

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

**Einfluss von Fucoidanen auf die Entzündungsantwort des retinalen
Pigmentepithels**

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

vorgelegt von
Tabea Sophie Thalenhorst
aus Bünde
Kiel 2024

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. Alexa Karina Klettner

2. Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. nat. Kirsten Hattermann-Koch

Tag der mündlichen Prüfung: 15.07.2025

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 09.05.2025

gez.: Prof. Dr. Alexa Karina Klettner

(Vorsitzende der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

1 Abkürzungsverzeichnis	III
2 Abbildungsverzeichnis	V
3 Tabellenverzeichnis	VII
4 Einleitung	1
4.1 Anatomie des Auges	1
4.2 Das retinale Pigmentepithel	2
4.2.1 Anatomie des retinalen Pigmentepithels	2
4.2.2 Funktionen des retinalen Pigmentepithels	2
4.3 Entzündungsmediatoren	5
4.4 Altersabhängige Makuladegeneration (AMD)	7
4.4.1 Bedeutung, Klinik, Pathogenese und Therapie der altersbedingten Makuladegeneration	7
4.4.2 Einfluss von Zytokinen auf die altersbedingte Makuladegeneration (AMD)	9
4.4.3 Behandlung der altersbedingten Makuladegeneration	12
4.5 Fucoidane	13
4.5.1 Aufbau und Funktion von Fucoidanen	13
4.5.2 Bioaktivität von Fucoidanen	13
4.5.3 Fucoidane bei der altersbedingten Makuladegeneration	14
4.6 Fragestellung und Zielsetzung	15
5 Material und Methoden	17
5.1 Material	17
5.1.1 Chemikalien und Reagenzien	17
5.1.2 Puffer und Kulturmedien	18
5.1.3 Geräte und Labormaterial	18
5.1.4 Verbrauchsmaterialien	19
5.1.5 Software	19
5.1.6 Algenextrakte	20
5.2 Methoden	20
5.2.1 Präparation von retinalen Pigmentepithel-Zellen aus Schweineaugen	20
5.2.2 Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands	21
5.2.3 Stimulation der retinalen Pigmentepithelzellen	22
5.2.4 <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA)	24
5.2.5 Bestimmung der metabolischen Aktivität der retinalen Pigmentepithel-Zellen mittels Tetrazolium-Test	24
5.2.6 Statistische Auswertung	26

6 Ergebnisse	27
6.1 Zellviabilität und Zytokinproduktion im unpolaren Zellmodell	27
6.1.1 Etablierung mit der Referenzsubstanz	27
6.1.2 Stimulation mit Extrakten der Spezies <i>Laminaria hyperborea</i> und <i>Saccharina latissima</i>	33
6.2 Zellviabilität, Barriere und Zytokinproduktion im polaren Zellmodell	49
6.2.1 Etablierung mit der Referenzsubstanz	49
6.2.2 Stimulation mit Extrakten der Spezies <i>Laminaria hyperborea</i> und <i>Saccharina latissima</i>	58
7 Diskussion	62
7.1 Diskussion der Methoden	62
7.2 Einfluss von Fucoidanen auf die Barrierefunktion des RPE	62
7.3 Einfluss von Fucoidanen auf die Zellviabilität des RPE	64
7.4 Einfluss von Fucoidanen auf die Entzündungsantwort des RPE	66
8 Zusammenfassung	70
9 Literaturverzeichnis	72
10 Anhänge	91
10.1 Grafiken und Tabellen	91
11 Danksagung	92
12 Erklärung zum selbstständigen Verfassen der Arbeit	93
13 Veröffentlichungen	94
13.1 Kongressbeiträge	94
13.2 Publikationen	94

1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AMD	altersbedingte Makuladegeneration
CNV	choroidale Neovaskularisationen
DAMPs	<i>Damage-associated molecular patterns</i> , dt.: Schaden-assoziierte molekulare Muster
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> , dt.: fetales Rinderserum
F.v.	<i>Fucus vesiculosus</i>
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
HRP	<i>Streptavidin-Horseradish peroxidase</i> , dt.: Streptavidin-Meerrettich Peroxidase
IFN	Interferon
IL	Interleukin
JAK	Januskinase
L.h.	<i>Laminaria hyperborea</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MAP	<i>mitogen-activated protein kinases</i> , dt.: mitogen-aktiviertes Protein
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MyD88	<i>myeloid differentiation factor 88</i>
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer'</i> of activated B-cells
Nr.	Nummer
Pam	Pam2CysSerLys4
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i> , dt.: Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PEDF	<i>Pigment epithelium-derived factor</i>
Pe/St	Penicillin/Streptomycin

Poly I:C	Polyinosinsäure:Polycytidylsäure
RPE	retinales Pigmentepithel
S.l.	<i>Saccharina latissima</i>
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i> , dt.: Signalwandler und Aktivatoren der Transkription
TEER	transepithelialer elektrischer Widerstand
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF-α	Tumornekrosefaktor- α
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> , dt.: vaskulär endothelialer Wachstumsfaktor
ZNS	zentrales Nervensystem
zVg.	zur Verfügung gestellt

2 Abbildungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

1	Aufbau des Auges	1
2	Funktionen des RPE	3
3	Funktion von Zytokinen an Toll-like-Rezeptoren	5
4	Pathogenese der AMD	7
5	Versuchsübersicht	16
6	RPE-Zellen 14 Tage nach Aussaat in 100-facher Vergrößerung	23
7	Funktionsweise des Tetrazolium-Tests	25
8	Zellviabilität von RPE-Zellen nach ein-, drei-, sieben- und 28-tägiger Stimulation mit F2, LPS, Poly I:C, TNF- α und Pam	28
9	Lichtbilder von RPE-Zellen nach 28-tägiger Stimulation mit F2, LPS, Poly I:C, TNF- α oder Pam	28
10	IL-6-Ausschüttung von RPE-Zellen nach ein-, drei-, sieben-, 14-, 21- und 28-tägiger Stimulation mit F2, LPS, Poly I:C, TNF- α oder Pam	30
11	IL-8-Ausschüttung von RPE-Zellen nach ein-, drei-, sieben-, 14-, 21- und 28-tägiger Stimulation mit F2, LPS, Poly I:C, TNF- α oder Pam	32
12	TNF- α -Ausschüttung von RPE-Zellen nach eintägiger Stimulation mit F2, LPS, Poly I:C und Pam	33
13	Zellviabilität von ausgewählten Extrakten im unpolaren Zellmodell	34
14	IL-6-Ausschüttung von RPE-Zellen nach ein-, drei-, sieben-, und 28-tägiger Stimulation mit E81, LPS, Poly I:C, TNF- α und Pam	36
15	IL-6-Ausschüttung von RPE-Zellen nach ein-, dreitägiger Stimulation mit E93, LPS, Poly I:C, TNF- α und Pam	37
16	IL-6-Ausschüttung von RPE-Zellen nach ein-, drei-, sieben-, und 28-tägiger Stimulation mit E112, LPS, Poly I:C, TNF- α und Pam	38
17	IL-6-Ausschüttung von RPE-Zellen nach ein- und dreitägiger Stimulation mit E125, LPS, Poly I:C, TNF- α und Pam	39
18	IL-6-Ausschüttung von RPE-Zellen nach ein-, drei-, sieben-, und 28-tägiger Stimulation mit E126, LPS, Poly I:C, TNF- α und Pam	40
19	IL-6-Ausschüttung von RPE-Zellen nach ein-, drei-, sieben-, und 28-tägiger Stimulation mit E127, LPS, Poly I:C, TNF- α und Pam	41
20	IL-8-Ausschüttung von RPE-Zellen nach ein-, drei-, sieben-, und 28-tägiger Stimulation mit E81, LPS, Poly I:C, TNF- α und Pam	42
21	IL-8-Ausschüttung von RPE-Zellen nach ein-, dreitägiger Stimulation mit E93, LPS, Poly I:C, TNF- α und Pam	43
22	IL-8-Ausschüttung von RPE-Zellen nach ein-, dreitägiger Stimulation mit E112, LPS, Poly I:C, TNF- α und Pam	44

23	IL-8-Ausschüttung von RPE-Zellen nach ein- und dreitägiger Stimulation mit E125, LPS, Poly I:C, TNF- α und Pam	44
24	IL-8-Ausschüttung von RPE-Zellen nach ein-, drei-, sieben-, und 28-tägiger Stimulation mit E126, LPS, Poly I:C, TNF- α und Pam	45
25	IL-8-Ausschüttung von RPE-Zellen nach ein-, drei-, sieben-, und 28-tägiger Stimulation mit E127, LPS, Poly I:C, TNF- α und Pam	47
26	TNF- α - Ausschüttung von RPE-Zellen nach eintägiger Stimulation mit E126, E127, LPS und Poly I:C	48
27	Zellviabilität von RPE-Zellen im polaren Zellmodell nach 28-tägiger Stimulation mit F2 und Entzündungsmediatoren:	49
28	Lichtbilder von RPE-Zellen im polaren Zellmodell nach 28-tägiger Stimulation mit F2, LPS, Poly I:C, TNF- α oder Pam	50
29	Barriere von F2 in Kombination mit LPS	51
30	Barriere von F2 in Kombination mit Poly I:C	52
31	Barriere von F2 in Kombination mit TNF- α	53
32	Barriere von F2 in Kombination mit Pam	54
33	Apikale IL-6-Ausschüttung von RPE-Zellen nach ein-, drei-, sieben-, 14-, 21- und 28-tägiger Stimulation mit F2, LPS, Poly I:C, TNF- α und Pam	55
34	Basale IL-6-Ausschüttung von RPE-Zellen nach ein-, drei-, sieben-, 14-, 21- und 28-tägiger Stimulation mit F2, LPS, Poly I:C, TNF- α und Pam	56
35	Apikale IL-8-Ausschüttung von RPE-Zellen nach ein-, drei-, sieben-, 14-, 21- und 28-tägiger Stimulation mit F2, LPS, Poly I:C, TNF- α und Pam	57
36	Basale IL-8-Ausschüttung von RPE-Zellen nach ein-, drei-, sieben-, 14-, 21- und 28-tägiger Stimulation mit F2, LPS, Poly I:C, TNF- α und Pam	58
37	Zellviabilität von ausgewählten Extrakten im polaren Zellmodell	59
38	Barriere von E112 mit TNF- α , E126 mit TNF- α und E127 in Kombination mit Poly I:C und TNF- α	60
39	Apikale und basale IL-6-Ausschüttung von RPE-Zellen nach dreitägiger Stimulation mit E112, E126, E127 und TNF- α	61
40	Apikale und basale IL -8-Ausschüttung von RPE-Zellen nach dreitägiger Stimulation mit E112, E126, E127 und TNF- α	61

3 Tabellenverzeichnis

Tabellenverzeichnis

1	Verwendete Chemikalien und Reagenzien	17
2	Verwendete Puffer und Kulturmedien	18
3	Verwendete Geräte und Labormaterial	18
4	Verwendete Verbrauchsmaterialien	19
5	Verwendete Software	19
6	Verwendete Algenextrakte	20
7	Chemische Eigenschaften der Fucoidane	20
8	Auftragsschema der 12-Transwell-Mikrotiterplatte	23
9	Auftragsschema der 24-Well-Mikrotiterplatte	24
10	Barriere von F2 und Entzündungsmediatoren in $\Omega * \text{cm}^2$	91
11	Barriere von E112, E126, E127 und Entzündungsmediatoren in $\Omega * \text{cm}^2$	91

4 Einleitung

4.1 Anatomie des Auges

Das Auge ist ein wichtiges Sinnesorgan des Menschen und dient vor allem der visuellen Wahrnehmung der Umwelt, wobei die Funktion der einer Filmkamera ähnelt. Der Bulbus des Auges kann in drei Schichten eingeteilt werden. Die äußere Schicht setzt sich aus der Sklera (dorsal) (Abbildung (Abb.) 1, Nummer (Nr.) 1) und Kornea (ventral) (Abb. 1, Nr. 2) zusammen [1, 2, 3]. Die Funktionen besteht aus der Druckaufrecht- und Formerhaltung des Auges. Die Kornea macht mit +43 Dioptrien den größten Anteil der Brechung des Lichtes aus [4]. Die Uvea setzt sich aus Choroidea (Abb. 1, Nr. 3), Iris (Abb. 1, Nr. 4) und Ziliarkörper (Abb. 1, Nr. 6) zusammen und liegt der Sklera nach innen hin auf [1]. Die Choroidea besteht vor allem aus Gefäßen, um damit der Blutversorgung der Retina zu dienen [5]. Im Zentrum der Iris befindet sich die Pupille (Abb. 1, Nr. 5), welche den Lichteinfall auf die Netzhaut reguliert [1, 2]. Der Ziliarkörper (Abb. 1, Nr. 6) sezerniert Kammerwasser und kann durch seine Verbindung mit der Linse über Zonulafasern (Abb. 1, Nr. 7) die Akkommodation steuern [1, 2]. Die innerste Schicht, die Netzhaut (Abb. 1, Nr. 8), welche aus ungefähr 55 verschiedenen Zelltypen besteht, wird in ein einschichtiges *Stratum pigmentosum* (retinales Pigmentepithel) und in ein mehrschichtiges *Stratum nervosum* aufgeteilt, wobei die verschiedenen Schichten in einem wichtigen engen Zusammenhang stehen [1, 6]. Die Aufgaben des *Stratum pigmentosum* werden in folgendem Abschnitt 4.2 näher beschrieben. Das zehnschichtige *Stratum nervosum* besteht aus Nervenzellen, welche das einfallende Licht in elektrochemische Signale umwandeln [3, 5, 7]. Die visuellen Informationen werden in Form von Lichtenergie aufgenommen [7, 8]. Diese Lichtenergie führt zu einer Änderung des Membranpotentials in den Photorezeptoren, welche als Folge dessen Neurotransmitter ausschütten [7, 8]. Die Photorezeptoren können in Stäbchen und Zapfen eingeteilt werden, wobei die Stäbchen vor allem eine hohe Lichtempfindlichkeit aufweisen und daher beim Sehen bei sehr schwachen Lichtverhältnissen aktiviert werden [8, 9]. Jedoch können Stäbchen, anders als die Zapfen, nicht die verschiedenen Wellenlängen von Licht unterscheiden [8]. Daher dienen nur die Zapfen, nicht die Stäbchen der Farbwahrnehmung [7, 8]. Im Bereich des gelben Flecks (Macula lutea), welche sich temporal des Austritts des Nervus opticus befindet, liegt der Bereich des schärfsten Sehens, da dort vor allem Zapfenzellen lokalisiert sind und diese in einem eins zu eins Verhältnis auf Bipolar- und Ganglienzellen umgeschaltet sind [1].

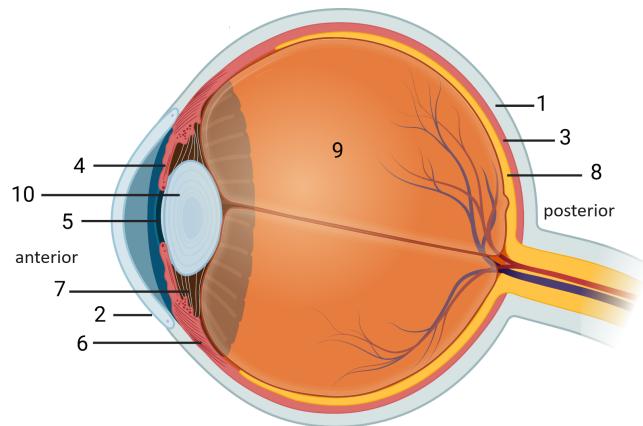


Abbildung 1: Aufbau des Auges

Nr. 1: Sklera; 2: Kornea; 3: Choroidea; 4: Iris; 5: Pupille; 6: Ziliarkörper; 7: Zonulafasern; 8: Netzhaut; 9: Glaskörper; 10: Linse.

Abbildung gestaltet mit Biorender.com.

In Richtung der Peripherie ändert sich das Verhältnis zu Gunsten der Stäbchen [1]. Die visuelle Information gelangt von den Photorezeptoren mittels Glutamat als Neurotransmitter an Bipolarzellen, wobei eine Modulation zwischen diesen beiden Zellen durch Horizontalzellen vorgenommen wird [1, 8]. Über modulierende Amakrinzellen wird die Information an Ganglionenzellen und von dort weiter zur Sehrinde im Gehirn geleitet, wo schließlich ein Bild generiert und bewertet wird [8]. Das Augeninnere wird vom Glaskörper (Abb. 1, Nr. 9) ausgefüllt, welcher zum größten Teil aus Wasser besteht und der Stabilität dient [1]. Die Linse (Abb. 1 Nr. 10) befindet sich am vorderen Teil des Glaskörpers, hinter der Iris und ist für die Brechung des Lichtes und somit für das scharfe Sehen verantwortlich [1].

4.2 Das retinale Pigmentepithel

4.2.1 Anatomie des retinalen Pigmentepithels

Das retinale Pigmentepithel (RPE) (*Stratum pigmentosum*) bildet zusammen mit dem *Stratum nervosum* die Retina, dem Ort im Auge, an dem das gesehene Bild in elektrochemische Signale umgewandelt und an das Gehirn weitergeleitet wird (siehe Abschnitt 4.1) [1]. Das RPE ist ein einschichtig kubisches Epithel, welches der Bruch-Membran aufsitzt [1, 10]. Apikal weisen die Zellen zahlreiche Mikrovilli und Microplicae, schmale Auffaltungen der Zellmembran, zur Oberflächenvergrößerung auf [1, 10]. Die Zellen sind untereinander durch Tight-, Adherens- und Gap Junctions verbunden und bilden so die Blut-Retina-Schranke, wodurch alle Stoffe, welche zwischen den Blutgefäßen und den Photorezeptoren ausgetauscht werden, die RPE-Schicht passieren müssen [1, 10, 11]. Durch die Position der RPE-Zellschicht im Auge zwischen Retina und der Choroidea und durch ihre verminderte Stoffdurchlässigkeit entsteht ein elektrochemischer Gradient über das Epithel. Zum Zeitpunkt der Geburt sind bereits alle Pigmentepithelzellen vollständig ausgebildet, weshalb sich diese nicht mehr teilen, jedoch kann reaktiv eine mitotische Aktivität ausgelöst werden, die zu einer Zellteilung führt [12]. Eine weitere Besonderheit ist die proliferative und metaplastische Aktivität auf endogene oder exogene Reize hin. [12]. Aufgrund der hohen Anzahl an basolateral gelegenen Mitochondrien kann den Zellen eine hohe metabolische Aktivität zugeschrieben werden [10, 12].

4.2.2 Funktionen des retinalen Pigmentepithels

Das retinale Pigmentepithel weist eine Vielzahl von Funktionen auf. Die wichtigsten Funktionen werden in Abbildung 2 dargestellt und im Folgenden ausgeführt.

Absorption von Licht (Abb. 2, Nr. 1): RPE-Zellen enthalten den Pigmentfarbstoff Melanin, welcher der Verhinderung von Lichtreflexion und damit dem Schutz der Photorezeptoren vor Streulicht dient [1, 10, 13]. Des Weiteren wird durch das Melanin viel Energie absorbiert, die durch Photooxidation zu Radikalproduktion und dadurch zu oxidativem Stress führen würde [13]. Die Bildung von Radikalen entsteht durch die hohe Lichtenergie auf der Photorezeptorseite und einem hohen Sauerstoffangebot auf der gut durchbluteten Choriokapillarseite [13]. Dieses kann durch lange Akkumulation dieser schädlichen Stoffe und durch Destabilisierung in-

trazellulärer Membrankompartimente wie Lysosomen und Mitochondrien zur Schädigung der RPE-Zellen führen [13]. Alles Genannte kann als eine mögliche Ursache in der Entstehung der altersbedingte Makuladegeneration (AMD) angesehen werden [14].

Epithelialer Transport (Abb. 2, Nr. 2): Der Stoffaustausch zur Retina wird reguliert, indem der Transport transzellulär, bei gleichzeitig parazellulärer Impermeabilität, erfolgt [13]. In die Richtung vom Blutgefäß zu den Photorezeptoren werden vor allem Nährstoffe, wie Glucose, Retinol und Fettsäuren transportiert [13]. Das transportierte Retinol unterstützt zusätzlich das Auffüllen der Speicher der Lichtsinneszellen zusätzlich zur Wiederaufbereitung durch die RPE-Zellen, wobei ein Versagen dieser Funktion zu einem Mangel und damit zu retinaler Degeneration führen kann [13]. Von den Photorezeptoren zur Choriokapillaris werden vor allem metabolische Endprodukte, Wasser und Laktat transportiert [10, 15]. Wasser und Laktat wird als Folge des großen Stoffwechselumsatzes in Neuronen und Photorezeptoren in der Netzhaut produziert [10, 15]. RPE transportiert Laktat und Wasser mittels eines Cotransporters aus dem subretinalen Raum zur basolateralen Seite und verhindert somit, dass sich Flüssigkeit subretinal ansammelt [10, 15].

Retinazyklus (Abb. 2, Nr. 3): Fällt Licht auf die Stäbchen und Zapfen in der Retina, wird das in den Außensegmenten der Photorezeptorzellen enthaltene 11-cis-Retinal in all-trans-Retinal umgeformt [13, 16, 17]. Für eine erneute Aktivierung muss dieses wieder zu 11-cis-Retinal umgewandelt werden [13]. Die Photorezeptoren besitzen anders als die RPE-Zellen keine cis-trans-Isomerase, wodurch all-trans-Retinal für die Umformung zum RPE transportiert werden muss [13]. Das all-trans-Retinal wird in den Photorezeptorzellen zu all-trans-Retinol reduziert und daraufhin zum RPE transportiert [16, 17]. Dort schließt sich eine Kaskade aus Reaktionen mit verschiedenen Enzymen an, die das all-trans-Retinol wieder zu 11-cis-Retinal umformen, welchen wieder zu den Photorezeptoren transportiert werden und erneut durch Photonen aktiviert werden kann [13, 17].

Phagozytose (Abb. 2, Nr. 4): RPE-Zellen zeigen unter allen Zellen die höchste Phagozytoseaktivität im menschlichen Körper [18, 19]. Sie phagozytieren unter anderem die Spitzen der distalen äußeren Photorezeptorsegmente, was täglich morgens nach dem ersten Lichteinfall

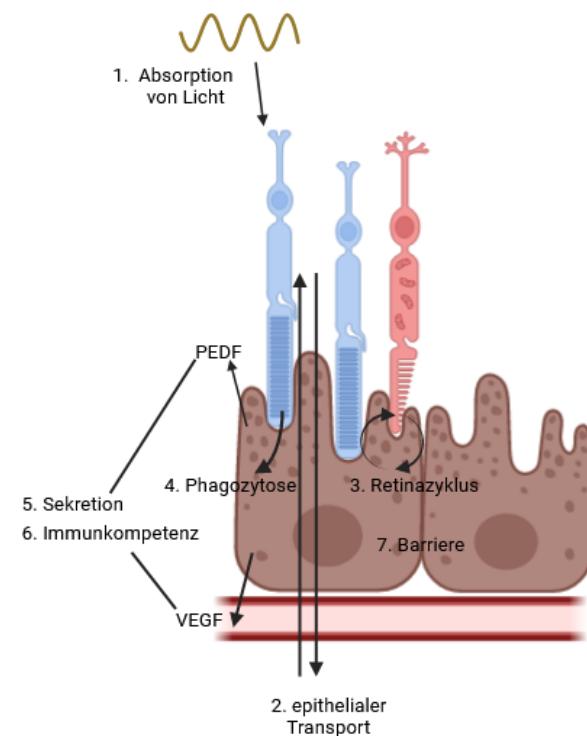


Abbildung 2: Zusammenfassung der Funktionen des retinalen Pigmentepithels

Zu den Funktionen des retinalen Pigmentepithels zählen 1. Absorption von Licht, 2. Epithelialer Transport, 3. Retinazyklus, 4. Phagozytose, 5. Sekretion von u.a. *Vascular endothelial growth factor*, dt.: vaskulär endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF) und *Pigment epithelium-derived factor* (PEDF), 6. Immunkompetenz. Abbildung gestaltet mit Biorender.com

geschieht [13, 18, 19, 20]. Die distalen Außensegmente werden phagozytiert, metabolisiert und schließlich zu der Choriokapillaris abtransportiert [13].

Sekretorische Aktivität (Abb. 2, Nr. 5): Weitere wichtige Funktionen der RPE-Zellen sind die Bildung von Wachstumsfaktoren und immunsuppressiver Faktoren, wie z.B. Fibroblasten Wachstumsfaktor, *Vascular endothelial growth factor*, dt.: vaskulär endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF), *Pigment epithelium-derived factor* (PEDF) und Interleukine [10]. Diese dienen der Erhaltung und Stabilität der Photorezeptoren, des Endothels der Kapillaren und der Immunmodulation [10]. PEDF dient vor allem der Strukturerhaltung der Photorezeptoren und wirkt daher antiapoptotisch [13, 21]. VEGF wird im Gegensatz zu PEDF stärker in Richtung der Choriokapillarseite ausgeschüttet und dient der Strukturerhaltung der Endothelzellen [13, 22]. In höheren Konzentrationen kann es die Ausbildung von Neovaskularisationen befördern, was zur Entstehung einer AMD beitragen kann [13, 22]. Die Sekretion durch die RPE-Zellen erfolgt parakrin (Wirkung auf benachbarte Zelle) oder autokrin (Wirkung auf die sekretorische Zelle selbst) [13].

Immunkompetenz (Abb. 2, Nr. 6): RPE-Zellen spielen eine entscheidende Rolle vor allem bei der angeborenen Immunität in der Retina [23]. Durch Zytokinproduktion, Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren (TLR), Komplementaktivierung und Antigenpräsentation werden die retinale Immunität und Autoimmunität gesteuert [23]. Näher auf die Rolle von Zytokinen und Toll-like-Rezeptor (TLR) wird in Abschnitt 4.3 eingegangen.

Barrierefunktion (Abb. 2, Nr. 7): Den wichtigsten Beitrag zur Diffusionsbarriere und Aufrechterhaltung eines transepithelialen Konzentrationsgradienten leisten Tight Junctions [24]. Diese bestehen aus Adhäsionsmolekülen wie verschiedenen Claudinen, Occludin und JAM (*junctional adhesion molecule*, dt. junktionales Adhäsionsmolekül) [24]. Diese Adhäsionsmoleküle werden zytoplasmatisch von weiteren Proteinen wie Afadin (AF)-6 und Zonula occludens-1 befestigt [24]. Bei RPE-Zellen liegt, im Unterschied zu anderen Zellen, die Natrium-Kalium-Pumpe in der apikalen, der Retina zugewandten Membran [25]. Diese Pumpe befördert drei Natrium Ionen aus der Zelle und zwei Kalium Ionen in die Zelle hinein. Dieses dient sowohl der Aufrechterhaltung des elektrochemischen Gradienten als auch der Bereitstellung von Natriumionen, welche für die Signaltransduktion in der Retina gebraucht wird [25]. Durch Tight Junctions zwischen den RPE-Zellen wird so eine positive elektrische Potentialdifferenz zwischen apikalen und basalen Zellpol geschaffen [26]. Es konnte gezeigt werden, dass die Stimulation mit dem TLR-4-Agonisten Lipopolysaccharid (LPS), dem TLR-3-Agonisten Polyinosinsäure:Polycytidylsäure (Poly I:C) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) die Barriere von RPE-Zellen negativ beeinflussen kann [27, 28, 29, 30]. Die Störung der Blut-Retina-Schranke ist ein wichtiger Faktor bei der Pathogenese der AMD, sodass angenommen werden kann, dass Entzündungsprozesse durch ihren negativen Einfluss auf die Barrierefunktion der RPE-Zellen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der AMD spielen, indem sie die Einfluss auf die Tight Junctions nehmen [27, 31, 32]. Die Barrierefunktion ist entscheidend an der Regulierung des Austausches von Stoffen zwischen der Choroidea und den Lichtsinneszellen als auch beim Schutz der Netzhaut vor dem Eindringen von Zytokinen aus dem Blutkreislauf beteiligt [33, 34]. Zudem wurde auch festgestellt, dass es durch Wachstumsfaktoren wie VEGF

und *Platelet-derived growth factor* (PDGF) zu einer Veränderung der Protein Zusammensetzung von Tight Junctions kommt und so die Zellpermeabilität erhöht wird, was eine weitere Säule in der Pathogenese der AMD darstellen kann [35].

4.3 Entzündungsmediatoren

Entzündungsmediatoren sind Stoffe verschiedenster Ursprungs, die Entzündungsreaktionen im Körper einleiten können. Dazu zählen unter anderem Lipopolysaccharid (LPS), Polyinosinsäure:Polycytidylsäure (Poly I:C), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Pam2Cys-SerLys4 (Pam), wobei LPS und TNF- α natürlicher Weise im Körper vorkommen und Poly I:C und Pam synthetisch hergestellt werden. Das Bindungsverhalten und die Funktionen der Zytokine sind in Abbildung 3 dargestellt.

LPS ist ein großes Lipopolysaccharid und integraler Bestandteil der äußeren Membran von gram-negativen Bakterien, welches nach deren Lyse freigesetzt wird [36, 37, 38]. Es für die Aufrechterhaltung der Barrierefunktion der äußeren Zellmembran und der Wechselwirkungen zwischen Bakterium und Umwelt verantwortlich [37]. LPS besteht aus den drei Anteilen Lipid A (der Hauptvirulenzfaktor), Kern-Polysaccharidregion und O-spezifischen Seitenketten und kann als *Pathogen-associated molecular patterns*, dt.: Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMP) als Bestandteil in gram-negativen Bakterien durch Bindung an den TLR-4 im menschlichen Körper eine Entzündung auslösen [36, 39, 40]. LPS ist beispielsweise als Bestandteil in gramnegativen Bakterien maßgeblich an der Entstehung eines septischen Schocks beteiligt [41].

TLRs sind häufig als Transmembranproteine der äußeren und inneren Zellmembran von Zellen des angeborenen Immunsystems wie beispielsweise Makrophagen, Granulozyten und dendritischen Zellen, aber auch auf nicht-Immunzellen, wie Epithelzellen und Fibroblasten zu finden [42]. Die TLR-1, -2, -4, -5, -6 und -11 sind eher in der äußeren Zellmembran lokalisiert und erkennen vor allem mikrobielle Membranbestandteile wie Lipide, Lipoproteine und Proteine [41]. Die TLR-3, -7, -8 und -9 sind eher intrazellulär zu finden und erkennen mikrobielle Desoxyribonukleinsäure (DNA) [41]. Als wichtigstes Mikrobensensorsystem erkennen die TLRs Moleküle, die von Bakterien, Pilzen und Viren stammen [43]. Neben der Erkennung von

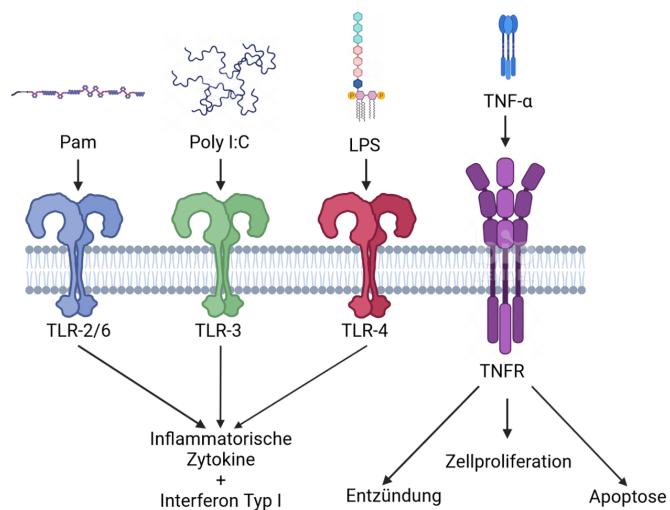


Abbildung 3: Funktion von Zytokinen an Toll-like-Rezeptoren

Pam2CysSerLys4 (Pam) bindet über den membranständigen Toll-like-Rezeptor (TLR)-2 und -6, Polyinosinsäure:Polycytidylsäure (Poly I:C) an TLR-3 und Lipopolysaccharid (LPS) an TLR-4. Dieses führt zur Bildung proinflammatorischer Zytokine und Typ-I-Interferone. Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) bindet an den TNF-Rezeptor (TNFR), was zur Bildung proinflammatorischer Zytokine, Apoptose und Zellproliferation führt. Abbildung gestaltet mit Biorender.com.

