123.6.774.

Shi, Xuan; Semkova, Irina; Müther, Philipp S.; Dell, Susanne; Kociok, Norbert; Jousen, Antonia M. (2006): Inhibition of TNF- $\alpha$  reduces laser-induced choroidal neovascularization. In: *Experimental eye research* 83 (6), S. 1325–1334. DOI: 10.1016/j.exer.2006.07.007.

Shin, Kunyoo; Fogg, Vanessa C.; Margolis, Ben (2006): Tight junctions and cell polarity. In: *Annual review of cell and developmental biology* 22, S. 207–235. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104219.

Sofat, Reecha; Casas, Juan P.; Webster, Andrew R.; Bird, Alan C.; Mann, Samantha S.; Yates, John R. W. et al. (2012): Complement factor H genetic variant and age-related macular degeneration. Effect size, modifiers and relationship to disease subtype. In: *International journal of epidemiology* 41 (1), S. 250–262. DOI: 10.1093/ije/dyr204.

Solomon, Sharon D.; Lindsley, Kristina B.; Krzystolik, Magdalena G.; Vedula, Satyanarayana S.; Hawkins, Barbara S. (2016): Intravitreal Bevacizumab Versus Ranibizumab for Treatment of Neovascular Age-Related Macular Degeneration. Findings from a Cochrane Systematic Review. In: *Ophthalmology* 123 (1), 70-77.e1. DOI: 10.1016/j.optha.2015.09.002.

Song, Cai; Zhang, Ye; Dong, Yilong (2013): Acute and subacute IL-1 $\beta$  administrations differentially modulate neuroimmune and neurotrophic systems: possible implications for neuroprotection and neurodegeneration. In: *Journal of neuroinflammation* 10, S. 59. DOI: 10.1186/1742-2094-10-59.

Sparrow, Janet R.; Boulton, Mike (2005): RPE lipofuscin and its role in retinal pathobiology. In: *Experimental eye research* 80 (5), S. 595–606. DOI: 10.1016/j.exer.2005.01.007.

- Srinivasan, Balaji; Kolli, Aditya Reddy; Esch, Mandy Brigitte; Abaci, Hasan Erbil; Shuler, Michael L.; Hickman, James J. (2015): TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. In: *Journal of laboratory automation* 20 (2), S. 107–126. DOI: 10.1177/2211068214561025.
- Stein-Streilein, Joan (2013): Mechanisms of immune privilege in the posterior eye. In: *International Reviews of Immunology* 32 (1), S. 42–56. DOI: 10.3109/08830185.2012.740535.
- Stewart, Elizabeth A.; Wei, Ruoxin; Branch, Matthew J.; Sidney, Laura E.; Amoaku, Winfried M. (2015): Expression of Toll-like receptors in human retinal and choroidal vascular endothelial cells. In: *Experimental eye research* 138, S. 114–123. DOI: 10.1016/j.exer.2015.06.012.
- Strauss, Olaf (2005): The retinal pigment epithelium in visual function. In: *Physiological reviews* 85 (3), S. 845–881. DOI: 10.1152/physrev.00021.2004.
- Streilein, J. W. (1995): Immunological non-responsiveness and acquisition of tolerance in relation to immune privilege in the eye. In: *Eye (London, England)* 9 (Pt 2), S. 236–240. DOI: 10.1038/eye.1995.46.
- Tabeta, K.; Georgel, P.; Janssen, E.; Du, X.; Hoebe, K.; Crozat, K. et al. (2004): Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. In: *PNAS* 101 (10), S. 3516–3521. DOI: 10.1073/pnas.0400525101.
- Tartey, Sarang; Takeuchi, Osamu (2017): Pathogen recognition and Toll-like receptor targeted therapeutics in innate immune cells. In: *International Reviews of Immunology* 36 (2), S. 57–73. DOI: 10.1080/08830185.2016.1261318.
- Terheyden, Laura; Roider, Johann; Klettner, Alexa (2021): Basolateral activation with TLR agonists induces polarized cytokine release and reduces barrier function in RPE in vitro. In: *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie* 259 (2), S. 413–424. DOI: 10.1007/s00417-020-04930-2.
- 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.
- Treumer, F.; Klettner, A.; Baltz, J.; Hussain, A. A.; Miura, Y.; Brinkmann, R. et al. (2012): Vectorial release of matrix metalloproteinases (MMPs) from porcine RPE-choroid explants following selective retina therapy (SRT). Towards slowing the macular ageing process. In: *Experimental eye research* 97 (1), S. 63–72. DOI: 10.1016/j.exer.2012.02.011.
- Twentyman, P. R.; Luscombe, M. (1987): A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. In: *British journal of cancer* 56 (3), S. 279–285.