PAMPs interagieren einige TLRs auch mit endogenen, aus geschädigten oder toten Zellen freigesetzten Molekülen, welche als DAMPs (*Damage-associated molecular patterns*) bezeichnet werden [44]. Dazu zählen unter anderem einige Proteine, Polysaccharide, Nukleinsäuren, Phospholipide und Abbauprodukte der extrazellulären Matrix [44]. TLRs induzieren die Transkription von proinflammatorischen Mediatoren (Zytokine, chemotaktische Stoffe, antimikrobielle Peptide), was zu einer Entzündungsreaktion, Geweberegeneration aber auch Entwicklung von Autoimmunerkrankungen führen kann [42, 43, 44]. Über die Aktivierung des *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer'* of activated B-cells (NF- κ B)-Signalweges regulieren die TLRs Immunantwort, Zellproliferation und Zelltod [42]. In RPE-Zellen werden die TLR-1–7, TLR-9 und TLR-10 exprimiert [45]. Die Rolle der verschiedenen TLR ist bisher nicht vollständig geklärt. Jedoch konnten Klettner et al. aus einer systematischen Literaturrecherche herausfinden, dass vor allem die Aktivierung der TLR-2, -3 und -4 eine tiefergreifende proinflammatorische Reaktion in RPE-Zellen hervorrufen sowie zu Zelldegeneration und damit zur AMD-Entwicklung führen kann [45]. Daher wird die Aktivierung dieser TLR und der Einfluss von Fucoidanen auf die durch TLR ausgelöste Zytokinproduktion hinsichtlich eines möglichen therapeutischen Nutzens in dieser Arbeit untersucht.

Die Signalkaskade von TLR soll im Folgenden anhand des TLR-4 durch Bindung von LPS dargestellt werden:

Die Aktivierung des TLR-4 durch **LPS** führt zur Transkription von NF- κ B, Aktivator Protein 1 (AP-1) und Interferon regulierenden Faktoren (IRFs) [39]. Dieses hat eine Initiierung der Transkription von proinflammatorischen Zytokinen und Typ-I-Interferonen zur Folge [39, 46]. Infolge einer Liganden-induzierte Dimerisierung des TLR-4 werden intrazelluläre Signalwege und dadurch entweder der *myeloid differentiation factor 88* (MyD88)-abhängige oder -unabhängige Signalweg ausgelöst, wobei ersterer der häufiger angesteuerte Signalweg ist [47]. Durch den MyD88-abhängigen Signalweg werden weitere Kaskaden durchlaufen, was zu Aktivierung und Translokation von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B und AP-1 (Aktivierendes Protein 1) und damit zur Produktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α , Interleukin (IL)-6 und IL-1- β , Vasodilatation und einer erhöhten Zellpermeabilität führt [47]. Der Körper reagiert darauf mit dem klassischen Entzündungssymptomen wie Fieber, Rötung, Schwellung, Schmerzen, Überwärmung und einer eingeschränkten Funktion. Durch den MyD88-unabhängigen Signalweg werden Transkriptionsfaktoren im Zellkern aktiviert, was die Produktion von Typ-I-Interferonen induziert [47]. Neben Mikroglia- und Ganglionzellen reagieren auch RPE-Zellen auf den Stimulus mit LPS, was zu einer IL-6 und IL-8 Produktion führen kann [48].

Poly I:C ist eine synthetisch hergestellte dsRNA (*double-stranded ribonucleic acid*, dt. doppelsträngige Ribonukleinsäure) [46, 49, 50]. Durch die Wirkung als TLR-3 Agonist führt es ähnlich wie TLR-4-Agonisten über den NF- κ B-Signalweg zur Transkription proinflammatorischer Zytokine wie Interferon (IFN)- β , IL-6, und -8 in RPE-Zellen und damit zu einer Entzündungsantwort [46, 49, 50, 51, 52, 53]. Außerdem kann durch die Aktivierung von TLR-3 durch den Agonisten Poly I:C der Zelltod über den *c-Jun N-terminal kinase* (JNK)-Signalweg eingeleitet werden [50]. Klettner et al. konnten zudem eine *mitogen-activated protein kinases*, dt.: mitogen-aktiviertes Protein (MAP)-Kinase-unabhängige Erhöhung der VEGF-Ausschüttung von RPE-

Zellen im Kurzzeitversuch feststellen, wie sie auch bei der feuchten AMD zu finden ist [50]. Das synthetische Lipopeptid **Pam** agonisiert TLR-2 und TLR-6 und kann damit die Ausschüttung von IL-6, IL-8, IL-1- β und TNF- α in RPE-Zellen stimulieren [45, 54]. Die Kostimulation von TLR-2 und TLR-6 führt wie auch bei TLR-3 und TLR-4 zur Transkription der Gene für Interferone der Familie I und über den NF- κ B-Signalweg zur Zytokinproduktion [46, 55]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass durch die Aktivierung des TLR-2 Tight Junctions zwischen den RPE-Zellen gestört werden können, was sich negativ auf die Barrierefunktion auswirken kann [27, 45].

TNF- α wurde 1975 das erste mal als Zytokin beschrieben, welches das Immunsystem stimuliert, zytotoxisch wirkte und damit eine Tumornekrose verursachte [56]. Das Zytokin bindet an den TNF-Rezeptor, welcher sowohl löslich als auch membrangebunden vorliegen kann [57]. Es gibt zwei verschiedene Rezeptoren für TNF- α , wobei TNF-Rezeptor 1 die Hauptrolle zukommt und TNF-Rezeptor 2 die Wirkung von TNF-Rezeptor 1 verstärkt [57]. Grundsätzlich können drei Signalwege durch Aktivierung des Rezeptors stimuliert werden: 1. Apoptose, 2. Zellproliferation und 3. Entzündung [57]. Der Zelltod erfolgt über die Aktivierung von Caspassen [58]. Die Zellproliferation und Produktion von inflammatorischen Zytokinen läuft über die Aktivierung des NF- κ B-Signalweges oder des MAP-Kinase-Signalweges ab [58]. Die Funktionen von TNF- α am RPE werden in Abschnitt 4.4.2 genauer erläutert.

Die durch TLR-Aktivierung sowohl entstehende proinflammatorische und proangiogene Zytokinsekretion im RPE als auch die Induktion des Zelltodes in RPE- und Endothelzellen kann eine wichtige Rolle in der Entstehung der AMD spielen [45].

4.4 Altersabhängige Makuladegeneration (AMD)

4.4.1 Bedeutung, Klinik, Pathogenese und Therapie der altersbedingten Makuladegeneration

Die AMD ist weltweit für 8,7 % der Erblindungen verantwortlich und ist in den Industrienationen die häufigste Erblandungsursache [59]. Für das Jahr 2020 wird die Prävalenz der AMD auf 196 Millionen Menschen (10-13 % der Menschen über 65 Jahre) geschätzt, bis zum Jahr 2040 wird mit bis zu 288 Millionen betroffenen Menschen gerechnet [59, 60].

Durch diese Erkrankung wird die Gesellschaft vor ein großes medizinisches, gesellschaftliches und ökonomisches Problem gestellt. Pro Jahr werden alleine in Deutschland mit volkswirtschaftlichen Kosten durch die AMD von mehr als 300 Millionen Euro gerechnet [61].

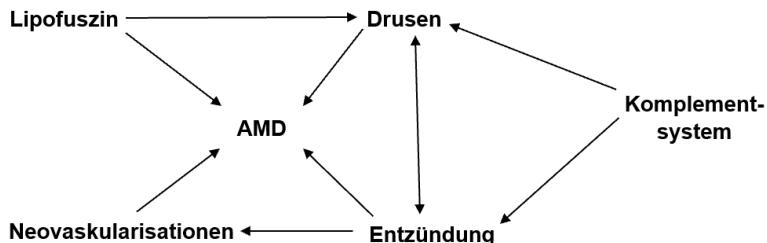


Abbildung 4: Pathogenese der AMD: Lipofuszin, Drusen, Entzündung, Aktivierung des Komplementsystems und Neovaskularisationen sind wichtige Faktoren bei der Pathogenese der altersbedingte Makuladegeneration (AMD). Diese Pathogenese der AMD wird in Abschnitt 4.4.1) weiter ausgeführt. Abbildung gestaltet mit Biorender.com

Der Verlauf der AMD wird in eine frühe, intermediäre und späte Form eingeteilt. Die frühe Form ist meist asymptomatisch. Im weiteren Verlauf beschreiben die Patienten die ersten Symptome oft mit einem Sehverlust in der Mitte des Gesichtsfeldes. Bei der späten Form wird in eine trockene und feuchte (exsudative) AMD unterschieden [62]. Die Mehrheit der Betroffenen (80 %) mit fortgeschritten AMD leiden an der trockenen Form, welche jedoch in die feuchte Form übergehen kann [63]. Bei der trockenen Form der AMD atrophieren das retinale Pigmentepithel, die Choroidiakapillaren und die Photorezeptoren [62, 63]. Die exsudative AMD ist gekennzeichnet durch choroidale Neovaskularisationen, die in die Retina eindringen, wodurch Flüssigkeit austreten und fibröse Narben entstehen [62, 63]. Patienten mit trockener AMD berichten häufig über ein Skotom, welches sich jahrelang vergrößert und vor allem das Lesen einschränkt [64]. Dagegen beschreiben Patienten mit einer feuchten AMD eine schnelle, über Wochen auftretende Verschlechterung der zentralen Sehschärfe [64]. Die Ursachen der AMD sind multifaktoriell. Es besteht starke Assoziation zwischen der Entstehung einer AMD mit Rauchen, Alter und familiärer Vorgeschichte [65]. Bei der Pathogenese der AMD spielen insbesondere vier Faktoren eine wichtige Rolle: Generierung von Lipofuszin (mit ihrer Verbindung zu oxidativem Stress), Drusogenese, lokale Entzündung und Neovaskularisation (bei der feuchten Form) [63, 66, 67].

Lipofuszin: RPE-Zellen sind für die retinalen Photorezeptoren von großer Bedeutung, da sie unter anderem am epithelialen Transport, am Retinazyklus und an der Phagozytose beteiligt sind (siehe Abschnitt 4.2.2). Zur Pathogenese der AMD zählt außerdem die altersabhängige phagozytotische Stoffwechselinsuffizienz der RPE-Zellen, was zu einer Akkumulation von Lipofuszin-Körnchen führt [63]. Die genaue Zusammensetzung von Lipofuszin ist bisher noch unbekannt, es wird jedoch davon ausgegangen, dass es sich um unvollständig abgebauten internalisierten Makromoleküle handelt, die aus oxidativ modifizierten Proteinen und Lipiden bestehen [68]. Die Hauptquelle dieser Lipofuszin-Granula stammt aus dem freien 11-cis-Retinal der äußeren Photorezeptorsegmente, welche sich im lysosomalen System der RPE-Zelle anreichern [68, 69]. Die Lipofuszin-Akkumulation in den RPE-Zellen nimmt mit dem Alter zu, da die Fähigkeit dieser Zellen, Zellabfälle zu entfernen, immer mehr beeinträchtigt wird [69, 70]. Als ein Hauptbestandteil von Lipofuszin gilt das Fluorophor A2E (N-Retinyl-N-Retinylidene Ethanolamin), welches ein Nebenprodukt des Sehzyklus ist und dessen Akkumulation mit der Entwicklung einer AMD assoziiert ist [70, 71]. Dieses A2E wird im Lipofuscin durch Photosensibilisierung aktiviert und kann zu oxidativem Stress, DNA-Schäden und Telomer-Verlust führen [70, 72]. Das wiederum kann über den NF- κ B-vermittelten Signalweg zur Schädigung von RPE-Zellen und damit zur Entstehung einer AMD führen [70]. Des Weiteren kann AE2 entzündungsfördernde Moleküle und VEGF hoch regulieren, die bei der Pathogenese der AMD eine wichtige Rolle spielen [73].

Drusen: Drusen sind extrazelluläre, zwischen RPE-Zellen und der inneren kollagenen Zone der Bruch-Membran befindliche Ablagerungen von Zelltrümmer [63, 74, 75]. Sie werden abhängig von ihrer Größe in harte, bzw. kleine Drusen (< 63 μ m), intermediäre (63 - 125 μ m) und weiche, bzw. große Drusen (> 125 μ m) eingeteilt [63, 74, 75]. Die kleinen harten Drusen haben im Gegensatz zu den weichen Drusen keinen Krankheitswert und sind bei 95 % der

älteren Bevölkerung zu finden [63, 76]. Vor allem depigmentierte weiche Drusen haben einen besonders hohen Krankheitswert für die Entstehung der AMD [63]. Drusen bestehen aus mehr als 120 von RPE-Zellen unverdauten Proteinen, welche die Bruch-Membran nicht passieren können, um von den Blutgefäßen abtransportiert zu werden [74]. Dieses stellt eine physikalische Barriere zwischen RPE-Zellschicht und Aderhaut dar, was den epithelialen Stofftransport und damit die Ernährung der RPE-Zellen und Photorezeptoren stört [74]. Neben der physikalischen Verschiebung der RPE-Zellschicht führen Drusen zur Aktivierung des Komplementsystems, Aktivierung des Immunsystems und damit zu einer lokalen Entzündung [63, 74, 77]. Durch den Entzündungsreiz werden vasoaktive Stoffe durch die Drusen stimuliert, was zu Neovaskularisationen und Blutungen führen kann [74]. Des Weiteren nimmt das Ausmaß an Photorezeptoranomalien durch die Drusenbildung zu, was zur Apoptose und damit Abnahme der Photorezeptorzeldichte führt [74].

Neovaskularisationen: Die Retina ist ein sehr stark durchblutetes Gewebe im menschlichen Körper [63]. Sie wird von zwei Blutgefäßsystemen versorgt: Bei den äußeren Schichten der Retina gelingt die Versorgung über Diffusion von der Aderhaut, während die inneren Schichten über die retinale Zentralarterie versorgt wird [63]. Normalerweise stehen proangiogene Faktoren wie beispielsweise VEGF und antiangiogene Faktoren wie PEDF im Gleichgewicht [63]. Durch Einfluss von Komponenten wie Sauerstoffmangel, oxidativem Stress und Zellen des Immunsystems, welche inflammatorischen Zytokinen bilden, kann die VEGF-Ausschüttung erhöht werden [63, 78, 79, 80]. Das hat die Bildung von sogenannten choroidale Neovaskularisationen (CNV) (Neubildungen von Gefäßen) zur Folge, welche einbluten können und damit dichte Makulanarben bilden können [63, 81]. Diese CNVs sind eine der Hauptursachen für den Sehverlust bei der AMD [63, 81].

4.4.2 Einfluss von Zytokinen auf die altersbedingte Makuladegeneration (AMD)

Zellen reagieren auf Beschädigung und Gefahr mit einer Entzündungsreaktion [82]. Diese soll das beschädigte bzw. fremde Material beseitigen und danach das Gewebe wiederherstellen [82]. Es gibt verschiedene Ursachen von Entzündungsreaktionen. Dazu gehören beispielsweise Fremdstoffe, mechanische Gewebsverletzungen und Autoantigene [67, 82, 83]. Aber auch oxidativer Stress kann eine Entzündung induzieren [67, 82, 83]. Die dafür verantwortlichen Zellen sind unter anderem Makrophagen, Mikroglia, dendritische Zellen, Kupferzellen, Granulozyten sowie auch Epithelzellen [82, 83, 84]. Kurzfristig, z.B. bei einer Infektion, kann diese Reaktion sehr positiv sein, langfristige Entzündungen haben jedoch schädigende Wirkungen [82]. Chronische Entzündungen entstehen durch die Wechselwirkungen von entzündungsfördernden und entzündungshemmenden Zytokinen [48, 83]. Im Auge hat das zur Folge, dass RPE- und Photorezeptorzellen degenerieren, CNV entstehen und Drusenbildung gefördert wird, was langfristig die AMD-Pathogenese fördern kann [63, 83, 85, 86]. Daher spielen inflammatorische Prozesse eine wichtige Rolle bei der Pathogenese, sowohl der trockenen als auch der feuchten AMD. RPE-Zellen sind im Besitz verschiedener zellassoziiierter Pathogenkennungsrezeptoren (PRRs) wie TLRs oder TNF- α -Rezeptoren zur Erkennung von endo-

genen und exogenen Pathogen- und Schadens-assoziierten molekularen Mustern PAMPs und *Damage-associated molecular patterns*, dt.: Schaden-assoziierte molekulare Muster (DAMPs), also Stoffe aus beschädigten Zellen, die das angeborene Immunsystem aktivieren [82, 87, 88]. Werden diese Rezeptoren durch ihren Liganden stimuliert, werden Entzündungsmediatoren produziert [82, 89]. Zu diesen gehören unter anderem die proinflammatorischen Zytokine und Chemokine wie IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IFN- β , TNF- α und VEGF [48, 83].

Zytokine und Chemokine sind Proteine, die verschiedene Reaktionskaskaden auslösen und somit eine Wachstums-, differenzierende und aktivierende Funktionen besitzen [89]. Jedes Zytokin kann, je nach Zielzelle, sehr unterschiedliche Aufgaben haben [89]. Im folgenden werden die Funktionen und die Rolle der einzelnen untersuchten Zytokine auf die AMD dargestellt.

Interleukin-1 β : IL-1 β ist ein potentes proinflammatorisches Zytokin, welches in Makrophagen, Monozyten, Granulozyten, dendritischen und Endothelzellen gebildet wird [90, 91, 92, 93]. Es spielt eine entscheidende Rolle bei der Abwehrreaktion gegen Infektionen und Verletzungen [90]. IL-1 β wird als inaktives Vorläuferprotein (pro-IL-1 β) als Reaktion auf PAMPs gebildet und durch die entzündungsfördernde Protease Caspase-1 gespalten, wodurch das aktive IL-1 β gebildet und aus der Zelle freigesetzt wird [90, 91, 94]. Es kann durch das Gewebe in die Blutbahn diffundieren und damit weiter entfernte Zellen erreichen [93]. Zu den wichtigsten Induktoren gehören mikrobielle Stoffe, die an TLR-bindet, aber auch verschiedene Zytokine, was dazu führt, dass mehrere hundert Gene transkribiert werden [93]. Zu den Funktionen gehören unter anderem die Induktion von IL-2, IL-6 und TNF- α , was weitere entzündungsfördernde Prozesse anregt (s.u.) [91, 93]. In RPE- und Müller-Zellen der Retina kann IL-1 β durch eine gesteigerte Zytokinproduktion Makrophagen rekrutieren, die zum Tod von RPE- und Photorezeptorzellen führen können [91, 95, 96]. Durch die Ansammlung weiterer Makrophagen können sich diese subretinal ablagern und somit zur Pathogenese der trockenen AMD beitragen [91]. Durch die Erhöhung der Prostaglandine ist dieses Zytokin auch an der Erhöhung der Körpertemperatur beteiligt [93, 97, 98, 99]. Das Gewebe wird durchlässiger für infiltrierende Leukozyten, wodurch diese schneller ihre Zielzellen erreichen und eine Entzündungsreaktion verursachen können [93]. In Augen von Patienten mit Netzhauterkrankungen wie der AMD können Mikroglia und Makrophagen gefunden werden, deren Rekrutierung und Migration mit einer erhöhten IL-1 β -Produktion und Komplementaktivierung verbunden ist, was zu fortschreitender Degeneration von Photorezeptoren führt [91]. Im Tiermodell konnte nachgewiesen werden, dass eine Fehlfunktion von IL-1 β mit Netzhautdegenerationen in Verbindung gebracht werden kann, da dieses Zytokin in photooxidativ geschädigten Netzhäuten hoch reguliert worden ist [91, 95, 96, 100].

Interleukin-6: IL-6 ist ein potentes proinflammatorisches Zytokin, welches von T-Lymphozyten, mononukleären Phagozyten, Fibroblasten und Zellen des zentrales Nervensystem (ZNS) gebildet wird [93]. Es wird als Reaktion auf eine Infektion, durch andere Zytokine wie IL-1 oder TNF- α und durch geschädigte Zellen bei nicht-infektiösen Entzündungen (DAMPs) ausgeschüttet [101, 102]. Durch Bindung von IL-6 an seinen membranständigen Rezeptor wird eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang gesetzt [103]. Durch Bindung dieses Komplexes an einen weiteren löslichen IL-6 Rezeptor kommt es durch intrazelluläre Phosphorylierung ei-

ner Janus-Kinase zur Aktivierung verschiedener, für die Immunreaktion wichtiger Signalwege [103]. Diese nachgeschalteten Signalwege umfassen die Aktivierung der *Signal transducer and activator of transcription* (STAT3) und der MAP-Kinase [104]. Diese Aktivierung führt zur Transkription unter anderem verschiedener Akute-Phase-Proteine [103]. Zu den Funktionen zählen die Förderung der Reifung von Makrophagen und Thrombozyten durch Stimulation von hämatopoetischen Stammzellen [93, 101, 105]. Vor allem bei inflammatorischen Prozessen spielt IL-6 eine große Rolle, z.B. als Wachstumsfaktor für B-Lymphozyten, wodurch sich diese zu Immunglobulin-produzierenden Plasmazellen umwandeln [93, 101]. Des Weiteren wird die Differenzierung von CD4+ T-Zellen gefördert, was die angeborene und erworbene Immunantwort miteinander verbindet [101]. Zudem fördert IL-6 die Differenzierung von folliculären T-Zellen und die Herstellung von IL-21, wodurch die Immunglobulinsynthese hoch reguliert wird [101]. Es konnte festgestellt werden, dass von retinalen Makrophagen produziertes IL-6 durch die Hochregulierung von VEGF-Rezeptoren die choroidale Angiogenese stimuliert und somit zur Pathogenese der AMD beiträgt [106, 107].

Interleukin-8: IL-8 ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches vor allem von Endothelzellen, Monozyten, Epithelzellen und Fibroblasten synthetisiert wird [108]. Die Bildung und Ausschüttung wird durch IL-1, IL-3, IL-6, TNF- α , IFN- γ , LPS und reaktiven Sauerstoffspezies gefördert [109]. Eine Hemmung findet durch IL-4 und IL-10 statt [110]. Die wesentlichen Funktionen zielen v.a. auf die neutrophilen Granulozyten und auf die Angiogenese ab. IL-8 fördert die Chemotaxis, die Expression von Adhäsionsmolekülen und die Degranulation der neutrophilen Granulozyten, welche in Entzündungsreaktionen eine wichtige Rolle spielen [108, 111, 112, 113]. Des Weiteren fördert IL-8 die Angiogenese, welches vor allem durch den Janus-Kinase-Signalweg in der Zelle induziert wird [114]. Hinsichtlich dieser proinflammatorischen und proangiogenen Eigenschaften könnte IL-8 an der Krankheitsentstehung der AMD beteiligt sein. Tsai et al. zeigten in ihrer Studie, dass ein signifikanter Zusammenhang zwischen einem IL-8 Genpolymorphismus und dem Auftreten feuchter AMD in einer taiwanesischen chinesischen Bevölkerung vorliegt [115].

Tumornekrosefaktor α : TNF- α ist ein Zytokin, welches als Transmembranprotein synthetisiert, von Metalloproteininasen abgespalten und damit freigesetzt wird, wobei sowohl membrangebundenes als auch lösliches TNF- α biologisch aktiv ist [93, 116]. Hauptproduzenten sind aktivierte Makrophagen, jedoch exprimieren auch verschiedene andern Zellen TNF- α wie beispielsweise Lymphozyten, natürliche Killerzellen und Epithelzellen [93, 117, 118]. TNF- α hat große Ähnlichkeit zu IL-1 hinsichtlich Sekretionsfaktoren und Funktion [119]. Daher führen alle Stimuli, die IL-1 induzieren auch zur Synthese von TNF- α [119]. Dazu gehören unter anderem PAMPs, Zytokine, aber auch TNF- α selbst [93].

Die Rezeptoren können membrangebunden oder löslich vorliegen [93]. Lösliche Rezeptoren wirken v.a. antientzündlich, da sie TNF- α binden können, sodass dieses blockiert wird [93]. Durch die Bindung an zwei unterschiedliche membrangebundene Rezeptoren werden verschiedene transzelluläre Signalkaskaden durchlaufen [93, 116, 120]: TNF- α bindet an seinen Rezeptor, wodurch verschiedene Caspasen aktiviert werden, was zu einer Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien und schlussendlich zum Zelltod führt [116, 121]. Der NF- κ B

vermittelten Signalweg ist durch zelluläre Aktivierung, Differenzierung und Zytokinproduktion gekennzeichnet [116, 117, 122, 123, 124].

Die Funktionen von TNF- α ähneln sehr stark denen von IL-1 [119]. Es kann sowohl apoptotische und inflammatorische als auch nicht-apoptotische und antiinflammatorische Eigenschaften aufweisen, je nachdem, ob TNF- α an den löslichen Rezeptor binden und damit inaktiviert wird oder ob es an den membrangebundenen Rezeptor bindet und damit aktiv wirkt [93]. Die apoptotische und damit antitumorale Wirkung entsteht über verschiedene Caspasen und Freisetzung von Cytochrom C aus Mitochondrien [116]. Über die Aktivierung von Makrophagen, natürlichen Killerzellen und zytotoxischen T-Zellen ist TNF- α an inflammatorischen Prozessen beteiligt [116, 125]. Außerdem ist es bei inflammatorischen Prozessen an der Stimulation der Diapedese der Makrophagen beteiligt [93, 116]. Zudem ist TNF- α an der Prostaglandinsynthese beteiligt, was zur Fieberreaktion führt [126]. Durch TNF- α -bedingte Veränderungen zwischen den Zell-Zell-Kontakten können zu Flüssigkeitsaustritt aus dem Endothel führen [93, 116]. Zudem konnte gezeigt werden, dass durch die Bindung von TNF- α an seinen Rezeptor VEGF ausgeschüttet wird [127]. Diese Hochregulation von VEGF findet auch in RPE-Zellen statt, was zu CNV führen kann und damit eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der AMD spielt [128]. Neben VEGF wird auch PDGF gebildet, welches ein wichtiger Faktor für die Proliferation mesenchymaler Zellen ist [129]. Dieser wirkt auch wie VEGF angiogen, wodurch er eine große Rolle in der Entwicklung retinaler Vaskulopathien spielt und damit an der Entstehung der AMD beteiligt sein kann [130, 131]. TNF- α kann über den NF- κ B-Signalweg die Produktion weiterer Zytokine Stimulieren [132]. Dazu gehören IL-1 und IL-6, deren Funktionen bereits beschrieben wurden [132]. Jedoch kann es sich auch selbst durch Produktion weiterer Moleküle von TNF- α hochregulieren [132]. Des Weiteren wirkt es zusammen mit IL-8 migrationsfördernd auf neutrophile Granulozyten, damit diese zum Ort der Entzündung gelangen können [133].

4.4.3 Behandlung der altersbedingten Makuladegeneration

Durch die vielen verschiedenen pathogenetischen Faktoren und undefinierten Ursachen, die der AMD zugrunde liegen, gibt es bisher wenige kausale Behandlung. Bisherige Behandlungsoptionen sind bisher symptomorientiert und können die Krankheit meist nur aufhalten und nicht heilen [63]. Die meisten Therapieansätze sind auf die Neovaskularisationen, die bei der feuchten AMD entstehen, ausgerichtet [63]. Für die trockene Form gibt es bisher noch keine Therapie [63, 134].

Die **thermale Laserkoagulation** war vor der photodynamischen Therapie (s.u.) die einzige gut etablierte Behandlung von CNV [63]. Dabei werden diese Neovaskularisationen mittels Argon-Laser gezielt koaguliert, was ein Fortschreiten der Erkrankung verhindern soll [135].

Bei der **photodynamischen Therapie** wird ein lichtempfindlicher Farbstoff intravenös in den Körper des Patienten injiziert, welcher sich in den CNV anreichert [60, 63]. Dieser wird mittels 698 nm Licht bestrahlt und dadurch angeregt, was eine chemische Reaktion in Gang setzt, die zur Verödung der CNV führt [60, 63]. Der Stellenwert dieser Therapieoption ist jedoch auf-

grund der besseren Wirksamkeit der VEGF-Therapie zurückgegangen [136].

Durch die Entdeckung von VEGF als wichtigen Faktor für die Entstehung von CNV wurde die Behandlung der AMD revolutioniert [137]. Der einzige zugelassene Ansatz bisher sind **VEGF-Inhibitoren**, bei dem unterschiedliche Fragmente von Antikörpern genutzt werden, um extrazellulär VEGF zu binden und zu neutralisieren [138]. Alle VEGF-Inhibitoren müssen in regelmäßigen Abständen intravitreal gespritzt werden, wodurch ein erheblicher zeitlicher und finanzieller Aufwand für die Klinik und den Patienten entsteht [139].

4.5 Fucoidane

4.5.1 Aufbau und Funktion von Fucoidanen

Braunalgen gehören zu einer der drei Hauptgruppen der Makroalgen (Braunalgen, Rotalgen und Grünalgen) und umfasst tausende Arten, die sich in ihren Zusammensetzungen und Eigenschaften zum Teil stark unterscheiden [140, 141]. Evolutionär haben sich die Braunalgen aus der Abstammungslinie von Tieren, Pilzen und Grünpflanzen entwickelt [142]. Vor allem ihr hoher Gehalt an ungesättigten Fettsäuren, Proteinen, Mineralien und Vitaminen macht sie ernährungsmedizinisch interessant [141]. Im Vergleich zu Landpflanzen und tierischen Produkten können sie zehn- bis 100-mal mehr Mineralien und Vitamine enthalten [141, 143]. Algen enthalten, je nach Spezies, große Anteile an Proteinen, Omega-3-Fettsäuren, Vitamin D, Vitamin B12, Folat und Eisen [144, 145]. Die Zellwand von Braunalgen besteht vor allem aus den wesentlichen Anteilen Cellulose, Alginate und Fucoidan [146]. Fucoidan wurde zum ersten mal im Jahr 1913 vom schwedischen Forscher Kylin aus verschiedenen Algenarten isoliert und als eine Gruppe sulfatierter Polysaccharide beschrieben [147]. Sie sind nicht nur in Algen zu finden, sondern auch in einigen wirbellosen Meerestieren [148].

Die genaue Struktur dieser sulfatierten Polysaccharide, das Molekulargewicht und die Verzweigung der Seitenketten sind abhängig von Art, Jahreszeit und Ernteort der Pflanze [148, 149, 150]. Die Grundstruktur besteht aus Fucose und Sulfatestergruppen [148, 149]. Manche Fucoidane haben einfache chemische Zusammensetzungen und bestehen nur aus Fucose und Sulfat, während Fucoidane anderer Arten aus vielen anderen Monosacchariden, Acetylgruppen und Proteinen aufgebaut und wesentlich komplexer sind [148, 149]. Die Extraktion gestaltet sich als schwierig, da die Struktur und Eigenschaften der Fucoidane durch beispielsweise Temperatur, Zeit und pH-Wert bei der Extraktion stark verändert werden können [151]. In der Alge spielen Fucoidane eine große Rolle bei der Stabilisierung der Zellwand und als Schutz vor Austrocknung bei Ebbe [152]. Außerdem unterstützen sie den osmotischen Ausgleich im Meer und schützen die Pflanze durch Bindung von Schwermetallionen [152]. Fucoidane unterstützen des Weiteren die Fortpflanzung durch Ausschüttung von Sporen und Gameten aus Geschlechtsorganen [152].

4.5.2 Bioaktivität von Fucoidanen

Fucoidane haben aufgrund ihrer vielfältigen biologischen und physiologischen Eigenschaften einen großen Potential sowohl für die menschliche Ernährung als auch für medizinische Anwendungen. In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von Studien zu Fucoidanen durchgeführt, wobei das Interesse an Fucoidanen immer mehr an Bedeutung gewonnen hat. Die verschiedenen biologischen Eigenschaften sind sehr unterschiedlich und hängen insbesondere von der Struktur des Fucoidans, aber auch vom Ursprung, der Extraktionsmethode und der Reinheit ab [153]. Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Fucoidane wie unter anderem *Fucus vesiculosus*, über unterschiedliche Wege Apoptose in Krebszellen induzieren und damit antitumoral wirken können [154, 155, 156]. Beispielsweise induziert das Fucoidan *Fucus vesiculosus* (F.v.) die Apoptose durch Aktivierung der Caspasen 8 und 9, welche schließlich die Zelle zum Zelltod führt [154]. Es konnten durch Fucoidane bereits positive Effekte beim hepatozellulären Karzinom und beim Brustkrebs beobachtet werden [155, 156].