- Viviani, Barbara; Bartesaghi, Stefano; Corsini, Emanuela; Galli, Corrado L.; Marinovich, Marina (2004): Cytokines role in neurodegenerative events. In: *Toxicology letters* 149 (1-3), S. 85–89. DOI: 10.1016/j.toxlet.2003.12.022.
- Waseem, Mohammad; Sahu, Upasana; Salman, Mohd; Choudhury, Arnab; Kar, Sudeshna; Tabassum, Heena; Parvez, Suhel (2017): Melatonin pre-treatment mitigates SHSY-5Y cells against oxaliplatin induced mitochondrial stress and apoptotic cell death. In: *PloS one* 12 (7), e0180953. DOI: 10.1371/journal.pone.0180953.
- 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.
- Wong, Wan Ling; Su, Xinyi; Li, Xiang; Cheung, Chui Ming G.; Klein, Ronald; Cheng, Ching-Yu; Wong, Tien Yin (2014): Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. In: *The Lancet Global Health* 2 (2), e106-e116. DOI: 10.1016/S2214-109X(13)70145-1.
- Wörnle, Markus; Merkle, Monika; Wolf, Armin; Ribeiro, Andrea; Himmelein, Susanne; Kernt, Marcus et al. (2011): Inhibition of TLR3-mediated proinflammatory effects by Alkylphosphocholines in human retinal pigment epithelial cells. In: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52 (9), S. 6536–6544. DOI: 10.1167/iovs.10-6993.
- Xu, Heping; Dawson, Rosemary; Crane, Isabel J.; Liversidge, Janet (2005): Leukocyte diapedesis in vivo induces transient loss of tight junction protein at the blood-retina barrier. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 46 (7), S. 2487–2494. DOI: 10.1167/iovs.04-1333.
- Yang, Zhenglin; Stratton, Charity; Francis, Peter J.; Kleinman, Mark E.; Tan, Perciliz L.; Gibbs, Daniel et al. (2008): Toll-like receptor 3 and geographic atrophy in age-related macular degeneration. In: *The New England journal of medicine* 359 (14), S. 1456–1463. DOI: 10.1056/NEJMoa0802437.
- Zamiri, Parisa; Masli, Sharmila; Kitaichi, Nobuyoshi; Taylor, Andrew W.; Streilein, J. Wayne (2005): Thrombospondin plays a vital role in the immune privilege of the eye. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 46 (3), S. 908–919. DOI: 10.1167/iovs.04-0362.
- Zareparsari, Sepideh; Buraczynska, Monika; Branham, Kari E.H.; Shah, Sapna; Eng, Donna; Li, Mingyao et al. (2005): Toll-like receptor 4 variant D299G is associated with susceptibility to age-related macular degeneration. In: *Human molecular genetics* 14 (11), S. 1449–1455. DOI: 10.1093/hmg/ddi154.
- Zech, J. C.; Pouvreau, I.; Cotinet, A.; Goureau, O.; Le, Varlet B.; de, Kozak Y. (1998): Effect of Cytokines and Nitric Oxide on Tight Junctions in Cultured Rat Retinal Pigment Epithelium. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 39 (9). Online verfügbar unter <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9699549/>.

Zhang, Yan; Chioreso, Catherine; Schweizer, Marin L.; Abràmoff, Michael D. (2017): Effects of Aflibercept for Neovascular Age-Related Macular Degeneration. A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Comparative Studies. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 58 (13), S. 5616–5627. DOI: 10.1167/iovs.17-22471.

Zhao, Shan; Lan, Xiaowen; Wu, Jingyang; Yue, Song; Zhang, Han; Wu, Qiang et al. (2019): Protocol of global incidence and progression of age-related macular degeneration. A systematic review. In: *Medicine* 98 (10), e14645. DOI: 10.1097/MD.00000000000014645.

Zhou, Peng; Fan, Lei; Yu, Ke-Da; Zhao, Ming-Wei; Li, Xiao-Xin (2011): Toll-like receptor 3 C1234T may protect against geographic atrophy through decreased dsRNA binding capacity. In: *FASEB j.* 25 (10), S. 3489–3495. DOI: 10.1096/fj.11-189258.