Fucoidane weisen aber nicht nur gegen Tumoren, sondern auch gegen virale Infektionen bedeutende Eigenschaften auf, etwa bei einer Influenza-A-Virus- oder bei einer Hepatitis B-Virus-Infektion [157, 158]. Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Fucoidane, unter anderem aus *Kjellmaniella crassifolia*, bei in-vitro-Experimenten das Influenza-A-Virus blockierten und gleichzeitig nur wenig zur Entwicklung von viralen Resistzenzen tendierten [157]. Jedoch wurden auch geringe toxische Effekte auf die Wirtszelle entdeckt [157]. Auch das Hepatitis B-Virus konnte durch *Fucus vesiculosus* über unterschiedliche Wege unschädlich gemacht werden [158]. Beispielsweise hemmte F.v. die Expression von Interferonen, wodurch weniger Hepatitis-B-Virus-DNA produziert wurde [158]. Apostolova et al. untersuchten in einer Datenanalyse die vielfältigen immunmodulatorischen und antiinflammatorischen Effekte von Fucoidanen [159]. Dabei konnte gezeigt werden, dass bei in-vivo-Versuchen die Ausschüttung von Prostaglandin E2, TNF- α , Interleukin-1 β , IL-6 und IL-8 unter Zugabe von Fucoidanen, durch Beeinflussung des NF- κ B- und des MAP-Kinase-Signalweges, vermindert war [159]. Auch hinsichtlich des metabolischen Syndroms, einer Kombination aus niedrigem *high-density-lipoproteine* (HDL)-Cholesterin, hohen Triglyceriden, einem hohen Taillen-Hüften-Verhältnis und einem erhöhten Blutdruck [160], zeigten Fucoidane positive Eigenschaften [161, 162, 163]. Es konnte gezeigt werden, dass sie α -Glucosidase gehemmt und den Glucosetransporter Typ 4 moduliert haben, was vorteilhaft beim Diabetes mellitus Typ II sein kann [161, 162]. α -Glucosidase spaltet Glucoseverbindungen zu freier Glucose [164]. Wird diese gehemmt, wird weniger freie Glucose gebildet, was sich positiv auf den Blutzucker auswirkt [164]. Der Glucosetransporter Typ 4 reguliert insulinabhängig die Glucoseaufnahme v.a. im Muskel, wobei bei einer Insulinresistenz wie beim Diabetes mellitus Typ 2 die Translokation des Transporters verringert ist und damit weniger Glucose in die Zelle aufgenommen werden kann [165]. Des weiteren kann Cholesterin im Serum durch Verstärkung von negativen Ladungen an Zelloberflächen und somit Bindung von Cholesterin gesenkt werden [148]. Hinsichtlich der Angiogenese hängt die Wirkung vom Fucoidan ab. Fucoidan aus *Ascophyllum nodosum* wirkte bei in-vivo-Versuchen proangiogen, während Fucoidan aus *Undaria pinnatifida* eher antiangiogen [166, 167, 168].

4.5.3 Fucoidane bei der altersbedingten Makuladegeneration

Die vielfältigen positiven Eigenschaften der Fucoidane auf den Körper wie beispielsweise antientzündliche und antiangiogene Effekte kann man sich auch bei okulären Erkrankungen wie der AMD zu Nutze machen. Zu den wichtigsten pathogenetischen Faktoren der AMD zählen Entzündung, Angiogenese und oxidativer Stress (siehe Abschnitt 4.4.1). Im Bezug auf Entzündungsreaktionen wurde gezeigt, dass Fucoidane über verschiedene Wege antiinflammatorisch wirken können. Beispielsweise wurde durch das aus *Sargassum fusiforme* isolierte Fucoidan die durch LPS induzierte Stickstoffmonoxidproduktion bei in-vitro-Modellen gehemmt und Prostaglandin E2, Interleukin-1 β , TNF- α und IL-6 reduziert [169]. In einer Mikroglia-Zelllinie kam es durch Zugabe von Fucoidanen zur Reduktion der Produktion von Stickstoffmonoxid, Prostaglandin E2, IL-1 β , TNF- α und zur Herunterregulierung von NF- κ B und verschiedenen anderen Kinasen [170]. In einer anderen Studie konnte an einer Makrophagen-Zelllinie gezeigt werden, dass Fucoidane die Leukozytenrekrutierung und die Freisetzung von Stickstoffmonoxid durch Hemmung von Aktivatorprotein 1 hemmen können [171].

Eine weitere wichtige Säule in der Pathogenese der AMD ist die Angiogenese. In früheren Arbeiten konnte nachgewiesen werden, dass Fucoidane antiangiogenetische Eigenschaften beim Multiplen Myelom [172], beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom [173] und beim Brustkrebs [174] aufwiesen. In einem in-vitro-Modell konnte nachgewiesen werden, dass Fucoidane die VEGF-Sekretion in RPE-Zellen vermindert haben [175]. Des Weiteren zeigten Koyanagi et al., dass nicht nur die Ausschüttung von VEGF, sondern auch die Bindung von VEGF an seinen Oberflächenrezeptor, in diesem Fall bei Sarkomen, Lungenkarzinom und Melanomen bei Mäusen durch Zugabe von Fucoidanen gehemmt wurde [176]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass durch Fucoidane die Transkription von VEGF, welche durch Hypoxie-induzierenden-Faktor (HIF)-1 α vermittelt wird, einem Faktor, der an Apoptose und Neovaskularisationen beteiligt ist, herunterreguliert wurde [177, 178, 179, 180]. Andererseits konnten Dithmer et al. an einer uvealen Melanom Zelllinie nachweisen, dass Fucoidane in diesem Fall proangiogene Eigenschaften aufwiesen [181].

Die dritte Säule bei der Pathogenese der AMD ist der oxidative Stress. Durch Abfangen von Superoxidradikalen können Fucoidane antioxidativ wirken, wobei gezeigt werden konnte, dass diese antioxidative Eigenschaften vom Sulfatgehalt der Fucoidane abhängig sein können [178, 182, 183]. Des Weiteren können Fucoidane Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2 (Nrf2), welches ein antioxidativer Transkriptionsfaktor im RPE ist, induzieren [178, 184]. Außerdem können Fucoidane die Eigenschaft haben, die Aktivierung von *Extracellular signal-regulated kinases* (ERK)1/2, einer Kinase, die durch oxidativen Stress VEGF hoch reguliert, zu hemmen [178, 185, 186]. Aufgrund ihrer Heterogenität müssen Fucoidane charakterisiert und nach einem festen Schema extrahiert werden, damit sie im Falle einer medizinischen Anwendung qualitativ reproduziert werden können [187]. Bei der Charakterisierung müssen Aspekte wie Herkunft, Algenart, Extraktionsmethode, Zellmodell und chemische Eigenschaften bestimmt werden [187].

4.6 Fragestellung und Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Beschreibung der Einflussnahme von Fucoidanen der Spezies *Fucus vesiculosus*, *Saccharina latissima* und *Laminaria hyperborea* hinsichtlich des Einflusses auf die Entzündung des retinalen Pigmentepithels im Langzeitversuch, wobei polare und unpolare RPE-Zellen als Zellmodell verwendet wurden. Es ist bekannt, dass einige Fucoidane einen positiven Einfluss hinsichtlich Verminderung des oxidativen Stresses und VEGF-Ausschüttung haben, welche zwei Hauptfaktoren für die Entstehung der AMD sind [175, 188]. Eine weitere Säule der Pathogenese der AMD sind Entzündungsprozesse, welche in dieser Arbeit untersucht werden sollen. Es wurde in früheren Arbeiten bereits beschrieben, dass RPE-Zellen Zytokine als Antwort auf Entzündungsmediatoren wie die Toll-like-Rezeptor-Agonisten LPS, Poly I:C, TNF- α oder Pam ausschütten [45, 48, 49]. Daher soll der Einfluss von verschiedenen Fucoidanen in Kombination mit diesen Entzündungsmediatoren auf die Zytokinproduktion der RPE-Zellen untersucht und dadurch eine neue Therapieoption für verschiedene Augenerkrankungen wie für die AMD diskutiert werden. Bei der Zytokinausschüttung der RPE-Zellen wurde besonderes Augenmerk auf die Ausschüttung von IL-6, IL-8, IL-1 β und TNF- α gelegt, da diese bei der Pathogenese der AMD eine Rolle spielen. Die Versuchszeitraum erstreckte sich über einen Tag, drei, sieben und 28 Tage, wobei die Zellviabilität nach 28 Tagen ermittelt wurde, in dem die metabolische Aktivität bestimmt worden ist. An polarisierten Zellen wurde außerdem die Barrierefähigkeit untersucht, da sie hinsichtlich der Pathogenese eine große Rolle spielt, indem sie an der Regulierung des Austausches von Stoffen zwischen Choroidea und Lichtsinneszellen und auch beim Schutz der Netzhaut vor dem Eindringen von Zytokinen aus dem Blutkreis relevant ist [33, 34].

Zusammengefasst, wird in dieser Arbeit:

1. der Einfluss von Fucoidanen in Kombination mit Entzündungsmediatoren auf die Zellviabilität untersucht,
2. der Einfluss von Fucoidanen in Kombination mit Entzündungsmediatoren auf die Zytokinproduktion getestet,
3. die Barrierefunktion von RPE-Zellen durch Zugabe von Fucoidanen und Entzündungsmediatoren getestet.

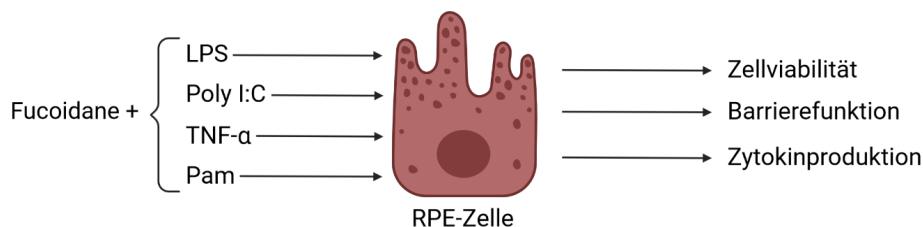


Abbildung 5: Versuchsübersicht

Es wurde der Einfluss der Entzündungsmediatoren LPS, Poly I:C, TNF- α bzw. Pam in Kombination mit verschiedenen Fucoidanen auf retinale Pigmentepithelzellen (RPE-Zellen) hinsichtlich Zellviabilität, Barrierefunktion und Zytokinproduktion getestet. Abbildung gestaltet mit Biorender.com.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien	Firma, Firmensitz
Ampuwa Spüllösung Plastipur® Aqua ad injectabilia (Aqua Bidest)	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg
Betaisodona®	Mundipharma GmbH, Frankfurt a. M.
DMEM/ <i>HIGH GLUCOSE</i> mit 4,00 mM L-Glutamin und 4500 mg/l Glucose	Cytiva Europe GmbH, Freiburg im Breisgau
DMEM/ <i>High Modified</i> mit 4,0 mM L-Glutamin und 4500 mg/l Glucose	Cytiva Europe GmbH, Freiburg im Breisgau
DMSO > 99,5 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
ELISA Plate Coating Buffer	R&D Systems, Minneapolis, MN (USA)
EDTA	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol > 99,5%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
FBS	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
HEPES-Puffer, 1 M	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α Duoset® ELISA	R&D Systems, Minneapolis, MN (USA)
LPS aus <i>Escherichia coli</i> 055:B5	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
MEM NEAA (100X)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
MTT	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO (USA)
NaCl 0,9 %	B. Braun Deutschland GmbH & Co. KG, Melsungen
Natriumpyruvat	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Pam ₂ CSK ₄	Tocris Bioscience, Bristol, Großbritannien
PBS	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Pe/St: 10,000 U Penicillin und 10 mg Streptomycin pro ml in 0,9%-igem NaCl	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Poly I:C	Tocris Bioscience, Bristol, Großbritannien
TNF- α	Bio-Techne GmbH, Minneapolis, MN (USA)
Trypsin; 0,25 % in PBS	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Trypsin/EDTA; 0,25 % / 0,02 % in PBS	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach

DMEM = Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMSO = Dimethylsulfoxid, EDTA = Ethyldiamintetraessigsäure, ELISA = Enzyme-linked Immunosorbent Assay, dt. Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest, FBS = Fetal Bovine Serum, dt. Fetales Rinder Serum, HEPES = 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, LPS = Lipopolysaccharid, MEM = Minimal Essential Medium, MTT = 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, NEAA = Non-Essential Amino Acids, dt. Nicht-essentielle Aminosäuren, Pam₂CSK₄ = Pathogen-associated molecular pattern, PBS = Phosphatgepufferte Salzlösung, Pe/St = Penicillin/Streptomycin, Poly I:C = Polyinosinsäure:Polycytidylsäure, TNF- α = rekombinanter humaner Tumornekrosefaktor- α (rhTNF α)

5.1.2 Puffer und Kulturmedien

Puffer und Kulturmedium	Inhalt
Iodlösung	20 ml NaCl 10 ml Betaisodona®
PBS+Pe/St	900 ml Aqua Bidest + 100 ml PBS + 10 ml Pe/St
Zellkulturmedium	500 ml DMEM <i>HIGH GLUCOSE</i> + 10 % FBS + 1 % Pe/St (10.000 U/ml) + 1 % Natriumpyruvat (100 mM) + 2,5 % HEPES (1M) + 1 % nicht essentielle Aminosäuren

Tabelle 2: Verwendete Puffer und Kulturmedien

5.1.3 Geräte und Labormaterial

Gerät und Labormaterial	Hersteller
CO ₂ -Inkubator (Heracell TM VIOS 160i)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Einkanalpipetten (10, 100, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Epithelial Volt/Ohm (TEER) Meter 3®	World Precision Instruments, Florida, USA
Gefrierschränke (-20 °C, -80 °C)	Liebherr, Kirchendorf an der Iller
Insert, 12-Well, 0,4 µl	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Lichtmikroskop (Axiovert 100)	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikroplattenleser (BioTek® Elx800)	BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA
Mikroplattenwascher (BioTek® ELx50)	BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA
Pinzetten (anatomisch, chirurgisch)	Bausch und Lomb GmbH, Berein
Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Sicherheitswerkbank (Safe 2020)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
STX3-PLUS Elektrode	World Precision Instruments, Florida, USA
TC Platte 12-Well, Standard	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
TC Platte 24-Well, Standard	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Vakuumpumpe	INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal
Wasserbad 1086	GFL, Brugwedel
Wippschüttler	Infors AG, Bottmingen
Zentrifugen (Sorvall ST40 und Heraus Fresco 17)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Tabelle 3: Verwendete Geräte und Labormaterial

5.1.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Mikrotiterplatten (12/24/96-Well)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Pipettenspitzen (10, 200, 1.000 µl)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Serologische Pipetten (5, 15, 50 ml)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Rasierklingen	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen
Reaktionsgefäße	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Zentrifugenrörchen	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht

5.1.5 Software

Tabelle 5: Verwendete Software

Software	Hersteller
AxioVs40 v4.8.0.0	Carl Zeiss AG, Oberkochen
BioRender	BioRender, Toronto, Ontario, USA
Citavi 6.10	Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, Schweiz
Gen5 v1.11.5	BioTek Instruments, Inc., Winooski, USA
GraphPad Prism 9	GraphPad Software, San Diego, USA
Microsoft Excel	Microsoft, Redmond, USA
MiKTeX (Version 21.12)	MiKTeX, Berlin
LaTeX	The Latex Project, Mainz
ZEN 2 (blue edition) v2.0.0.0	Carl Zeiss AG, Oberkochen

5.1.6 Algenextrakte

Tabelle 6: Verwendete Algenextrakte

Extraktbezeichnung (Algenspezies)	Herkunft
F2 (<i>Fucus vesiculosus</i>)	kommerziell erhältlich bei Sigma-Aldrich, St. Louis (USA) (Lot SLBT5471)
E81 (<i>Laminaria hyperborea</i>)	Alginor ASA, Haugesund, Norwegen (zur Verfügung gestellt (zVg.) von Dr. Georg Kopplin)
E93 (<i>Saccharina latissima</i>)	DTU, Lyngby, Dänemark (zVg. von Dr. Maria Dalgaard Mikkelsen)
E112 (<i>Saccharina latissima</i>)	Pharmazeutische Institut der CAU (zVg. von Prof. Dr. Susanne Al- ban), geerntet bei Färöer-Inseln
E125 (<i>Saccharina latissima</i>)	DTU, Lyngby, Dänemark (zVg. von Dr. Maria Dalgaard Mikkelsen)
E126 (<i>Saccharina latissima</i>)	Pharmazeutische Institut der CAU (zVg. von Prof. Dr. Susanne Al- ban), geerntet bei Norwegen
E127 (<i>Laminaria hyperborea</i>)	Alginor ASA, Haugesund, Norwegen (zVg. von Dr. Georg Kopp- lin)

CAU = Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, DTU = Dänemarks Technische Universität

Tabelle 7: Chemische Eigenschaften der Fucoidane

Fucoidan	MW in kDa	Fucosegehalt in mol %	Sulfatgehalt in % Gewicht	molarer Sulfatierungsgrad
F2	49,85	88,17	27,89	0,55
E81	1548	97,00	53,8	1,7
E93	800	64,70	35,60	2,40
E112	997	81,12	25,79	0,49
E125	300 - 800	63,07	32,11	2,01
E126	311,70	73,59	21,31	0,38
E127	3700	86,15	38,00	0,90

Quellen: [189, 190, 191, 192] Quelle für E125 und E127

MW = Molekulargewicht, kDa = Kilodalton

5.2 Methoden

5.2.1 Präparation von retinalen Pigmentepithel-Zellen aus Schweineaugen

Die Isolation von RPE-Zellen aus Schweineaugen erfolgte nach bereits etablierten Methoden [193]. Die retinalen Pigmentepithel-Zellen wurden aus Schweineaugen gewonnen, die von regionalen Schlachthöfen ungefähr vier bis sechs Stunden nach Schlachtung auf Eis geliefert wur-

den. Zur Herstellung einer Transwell-Mikrotiterplatte wurden 17 Augen und für eine 24-Well-Mikrotiterplatte 12 Augen verwendet.

Zu Beginn wurden die Augen mittels einer chirurgischen Schere von überschüssiger Muskulatur und Bindegewebe befreit und anschließend für fünf Minuten in Betaisodona-Lösung desinfiziert. Anschließend wurden die Augen bis zur weiteren Verwendung in steriler Natrium-chloridlösung auf Eis gelagert. Die weitere Präparation erfolgte an der Sicherheitswerkbank. Zunächst wurde mit Hilfe einer Rasierklinge der vordere Teil des Auges (mit 0,5 cm Abstand um die Iris herum) entfernt. Danach wurde der Glaskörper und die Linse mittels einer Pinzette vollständig entfernt. Die übrig gebliebenen Bulbi werden folgend als „Augenbecher“ bezeichnet.

Die Augenbecher wurden daraufhin mit warmer phoshatgepufferter Salzlösung (PBS) befüllt, damit sich die Retina besser ablösen ließ. Das Ablösen der Retina wurde unter Zuhilfenahme einer anatomischen Pinzette durchgeführt. Für den besseren Halt wurden die Augenbecher in Flaschendeckel gelegt.

Danach wurde Trypsin in die Augenbecher geben und für zehn Minuten bei 37 °C inkubiert. Dieses wurde anschließend abgesaugt, durch Trypsin - Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) ersetzt und für 35 Minuten bei 37 °C inkubiert. Mit Hilfe einer Pipette wurde das Trypsin-EDTA in den Augenschälchen ca. 40-mal resuspendiert und damit die RPE-Zellen gelöst. Die Überstände wurden auf zwei Falcons mit je 30 ml Zellkulturmedium (RPE-Gibco) aufgeteilt und fünf Minuten bei 900 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Anschließend wurde jeweils ein weiteres Mal der Überstand entfernt, die Pellets in je 2 ml Medium resuspendiert und danach in ein Falcon zusammengeführt. Sechzehn ml Medium wurden zugeben und es erfolgte erneut eine Zentrifugation für fünf Minuten bei 8900 Umdrehungen pro Minute. Danach wurde jeweils ein weiteres Mal der Überstand abgenommen, die Pellets in 2 ml Medium resuspendiert und 10,5 ml Medium hinzugegeben.

Bei der Transwell-Mikrotiterplatte wurde in jedes Well apikal 1 ml der Zellsuspension und basal 1,5 ml Medium hinzugegeben. Bei einer 24-Well-Mikrotiterplatte wurde 0,5 ml der Zellsuspension ausgesät. Anschließend wurden die Platten leicht geschwenkt, um die Zellen gut zu verteilen, und im Inkubator bei 37 °C bis zu Beginn des Experiments inkubiert. Während des Wachstums der Zellen und vor Beginn der Experimente wurde zwei Mal pro Woche das Medium gewechselt.

5.2.2 Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands

Der transepithiale elektrische Widerstand (TEER) zeigt das Ausmaß der Bedeckung der Oberfläche der Transwell-Platten-Inserts mit RPE und die Ausbildung von Tight Junctions an. Die Messung des TEER erfolgte mittels des Epithelial Volt/Ohm (TEER) Meter 3®. Als zugehörige Elektrode wurde die STX3-PLUS verwendet.

Dabei wurde der Widerstand zwischen dem Medium des Trans-Well-Platten Inserts und dem äußeren Medium in den jeweiligen Wells der Trans-Well-Mikrotiterplatte durch Erzeugung eines niedrigen Wechselstroms gemessen [194].

Die Messung der TEER erfolgte jeweils sieben, zehn und 14 Tage nach Aussaat der Zellen. Ab einem TEER-Wert von $150 \Omega * \text{cm}^2$, welcher meistens nach zwei Wochen erreicht wurde, wurde mit der Stimulation der RPE-Zellen durch Zugabe von LPS, Poly I:C, TNF- α , Pam und den Fucoidanen begonnen. Weitere TEER-Messungen erfolgten am ersten Tag nach Beginn der Stimulation und drei, sieben, 14, 21 und 28 Tage nach der ersten Stimulation.

Zunächst wurde die Barriere eines nur mit Medium gefüllten Wells ohne RPE gemessen und als Leerwert verwendet. Danach erfolgte die Messung der anderen Wells mit den jeweiligen Versuchsansätzen einer Trans-Well-Mikrotiterplatte, wobei der Leerwert bereits durch das Gerät automatisch abgezogen wurde. Nach Messung in jedem Well wurde die Elektrode mit Ethanol gereinigt, mit Aqua Bidest gespült und mit einer sterilen Komresse getrocknet.

5.2.3 Stimulation der retinalen Pigmentepithelzellen

Wie in Abschnitt 5.2.2 erwähnt, konnte mit der Stimulation der RPE bei der Trans-Well-Mikrotiterplatte durch Zugabe von LPS, Poly I:C, TNF- α , Pam und dem Fucoidan ab einem TEER von ca. $150 \Omega * \text{cm}^2$ begonnen werden.

Zu Beginn jeder Stimulation wurde nach TEER Messung und Anfertigung von Fotoaufnahmen der Überstand sowohl apikal, d.h. aus dem Insert als auch basal, d.h. im Well entnommen und in beschriftete Eppendorfgefäß gegeben. Der apikale Überstand wurde für fünf Minuten bei 13.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Daraufhin konnte der Überstand in ein weiteres Eppendorfgefäß überführt und für die spätere Analyse bei -20°C eingefroren werden. Der basale Überstand wurde nicht zentrifugiert, sondern direkt bei -20°C eingefroren. Dem basalen Well wurde wieder 1,5 ml des Zellkulturmediums (DMEM Pan-BioTech mit Phenolrot, Pyruvat und Gibco FBS) zugeführt. Apikal in die Inserts wurde Zellkulturmedium gegeben. Zwei Wells wurden als Kontrolle verwendet, d.h. sie wurde nur mit Medium befüllt. Zudem enthält die Trans-Well-Mikrotiterplatte jeweils ein Kontroll-Well für jeden Entzündungsmediator. Hier wurden neben dem Medium 100 μl Verdünnung der Entzündungsmediatoren LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), Poly I:C (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), TNF- α (50 ng/ml), Pam (10 ng/ml) zugegeben. In weitere Wells wurden zusätzlich zum Medium 100 μl Verdünnung des Fucoidans (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) mit jeweils 100 μl Verdünnung eines Entzündungsmediators gegeben (siehe Abbildung 8), wobei die Zahlen die Spaltennummer und die Buchstaben die Zeilenbezeichnung angeben. Zuerst wurde das Fucoidan zugegeben, nach 30 Minuten Inkubation die Entzündungsmediatoren.

Die Stimulation erfolgte abhängig von den Versuchen einen Tag, drei, sieben und 28 Tage nach der ersten Stimulation. Jeweils 24 Stunden vorher wurde ein Ansatzwechsel durchgeführt. Zudem erfolgte ein Ansatzwechsel 11, 15, 19 und 23 Tage nach der ersten Stimulation zum Erneuern des Mediums.

Tabelle 8: Auftragsschema der 12-Transwell-Mikrotiterplatte

	1	2	3	4
A	Medium Kontrolle 1	LPS Kontrolle	Pam Kontrolle	Fucoidan + TNF- α
B	Medium Kontrolle 2	Poly I:C Kontrolle	Fucoidan + LPS	Fuocidan + Pam
C	Fucoidan Kontrolle	TNF- α Kontrolle	Fucoidan + Poly I:C	-

Bei der 24-Well-Mikrotiterplatte wurde die Konfluenz der RPE mit Hilfe des Lichtmikroskops beurteilt. Meistens konnte hier nach zwei bis drei Wochen mit der Stimulation begonnen werden. Die Zellen sollten ein Honigwaben-Muster aufweisen und den Boden der Mikrotiterplatte vollständig bedecken (siehe beispielhaft Abbildung 6). Die Stimulation wurde drei, sieben, 14, 21 und 28 Tage nach der ersten Stimulation durchgeführt.

Ein Ansatzwechsel erfolgte wie bei der Trans-Well-Mikrotiterplatte jeweils 24 Stunden vorher und zusätzlich an Tag 10, 17 und 14 nach der ersten Stimulation. Diese erfolgte analog zum Prinzip der Stimulation der Trans-Well-Mikrotiterplatte. Das Auftragsschema wird in Tabelle 9 dargestellt.

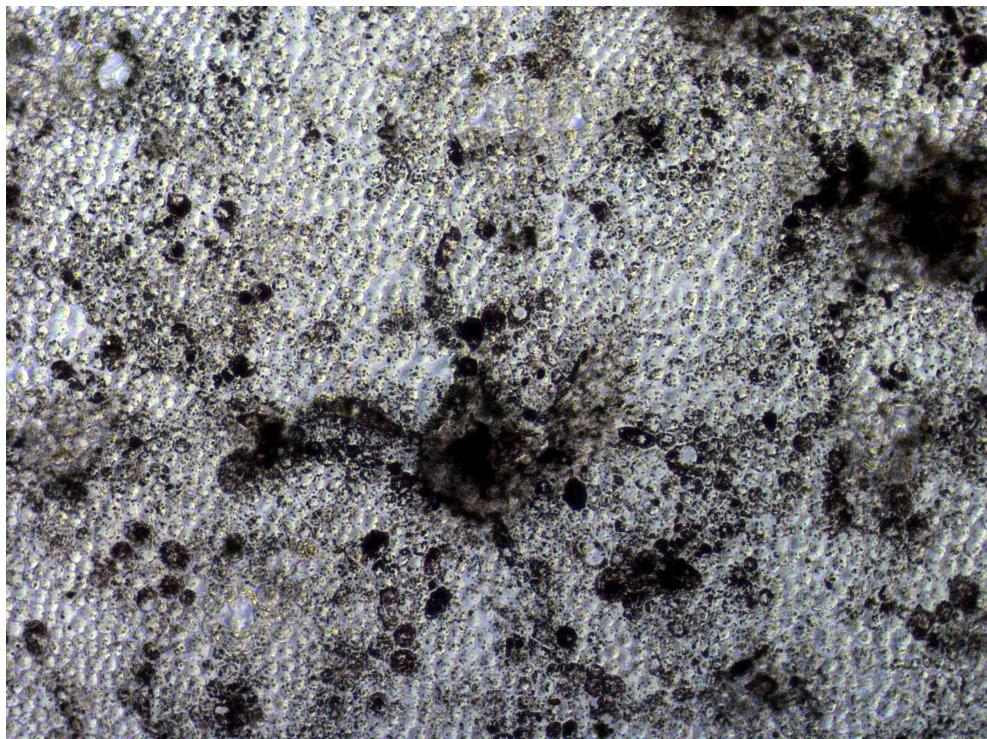


Abbildung 6: Retinale Pigmentepithel-Zellen 14 Tage nach Aussaat in 100-facher Vergrößerung
pflastersteinartiges Aussehen von retinalen Pigmentepithel-Zellen, welche den kompletten Boden des Wells bedecken.

Tabelle 9: Auftragsschema der 24-Well-Mikrotiterplatte

	1	2	3	4	5	6
A	Medium Kontrolle 1	Medium Kontrolle 2	Fucoidan 1 Kontrolle	Fucoidan 2 Kontrolle	Fucoidan 3 Kontrolle	-
B	Pam Kontrolle	LPS Kontrolle	Fucoidan 1 + LPS	Fucoidan 2 + LPS	Fucoidan 3 + LPS	Fucoidan 1 + Pam
C	Fucoidan 2 + Pam	Poly I:C Kontrolle	Fucoidan 1 + Poly I:C	Fucoidan 2 + Poly I:C	Fucoidan 3 + Poly I:C	Fucoidan 3 + Pam
D	-	TNF- α Kontrolle	Fucoidan 1 + TNF- α	Fucoidan 2 + TNF- α	Fucoidan 3 + TNF- α	-

5.2.4 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zur Bestimmung der Zytokinkonzentration von porcinen IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF- α wurden DuoSet® ELISA Kits der Firma R&D Systems verwendet.

Die ELISA-Methode wurde ursprünglich von Peter Perlmann und Eva Engvall entwickelt [195]. Beim DuoSet® ELISA binden spezifische Antikörper (Fängerantikörper) an die 96-Well-ELISA-Platte. Nachfolgend wurden die Standards und Proben hinzugegeben, welche an die immobilisierten Antikörper binden. Daraufhin wurden weitere Antikörper (Detektions-Antikörper) zugefügt, die an die antikörpergebundenen Proben bzw. Standards binden. Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase HRP ist ein Enzym, welches Tetramethylbenzidine (TMB) Substrat in ein blaues Produkt umwandelt. Durch Zugabe von Stopp-Lösung kommt es anschließend zum Stoppen der Enzymreaktion. Die Gelbfärbung erfolgt in Abhängigkeit zur Probenkonzentration. Anschließend konnte die Absorption bei 450 nm mit einem ELISA-Reader gemessen werden [196]. Das Vorgehen erfolgte nach dem Herstellerprotokoll[197, 198].

5.2.5 Bestimmung der metabolischen Aktivität der retinalen Pigmentepithel-Zellen mittels Tetrazolium-Test

Am letzten Versuchstag wurde nach der Stimulation die metabolische Aktivität der RPE Zellen mittels 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Assay bestimmt. Der MTT-Test wurde für die jeweiligen Extrakte jeweils an Tag eins, drei, sieben und 28 nach Stimulation durchgeführt. Dieser Test ist 1983 von Tim Mosmann entwickelt worden. Grundprinzip ist die Bestimmung der mitochondrialen Aktivität, welche ein Maß für die Zellviabilität ist [199]. Zuerst wurden die Zellen mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) zweimal gewaschen. Daraufhin wurden 250 μ l verdünnte MTT-Lösung (1:10 Verdünnung mit Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ohne Phenolrot) zugegeben und für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Als nächster Schritt erfolgte das Absaugen der überständigen Lösung und die Zugabe von 250 μ l Dimethylsulfoxid (DMSO). Die Mikrotiterplatte wurde daraufhin für fünf Minuten geschüttelt. Eine 96-Well-Mikrotiterplatte wurde unterdessen vorbereitet, indem in jedes Well 1000 μ l DMSO gegeben wurde. Nach Abschluss des Schüttelvorgangs wurden jeweils 500 μ l

des Überstandes in den Wells auf die 96-Well-Mikrotiterplatte aufgetragen. Als Kontrolle wurde 500 µl DMSO in zwei Wells aufgetragen. Es wurden immer Doppelwerte pipettiert. Abschließend konnte die Platte bei 550 nm ausgelesen werden. Die prinzipielle Funktionsweise des MTT-Test ist in Abbildung 7 dargestellt. MTT-Lösung wird in die Wells gegeben. Mitochondriale Dehydrogenasen wandeln das MTT in dunkelblaue Formazankristalle um. Durch Zugabe von Dimethylsulfoxid werden die Formazankristalle gelöst und der Überstand kann abgenommen und die Farbintensität bei 550 nm ausgelesen werden. Je vitaler die Zellen, desto mehr Mitochondrien sind vorhanden und desto höher ist die Konzentration an violetten Formazan [200]. Das Vorgehen bei der Trans-Well-Mikrotiterplatte und der 24-Well-Mikrotiterplatte erfolgte nach dem gleichen Prinzip.

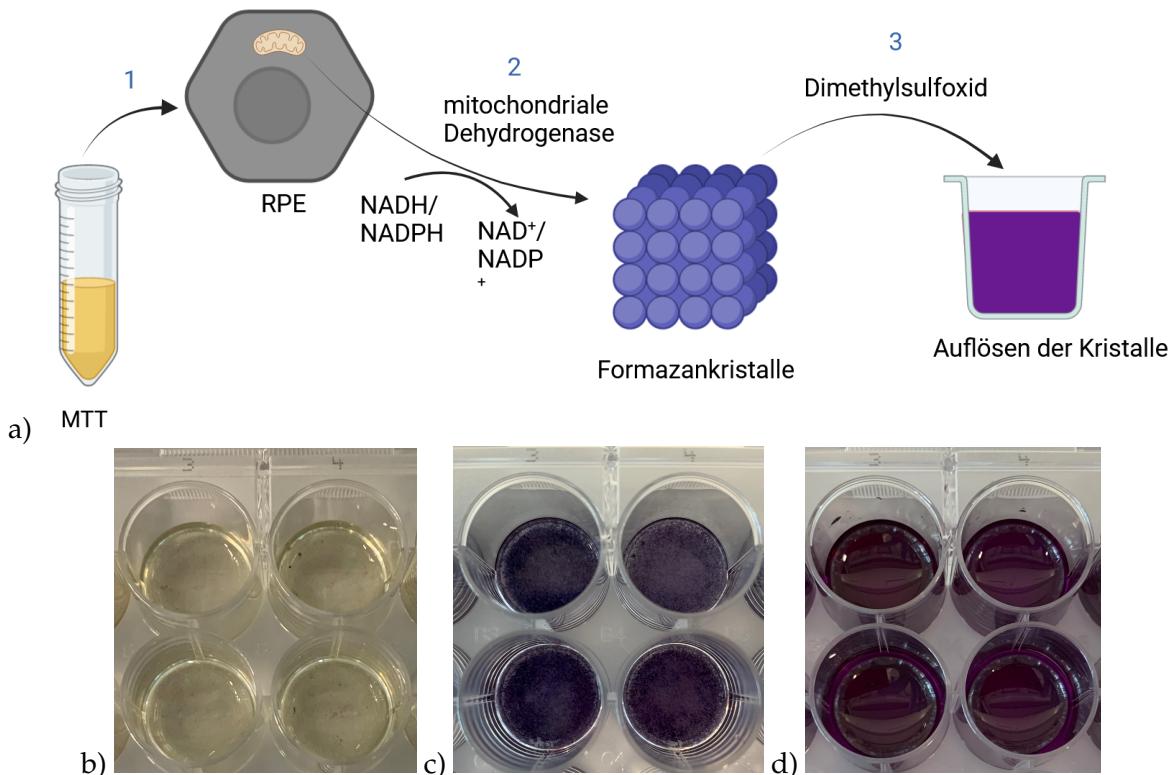


Abbildung 7: Funktionsweise des Tetrazolium-Tests

Abbildung a) 1. MTT-Lösung wird in die Wells zu den Zellen gegeben. 2. Mitochondriale Dehydrogenasen wandeln unter NADH bzw. NADPH-Verbrauch das MTT in dunkelblaue Formazankristalle um. 3. Durch Zugabe von Dimethylsulfoxid werden die Formazankristalle gelöst. Abbildung b) Vier Wells einer 24-Well-Mikrotiterplatte 14 Tage nach Aussaat der retinalen Pigmentepithel-Zellen, direkt nach Zugabe von MTT (Entspricht Schritt 1 in Abbildung a). Abbildung c) zwei Stunden nach Zugabe von MTT (Entspricht Schritt 2 in Abbildung a). Abbildung d) direkt nach Zugabe von DMSO (Entspricht Schritt 3 in Abbildung a). Abbildung gestaltet mit Biorender.com.

5.2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel und GraphPad Prism 9. Alle Versuche wurden mindestens drei Mal durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf 0,05 festgelegt. Als biologisch relevante Unterschiede wurde Abweichungen von mehr als 10 % zur Vergleichsgruppe betrachtet. Die Prüfung auf Normalverteilung erfolgte mittels Shapiro-Wilk-Test. Absolute Daten, die normalverteilt waren, wurden mittels ANOVA (analysis of variance, dt.: Einfaktorielle Varianzanalyse) und Students *t*-test ausgewertet. Wenn diese nicht normalverteilt waren, wurde ein Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Da alle relativen Werte normalverteilt waren, erfolgte hier ein One-Sample-*t*-test. Mit Excel wurden Diagramme erstellt, wobei die Säulen die Mittelwerte und die Standardabweichung als Linien dargestellt werden.

6 Ergebnisse

Es wurden verschiedene Fucoidane der Spezies *Fucus vesiculosus* (F2), *Laminaria hyperborea* (E81 und E127) und *Saccharina latissima* (E93, E112, E125 und E126) (siehe Tabelle 6) an RPE-Zellen hinsichtlich Beeinflussung der Zellviabilität, Zytokinproduktion (IL-6, IL-8, IL-1 β und TNF- α) und Barrierefunktion getestet. Diese Testung erfolgte sowohl an einem unpolaren Zellenmodell (auf 24-Well-Mikrotiterplatten) als auch an einem polaren Zellenmodell (auf Transwell-Mikrotiterplatten). Als Referenz wurde das Fucoidan *Fucus vesiculosus* (F2) von Sigma-Aldrich verwendet, da es in vorherigen Versuchen bereits vielversprechende Eigenschaften wie VEGF-Senkung aufwies [189, 201]. Zudem ist es kommerziell erhältlich.

6.1 Zellviabilität und Zytokinproduktion im unpolaren Zellmodell

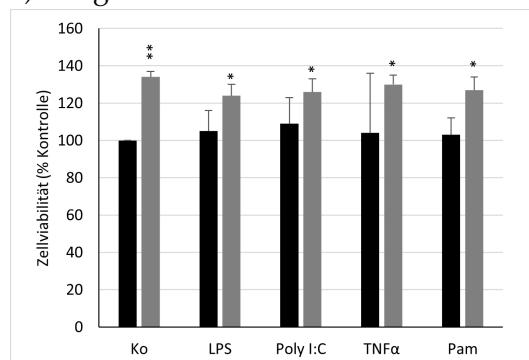
6.1.1 Etablierung mit der Referenzsubstanz

a) Zellviabilität:

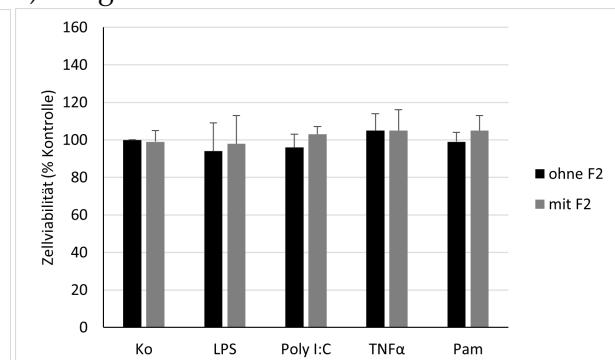
Die Zellviabilität der RPE-Zellen wurde im unpolaren Zellmodell an verschiedenen Tagen nach Stimulation mittels MTT-Test bestimmt. Die Abbildungen 8a-d zeigen die Zellviabilität von Zellen, die mit F2, den Entzündungsmediatoren und F2 gemeinsam mit einem Entzündungsmediator ein- (a), drei- (b), sieben- (c) und 28 Tage (d) stimuliert wurden, in Prozent in Bezug auf die Kontrolle, die auf 100 % gesetzt wurde. Es ist zu erkennen, dass das Signal einen Tag nach Stimulation durch Zugabe von F2 ($134 \pm 2\%$, $p = 0,004$), F2 mit LPS ($124 \pm 6\%$, $p = 0,031$), F2 mit Poly I:C ($126 \pm 7\%$, $p = 0,031$), F2 mit TNF- α ($130 \pm 5\%$, $p = 0,013$) und F2 mit Pam ($127 \pm 7\%$, $p = 0,036$) jeweils signifikant erhöht wurde. Drei und sieben Tage nach Stimulation konnte keine signifikante Veränderung der Zellviabilität beobachtet werden. 28 Tage nach Stimulation mit F2 und Pam ($107 \pm 2\%$) konnte keine signifikante Veränderung der Zellviabilität gegenüber der Kontrolle ausgemacht werden.

Abbildung 9 zeigt mikroskopische Lichtbilder in 100-facher Vergrößerung von RPE-Zellen an Versuchstag 28 nach Stimulation mit F2 und den Entzündungsmediatoren. Bei allen Versuchsanlässen ist ein lückenloser pflastersteinartiger Zellrasen und keine Störung der Morphologie und Differenzierung der Zellen zu erkennen.

a) 1 Tag



b) 3 Tage



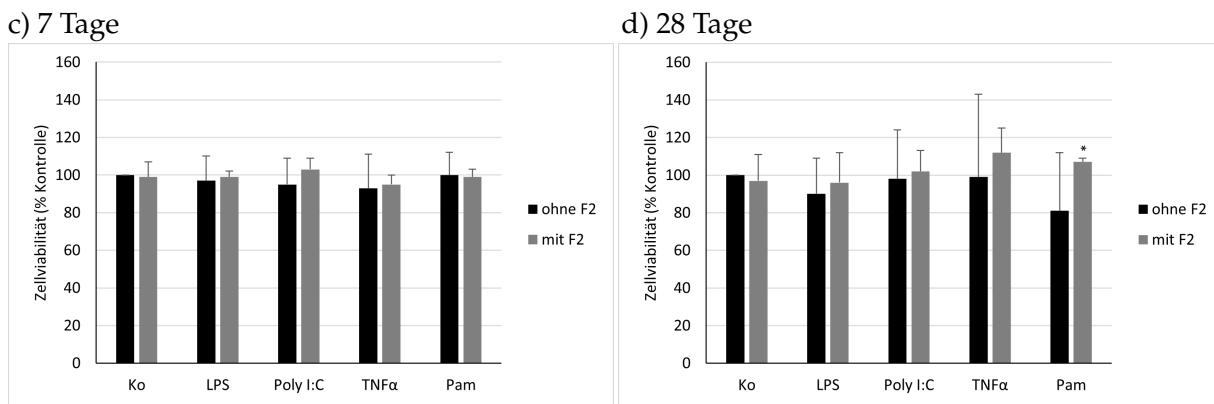


Abbildung 8: Zellviabilität von RPE-Zellen nach ein- (a), drei- (b), sieben- (c) und 28-tägiger (d) Stimulation mit F2, Lipopolysaccharid (LPS), Polyinosinsäure:Polycytidylsäure (Poly I:C), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Pam: Die Zellviabilität von primären porcinen retinalen Pigmentepithelzellen wurde nach ein-, drei-, sieben- und 28-tägiger Stimulation mit dem Fucoidan F2 (50 μ g/ml), einem Entzündungsmediator [LPS (1 μ g/ml), Poly I:C (10 μ g/ml), TNF- α (50 ng/ml), Pam (10 ng/ml)] und dem Fuocidan in Kombination mit einem Entzündungsmediator mittels 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Test bestimmt. Die Zellviabilitäten wurden in Prozent zur Kontrolle (100 Prozent) berechnet. Die Mittelwerte dieser Berechnungen werden durch die Säulen repräsentiert. Die Linien zeigen die Standardabweichungen, welche mit Microsoft Excel ermittelt wurden. Die Daten an Tag 1 und Tag 28 sind nach Shapiro-Wilk-Test normalverteilt. Sie wurden mittels Ein-Stichproben- t -Test auf Signifikanz getestet (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$). Die Daten an Tag 3 und 7 sind nach Shapiro-Wilk-Test nicht normalverteilt. Diese Daten wurden mittels Wilcoxon signed-rank test, dt. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test auf Signifikanz getestet, weisen jedoch keine Signifikanzen auf. Anzahl der unabhängigen Experimente: $n \geq 3$.

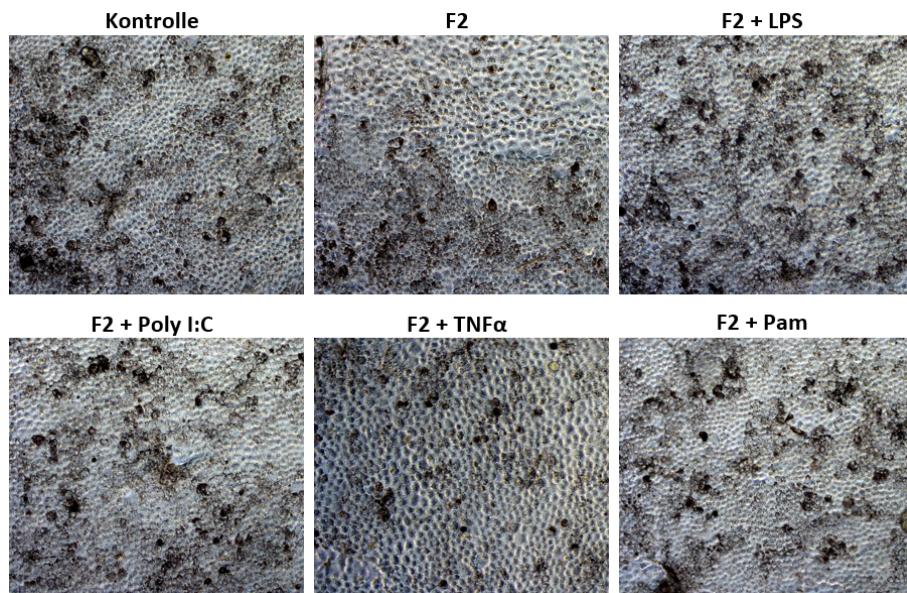
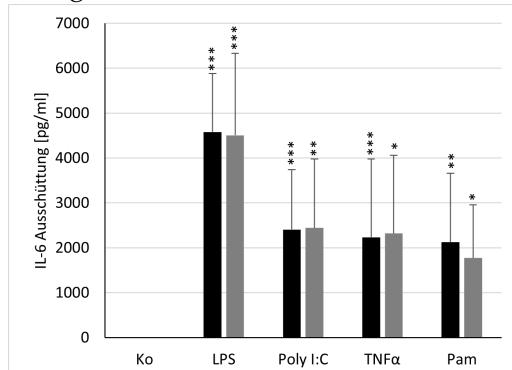


Abbildung 9: Lichtbilder von retinalen Pigmentepithelzellen nach 28-tägiger Stimulation mit F2, Lipopolysaccharid (LPS), Polyinosinsäure:Polycytidylsäure (Poly I:C), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) oder Pam: Mikroskopische Lichtbilder in 100-facher Vergrößerung von RPE-Zellen an Versuchstag 28 nach Stimulation mit F2, LPS, Poly I:C, TNF- α , Pam und der Kombination von F2 mit einem Entzündungsmediator.

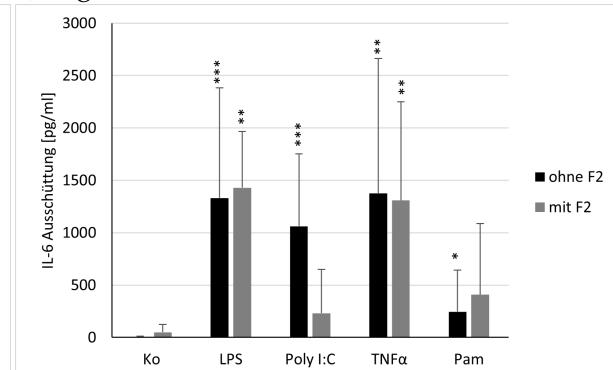
b) Interleukin-6-Ausschüttung:

Es wurde der Einfluss der alleinigen Stimulation der RPE-Zellen mit F2, LPS, Poly I:C, TNF- α oder Pam im Vergleich zur gemeinsamen Stimulation mit F2 und jeweils einem Entzündungsmediator auf die IL-6-Ausschüttung der Zellen an verschiedenen Tagen mittels ELISA untersucht. Einen Tag nach Stimulation kam es durch Zugabe aller getesteten Entzündungsmediatoren zu einer signifikanten Ausschüttung von IL-6, genau wie durch Stimulation durch die Kombination eines Entzündungsmediators mit F2. F2 alleine führte zu keinem signifikanten Anstieg der Zytokinproduktion (Abb. 10a). An Tag 3 nach Stimulation konnte ein signifikanter Anstieg der IL-6-Ausschüttung durch Zugabe von LPS, Poly I:C, TNF- α , Pam und der Kombination von LPS und TNF- α jeweils in Kombination mit F2 beobachtet werden (Abb. 10b). Unter LPS, Poly I:C, TNF- α , Pam und der Kombination aus F2 und LPS bzw. TNF- α kam es an Tag 7 zu einer signifikanten Erhöhung der IL-6-Ausschüttung. Die Zytokinausschüttung wurde signifikant ($p = 0,008$) um 91 Prozentpunkte durch Stimulation mit F2 und Poly I:C (85 ± 106 pg/ml) im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Poly I:C (992 ± 487 pg/ml, $p < 0,0001$) reduziert (Abb. 10c). 14 Tage nach Stimulation konnten keine signifikanten Veränderungen der IL-6-Ausschüttung beobachtet werden. Pam wurde an Tag 14 und 21 nicht getestet, da es nach 28 Tagen nicht mehr aktiv war und keine signifikanten Ergebnisse lieferte (Abb. 10d). Die IL-6-Ausschüttung war an Tag 21 durch Stimulation mit keinem Entzündungsmediator alleine oder in Kombination mit F2 signifikant (Abb. 10e). Des Weiteren kam es an Tag 28 durch F2 und Poly I:C (296 ± 406 pg/ml) zu einer signifikanten ($p = 0,031$) Reduktion der Zytokinausschüttung im Vergleich zur Stimulation nur mit Poly I:C (1147 ± 931 pg/ml, $p = 0,004$). Die Zytokinausschüttungen durch Stimulation mit LPS, Poly I:C und TNF- α waren jeweils signifikant (Abb. 10f).

a) Tag 1



b) Tag 3



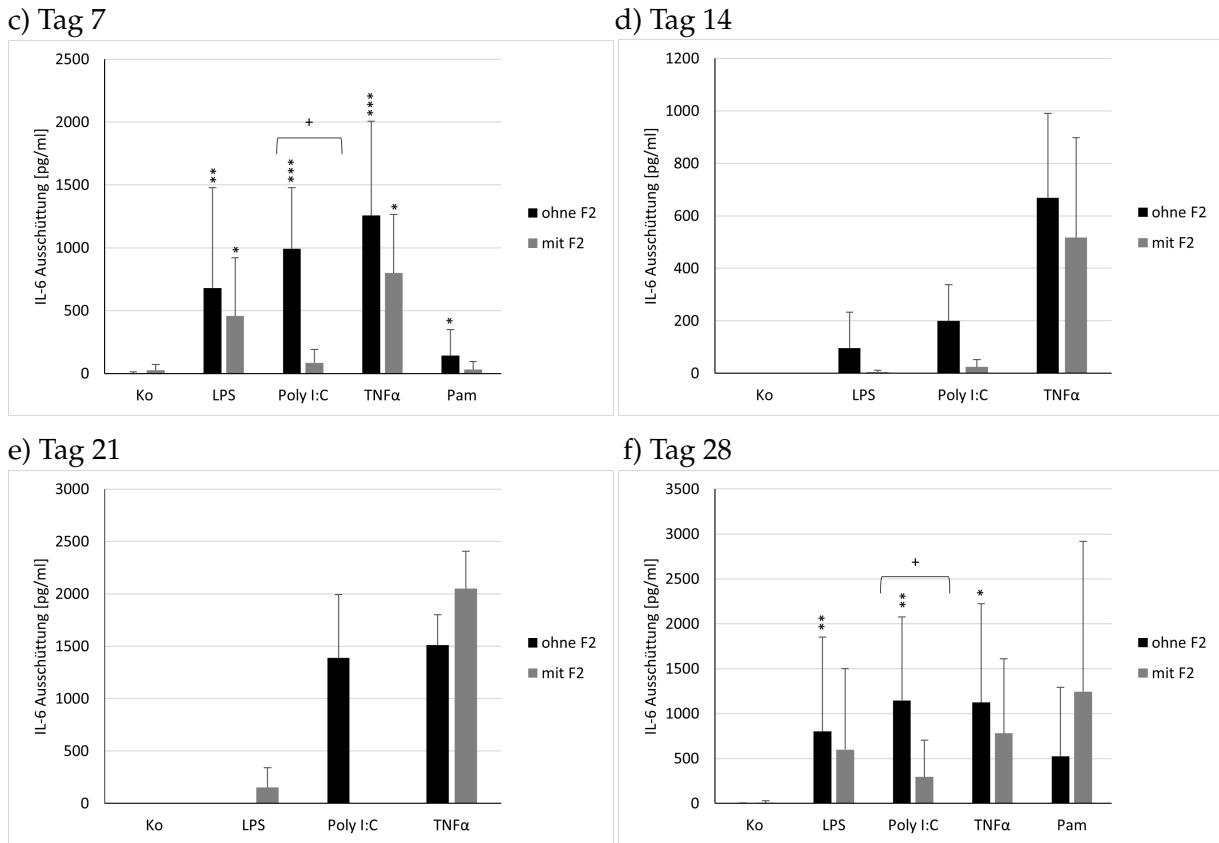
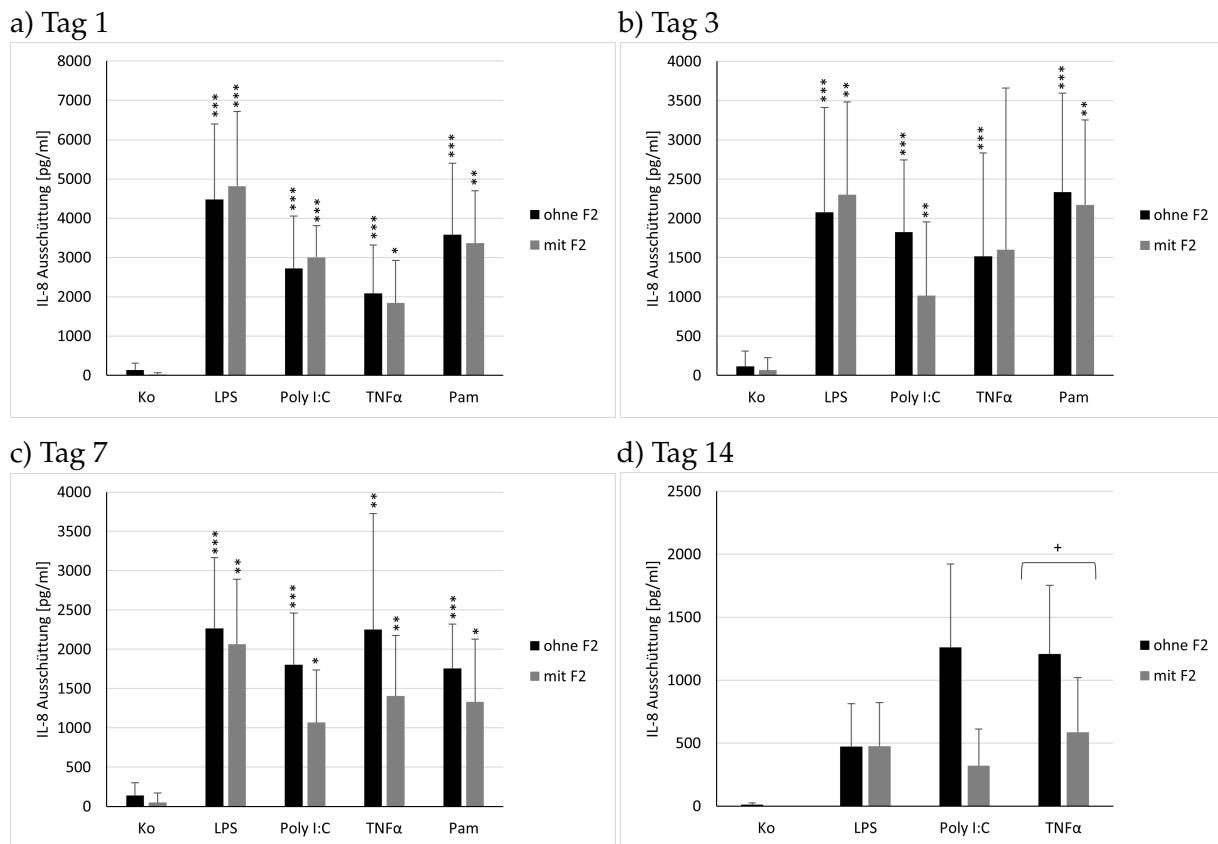


Abbildung 10: Interleukin-6-Ausschüttung von RPE-Zellen nach ein- (a), drei- (b), sieben- (c), 14- (d), 21- (e) und 28-tägiger (f) Stimulation mit F2, Lipopolysaccharid (LPS), Polyninosinsäure:Polycytidylsäure (Poly I:C), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) oder Pam: Die IL-6-Ausschüttung durch F2 (50 μ g/ml), LPS (1 μ g/ml), Poly I:C (10 μ g/ml), TNF- α (50 ng/ml) und Pam (10 ng/ml) wurde mittels ELISA analysiert. Diese wird in pg/ml angegeben. Die Daten an Tag 1 und Tag 14 sind nach Shapiro-Wilk-Test normalverteilt und nach einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) signifikant. Sie wurden mittels Students *t*-Test auf zweiseitige Signifikanz getestet. Die Daten an den Tagen 3, 7, 21 und 28 sind nach Shapiro-Wilk-Test nicht normalverteilt und nach Kruskal-Wallis-Test signifikant. Diese wurden mittels Wilcoxon matched pairs signed-rank-Test auf zweiseitige Signifikanz getestet. Signifikanz im Bezug zur Kontrolle: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. Signifikanzen vom Fucoidan in Kombination mit dem Entzündungsmediator im Bezug zur alleinigen Stimulation mit einem Entzündungsmediator: + = $p < 0,05$. Anzahl der unabhängigen Experimente: $n \geq 3$.

c) Interleukin-8-Ausschüttung:

Die Abbildungen 11a-f zeigen die IL-8-Ausschüttung von RPE-Zellen nach Stimulation mit F2 und verschiedenen Entzündungsmediatoren (LPS, Poly I:C, TNF- α oder Pam) an verschiedenen Tagen der Stimulation. Einen Tag nach Stimulation kam es durch Zugabe aller getesteten Entzündungsmediatoren zu einer signifikanten Ausschüttung von IL-8, genau wie durch die Stimulation mit der Kombination jeweils eines Entzündungsmediators mit F2. F2 alleine hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Zytokinproduktion (Abb. 11a). An Tag 3 nach Stimulation konnte ein signifikanter Anstieg der IL-8-Ausschüttung durch Zugabe jeder Entzündungsmediatoren und der Kombination von LPS, Poly I:C bzw. Pam jeweils in Kombination mit F2 beobachtet werden. F2 alleine und in Kombination mit TNF- α zeigte keine signifikan-

te Erhöhung der Zytokinausschüttung (Abb. 11b). Unter LPS, Poly I:C, TNF- α , Pam und der Kombination aus F2 und allen getesteten Entzündungsmediatoren kam es an Tag 7 zu einer signifikanten Erhöhung der IL-8-Ausschüttung (Abb. 11c). Nach 14-tägiger Stimulation konnte durch die Stimulation der RPE-Zellen durch F2 + TNF- α (586 ± 435 pg/ml) eine signifikante ($p = 0,024$) Reduktion der IL-8-Ausschüttung beobachtet werden. Dem gegenüber steht die alleinige Stimulation mit TNF- α (1208 ± 545 pg/ml) (Abb. 11d). Unter Stimulation mit LPS, Poly I:C, TNF- α und in Kombination mit LPS und TNF- α + F2 wurde die Freisetzung von IL-8 an Tag 21 signifikant erhöht. Die Zugabe von F2 und Poly I:C (1052 ± 809 pg/ml) hatte eine signifikanten ($p = 0,008$) Reduktion der IL-8-Ausschüttung im Vergleich zur Stimulation mit Poly I:C (1739 ± 369 pg/ml $p = 0,023$) zur Folge (Abb. 11e). An Tag 28 wurde die Ausschüttung von IL-8 signifikant durch Zufügen der Entzündungsmediatoren alleine, dem Extrakt F2 alleine und in Kombination mit LPS und TNF- α erhöht. Durch die Stimulation mit F2 und Poly I:C (1052 ± 809 pg/ml) kam es zu einer signifikanten ($p = 0,007$) Reduktion der IL-8-Ausschüttung auf 60 % im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Poly I:C (1754 ± 669 pg/ml, $p < 0,0001$) (Abb. 11f).



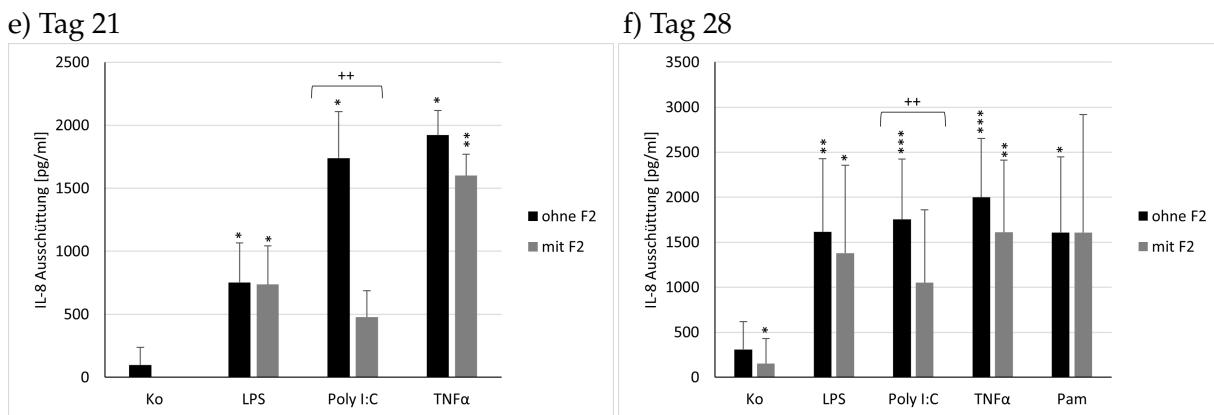


Abbildung 11: Interleukin-8-Ausschüttung von RPE-Zellen nach ein- (a), drei- (b), sieben- (c), 14- (d), 21- (e) und 28-tägiger Stimulation mit F2, Lipopolysaccharid (LPS), Polyinosinsäure:Polycytidylsäure (Poly I:C), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) oder Pam: IL-8-Ausschüttung durch F2 (50 μ g/ml) S, LPS (1 μ g/ml), Poly I:C (10 μ g/ml), TNF- α (50 ng/ml) und Pam (10 ng/ml) wurde mittels ELISA analysiert und wird in pg/ml angegeben. Alle Daten sind nach Shapiro-Wilk-Test normalverteilt und nach einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) signifikant. Sie wurden mittels Students t -Test auf zweiseitige Signifikanz getestet. Signifikanzen im Bezug zur Kontrolle: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$. Signifikanzen vom Fucoidan in Kombination mit dem Entzündungsmediator im Bezug zur alleinigen Stimulation mit einem Entzündungsmediator (+ = $p < 0,05$; ++ = $p < 0,01$). Anzahl der unabhängigen Experimente: $n \geq 3$.

d) Interleukin-1 β - und Tumornekrosefaktor- α -Ausschüttung:

Die IL-1 β -Sekretion von primären porcinen RPE-Zellen wurde mittels ELISA einen Tag und sieben Tage nach Stimulation mit F2 und den Entzündungsmediatoren LPS, Poly I:C oder Pam bestimmt. Es fand lediglich an Tag 1 für die Stimulation mit LPS und F2 + LPS eine Ausschüttung des Zytokins statt. Bei allen anderen stimulierten Zellen kam es zu keiner messbaren Sekretion von IL-1 β (Daten werden hier nicht gezeigt).