Zhu, Y.; Dai, B.; Li, Y.; Peng, H. (2015): C5a and Toll-Like Receptor 4 Crosstalk in Retinal Pigment Epithelial Cells. In: *Molecular vision* 21. Online verfügbar unter <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26487798/>.

## 7. Anhang

### 7.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.: Histologischer Schnitt durch die Retina eines enukleierten menschlichen Bulbus in HE-Färbung .....	3
Abbildung 2: Untersuchungen des rechten Auges einer 79-jährigen Kieler Patientin mit geographischer Atrophie bei trockener AMD .....	7
Abbildung 3: Blut-Retina-Schranke .....	11
Abbildung 4: Darstellung der ableitenden Signalwege durch Stimulation der in dieser Arbeit untersuchten TLR-2, -3 und -4 .....	14
Abbildung 5: Lichtmikroskopische Photographie einer unbehandelten Primären RPE-Zellkultur auf einer Transwellplatte an Tag 22 kurz vor Stimulation .....	27
Abbildung 6: Organkulturmodell .....	28
Abbildung 7: Herstellung eines Organkulturringes .....	30
Abbildung 8: Einspannen des Organkulturringes in die Ussing-Kammer .....	31
Abbildung 9: Querschnitt durch ein Transwell mit Darstellung der STX2-Elektrode .....	33
Abbildung 10: Darstellung der Einzelwiderstände: parazellulärer Widerstand ( $R_p$ ), zellulärer Widerstand ( $R_c$ ) und Widerstand der Transwellmembran ( $R_m$ ) im RPE-Transwell-Modell ....	33
Abbildung 11: Schematische Darstellung zur Stimulation der RPE-Transwell-Platten .....	35
Abbildung 12: Schematische Darstellung eines Transwell-Filter-Systems während der 24-stündigen Inkubation .....	36
Abbildung 13: SH-SY5Y-Zellkultur in Neuromedium vor Stimulation .....	37
Abbildung 14: Calceinfärbungen.. .....	39
Abbildung 15: Zellviabilität der primären RPE-Zellen nach 24-stündiger Stimulation mit TLR-Agonisten .....	42
Abbildung 16: Transepithelialer Widerstand (TEER) der primären RPE-Zellen vor und nach 24-stündiger Stimulation mit TLR-Agonisten. ....	44
Abbildung 17: Immunfluoreszenzfärbung der primären RPE-Zellkulturen nach 24-stündiger Stimulation mit TLR-Agonisten. 20-fache Vergrößerung unter dem Immunfluoreszenz-Mikroskop. ....	45
Abbildung 18: Immunfluoreszenzfärbung der primären RPE-Zellkulturen nach 24-stündiger Stimulation mit TLR-Agonisten. 63-fache Vergrößerung unter dem Immunfluoreszenz-Mikroskop .....	46
Abbildung 19: Immunfluoreszenzfärbung der Organkulturen nach 24-stündiger Stimulation mit TLR-Agonisten. 20-fache Vergrößerung unter dem Immunfluoreszenz-Mikroskop .....	47
Abbildung 20: Immunfluoreszenzfärbung der Organkulturen nach 24-stündiger Stimulation mit TLR-Agonisten. 63-fache Vergrößerung unter dem Immunfluoreszenz-Mikroskop .....	48
Abbildung 21: Apikale und basale Sekretion des Zytokins TNF- $\alpha$ von primären RPE-Zellen nach 24-stündiger Stimulation mit TLR-Agonisten .....	49
Abbildung 22: Apikale und basale Sekretion des Zytokins IL-6 von primären RPE-Zellen nach 24-stündiger Stimulation mit TLR-Agonisten .....	50

Abbildung 23: Apikale und basale Sekretion des Zytokins IL-1 $\beta$ von primären RPE-Zellen nach 24-stündiger Stimulation mit TLR-Agonisten.....	51
Abbildung 24: Apikale und basale Zytokinsekretion von TNF- $\alpha$ der Organkulturen nach 24-stündiger Stimulation mit TLR-Agonisten.....	52
Abbildung 25: Apikale und basale Zytokinsekretion von IL-6 der Organkulturen nach 24-stündiger Stimulation mit TLR-Agonisten.....	53
Abbildung 26: Apikale und basale Zytokinsekretion von IL-1 $\beta$ der Organkulturen nach 24-stündiger Stimulation mit TLR-Agonisten.....	54
Abbildung 27: MTT-Assay der SH-SY5Y-Zellkulturen nach 24-stündiger Stimulation mit RPE-Überständen (RPE-ÜS) und zugehörigen Kontrollen .....	55
Abbildung 28: MTT-Assay der SH-SY5Y-Zellkulturen nach 24-stündiger Stimulation mit Organkultur-Überständen (OK-ÜS) und zugehörigen Kontrollen.....	56