Die TNF- α -Ausschüttung von RPE-Zellen wurde mittels ELISA einen Tag nach Stimulation mit F2, LPS, Poly I:C oder Pam bestimmt. Es konnte eine signifikante TNF- α -Ausschüttung nach Zugabe von entweder LPS oder Poly I:C beobachtet werden. Die Zytokinausschüttung wurde bei keinem Entzündungsmediator durch F2 signifikant gesenkt (siehe Abb. 12).

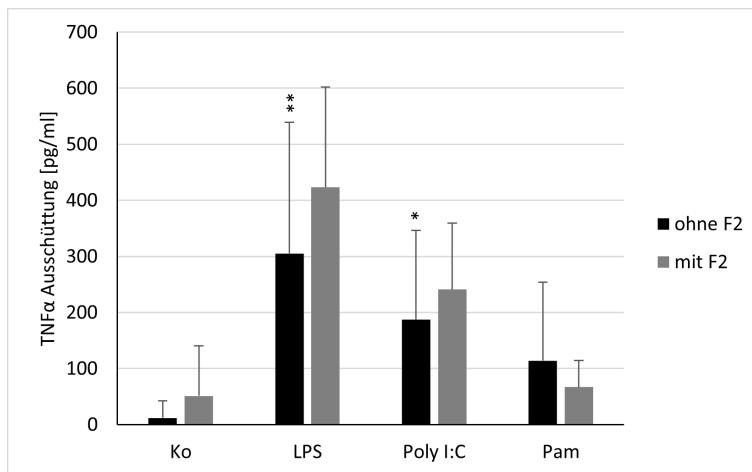


Abbildung 12: TNF- α -Ausschüttung von RPE-Zellen nach eintägiger Stimulation mit F2, Lipopolysaccharid (LPS), Polyinosinsäure:Polycytidylsäure (Poly I:C) oder Pam: Die TNF- α -Ausschüttung durch F2 (50 μ g/ml), LPS (1 μ g/ml), Poly I:C (10 μ g/ml) und Pam (10 ng/ml) wurde mittels ELISA analysiert. TNF- α -Konzentrationen in pg/ml. Die Daten sind nach Shapiro-Wilk-Test nicht normalverteilt und nach Kurskal Wallis-Test signifikant. Sie wurden mittels Wilcoxon paired sign rank test auf zweiseitige Signifikanz getestet (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$). Anzahl der unabhängigen Experimente: $n \geq 3$.

6.1.2 Stimulation mit Extrakten der Spezies *Laminaria hyperborea* und *Saccharina latissima*

Neben F2 wurden Extrakte der Spezies *Laminaria hyperborea* (E81 und E127) und *Saccharina latissima* (E93, E112, E125 und E126) untersucht. E81 und E93 wurden eingesetzt, da sie in Vorversuchen antioxidativ, VEGF- und entzündungshemmend gewirkt haben. E112, E125 und E127 wurden verwendet, da sie chemische Ähnlichkeiten aufweisen und auch aus der Spezies *Laminaria hyperborea* bzw. *Saccharina latissima* extrahiert werden und somit ein ähnlicher Effekt erwartet wurde.

a) Zellviabilität

Die Zellviabilität der RPE-Zellen wurde mittels MTT-Assay für die Tage eins, drei, sieben und 28 für die Extrakte E81, E93, E112, E125, E126 und E127 ermittelt. Abbildung 13 zeigt die Mittelwerte der Viabilität in % zur unbehandelten Kontrolle (auf 100 % genormt) der RPE-Zellen nach Zugabe der verschiedenen Extrakte und Entzündungsmediatoren. Ein grüner Hintergrund zeigt eine hohe Zellviabilität (100 %), gelb eine mittelhohe (50 %) und rot eine niedrige (0 %). Bei Werten zwischen 50 % und 100 % werden diese Farben im Farbverlaufsspektrum zwischen gelb, über hellgelb, hellgrün und dunkelgrün zugeordnet. Bei Werten zwischen 0 % und 50 % werden diese den Farben zwischen rot über hellrot, orange und gelb zugeordnet. Die Zellviabilität der RPE-Zellen nach Stimulation durch die Entzündungsmediatoren LPS, Poly I:C, TNF- α bzw. Pam zeigte an den Tagen 1 und 3 keine Reduktion.

Nach 28-tägiger Stimulation konnte eine nicht-signifikante Verringerung der Viabilität der Zellen beobachtet werden, welche mit LPS ($90 \pm 19\%$, $p = 0,180$) oder Pam ($81 \pm 31\%$, $p = 0,220$) stimuliert worden sind. Nach dem ersten Tag der Stimulation konnten Reduktionen der Zellviabilitäten mit E81, E81 + LPS, E81 + Poly I:C, E81 + TNF- α bzw. E81 + Pam beobachtet werden, welche jedoch nicht signifikant waren. Drei Tage nach Stimulation verbesserte sich die Viabilität unter E81, E81 + Poly I:C, E81 + TNF- α und E81 + Pam wieder, gleichzeitig sanken die Viabilitäten der RPE-Zellen, welche mit E81 + LPS stimuliert worden sind. An Tag 7 nach Stimulation mit E81 und E81 zusammen mit Poly I:C, TNF- α oder Pam wurden die Zellviabilitäten weiter reduziert. Lediglich durch E81 und LPS erholte sich die Viabilität etwas im Vergleich zu Tag 3. 28 Tage nach Stimulation mit E81 alleine und in Kombination mit LPS, TNF- α oder Pam, konnte eine nicht-signifikante Erholung der Zellviabilität beobachtet werden. Alle Veränderungen der Zellviabilität von E81 waren an keinem Tag signifikant.

Unter E93 konnte bereits einen Tag nach Stimulation eine nicht-signifikante reduzierte Zellviabilität nach Zugabe von E93 in Kombination mit LPS gezeigt werden. Bei E93 zeigte sich eine signifikante Reduktion der Viabilität an Tag drei nach alleiniger Stimulation mit E93 ($87 \pm 3\%$, $p = 0,014$) und in Kombination mit TNF- α ($82 \pm 6\%$, $p = 0,029$), sowie an Tag sieben für E93 ($39 \pm 42\%$, $p = 0,012$), E93 mit Poly I:C ($36 \pm 34\%$, $p = 0,008$), E93 mit TNF- α ($41 \pm 21\%$, $p = 0,004$) und E93 mit Pam ($46 \pm 51\%$, $p = 0,027$). Dieser negative Einfluss auf die Zellviabilität setzte sich auch nach 28 Tagen weiter fort: E93 ($1 \pm 0\%$, $p < 0,0001$), E93 + LPS

	Tag 1	Tag 3	Tag 7	Tag 28
Kontrolle	100	100	100	100
LPS	105	99	97	90
Poly I:C	109	108	95	98
TNF α	104	110	93	99
Pam	103	102	100	81
E81	93	103	86	92
E81 + LPS	83	73	88	93
E81 + Poly I:C	82	97	89	80
E81 + TNF α	88	95	72	115
E81 + Pam	88	98	84	101
E93	94	87 *	39 *	1 **
E93 + LPS	88	86	65	2 **
E93 + Poly I:C	94	61	36 **	1 **
E93 + TNF α	94	82 *	41 **	11 **
E93 + Pam	96	85	46 *	
E112	96	101	79	10 **
E112 + LPS	99	93	71 *	12 **
E112 + Poly I:C	94	92	72	5 **
E112 + TNF α	97	101	83	33 *
E112 + Pam	93	94	59	11 **
E125	91 **	57 *	20	2 **
E125 + LPS	86 *	54 *	20	2 ***
E125 + Poly I:C	87 *	25 *	18	1 ***
E125 + TNF α	87	47 *	23	2 ***
E125 + Pam	91 *	44	20	2 ***
E126	99	100	88 *	72
E126 + LPS	96	97	82	71
E126 + Poly I:C	98	97	83	74
E126 + TNF α	99	103	86	71
E126 + Pam	95	99	89	62 *
E127	95	98	100	75
E127 + LPS	91	87	81	64
E127 + Poly I:C	94	77	88	78
E127 + TNF α	96	95	98	90
E127 + Pam	97	96	91	63

Abbildung 13: Zellviabilität nach ein-, drei-, sieben-, 28-tägiger Stimulation mit den Kontrollen, Fucoidanen ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$) E81, E93, E112, E125, E126, E127 und Entzündungsmediatoren: Die Viabilitäten wurden in Prozent zur unbehandelten Kontrolle (100 %) berechnet. Die Zahlen zeigen die Mittelwerte, die Farben die Viabilität. Bei Werten zwischen 50 % und 100 % werden diese Farben im Farbverlaufsspektrum zwischen gelb, über hellgelb, hellgrün und dunkelgrün zugeordnet. Bei Werten zwischen 0 % und 50 % werden diese den Farben zwischen rot über hellrot, orange und gelb zugeordnet. Die Daten für E81 an den Tagen 1, 3 und 7, für E93 an Tag 7 und für E125 an Tag 7 sind nach Shapiro-Wilk-Test nicht normalverteilt. Diese Daten wurden mittels Wilcoxon signed-rank test auf Signifikanz getestet. Die restlichen Daten sind nach Shapiro-Wilk-Test normalverteilt. Sie wurden mittels One-Sample-t-test auf Signifikanz getestet (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$). Anzahl der unabhängigen Experimente: $n \geq 3$.

($2 \pm 0\%$, $p < 0,0001$), E93 + Poly I:C ($1 \pm 0\%$, $p < 0,0001$), E93 + TNF- α ($11 \pm 9\%$, $p < 0,0001$). Durch den Extrakt E112 in Kombination mit Poly I:C bzw. Pam konnte keine signifikante Reduktion der Viabilität einen und drei Tage nach Stimulation beobachtet werden. Nach sieben Tagen wurde die Viabilität signifikant durch E112 mit LPS ($71 \pm 9\%$, $p = 0,040$) und nicht-signifikant durch E112 alleine und in Kombination mit Poly I:C, TNF- α oder Pam reduziert. 28 Tage nach Stimulation wurde die Viabilität durch Zugabe aller getesteten Entzündungsmediatoren mit E112 signifikant reduziert: E112 ($10 \pm 4\%$, $p = 0,001$), E112 + LPS ($12 \pm 8\%$, $p = 0,004$), E112 + Poly I:C ($5 \pm 0\%$, $p < 0,0001$), E112 + TNF- α ($33 \pm 11\%$, $p = 0,013$) und E112 + Pam ($11 \pm 6\%$, $p = 0,002$).

Bei E125 zeigte sich bereits einen Tag nach Stimulation signifikante Reduktionen der Zellviabilität durch Stimulation mit E125 alleine ($91 \pm 1\%$, $p = 0,006$) und in Kombination mit LPS ($86 \pm 5\%$, $p = 0,049$) und Poly I:C ($87 \pm 3\%$, $p = 0,029$). Auch an Tag drei konnte keine signifikante Reduktion der Viabilität für die Zellen, die mit E125 ($57 \pm 11\%$, $p = 0,031$), E125 + LPS ($54 \pm 14\%$, $p = 0,044$), E125 + Poly I:C ($25 \pm 13\%$, $p = 0,016$) und E125 + TNF- α ($47 \pm 15\%$, $p = 0,036$) stimuliert wurden, beobachtet werden. 28 Tage nach Stimulation war signifikant kaum eine Viabilität mehr zu beobachten: E125 ($2 \pm 0\%$, $p < 0,0001$), E125 + LPS ($2 \pm 0\%$, $p < 0,0001$), E125 + Poly I:C ($1 \pm 1\%$, $p < 0,0001$), E125 + TNF- α ($2 \pm 0\%$, $p < 0,0001$) und E125 + Pam ($2 \pm 0\%$, $p < 0,0001$).

Unter E126 alleine und mit den verschiedenen Entzündungsmediatoren kam es weder an Tag eins noch an Tag drei zu signifikanten Reduktionen der Zellviabilitäten. Sieben Tage nach Stimulation kam es zu einer signifikanten Reduktion der Viabilität durch Zugabe von E126 ($88 \pm 3\%$, $p = 0,029$) und zu einer nicht-signifikanten Reduktion durch E126 mit LPS, Poly I:C, TNF- α oder Pam. Diese Reduktion wurde an Tag 28 signifikant durch Zugabe von E126 mit Pam ($62 \pm 12\%$, $p = 0,045$) und nicht-signifikant durch Zugabe von E126 alleine und zusammen mit LPS, Poly I:C und TNF- α fortgeführt.

Durch die Stimulation mit E127 wurde an Tag drei die Viabilität der mit E127 und LPS sowie E127 mit Poly I:C behandelten Zellgruppen weiter nicht-signifikant reduziert. Sieben Tage nach Stimulation wurde die Viabilität durch Zugabe von E127 mit LPS und E127 mit Poly I:C weiter nicht-signifikant reduziert. Durch alle Versuchsansätze kam es an Tag 28 zu einer nicht-signifikanten Reduktion der Viabilität der RPE-Zellen.

b) Interleukin-6-Ausschüttung:

Die Abbildungen 14-19 zeigen die Ausschüttung von porcinem IL-6 einen Tag, drei-, sieben- und 28 Tage nach Stimulation der RPE-Zellen mit den Fucoidanen E81, E93, E112, E125, E126 und E127 alleine und zusammen mit den jeweiligen Entzündungsmediatoren (LPS, Poly I:C, TNF- α , Pam).

E81: Einen Tag nach Stimulation kam es durch die Zugabe aller getesteten Entzündungsmediatoren zu einer signifikanten Ausschüttung von IL-6, genau wie durch die Stimulation mit der Kombination aus Entzündungsmediatoren und E81. Auch E81 alleine hatte einen signifikanten Einfluss auf die Zytokinproduktion (Abb. 14a). An Tag 3 nach Stimulation konnte ein signifikanter Anstieg der IL-6-Ausschüttung durch Zugabe von E81, LPS, Poly I:C, TNF- α und

der Kombination von LPS bzw. TNF- α mit E81 beobachtet werden (Abb. 14b). Sieben Tage nach Stimulation kam es durch Zugabe aller getesteten Entzündungsmediatoren zu einer signifikanten Ausschüttung von IL-6, genau wie durch die Stimulation durch die Kombination der Entzündungsmediatoren mit E81. Ebenso hatte E81 alleine einen signifikanten Einfluss auf die Zytokinproduktion (Abb. 14c). Des Weiteren kam es an Tag 28 sowohl durch Poly I:C und TNF- α als auch durch F2 mit LPS, TNF- α oder Pam zu einer signifikanten Erhöhung der Zytokinausschüttung (Abb. 14d). Eine Reduktion der IL-6-Ausschüttung durch Zugabe von E81 zu einem Entzündungsmediator im Vergleich zur Zytokinproduktion durch die alleinige Stimulation mit einem Entzündungsmediator konnte an keinem untersuchten Tag festgestellt werden.

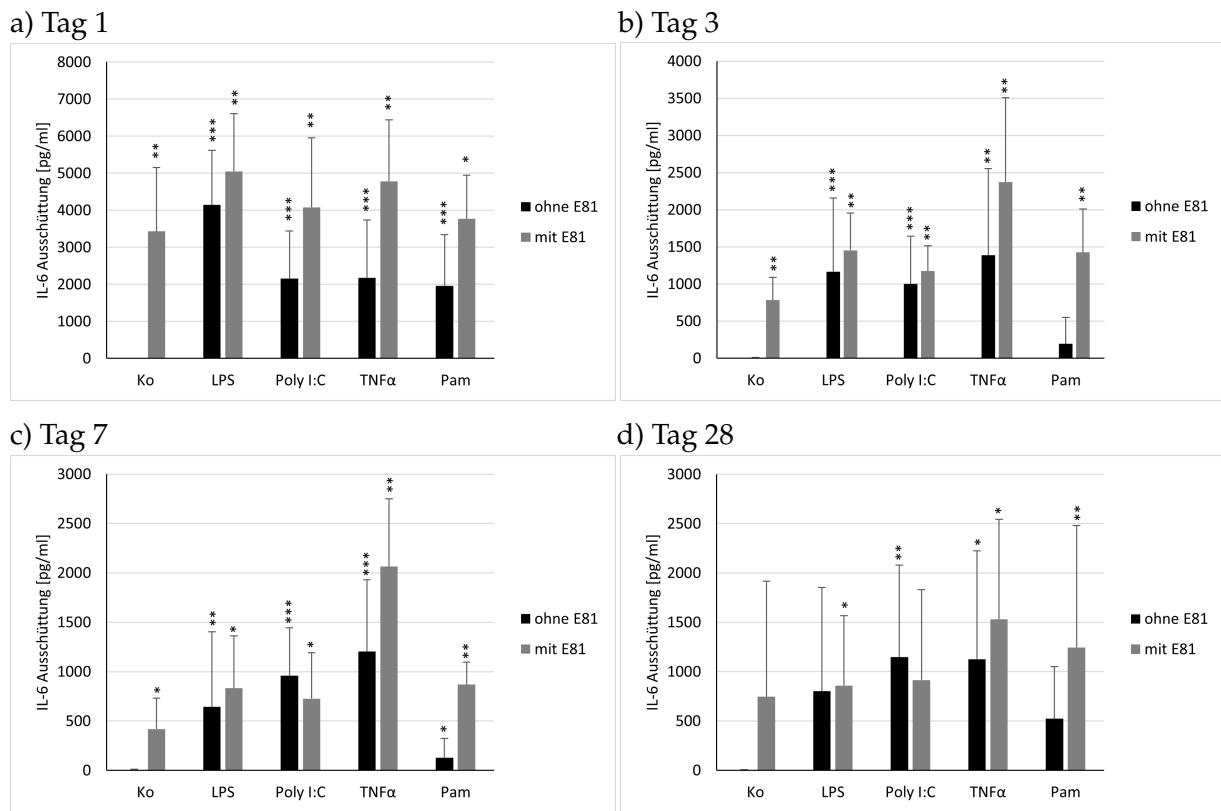
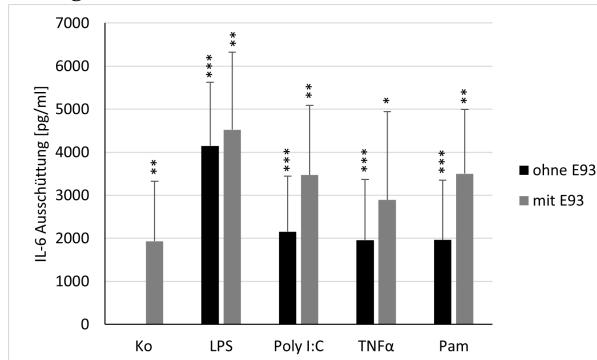


Abbildung 14: Interleukin-6-Ausschüttung von RPE-Zellen nach ein- (a), drei- (b), sieben- (c) und 28-tägiger (d) Stimulation mit E81, Lipopolysaccharid (LPS), Poly I:C, Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Pam: IL-6-Ausschüttung (in pg/ml) durch E81 (50 μ g/ml), LPS (1 μ g/ml), Poly I:C (10 μ g/ml), TNF- α (50 ng/ml) und Pam (10 ng/ml) wurde mittels ELISA analysiert. Die Daten sind nach Shapiro-Wilk-Test normalverteilt und nach einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) signifikant. Sie wurden mittels Students *t-test* auf zweiseitige Signifikanz getestet. Signifikanzen im Bezug zur Kontrolle: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$. Anzahl der unabhängigen Experimente: $n \geq 3$.

E93: Einen Tag nach Stimulation kam es durch Zugabe aller getesteten Entzündungsmediatoren zu einer signifikanten Ausschüttung von IL-6, genau wie durch die Stimulation durch die Kombination der Entzündungsmediatoren mit E93 sowie E93 alleine (Abb. 15a). An Tag 3 nach Stimulation konnte ein signifikanter Anstieg der IL-6 Ausschüttung durch Zugabe von LPS, Poly I:C, TNF- α und der Kombination von LPS, Poly I:C oder Pam mit E93 beobachtet werden

(Abb. 15b). Eine Reduktion der IL-6-Ausschüttung durch Zugabe von E93 zu einem Entzündungsmediator im Vergleich zur Zytokinproduktion durch die alleinige Stimulation mit einem Entzündungsmediator konnte an keinem der untersuchten Tagen festgestellt werden. Da sich, wie im MTT festgestellt wurde, die RPE-Zellen Tag 7 bereits abgelöst haben, kann keine Aussage über die Zytokinausschüttung an den Tagen 7 und 28 getätigt werden.

a) Tag 1



b) Tag 3

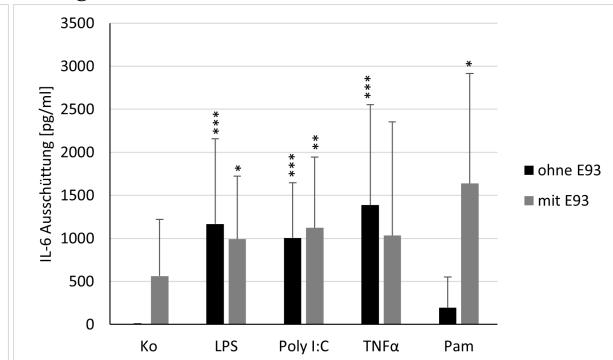


Abbildung 15: Interleukin-6-Ausschüttung von RPE-Zellen nach ein- (a) und dreitägiger (b) Stimulation mit E93, Lipopolysaccharid (LPS), Polyinosinsäure:Polycytidylsäure (Poly I:C), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Pam: IL-6-Ausschüttung von E93 (50 μ g/ml), LPS (1 μ g/ml), Poly I:C (10 μ g/ml), TNF- α (50 ng/ml) und Pam (10 ng/ml) in pg/ml. Die Daten sind nach Shapiro-Wilk-Test normalverteilt und nach einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) signifikant. Sie wurden mittels *Students t-test* auf beidseitige Signifikanz getestet. Signifikanzen im Bezug zur Kontrolle: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$. Anzahl der unabhängigen Experimente: $n \geq 3$.

E112: Nach eintägiger Stimulation kam es durch Zugabe der Entzündungsmediatoren LPS, Poly I:C, TNF- α oder Pam zu einer signifikanten Ausschüttung von IL-6, genau wie durch die Stimulation durch die Kombination von LPS, TNF- α oder Pam mit E112. Der Extrakt E112 alleine hat keinen signifikanten Einfluss auf die Zytokinproduktion (Abb. 16a). An Tag 3 nach Stimulation konnte ein signifikanter Anstieg der IL-6-Ausschüttung durch Zugabe von LPS, Poly I:C, TNF- α , Pam und der Kombination von LPS mit E112 beobachtet werden (Abb. 16b). Nach sieben Tagen kam es durch Zugabe aller getesteten Entzündungsmediatoren alleine zu einer signifikanten Ausschüttung von IL-6 (Abb. 16c). Des Weiteren konnte an Tag 28 durch LPS, Poly I:C und TNF- α eine signifikante Erhöhung der Zytokinausschüttung beobachtet werden (Abb. 16d). Eine Reduktion der IL-6-Ausschüttung durch Zugabe von E112 zu einem Entzündungsmediator im Vergleich zur Zytokinproduktion durch die alleinige Stimulation mit einem Entzündungsmediator konnte an keinem der untersuchten Tage festgestellt werden.

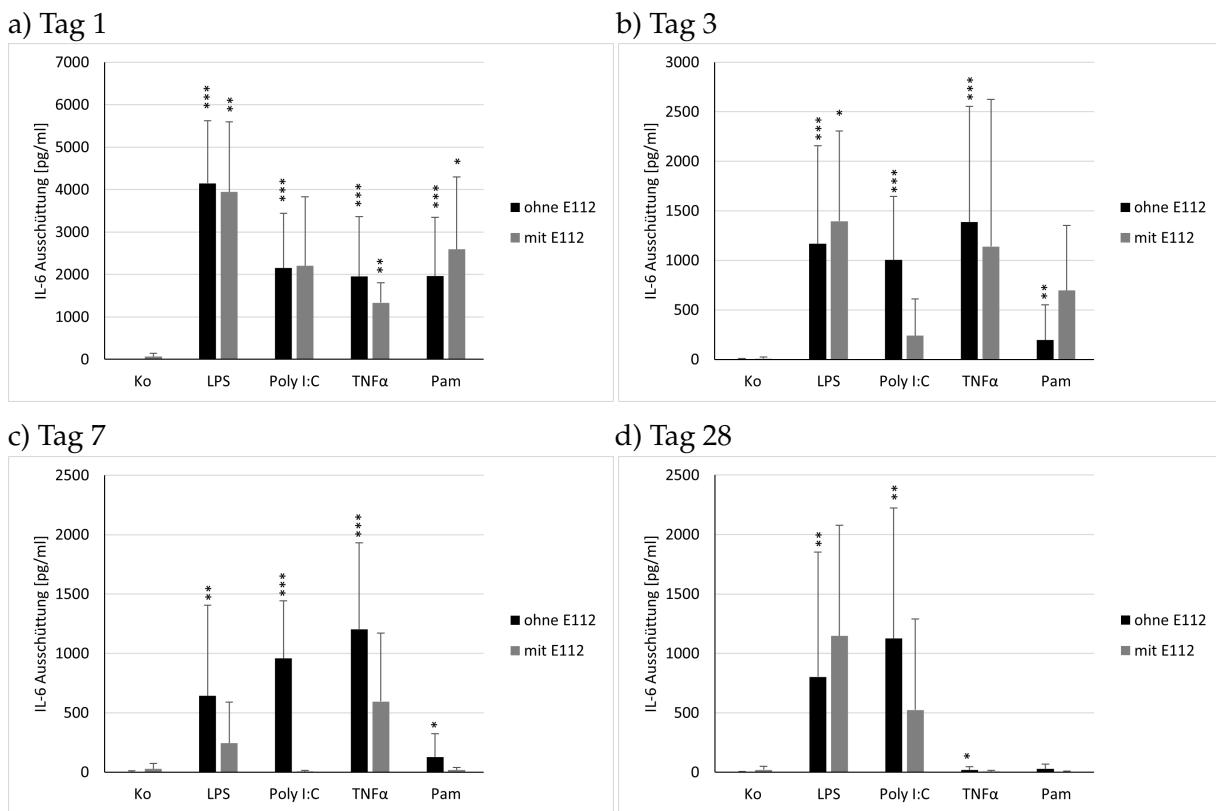


Abbildung 16: Interleukin-6-Ausschüttung von RPE-Zellen nach ein- (a), drei- (b), sieben- (c) und 28-tägiger (d) Stimulation mit E112, Lipopolysaccharid (LPS), Polyinosinsäure:Polycytidylsäure (Poly I:C), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Pam: IL-6-Ausschüttung durch E112 (50 μ g/ml), LPS (1 μ g/ml), Poly I:C (10 μ g/ml), TNF- α (50 ng/ml) und Pam (10 ng/ml) in pg/ml. Die Daten an Tag 1 sind nach Shapiro-Wilk-Test normalverteilt und nach einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) signifikant. Sie wurden mittels Students *t*-test auf zweiseitige Signifikanz getestet. Die Daten an den Tagen 3, 7 und 28 sind nach Shapiro-Wilk-Test nicht normalverteilt. Sie sind nach Kruskal-Wallis Test signifikant und wurden mittels Wilcoxon matched pairs signed-rank-Test auf zweiseitige Signifikanz getestet. Signifikanzen im Bezug zur Kontrolle: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$. Anzahl der unabhängigen Experimente: $n \geq 3$.

E125: Einen Tag nach Stimulation kam es durch Zugabe aller getesteten Entzündungsmediatoren zu einer signifikanten Ausschüttung von IL-6, genau wie durch die Kombination mit E125 und LPS (Abb. 17a). Nach drei Tagen konnte ein signifikanter Anstieg von IL-6 durch Zugabe von LPS, Poly I:C, TNF- α und der Kombination von LPS mit E125 beobachtet werden (Abb. 17b). Es konnte keine Reduktion der IL-6-Ausschüttung durch Zugabe von E125 zu einem Entzündungsmediator beobachtet werden. Da sich, wie im MTT festgestellt wurde, die RPE-Zellen Tag 7 bereits abgelöst haben, kann keine Aussage über die Zytokinausschüttung an den Tagen 7 und 28 getätigt werden.

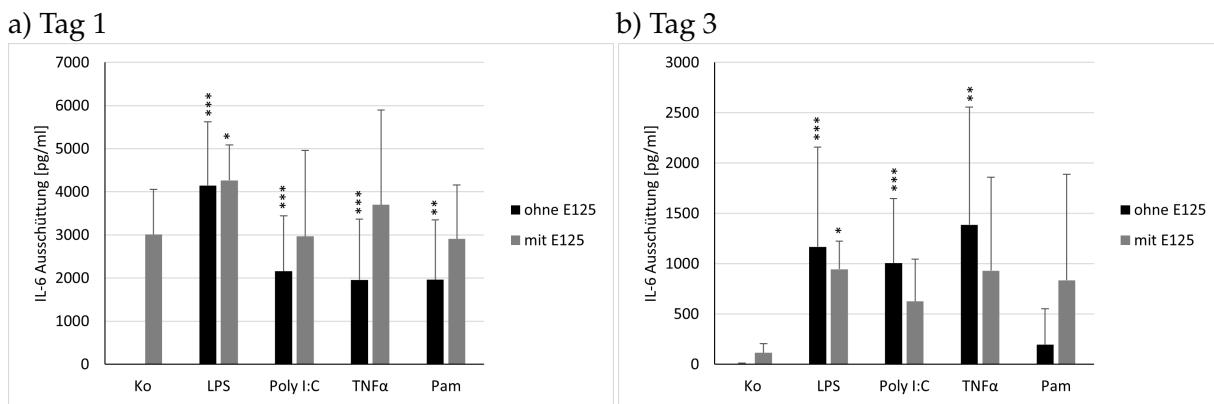
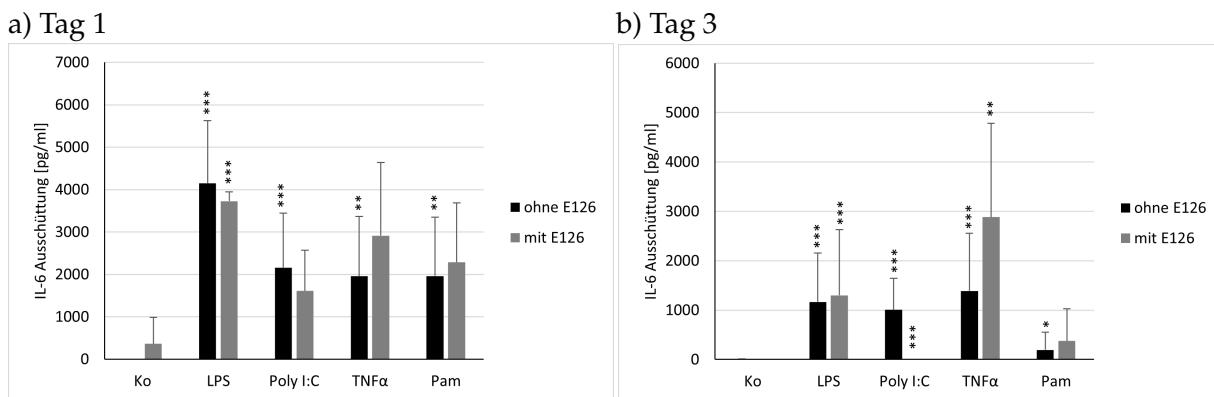


Abbildung 17: Interleukin-6-Ausschüttung von RPE-Zellen nach ein- (a) und dreitägiger (b) Stimulation mit E125, Lipopolysaccharid (LPS), Polyinosinsäure:Polycytidylsäure (Poly I:C), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Pam: IL-6-Ausschüttung durch E125 (50 μ g/ml), LPS (1 μ g/ml), Poly I:C (10 μ g/ml), TNF- α (50 ng/ml) und Pam (10 ng/ml) in pg/ml. Die Daten sind nach Shapiro-Wilk-Test normalverteilt und nach einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) signifikant. Sie wurden mittels Students *t*-test auf zweiseitige Signifikanz getestet. Signifikanzen im Bezug zur Kontrolle: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$. Anzahl der unabhängigen Experimente: $n \geq 3$.

E126: Einen Tag nach Stimulation kam es durch Zugabe aller getesteten Entzündungsmediatoren zu einer signifikanten Ausschüttung von IL-6. Auch durch die Gabe von LPS und E126 konnte ein Anstieg der Zytokinproduktion beobachtet werden. E126 alleine hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Zytokinproduktion (Abb. 18a). An Tag 3 nach Stimulation konnte ein signifikanter Anstieg der IL-6-Ausschüttung durch Zugabe aller getesteten Entzündungsmediatoren und der Kombination von LPS, Poly I:C und TNF- α jeweils in Kombination mit E126 beobachtet werden (Abb. 18b). Unter LPS, Poly I:C, TNF- α , Pam und der Kombination aus E126 und Poly I:C kam es an Tag 7 zu einer signifikanten Erhöhung der IL-6-Ausschüttung. Die Zytokinproduktion wurde signifikant ($p = 0,008$) durch Stimulation mit E126 und Poly I:C (0 ± 0 pg/ml, $p < 0,0001$) im Vergleich zur Stimulation mit Poly I:C (958 ± 485 pg/ml, $p < 0,0001$) gesenkt (Abb. 18c). An Tag 28 wurde die Ausschüttung von IL-6 signifikant durch Stimulation mit LPS, Poly I:C und TNF- α erhöht (Abb. 18d).



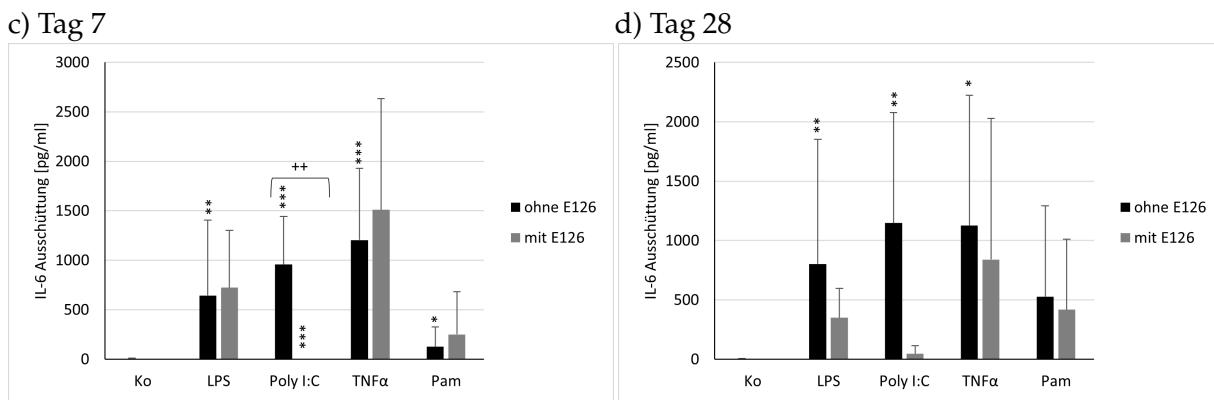
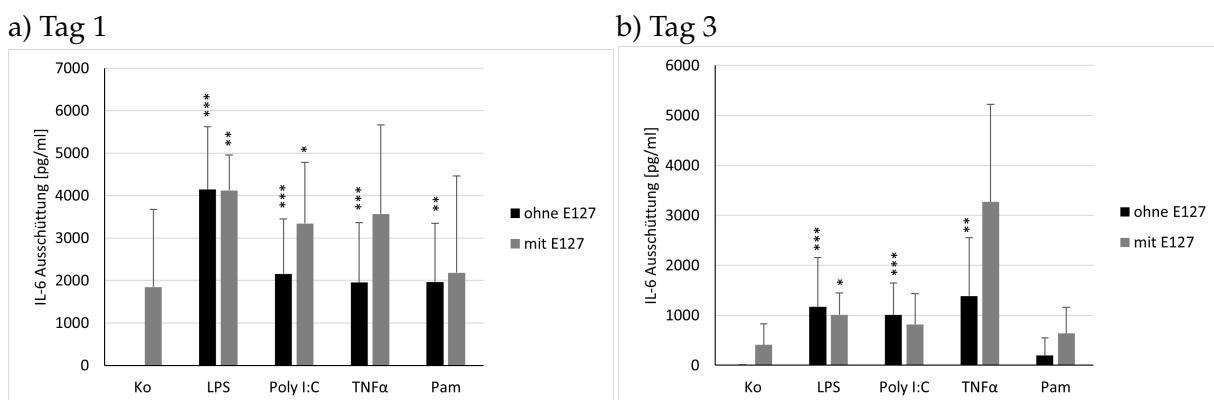


Abbildung 18: Interleukin-6-Ausschüttung von RPE-Zellen nach ein- (a), drei- (b), sieben- (c) und 28-tägiger (d) Stimulation mit E126, Lipopolysaccharid (LPS), Polyinosinsäure:Polycytidylsäure (Poly I:C), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Pam: IL-6-Ausschüttung durch E126 (50 μ g/ml), LPS (1 μ g/ml), Poly I:C (10 μ g/ml), TNF- α (50 ng/ml) und Pam (10 ng/ml) in pg/ml. Die Daten an Tag 1 und 7 sind nach Shapiro-Wilk-Test normalverteilt und nach einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) signifikant. Sie wurden mittels *Students t-test* auf zweiseitige Signifikanz getestet. Die Daten an den Tagen 3 und 28 sind nach Shapiro-Wilk-Test nicht normalverteilt. Sie sind nach Kruskal-Wallis Test signifikant und wurden mittels Wilcoxon matched pairs signed-rank-Test auf zweiseitige Signifikanz getestet. Signifikanzen im Bezug zur Kontrolle: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,001$. Signifikanzen vom Fucoidan in Kombination mit dem Entzündungsmediator im Bezug zur alleinigen Stimulation mit einem Entzündungsmediator: ++ = $p < 0,01$. Anzahl der unabhängigen Experimente: $n \geq 3$.**

E127: Nach eintägiger Stimulation kam es durch Zugabe der Entzündungsmediatoren LPS, Poly I:C, TNF- α oder Pam zu einer signifikanten Ausschüttung von IL-6, genau wie durch die Stimulation durch die Kombination von LPS und Poly I:C mit E127 (Abb. 19a). An Tag 3 konnte ein signifikanter Anstieg der IL-6-Ausschüttung durch Zugabe von LPS, Poly I:C, TNF- α sowie der Kombination von E127 und LPS beobachtet werden (Abb. 19b). Sieben Tage nach Stimulation kam es durch Zufügen aller getesteten Entzündungsmediatoren alleine zu einer signifikanten Ausschüttung von IL-6. Es konnte eine signifikante ($p = 0,001$) Reduktion der IL-6-Ausschüttung um 80 Prozentpunkte durch E127 + Poly I:C (194 ± 210 pg/ml, $p = 0,208$) im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Poly I:C (958 ± 485 pg/ml, $p < 0,0001$) beobachtet werden (Abb. 19c). Des Weiteren kam es an Tag 28 durch LPS, Poly I:C oder TNF- α zu einer signifikanten Erhöhung der Zytokinausschüttung (Abb. 19d).



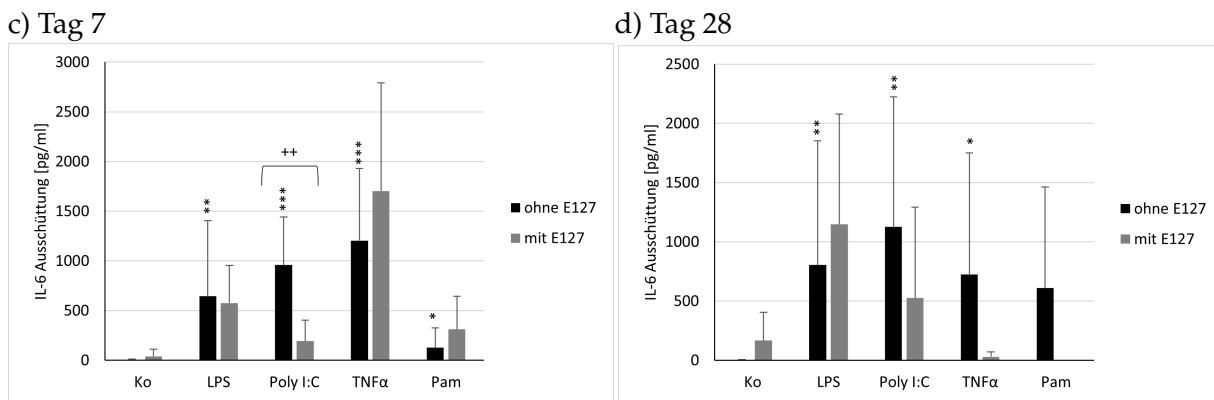


Abbildung 19: Interleukin-6-Ausschüttung von RPE-Zellen nach ein- (a), drei- (b), sieben- (c) und 28-tägiger (d) Stimulation mit E127, Lipopolysaccharid (LPS), Polyinosinsäure:Polycytidylsäure (Poly I:C), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Pam: IL-6-Ausschüttung durch E127 (50 μ g/ml), LPS (1 μ g/ml), Poly I:C (10 μ g/ml), TNF- α (50 ng/ml) und Pam (10 ng/ml) in pg/ml. Die Daten an Tag 1, 3 und 7 sind nach Shapiro-Wilk-Test normalverteilt und nach einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) signifikant. Sie wurden mittels *Students t-test* auf zweiseitige Signifikanz getestet. Die Daten an Tag 28 sind nach Shapiro-Wilk-Test nicht normalverteilt. Sie sind nach Kruskal-Wallis Test signifikant und wurden mittels Wilcoxon matched pairs signed-rank-Test auf zweiseitige Signifikanz getestet. Signifikanzen im Bezug zur Kontrolle: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$. Signifikanzen vom Fucoidan in Kombination mit dem Entzündungsmediator im Bezug zur alleinigen Stimulation mit einem Entzündungsmediator: ++ = $p < 0,01$ Anzahl der unabhängigen Experimente: $n \geq 3$.

c) Interleukin-8-Ausschüttung:

Die Abbildungen 20-25 zeigen die Ausschüttung von porcinem IL-8 an verschiedenen Tagen nach Stimulation der RPE-Zellen mit den Fucoidanen E81, E93, E112, E125, E126 und E127 alleine und zusammen mit den Entzündungsmediatoren LPS, Poly I:C, TNF- α oder Pam.

E81: Einen Tag nach Stimulation kam es durch Zugabe aller getesteten Entzündungsmediatoren zu einer signifikanten Ausschüttung von IL-8. Auch durch die Stimulation mit E81 alleine und in Kombination mit LPS, Poly I:C und TNF- α konnte eine signifikante Zytokinausschüttung festgestellt werden (Abb. 20a). An Tag 3 nach Stimulation konnte ein signifikanter Anstieg von IL-8 durch Zugabe von E81 alleine und in Kombination mit allen Entzündungsmediatoren sowie durch Stimulation der Entzündungsmediatoren alleine beobachtet werden (Abb. 20b). Nach sieben Tagen kam es durch Zugabe aller getesteten Entzündungsmediatoren alleine zu einer signifikanten Ausschüttung von IL-8, genau wie durch die Stimulation mit E81 alleine und in Kombination mit LPS, Poly I:C und TNF- α (Abb. 20c). Des Weiteren wurde an Tag 28 sowohl durch die Entzündungsmediatoren alleine als auch durch E81 alleine und in Kombination mit allen Entzündungsmediatoren die Zytokinausschüttung signifikant erhöht (Abb. 20d).

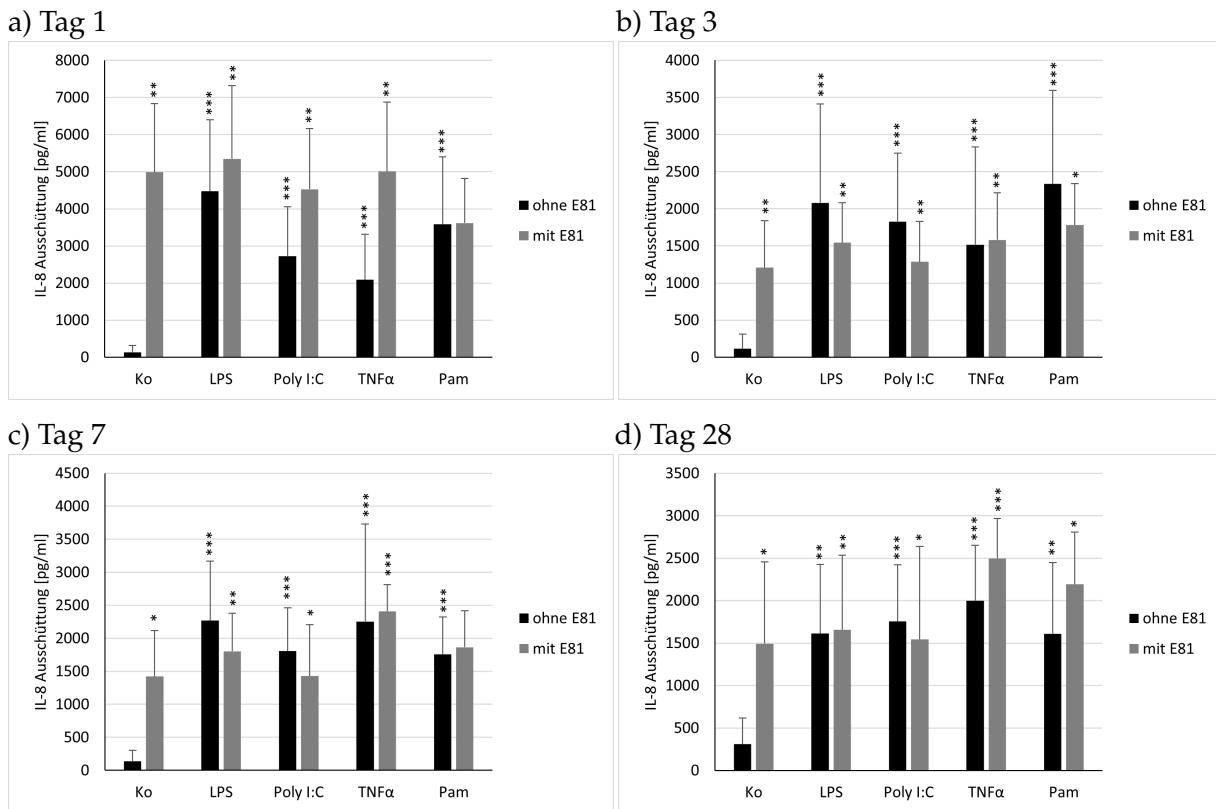


Abbildung 20: Interleukin-8-Ausschüttung von RPE-Zellen nach ein- (a), drei- (b), sieben- (c) und 28-tägiger (d) Stimulation mit E81, Lipopolysaccharid (LPS), Polyinosinsäure:Polycytidylsäure (Poly I:C), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Pam: IL-8-Ausschüttung durch E81 (50 μ g/ml), LPS (1 μ g/ml), Poly I:C (10 μ g/ml), TNF- α (50 ng/ml) und Pam (10 ng/ml) in pg/ml. Die Daten sind nach Shapiro-Wilk-Test normalverteilt und nach einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) signifikant. Sie wurden mittels *Students t-test* auf zweiseitige Signifikanz getestet. Signifikanzen im Bezug zur Kontrolle: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$. Anzahl der unabhängigen Experimente: $n \geq 3$.

E93: An Tag 1 und 3 kam es durch Zugabe aller getesteten Entzündungsmediatoren, E93 alleine und E93 in Kombination mit einem Entzündungsmediator zu einer signifikanten Ausschüttung von IL-8 (Abb. 21 a und b). Da sich die Zellen Tag 7 bereits abgelöst haben, kann keine Aussage über die Zytokinausschüttung an den Tagen 7 und 28 getätigt werden.

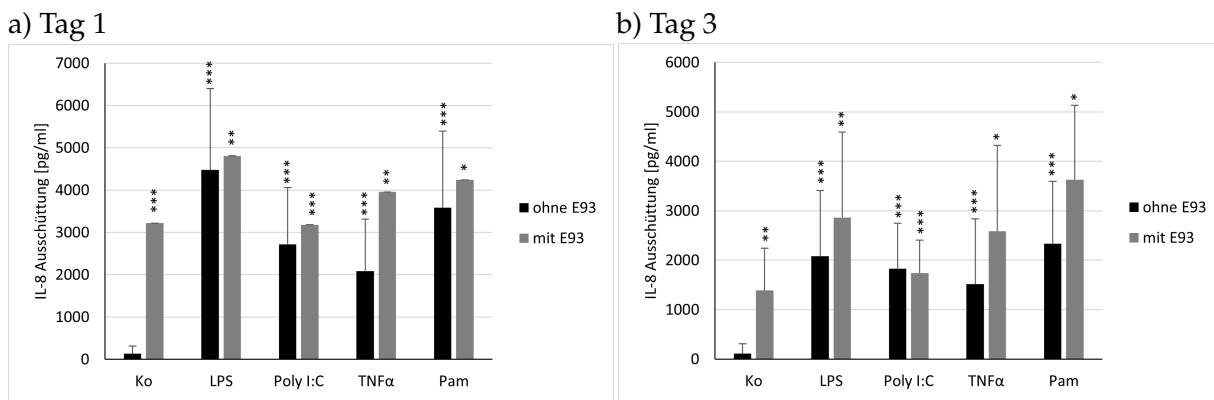
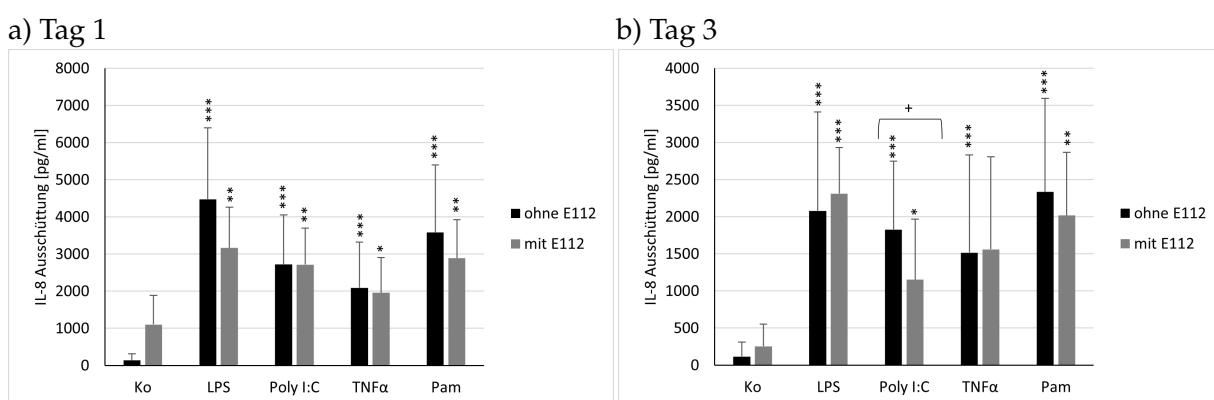


Abbildung 21: Interleukin-8-Ausschüttung von RPE-Zellen nach ein- (a) und dreitägiger (b) Stimulation mit E93, Lipopolysaccharid (LPS), Polyinosinsäure:Polycytidylsäure (Poly I:C), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Pam: IL-8-Ausschüttung durch E93 (50 μ g/ml), LPS (1 μ g/ml), Poly I:C (10 μ g/ml), TNF- α (50 ng/ml) und Pam (10 ng/ml) in pg/ml. Die Daten sind nach Shapiro-Wilk-Test normalverteilt und nach einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) signifikant. Sie wurden mittels Students *t*-test auf zweiseitige Signifikanz getestet. Signifikanzen im Bezug zur Kontrolle: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,001$. Anzahl der unabhängigen Experimente: $n \geq 3$.**

E112: Nach eintägiger Stimulation kam es durch Zugabe aller getesteten Entzündungsmediatoren sowie durch die Kombination der Entzündungsmediatoren mit E112 zu einer signifikanten Ausschüttung von IL-8 (Abb. 22a). An Tag 3 nach Stimulation konnte ein signifikanter IL-8-Anstieg durch Zugabe von LPS, Poly I:C, TNF- α , Pam sowie der Kombination von LPS, Poly I:C oder Pam mit E112 beobachtet werden. Durch Hinzufügen des Extraktes E112 sank die IL-8-Ausschüttung signifikant ($p = 0,038$) in Kombination mit Poly I:C (1152 ± 816 pg/ml, $p = 0,018$) um 37 Prozentpunkte im Vergleich zur Stimulation mit dem Entzündungsmediator Poly I:C alleine (1827 ± 920 pg/ml, $p < 0,0001$) (Abb. 22b). Sieben Tage nach Stimulation kam es durch Zugabe aller getesteten Entzündungsmediatoren alleine und E112 + LPS bzw. + TNF- α zu einer signifikanten Ausschüttung von IL-8. Es konnte eine signifikante ($p < 0,025$) Reduktion der IL-8-Ausschüttung durch Zugabe von E112 + Poly I:C (359 ± 206 pg/ml, $p = 0,168$) im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Poly I:C (1804 ± 656 pg/ml, $p < 0,0001$) beobachtet werden (Abb. 22c). Des Weiteren kam es an Tag 28 sowohl durch LPS als auch durch E112 mit LPS bzw. Pam zu einer signifikanten Erhöhung der Zytokinausschüttung (Abb. 22d).



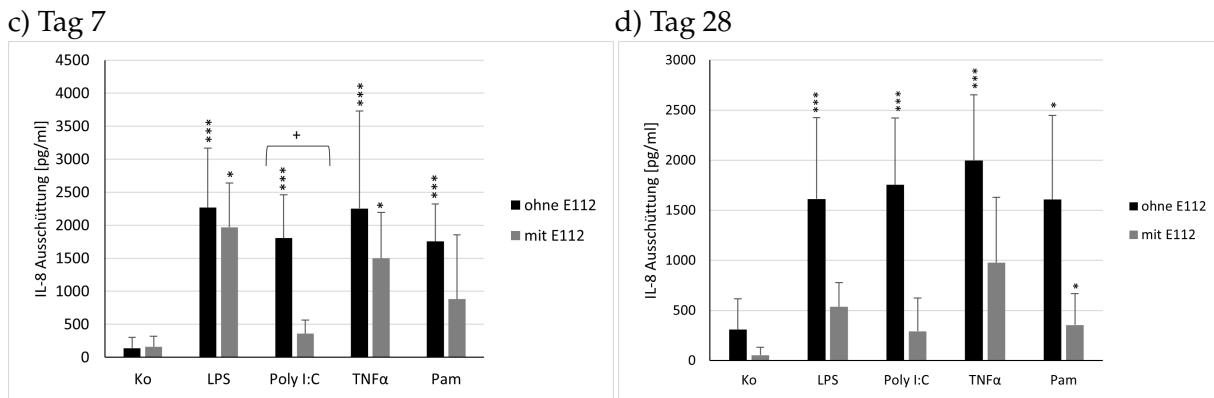


Abbildung 22: Interleukin-8-Ausschüttung von RPE-Zellen nach ein- (a) und dreitägiger (b) Stimulation mit E112, Lipopolysaccharid (LPS), Polyinosinsäure:Polycytidylsäure (Poly I:C), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Pam: IL-8-Ausschüttung durch E112 (50 μ g/ml), LPS (1 μ g/ml), Poly I:C (10 μ g/ml), TNF- α (50 ng/ml) und Pam (10 ng/ml) in pg/ml. Die Daten sind nach Shapiro-Wilk-Test normalverteilt und nach einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) signifikant. Sie wurden mittels *Students t-test* auf zweiseitige Signifikanz getestet. Signifikanzen im Bezug zur Kontrolle: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,001$. Signifikanzen vom Fucoidan in Kombination mit dem Entzündungsmediator im Bezug zur alleinigen Stimulation mit einem Entzündungsmediator: + = $p < 0,05$. Anzahl der unabhängigen Experimente: $n \geq 3$.**

E125: Das Hinzufügen von LPS, Poly I:C, TNF- α oder Pam hatte nach einem Tag eine signifikante Ausschüttung von IL-8 zur Folge. Auch durch die Kombination der Entzündungsmediatoren mit E125 und E125 alleine kam es zu einer erhöhten Zytokinausschüttung (Abb. 23a). Nach drei Tagen konnte ein signifikanter Anstieg der IL-8-Sekretion durch Zugabe aller getesteten Entzündungsmediatoren, E125 alleine und E125 zusammen mit LPS und Poly I:C beobachtet werden (Abb. 23b).

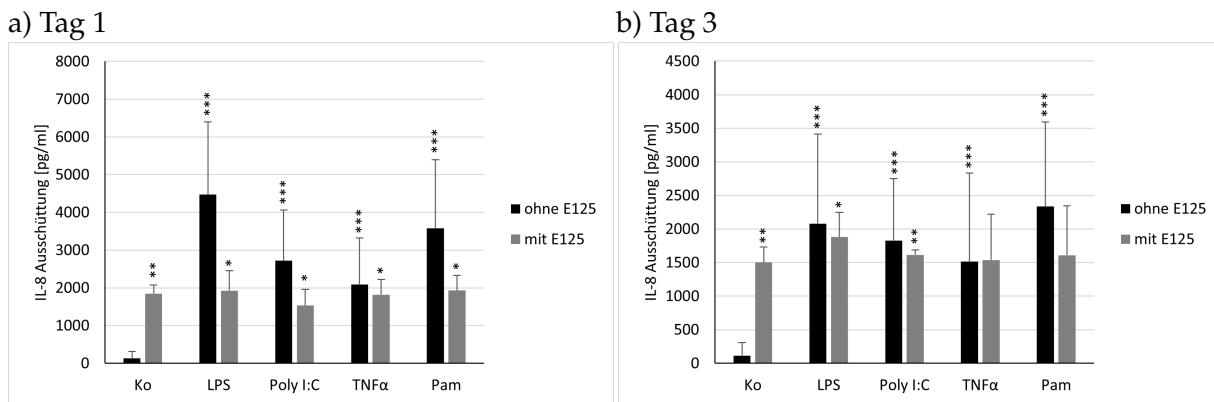


Abbildung 23: Interleukin-8-Ausschüttung von RPE-Zellen nach ein- (a) und dreitägiger (b) Stimulation mit E125, Lipopolysaccharid (LPS), Polyinosinsäure:Polycytidylsäure (Poly I:C), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Pam: IL-8-Ausschüttung durch E125 (50 μ g/ml) und den Entzündungsmediatoren in pg/ml. Die Daten sind nach Shapiro-Wilk-Test normalverteilt und nach einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) signifikant. Sie wurden mittels *Students t-test* auf zweiseitige Signifikanz getestet. Signifikanzen im Bezug zur Kontrolle: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,001$. Anzahl der unabhängigen Experimente: $n \geq 3$.**

E126: Nach einem Tag konnte durch Zugabe der jeweiligen Entzündungsmediatoren alleine und E126 mit LPS, Poly I:C oder TNF- α eine signifikante IL-8-Ausschüttung beobachtet werden. Durch die Zugabe des Extraktes E126 sank diese Ausschüttung signifikant ($p = 0,045$) in Kombination mit Poly I:C (1208 ± 369 pg/ml, $p = 0,047$) im Vergleich zur Stimulation nur mit Poly I:C (2723 ± 1332 pg/ml, $p < 0,0001$) (Abb. 24a). An Tag 3 kam es zu einem signifikanten Anstieg der IL-8-Ausschüttung durch Zugabe aller getesteten Entzündungsmediatoren und der Kombination von Pam mit E126. Die Zytokinproduktion wurde durch Zugabe von Poly I:C zusammen mit dem Fucoidan (336 ± 294 pg/ml, $p = 0,163$) im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Poly I:C (1827 ± 920 pg/ml, $p < 0,0001$) signifikant ($p = 0,014$) gesenkt (Abb. 24b). Unter jeweils allen Entzündungsmediatoren und der Kombination aus E126 mit LPS bzw. Pam kam es an Tag 7 zu einer signifikanten IL-8-Ausschüttung. Die Zytokinproduktion wurde signifikant ($p = 0,001$) durch Stimulation mit E126 und Poly I:C (363 ± 290 pg/ml, $p = 0,157$) im Vergleich zu Poly I:C (1804 ± 656 pg/ml, $p < 0,0001$) gesenkt (Abb. 24c). An Tag 28 wurde die Ausschüttung von IL-8 signifikant durch Stimulation mit LPS, Poly I:C TNF- α und E126 mit LPS bzw. Poly I:C erhöht (Abb. 24d).

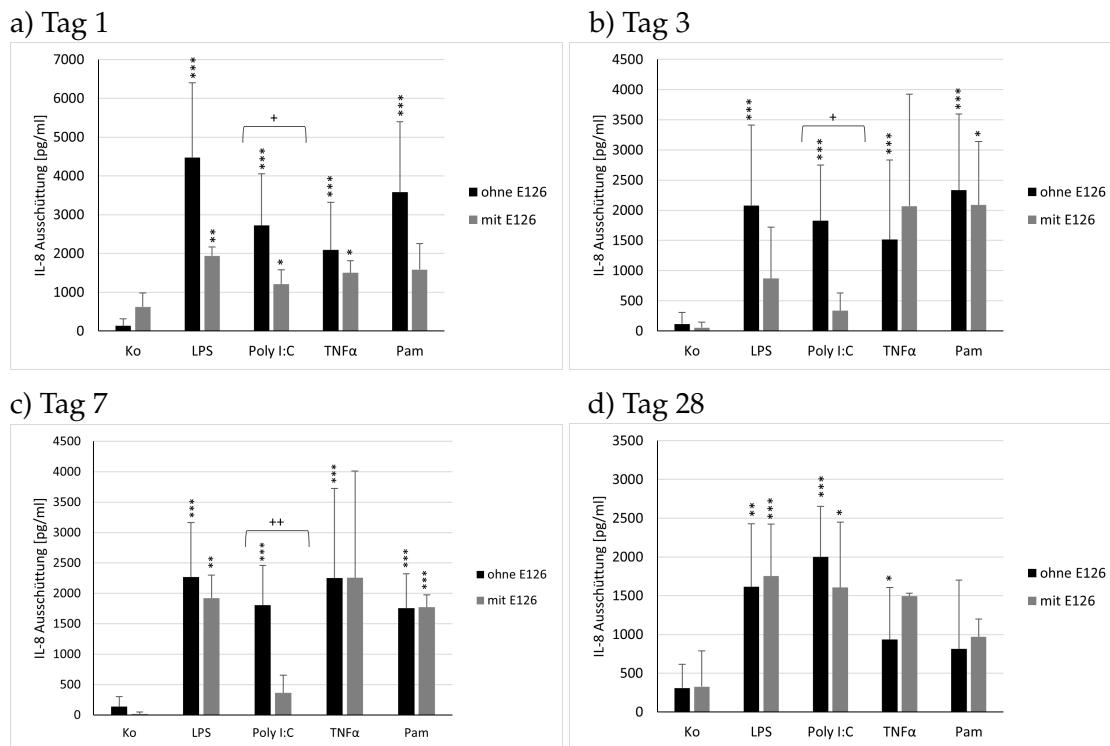


Abbildung 24: Interleukin-8-Ausschüttung von RPE-Zellen nach ein- (a), drei- (b), sieben- (c) und 28-tägiger (d) Stimulation mit E126, Lipopolysaccharid (LPS), Polyinosinsäure:Polycytidylsäure (Poly I:C), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Pam: IL-8-Ausschüttung durch E126 ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$) und die Entzündungsmediatoren in pg/ml. Die Daten sind nach Shapiro-Wilk-Test normalverteilt und nach einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) signifikant. Sie wurden mittels Students t -test auf zweiseitige Signifikanz getestet. Signifikanzen im Bezug zur Kontrolle: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$. Signifikanzen vom Fucoidan in Kombination mit dem Entzündungsmediator im Bezug zur alleinigen Stimulation mit einem Entzündungsmediator (+ = $p < 0,05$; ++ = $p < 0,01$). Anzahl der unabhängigen Experimente: $n \geq 3$.