## 7.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der Geräte und Instrumente mit Angabe des Namens und Firmensitzes des Herstellers .....	21
Tabelle 2: Auflistung der Chemikalien mit Angabe des Namens und Firmensitzes des Herstellers.....	23
Tabelle 3: Auflistung der Lösungen mit Angabe ihrer Zusammensetzung .....	24
Tabelle 4: Auflistung der Antikörper mit Angabe des Namens und Firmensitzes des Herstellers.....	25
Tabelle 5: Auflistung der ELISA-Kits mit Angabe des Namens und Firmensitzes des Herstellers.....	25
Tabelle 6: Auflistung der biologischen Materialien mit Angabe von Herkunftsstätte und -ort .....	25
Tabelle 7: Auflistung der Verbrauchsmaterialien mit Angabe des Namens und Firmensitzes des Herstellers .....	26

## 7.3. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertationsschrift mit dem Titel „Apikale Effekte bei basolateraler Aktivierung des retinalen Pigmentepithels vor dem Hintergrund der altersbedingten Makuladegeneration“ selbstständig verfasst, und keine, außer den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln, verwendet zu haben. Ich versichere, alles kenntlich gemacht zu haben, was aus Arbeiten Anderer unverändert oder mit Abänderungen entnommen wurde. Die Dissertation lag weder in dieser noch in einer anderen Fassung einer anderen Fakultät vor. Unterstützt und wissenschaftlich betreut wurde ich während dieser Arbeit durch Frau Prof. Dr. Alexa Klettner.

Flensburg, den 07.02.2022, Laura Terheyden



#### **7.4. Danksagung**

Zuerst möchte ich Herrn Prof. Dr. Roider für die Unterstützung meiner Arbeit, die Nutzung der Labore sowie die freundliche Genehmigung des Bildmaterials aus seiner Klinik für Ophthalmologie des UKSH Campus Kiel danken.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Alexa Klettner für das fesselnde und auf den Leib zugeschnittene Thema, die hervorragende motivierende und professionelle Betreuung und vor allem auch das Vertrauen in mich und die Freiheiten, durch die ich diese Arbeit und auch mich selbst weiterentwickeln konnte.

Außerdem danke ich allen wissenschaftlichen Mitarbeitern der Labore der Augenklinik, insbesondere Frau Serap Luick, Frau Katinka Winter und Herrn Philipp Dörschmann, für die großartige labortechnische Kompetenz, die ständige Erreichbarkeit und Hilfsbereitschaft, durch die diese Experimente erst möglich wurden.

Frau Dr. Hösel möchte ich für die Unterstützung bei der Photographie des histologischen Schnittes und Herrn Dr. Purtskhvanidze für die Hilfe bei der Suche nach dem klinischen Bildmaterial aus dieser Arbeit während meines Praktischen Jahres an der Augenklinik danken.

Bei Frau Dr. Vicki Wätzig und ihrer Arbeitsgruppe aus dem Institut für Pharmakologie möchte ich mich für die großzügige Leihgabe ihres TEER-Messgerätes und die Unterstützung bei den SH-SY5Y-Zellversuchen bedanken.

Schließlich möchte ich meinen Eltern für die finanzielle Unterstützung meines gesamten Studiums und den Glauben an mich und die erfolgreiche Fertigstellung dieser Arbeit danken, sowie auch meinen Geschwistern und Freunden, die mir treu über diese Zeit mit motivierenden Worten und Ratschlägen zur Seite standen.

## **7.5. Veröffentlichungen**

### **7.5.1. Zeitschriftenartikel**

**Laura Terheyden**, Johann Roider, Alexa Klettner. Basolateral activation with TLR agonists induces polarized cytokine release and reduces barrier function in RPE in vitro. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2020 Sep 19. doi: 10.1007/s00417-020-04930-2.

### **7.5.2. Kongressbeiträge**

Basolaterale Aktivierung mit TLR-Agonisten induziert eine polarisierte Ausschüttung von Zytokinen und einen Verlust der Barriere-Funktion im retinalen Pigmentepithel in vitro. Kurzvortrag als freier Beitrag für die Online-Mediathek auf dem Online-Kongress der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft (DOG) 2020.