E127: Einen Tag nach Zugabe von LPS, Poly I:C, TNF- α oder Pam kam es zu einer signifikanten Ausschüttung von IL-8. Auch durch die Stimulation mit E127 alleine und der Kombination aus E127 mit LPS, Poly I:C und TNF- α wurde die Zytokinausschüttung signifikant erhöht. Es konnte eine signifikante ($p = 0,001$) Reduktion der IL-8-Ausschüttung durch Zugabe von E127 + Poly I:C (1809 ± 460 pg/ml, $p = 0,033$) im Vergleich zur Stimulation mit Poly I:C (4475 ± 1924 pg/ml, $p < 0,0001$) beobachtet werden (Abb. 25a). An Tag 3 wurde die IL-8-Ausschüttung durch LPS, Poly I:C, TNF- α , Pam und der Kombination aus LPS mit E127 erhöht (Abb. 25b). Nach sieben Tagen kam es durch Zugabe jeweils aller getesteten Entzündungsmediatoren und durch E127 mit LPS, TNF- α oder Pam zu einer signifikanten Ausschüttung von IL-8. Es konnte eine signifikante ($p = 0,009$) Reduktion der IL-8 Ausschüttung durch Zugabe von E127 + Poly I:C (566 ± 346 pg/ml, $p = 0,062$) im Vergleich zur Stimulation mit Poly I:C (1804 ± 656 pg/ml, $p < 0,0001$) beobachtet werden (Abb. 25c). Des Weiteren kam es an Tag 28 sowohl durch LPS, Poly I:C, TNF- α oder Pam als auch durch E127 mit Poly I:C zu einer signifikanten Erhöhung der Zytokinausschüttung. Die IL-8-Ausschüttung wurde durch Stimulation mit E127 und LPS (595 ± 381 pg/ml, $p = 0,573$) im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit LPS (1614 ± 803 pg/ml, $p = 0,002$) signifikant ($p = 0,023$) reduziert (Abb. 25d).

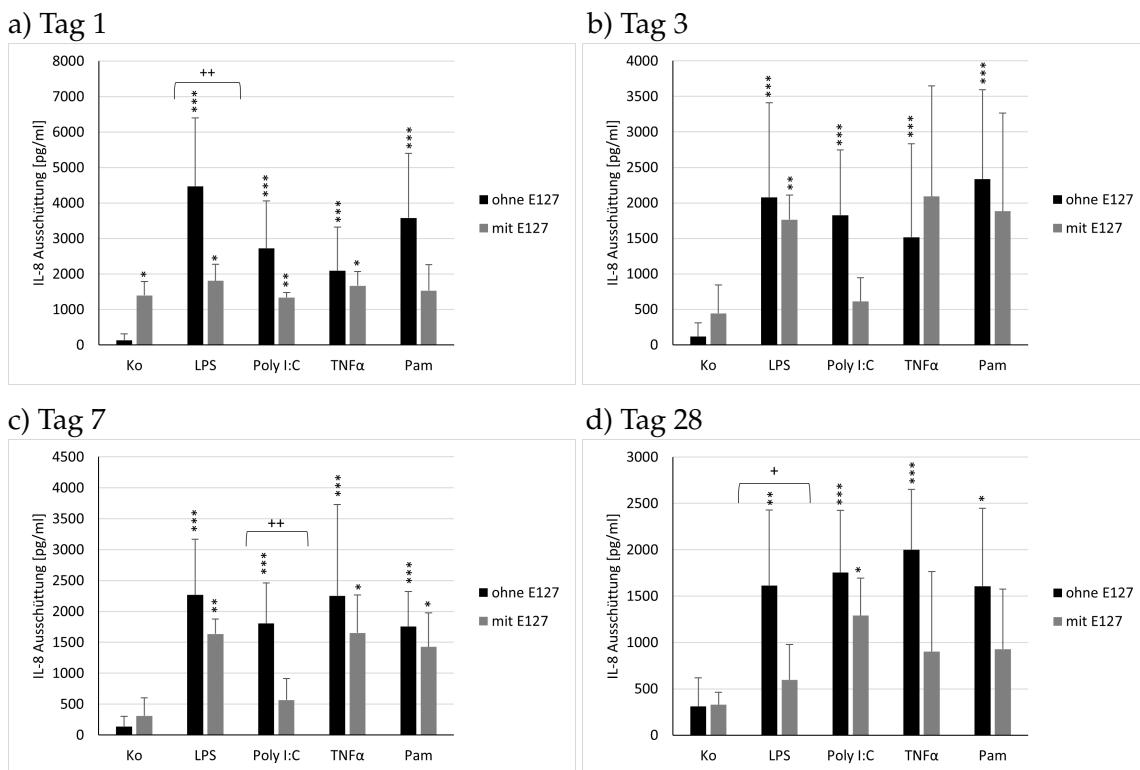


Abbildung 25: Interleukin-8-Ausschüttung von RPE-Zellen nach ein- (a), drei- (b), sieben- (c) und 28-tägiger (d) Stimulation mit E127, Lipopolysaccharid (LPS), Polyinosinsäure:Polycytidylsäure (Poly I:C), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Pam: IL-8-Ausschüttung durch E127 (50 μ g/ml) und Entzündungsmediatoren in pg/ml. Die Daten sind nach Shapiro-Wilk-Test normalverteilt und nach einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) signifikant. Signifikanzen (nach *Students t-test*) vom Fucoidan mit dem Entzündungsmediator im Bezug zur alleinigen Stimulation mit einem Entzündungsmediator (+ = $p < 0,05$; ++ = $p < 0,01$). Anzahl der unabhängigen Experimente: $n \geq 3$

d) Interleukin-1 β - und Tumornekrosefaktor- α -Ausschüttung:

IL-1 β : Die IL-1 β -Ausschüttung wurde einen Tag und sieben Tage nach Stimulation mit verschiedenen Fucoidanen und Entzündungsmediatoren gemessen. Einen Tag nach Stimulation wurde die Zytokinausschüttung durch Stimulation mit E126, 127, den Entzündungsmediatoren LPS und Poly I:C und der Kombination aus E126 mit Poly I:C und E127 mit LPS untersucht, da diese bei den Zytokinausschüttungen von IL-6 und IL-8 vielversprechende Wirkungen zeigten. Die IL-1 β -Ausschüttung durch E93, E112, E125, E126 und E127, Poly I:C und Poly I:C mit den verschiedenen Entzündungsmediatoren wurde sieben Tage nach Stimulation untersucht. Durch die untersuchten Extrakte und Entzündungsmediatoren kam es weder einen Tag noch sieben Tage nach Stimulation zu einer messbaren Ausschüttung von IL-1 β . Nur an Tag 1 konnte durch Stimulation mit LPS (105 ± 220 pg/ml, $p = 0,125$) und F2 mit LPS (40 ± 64 pg/ml, $p = 0,125$) eine nicht-signifikante IL-1 β - Ausschüttung beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

TNF- α : Die TNF- α -Ausschüttung wurde einen Tag nach Stimulation mit E126, E127, den Ent-

zündungsmediatoren LPS, Poly I:C, E126 mit Poly I:C und E127 mit LPS getestet. Die TNF- α -Ausschüttung wurde signifikant durch Zugabe von LPS und Poly I:C erhöht. Es konnte keine signifikante Reduktion der Zytokinausschüttung durch Zugabe eines Fucoidans zum Entzündungsmediator im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit dem Entzündungsmediator festgestellt werden (siehe Abb. 26).

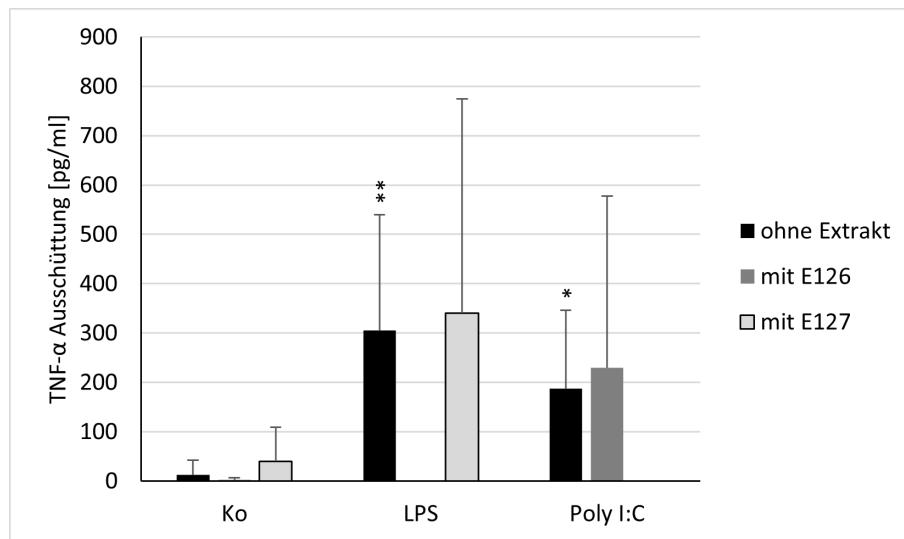


Abbildung 26: Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)-Ausschüttung von retinalem Pigmentepithel (RPE)-Zellen nach eintägiger Stimulation mit E126, E127, Lipopolysaccharid (LPS) und Polyinosinsäure:Polycytidylsäure (Poly I:C): Die TNF- α -Ausschüttung durch E126 (50 μ g/ml), E127 (50 μ g/ml), LPS (1 μ g/ml) und Poly I:C (10 μ g/ml) in pg/ml. Die Daten sind nach Shapiro-Wilk-Test nicht normalverteilt und nach Kruskal-Wallis-Test signifikant. Sie wurden mittels Wilcoxon paired sign rank test auf zweiseitige Signifikanz getestet ($*$ = $p < 0,05$). Anzahl der unabhängigen Experimente: $n \geq 3$.

6.2 Zellviabilität, Barriere und Zytokinproduktion im polaren Zellmodell

6.2.1 Etablierung mit der Referenzsubstanz

a) Zellviabilität:

Die Zellviabilität der RPE-Zellen im polaren Zellmodell wurde mittels MTT-Test bestimmt. Dieser Versuch wurde nach 28-tägiger Stimulation durchgeführt. Abbildung 27 zeigt, dass die Zellviabilitäten durch Zugabe von F2, den Entzündungsmediatoren alleine und der Kombination aus F2 mit den Entzündungsmediatoren keinen Einfluss auf die Zellviabilität hat.

Zudem wurden lichtmikroskopische Bilder der Zellen an den Tagen 1, 3, 7, 14, 21 und 28 angefertigt. Die Bilder von Tag 28 sind in 100-facher Vergrößerung der Abbildung 28 zu entnehmen. Es ist zu sehen, dass nach Stimulation mit F2, LPS, Poly I:C, TNF- α , Pam und der Kombination von F2 mit einem Entzündungsmediator ein lückenloser pflastersteinartiger Zellrasen und keine Störung der Morphologie und Differenzierung der Zellen vorliegt.

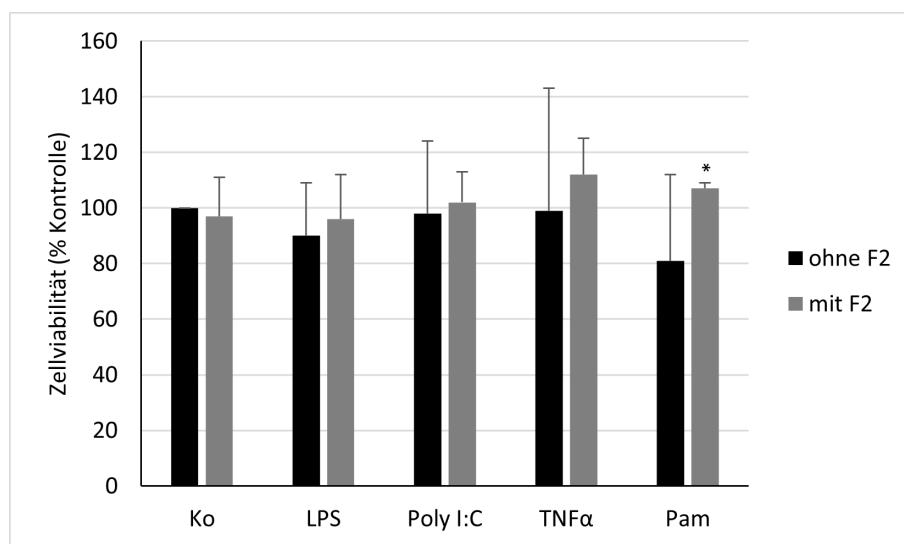


Abbildung 27: Zellviabilität von RPE-Zellen im polaren Zellmodell nach 28-tägiger Stimulation mit F2 und Entzündungsmediatoren: Zellviabilität von polaren RPE-Zellen nach 28-tägiger Stimulation mit dem Fucoidan F2 (50 µg/ml), LPS (1 µg/ml), Poly I:C (10 µg/ml), TNF- α (50 ng/ml) und Pam (10 ng/ml) und der Kombination von F2 mit einem Entzündungsmediator. Die Daten sind nach Shapiro-Wilk-Test normalverteilt, aber nach One-Sample-t-test nicht signifikant. Anzahl der unabhängigen Experimente: $n \geq 4$.

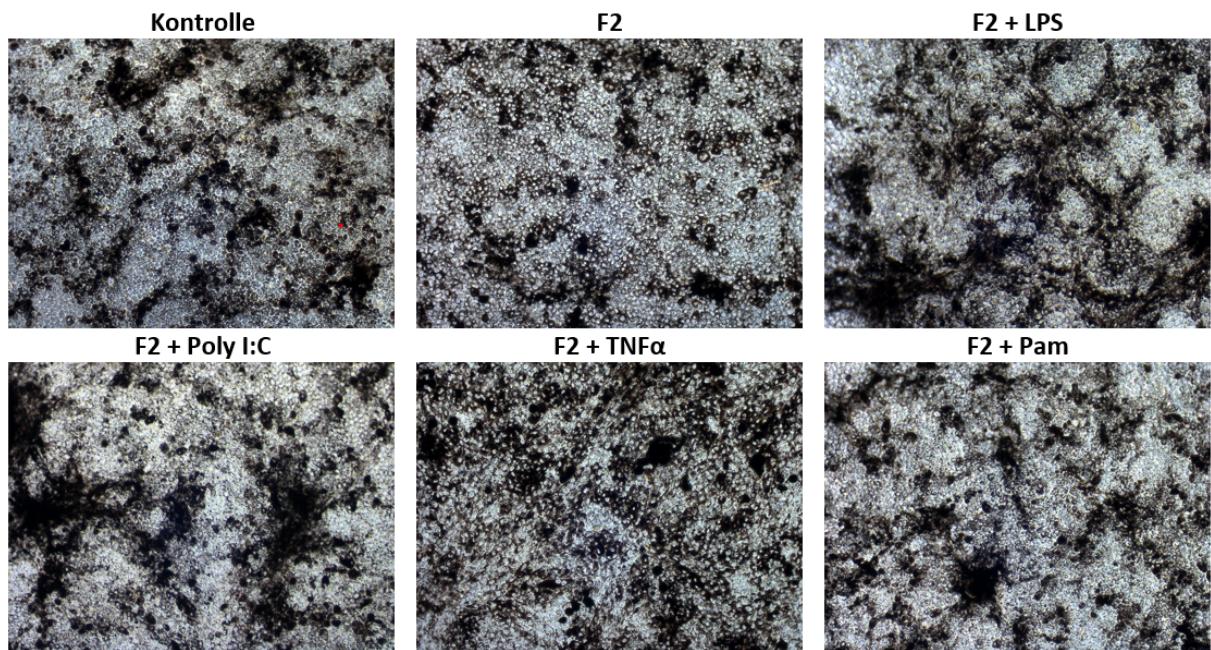


Abbildung 28: Lichtbilder von RPE-Zellen im polaren Zellmodell nach 28-tägiger Stimulation mit F2, Lipopolysaccharid (LPS), Polyinosinsäure:Polycytidylsäure (Poly I:C), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Pam: Mikroskopische Lichtbilder in 100-facher Vergrößerung von RPE-Zellen an Versuchstag 28 nach Stimulation mit F2 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), Poly I:C (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), TNF- α (50 ng/ml) und Pam (10 ng/ml) und der Kombination von F2 mit einem Entzündungsmediator.

b) Barriere:

Zur Beurteilung der Intaktheit der Zellmembran und der Ausbildung von Tight Junctions wurden direkt vor der ersten Stimulation und einen Tag, drei-, sieben-, 14-, 21- und 28- Tage nach Stimulation eine transepithelialer elektrischer Widerstand (TEER)-Messung durchgeführt (siehe Abschnitt 5.2.2). Um die Barriere im Laufe der Zeit beurteilen zu können, wurden die Ausgangswerte vor Stimulation (Initialmessung) auf 100 % genormt. Die Werte an den darauffolgenden Tagen wurden auf den jeweiligen Wert der Initialmessung bezogen. Die Abbildung zeigt den transepithelialen elektrischen Widerstand in Prozent bezogen auf die Initialmessung nach Stimulation durch LPS (Abb. 29), Poly I:C (Abb. 30), TNF- α (Abb. 31) oder Pam (Abb. 32) und F2 alleine und in Kombination mit einem Entzündungsmediator im zeitlichen Verlauf (x-Achse). Die absoluten Daten aller gemessenen Barrierefälle sind Tabelle 10 im Anhang zu entnehmen.

LPS: Einen Tag nach Stimulation war eine gegenüber der Kontrolle und gegenüber der Initialmessung signifikante ($p = 0,007$) Reduktion der Barriere durch F2 + LPS ($65 \% \pm 16 \%$, $p = 0,019$) im Vergleich zur Stimulation mit LPS ($106 \% \pm 43 \%$) zu erkennen. An Tag 3 nach Stimulation konnte eine signifikante Reduktion der Barriere der Zellen des Kontroll-Wellen und des mit F2 + LPS stimulierten Wellen gegenüber der Initialmessung beobachtet werden. Des Weiteren wurde sieben Tage nach Stimulation die Barriere durch Zugabe von LPS und F2 mit LPS sowohl gegenüber der Kontrolle als auch gegenüber der Initialmessung signifikant reduziert. Gegen-

über der alleinigen Stimulation mit LPS ($52\% \pm 27\%$, $p = 0,020$) wurde durch Zugabe von LPS zusammen mit F2 ($26\% \pm 14\%$, $p < 0,001$) die Barriere signifikant ($p < 0,001$) reduziert. 14 Tage nach Stimulation wurde die Barriere durch Zugabe von F2 mit LPS gegenüber der Kontrolle und der Initialmessung signifikant reduziert. Des Weiteren fand eine signifikante Reduktion der Barrierefunktion 21 Tage nach Stimulation mit LPS gegenüber der Initialmessung und mit F2 + LPS gegenüber der Initialmessung und der Kontrolle statt. 28 Tage nach Stimulation mit LPS kam es zu einer signifikanten Verminderung der Barrierefunktion gegenüber der Initialmessung und mit F2 in Kombination mit LPS gegenüber der Initialmessung und der Kontrolle. Außerdem wurde durch Zugabe von F2 mit LPS ($29\% \pm 19\%$, $p = 0,035$) die Barrierefunktion signifikant ($p = 0,044$) im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit LPS ($56\% \pm 29\%$) erhöht (Abb. 29).

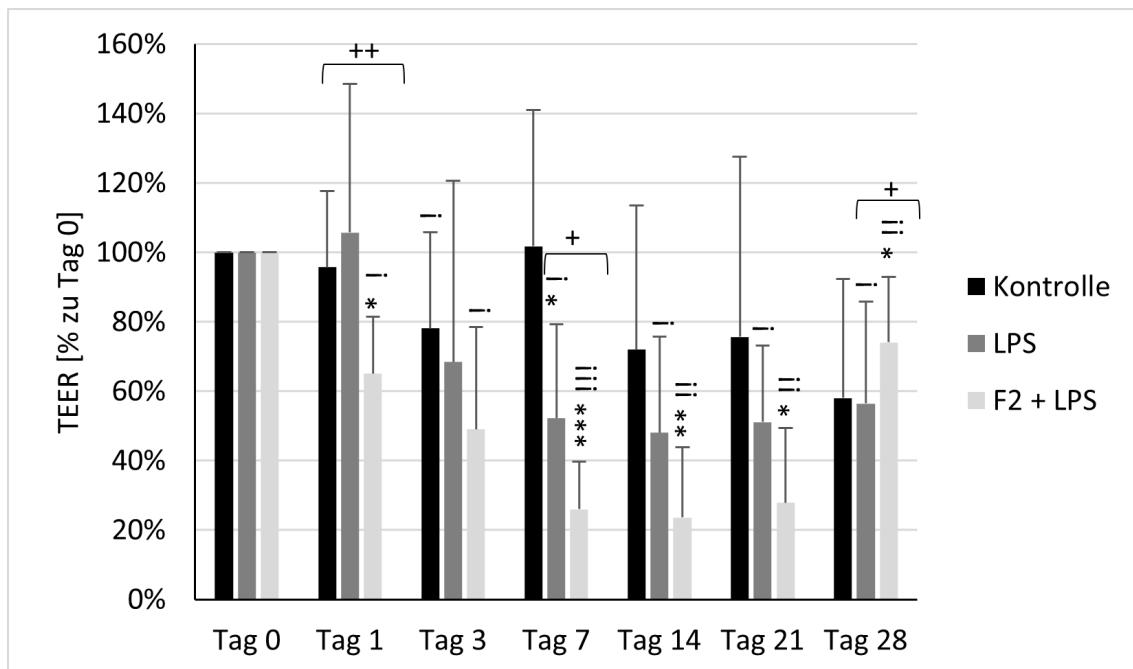


Abbildung 29: Barriere von F2 in Kombination mit Lipopolysaccharid (LPS) an den Tagen eins, drei, sieben, 14, 21 und 28: Die Barrierefunktion der retinalen Pigmentepithel-Zellen wurde mittels TEER-Messung bestimmt. Die Daten der Initialmessung wurden auf 100 % genormt. Die Barriewerte der Tage 1 - 28 nach Stimulation wurden jeweils in % zur Initialmessung (100 %) berechnet. Die Daten sind nach Shapiro-Wilk-Test normalverteilt. Die Signifikanzen wurden anhand des Ein-Stichproben-*t*-Test berechnet. Die Sterne stellen die Signifikanzen im Bezug zur Kontrolle des jeweiligen Tages dar (* = $p < 0,05$), die Ausrufezeichen die Signifikanzen im Bezug zur Initialmessung (! = $p < 0,05$; !! = $p < 0,01$; !!! = $p < 0,001$) und die Kreuze repräsentieren die Signifikanzen vom Fucoidan in Kombination mit dem Entzündungsmediator im Bezug zur alleinigen Stimulation mit dem Entzündungsmediator (+ = $p < 0,05$; ++ = $p < 0,01$). Anzahl der unabhängigen Experimente: $n \geq 4$.

Poly I:C: Durch die Stimulation mit Poly I:C und F2 mit Poly I:C wurde sieben Tage nach Stimulation die Barrierefunktion der RPE-Zellen signifikant im Bezug zur Kontrolle und zur Initialmessung gesenkt. An den Tagen 21 und 28 ist die Reduktionen der Barriere durch Poly I:C gegenüber der Initialmessung zu erkennen (Abb. 30).

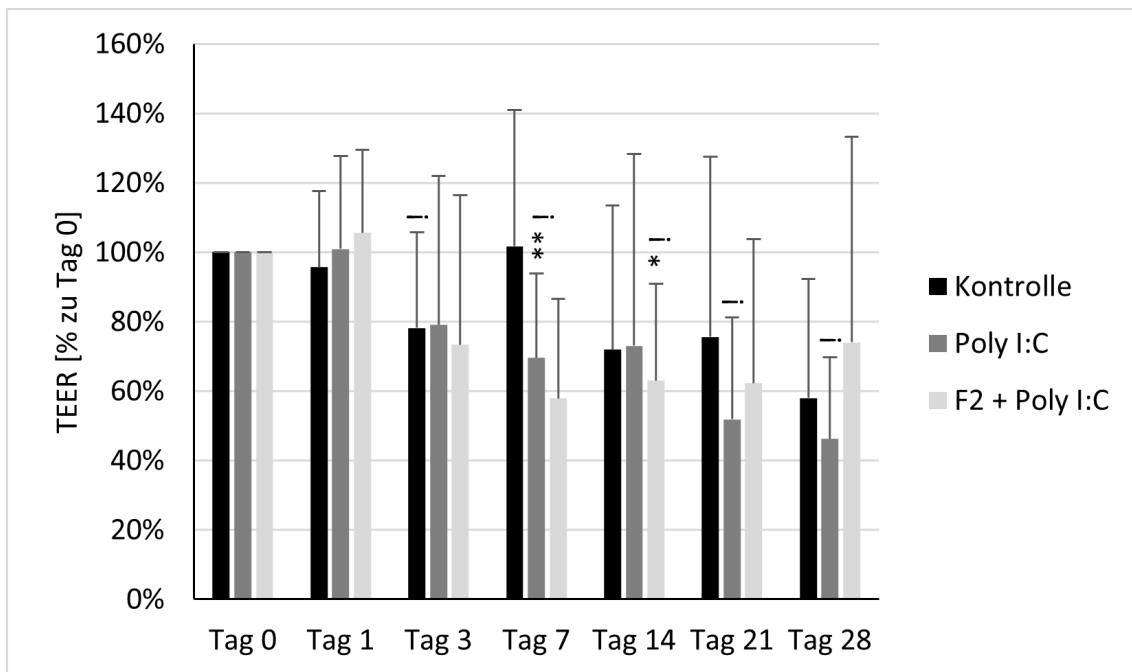


Abbildung 30: Barriere von F2 in Kombination mit Polyinosinsäure:Polycytidylsäure (Poly I:C) an den Tagen eins, drei, sieben, 14, 21 und 28: Die Daten der Barrierefunktion der Initialmessung wurden auf 100 % genormt. Die Barriewerte der Tage 1 - 28 nach Stimulation wurden jeweils in % zur Initialmessung (100 %) berechnet. Die Daten sind nach Shapiro-Wilk-Test normalverteilt. Die Signifikanzen wurden anhand des Ein-Stichproben-*t*-Test berechnet. Die Sterne stellen die Signifikanzen im Bezug zur Kontrolle des jeweiligen Tages dar (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$) und die Ausrufezeichen die Signifikanzen im Bezug zur Initialmessung (! = $p < 0,05$; !! = $p < 0,01$). Anzahl der unabhängigen Experimente: $n \geq 4$.

TNF- α : Durch Stimulation mit TNF- α wurde die Barrierefunktion der RPE-Zellen einen Tag nach Stimulation mit TNF- α signifikant um 53 % gegenüber der Initialmessung gesenkt. Drei, sieben, 14, 21 und 28 Tage nach Stimulation konnte eine signifikante Reduktion der Barriere durch Zugabe von TNF- α und F2 mit TNF- α gegenüber der Kontrolle und der Initialmessung beobachtet werden. Zusätzlich konnte an Tag 28 eine signifikante ($p = 0,044$) Reduktion der Barrierefunktion durch F2 mit TNF- α ($30 \% \pm 6 \%$, $p = 0,001$) gegenüber der alleinigen Stimulation mit TNF- α ($43 \% \pm 26 \%$) (Abb. 31).

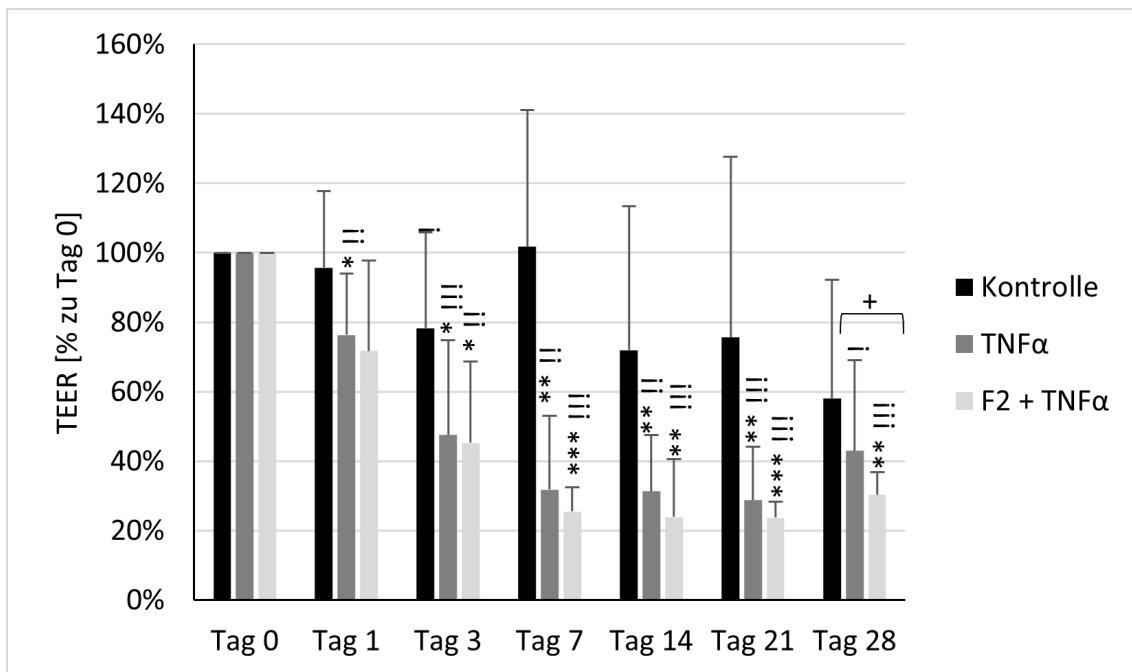


Abbildung 31: Barriere von F2 in Kombination mit Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) an den Tagen eins, drei, sieben, 14, 21 und 28: Die Daten der Initialmessung wurden auf 100 % genormt. Die Barrierefälle der Tage 1-28 nach Stimulation wurden jeweils in % zur Initialmessung (100 %) berechnet. Die Daten sind nach Shapiro-Wilk-Test normalverteilt und wurden anhand des Ein-Stichproben- t -Test auf Signifikanz berechnet. Die Sterne stellen die Signifikanzen im Bezug zur Kontrolle des jeweiligen Tages dar (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$), die Ausrufezeichen die Signifikanzen im Bezug zur Initialmessung (! = $p < 0,05$; !! = $p < 0,01$; !!! = $p < 0,001$) und die Kreuze repräsentieren die Signifikanzen vom Fucoidan in Kombination mit dem Entzündungsmediator (+ = $p < 0,05$). Anzahl der unabhängigen Experimente: $n \geq 4$.

Pam: Durch die Stimulation mit Pam und F2 + Pam konnte sieben Tage nach Stimulation eine gegenüber der Initialmessung und der Kontrolle signifikante Reduktion der Barriere beobachtet werden. Zudem wurde nach Stimulation die Barrierefunktion signifikant ($p < 0,0013$) durch Pam allein ($61 \% \pm 7 \%$, $p = 0,003$) im Gegensatz zur Stimulation mit F2 und Pam ($37 \% \pm 4 \%$, $p < 0,0001$) reduziert. 14 und 21 Tage nach Stimulation konnte eine signifikante Reduktion der Barriere durch Pam und F2 mit Pam gegenüber der Initialmessung, sowie an Tag 28 durch F2 + Pam beobachtet werden. (Abb. 32).

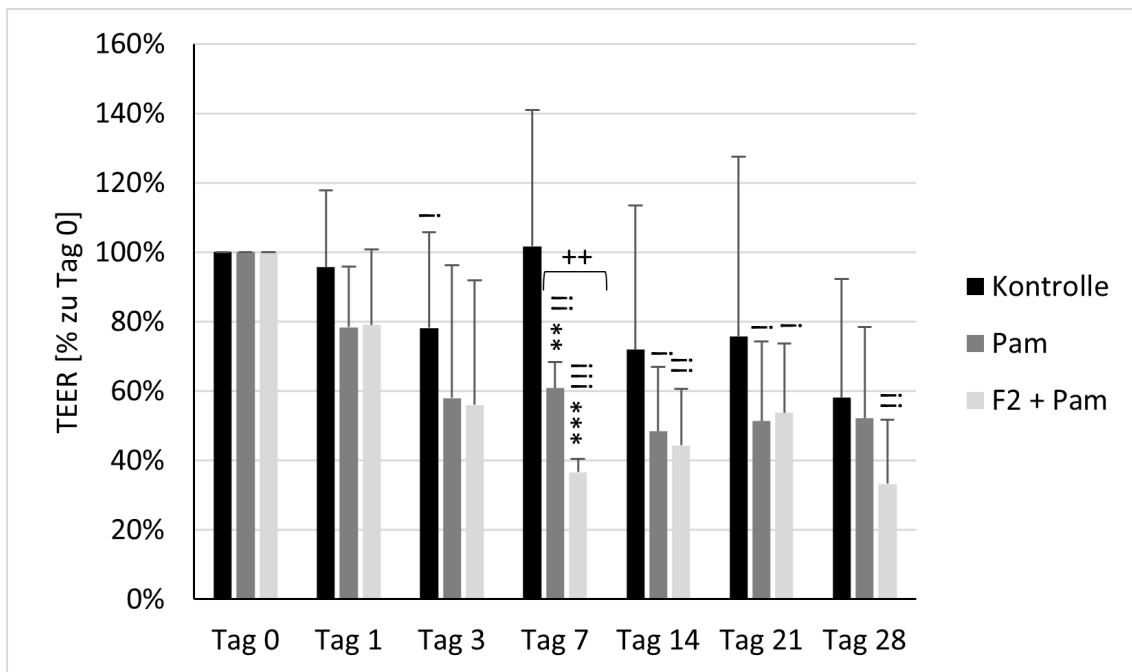


Abbildung 32: Barriere von F2 in Kombination mit Pam2CysSerLys4 (Pam) an den Tagen eins, drei, sieben, 14, 21 und 28: Die Daten der Barrierefunktion der Initialmessung wurden auf 100 % genormt. Die Barrierefälle der Tage 1-28 nach Stimulation wurden jeweils in % zur Initialmessung 0 (100 %) berechnet. Die Daten sind nach Shapiro-Wilk-Test normalverteilt. Die Signifikanzen wurden anhand des Ein-Stichproben-*t*-Test berechnet. Die Sterne stellen die Signifikanzen im Bezug zur Kontrolle des jeweiligen Tages dar (** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$) und die Ausrufezeichen die Signifikanzen im Bezug zur Initialmessung (! = $p < 0,05$, !! = $p < 0,01$, !!! = $p < 0,001$). Die Kreuze repräsentieren die Signifikanzen vom Fucoidan in Kombination mit dem Entzündungsmediator im Bezug zur alleinigen Stimulation mit dem Entzündungsmediator (+++ = $p < 0,001$). Anzahl der unabhängigen Experimente: $n \geq 4$.

c) Interleukin-6-Ausschüttung:

Es wurde der Einfluss der alleinigen Stimulation der RPE-Zellen mit F2, LPS, Poly I:C, TNF- α , Pam im Vergleich zur gemeinsamen Stimulation mit F2 und jeweils einem Entzündungsmediator auf die IL-6-Ausschüttung von RPE-Zellen im polaren Zellmodell an verschiedenen Tagen mittels ELISA untersucht.

Einen Tag nach Stimulation kam es durch Zugabe der Entzündungsmediatoren LPS, Poly I:C oder TNF- α apikal zu einer signifikanten Ausschüttung von IL-6 genau wie durch die Stimulation durch die Kombination von LPS und Poly I:C mit F2. F2 alleine hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Zytokinproduktion (Abb. 33a). Drei, sieben und 28 Tage nach Stimulation konnte keine signifikante apikale Ausschüttung von IL-6 festgestellt werden (Abb. 33b-d). Es konnte keine signifikante IL-6-Ausschüttung im basalen Well der RPE-Zellen beobachtet werden (Abb. 34a-d).

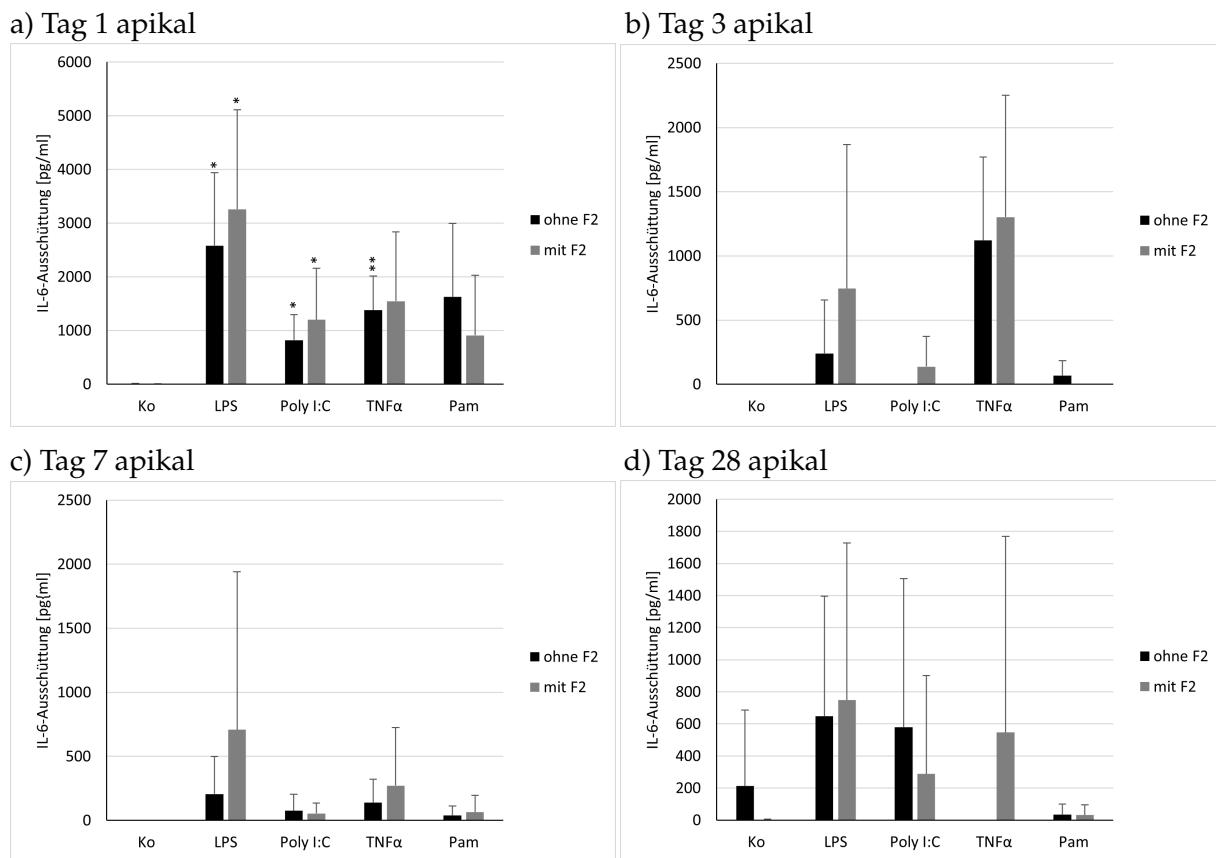
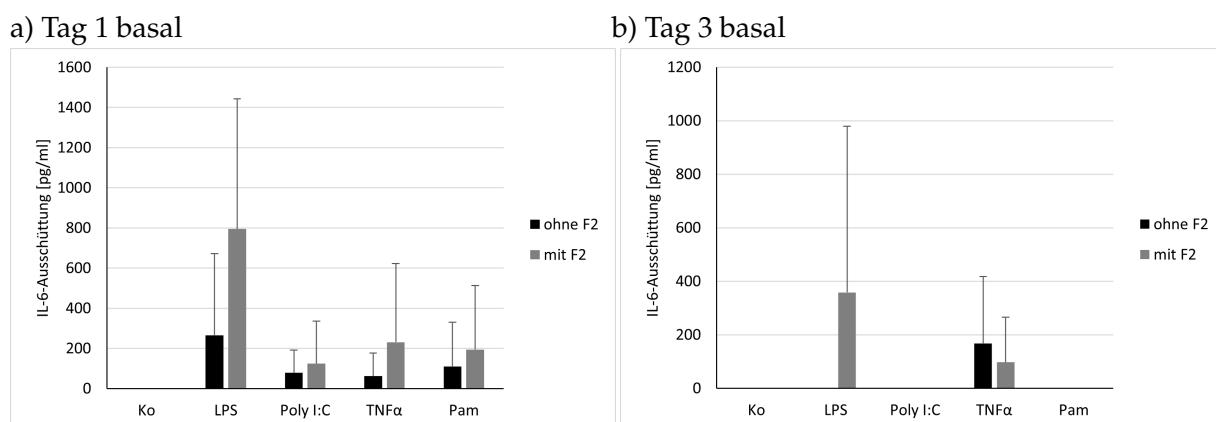


Abbildung 33: Apikale Interleukin-6-Ausschüttung von RPE-Zellen nach ein- (a), drei- (b), sieben- (c), 14- (d), 21- (e) und 28-tägiger (f) Stimulation mit F2, Lipopolysaccharid (LPS), Polyinosinsäure:Polycytidylsäure (Poly I:C), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Pam: IL-6-Ausschüttung durch F2 (50 μ g/ml), LPS (1 μ g/ml), Poly I:C (10 μ g/ml), TNF- α (50 ng/ml) und Pam (10 ng/ml) wurde mittels ELISA analysiert. Diese wird in pg/ml angegeben. Die Daten an Tag 1 sind nach Shapiro-Wilk-Test normalverteilt und nach einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) signifikant. Sie wurden mittels *Students t-test* auf zweiseitige Signifikanz getestet. Die Daten an den restlichen Tagen sind nach Shapiro-Wilk-Test nicht normalverteilt und an den Tagen 7 und 28 nach Kruskal-Wallis-Test nicht signifikant bzw. an Tag 3 signifikant. Dies nicht-normalverteilten signifikanten Daten wurden mittels Wilcoxon matched pairs signed-rank-Test auf zweiseitige Signifikanz getestet. Signifikanzen gegen die Kontrolle: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$. Anzahl der unabhängigen Experimente: $n \geq 3$.



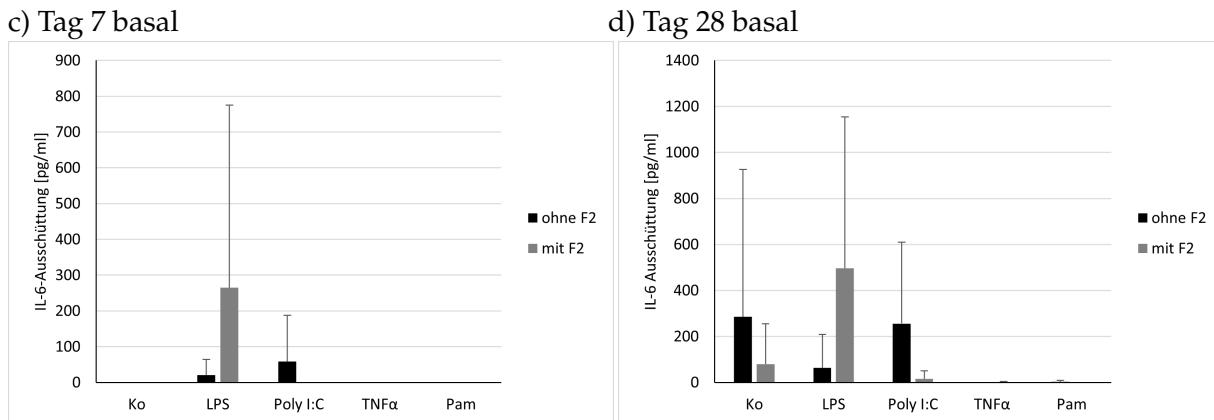


Abbildung 34: Basale Interleukin-6-Ausschüttung von RPE-Zellen nach ein- (a), drei- (b), sieben- (c), 14- (d), 21- (e) und 28-tägiger (f) Stimulation mit F2, Lipopolysaccharid (LPS), Polyinosinsäure:Polycytidylsäure (Poly I:C), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Pam: IL-6-Ausschüttung durch F2 (50 μ g/ml), LPS (1 μ g/ml), Poly I:C (10 μ g/ml), TNF- α (50 ng/ml) und Pam (10 ng/ml) wurde mittels ELISA analysiert. Diese wird in pg/ml angegeben. Die Daten sind nach Shapiro-Wilk-Test nicht normalverteilt und an den Tagen 1, 3, und 28 nach Kruskal-Wallis-Test nicht signifikant bzw. an Tag 7 signifikant. Dies nicht-normalverteilten signifikanten Daten wurden mittels Wilcoxon matched pairs signed-rank-Test auf zweiseitige Signifikanz getestet. Anzahl der unabhängigen Experimente: $n \geq 3$.

d) Interleukin-8-Ausschüttung:

Die Abbildungen 35a-d und 36a-d zeigen die apikale und basale IL-8-Ausschüttung von RPE-Zellen im polaren Zellmodell nach Stimulation mit F2 und verschiedenen Entzündungsmediatoren an unterschiedlichen Tagen.

Einen Tag nach Stimulation kam es durch Zugabe aller getesteten Entzündungsmediatoren zu einer signifikanten Ausschüttung von IL-8, genau wie durch die Stimulation durch die Kombination von LPS, Poly I:C oder TNF- α mit F2. F2 allein hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Zytokinproduktion (Abb. 35a). An Tag 3 nach Stimulation konnte apikal ein signifikanter Anstieg der IL-8-Ausschüttung durch Zugabe von allen Entzündungsmediatoren und der Kombination von LPS in Kombination mit F2 beobachtet werden (Abb. 35b). Unter LPS, Poly I:C, TNF- α , Pam und der Kombination aus F2 und allen getesteten Entzündungsmediatoren kam es an Tag 7 zu einer signifikanten Erhöhung der apikalen IL-8-Ausschüttung. Zudem wurde die IL-8-Ausschüttung signifikant ($p = 0,009$) durch F2 mit Pam (711 ± 330 pg/ml) im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Pam (1043 ± 502 pg/ml, $p = 0,030$) reduziert (Abb. 35c). Durch die Stimulation mit F2 und Pam (848 ± 956 pg/ml) kam es an Tag 28 apikal zu einer signifikanten ($p = 0,003$) Reduktion der IL-8-Ausschüttung auf im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Pam (1389 ± 1029 pg/ml) (Abb. 35d).

Basal wurde die IL-8-Ausschüttung an Tag 1 signifikant ($p = 0,027$) durch Stimulation mit F2 und LPS (2022 ± 781 pg/ml, $p = 0,007$) im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit LPS (1056 ± 719 pg/ml, $p = 0,042$) erhöht (Abb. 36a). An den Tagen 3 und 28 konnte basal keine signifikante Zytokinausschüttung nachgewiesen werden (Abb. 36b und d). 7 Tage nach Stimulation kam es basal zu einer signifikanten IL-8-Ausschüttung durch Stimulation mit F2 + LPS (Abb. 36c).

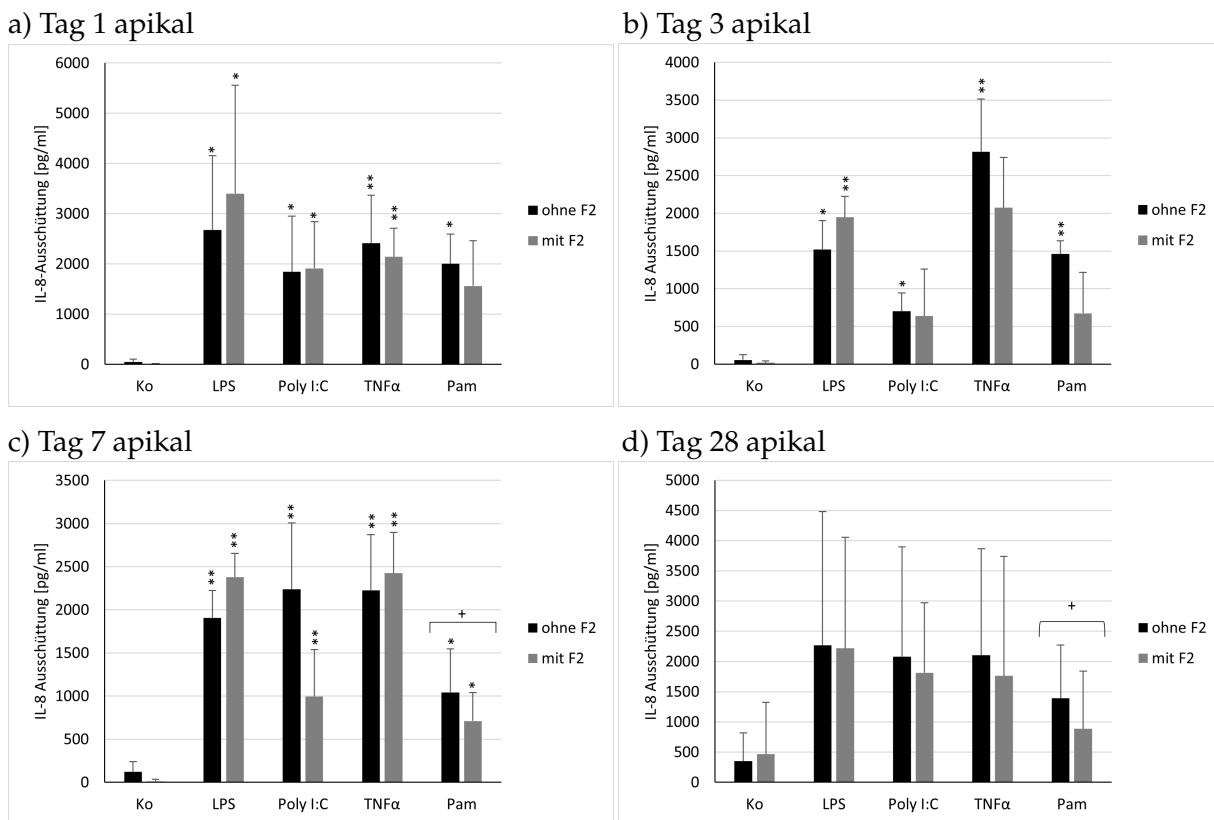
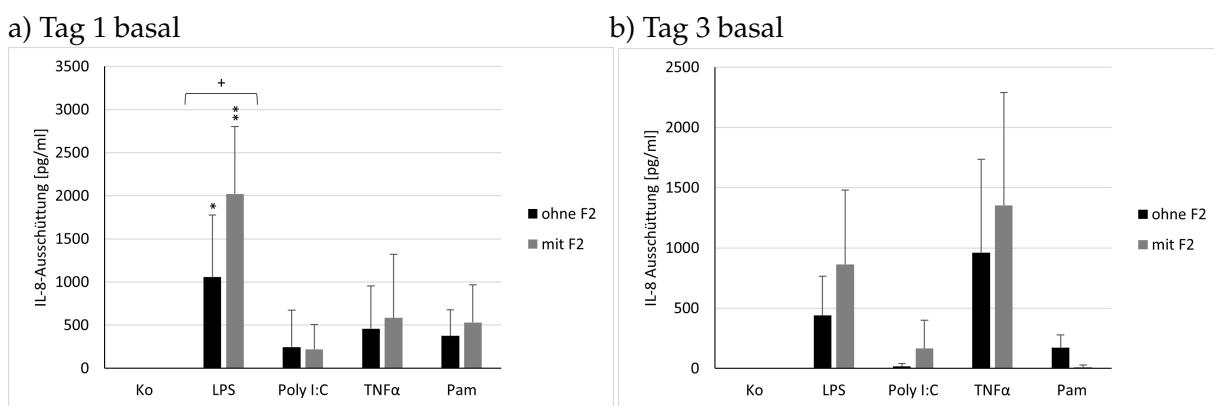


Abbildung 35: Apikale Interleukin-8-Ausschüttung von RPE-Zellen nach ein- (a), drei- (b), sieben- (c), 14- (d), 21- (e) und 28-tägiger (f) Stimulation mit F2, Lipopolysaccharid (LPS), Polyinosinsäure:Polycytidylsäure (Poly I:C), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Pam: IL-8-Ausschüttung durch F2 (50 μ g/ml), LPS (1 μ g/ml), Poly I:C (10 μ g/ml), TNF- α (50 ng/ml) und Pam (10 ng/ml) in pg/ml. Alle Daten sind nach Shapiro-Wilk-Test normalverteilt und nach einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) an den Tagen 1, 3 und 7 signifikant. Sie wurden mittels *Students t-test* auf zweiseitige Signifikanz getestet. Signifikanzen im Bezug zur Kontrolle: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$. Signifikanzen vom Fucoidan in Kombination mit dem Entzündungsmediator im Bezug zur alleinigen Stimulation mit einem Entzündungsmediator (+ = $p < 0,05$). Anzahl der unabhängigen Experimente: $n \geq 3$.



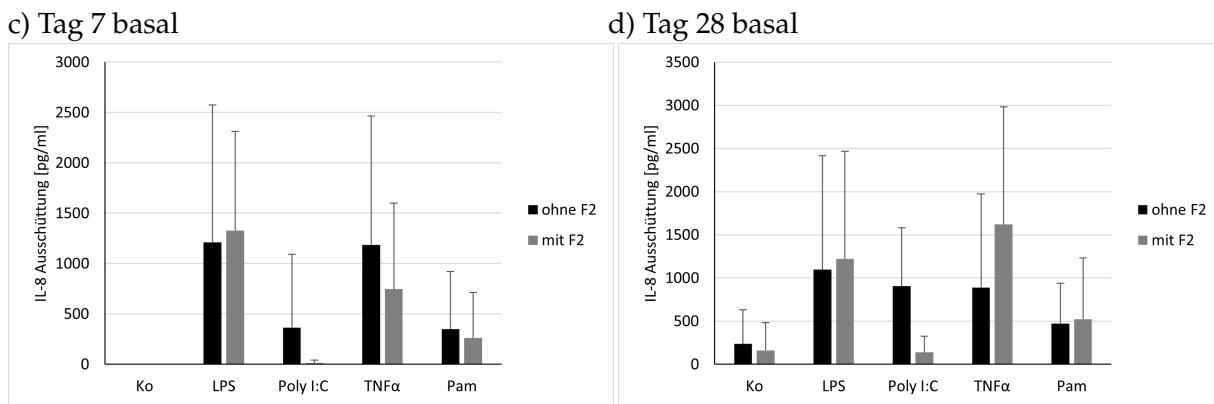


Abbildung 36: Basale Interleukin-8-Ausschüttung von RPE-Zellen nach ein- (a), drei- (b), sieben- (c), 14- (d), 21- (e) und 28-tägiger (f) Stimulation mit F2, Lipopolysaccharid (LPS), Polyinosinsäure:Polycytidylsäure (Poly I:C), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Pam: IL-8-Ausschüttung durch F2 (50 μ g/ml), LPS (1 μ g/ml), Poly I:C (10 μ g/ml), TNF- α (50 ng/ml) und Pam (10 ng/ml) in pg/ml. Alle Daten sind nach Shapiro-Wilk-Test normalverteilt und nach einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) an den Tagen 1 und 3 signifikant. Sie wurden mittels Students t-test auf zweiseitige Signifikanz getestet. Signifikanzen im Bezug zur Kontrolle: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$. Signifikanzen vom Fucoidan in Kombination mit dem Entzündungsmediator im Bezug zur alleinigen Stimulation mit einem Entzündungsmediator (+ = $p < 0,05$). Anzahl der unabhängigen Experimente: $n \geq 3$.

6.2.2 Stimulation mit Extrakten der Spezies *Laminaria hyperborea* und *Saccharina latissima*

Auf Transwell-Platten wurden die Extrakte der Spezies *Saccharina latissima* (E112 und E126), *Laminaria hyperborea* (E127) und die Entzündungsmediatoren Poly I:C und TNF- α getestet. Diese Extrakte und die zu testenden Tage wurden ausgewählt, weil sie bei unpolaren Zellen positive Wirkungen zeigten. Poly I:C wurde ausgewählt, da bei diesem in Kombination mit einem Fucoidan die Zytokinausschüttung reduziert wurde. TNF- α wurde untersucht, da in früheren Versuchen bereits festgestellt worden ist, dass es die Barrierefunktion reduziert [29].

a) Zellviabilität: Abbildung 37 zeigt die Zellviabilität von Zellen, die mit E112 und E126 alleine und jeweils in Kombination mit TNF- α und von Zellen, die mit E127 und E127 in Kombination mit Poly I:C und TNF- α stimuliert worden sind. Die Prüfung auf Zellviabilität erfolgte mittels MTT-Test drei und sieben Tage nach Stimulation. Ein grüner Hintergrund zeigt eine hohe Zellviabilität (100 %), gelb eine mittelhohe (50 %) und rot eine niedrige (0 %). Bei Werten zwischen 50 % und 100 % werden diese Farben im Farbverlaufsspektrum zwischen gelb, über hellgelb, hellgrün und dunkelgrün zugeordnet. Bei Werten zwischen 0 % und 50 % werden diese den Farben zwischen rot über hellrot, orange und gelb zugeordnet. Unter Poly I:C an Tag 7 und TNF- α an Tag 3 zeigte sich keine signifikante Reduktion der Zellviabilität. Unter Stimulation von E112 (80 ± 20 %) und E112 mit TNF- α (80 ± 23 %) konnte eine nicht-signifikante Reduktion der Zellviabilität an Tag 3 beobachtet werden. Auch die Viabilität der Zellen, die an Tag 3 mit E126 (91 ± 11 %) und E126 mit TNF- α (84 ± 19 %) stimuliert wurden, wurde verringert. Des weiteren wurde drei Tage nach Stimulation mit E127 und TNF- α (87 ± 27 %) die Zellviabilität

nicht-signifikant verringert. Sieben Tage nach Stimulation konnte eine signifikante Reduktion der Viabilität der RPE-Zellen sowohl durch Stimulation mit E127 ($66 \pm 1\%$, $p < 0,0001$) als auch mit E127 + Poly I:C ($61 \pm 6\%$, $p < 0,001$) beobachtet werden.

	Kontrolle	Poly I:C	TNF α	E112	E112 + TNF α
Tag 3	100		95	80	80
Tag 7	100	106 *			
	E126	E126 + TNF α	E127	E127 + Poly I:C	E127 + TNF α
Tag 3	91	84	93		87
Tag 7			66 ***	61 *	

Abbildung 37: Zellviabilität von RPE-Zellen nach drei- und siebentägiger Stimulation mit den Kontrollen, den Fucoidanen E112, E126, E127 und den Entzündungsmediatoren TNF- α und Poly I:C: Die Zellviabilitäten wurden in Prozent zur unbehandelten Kontrolle (100 Prozent) berechnet. Die Zahlen repräsentieren die Mittelwerte der Zellviabilität. Bei Werten zwischen 50 % und 100 % werden diese Farben im Farbverlaufsspektrum zwischen gelb, über hellgelb, hellgrün und dunkelgrün zugeordnet. Bei Werten zwischen 0 % und 50 % werden diese den Farben zwischen rot über hellrot, orange und gelb zugeordnet. Die Daten sind nach Shapiro-Wilk-Test normalverteilt. Die Signifikanzen wurden mittels Ein-Stichproben- t -Test ermittelt. Signifikanzen im Bezug zur Kontrolle: * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$. Anzahl der unabhängigen Experimente: $n \geq 3$.

b) Barrierefunktion:

Einen Tag nach Stimulation war eine gegenüber der Kontrolle und gegenüber der Initialmessung signifikante Reduktion der Barriere durch Stimulation mit TNF- α zu erkennen. Außerdem wurde die Barriere einen Tag nach Stimulation durch E112 mit TNF- α gegenüber der Initialmessung signifikant gesenkt. An Tag 3 nach Stimulation konnte eine signifikante Reduktion der Barriere der Zellen des Kontroll-Wellen gegenüber der Initialmessung beobachtet werden. Außerdem wurde die Barrierefunktion der Zellen, welche mit TNF- α stimuliert wurden, signifikant gegenüber der Kontrolle und der Initialmessung gesenkt (Abb. 38a). Unter Stimulation mit E126 und TNF- α wurde die Barrierefunktion der RPE-Zellen nach einem Tag signifikant gegenüber der Kontrolle und der Initialmessung und nach drei Tagen gegenüber der Initialmessung reduziert (Abb. 38b). Des Weiteren wurde einen Tag nach Stimulation durch E127 und Poly I:C ($88 \pm 5\%$, $p = 0,026$) die Barriere signifikant ($p = 0,004$) gegenüber der alleinigen Stimulation mit Poly I:C ($101 \pm 27\%$) reduziert (Abb. 38c). Außerdem wurde unter E127 und TNF- α ($63 \pm 1\%$, $p = 0,004$) die Zellviabilität im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit TNF- α ($76 \pm 18\%$) signifikant ($p = 0,003$) reduziert (Abb. 38d).

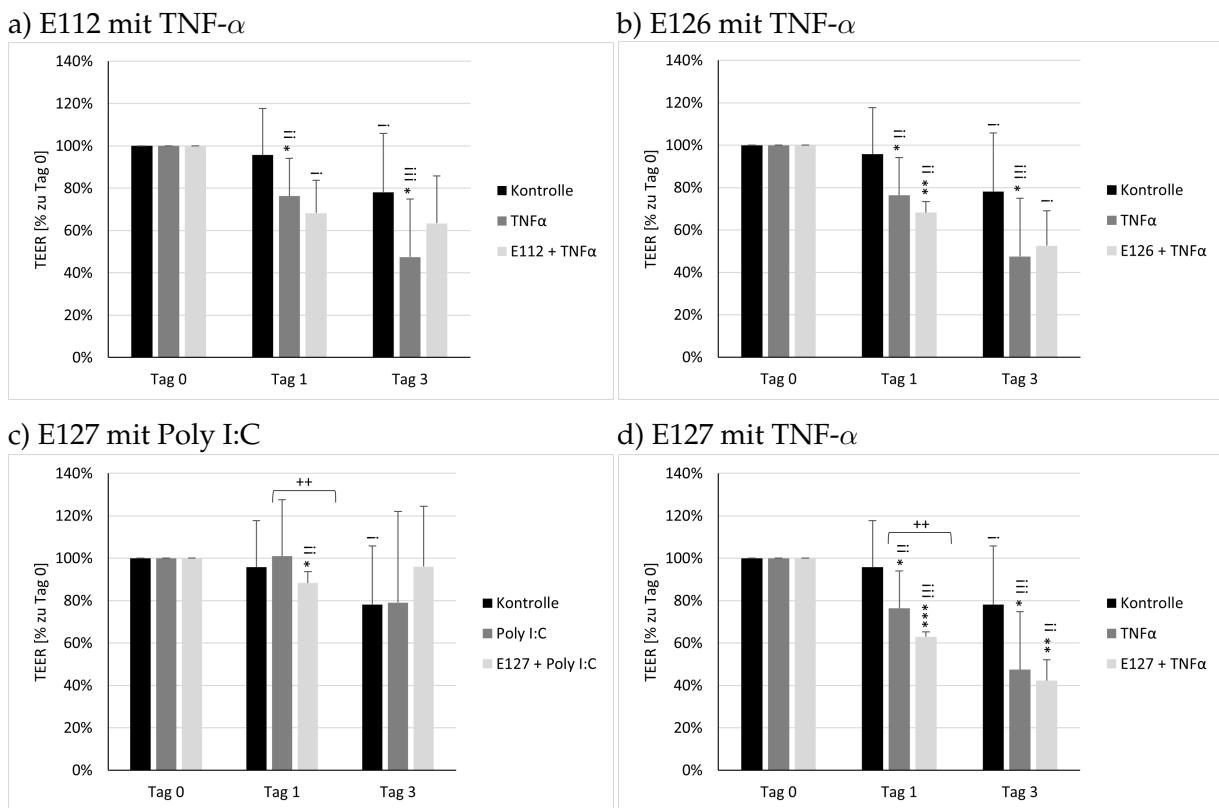


Abbildung 38: Barriere von E112, E126, E127, Polyinosinsäure:Polycytidylsäure (Poly I:C) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) an den Tagen 0, 1 und 3: Die Barrierefunktion wurde vor Stimulation und ein bzw. drei Tage nach Stimulation mit E112 (50 μ g/ml), E126 (50 μ g/ml), E127 (50 μ g/ml), Poly I:C (10 μ g/ml), TNF- α (50 ng/ml) bestimmt. Die Daten der Initialmessung wurden auf 100 % genormt. Die Barrierefälle der Tage 1 - 28 nach Stimulation wurden jeweils in % zur Initialmessung (100 %) berechnet. Die Daten sind nach Shapiro-Wilk-Test normalverteilt. Die zweiseitigen Signifikanzen wurden anhand des Ein-Stichproben- t -Test berechnet. Signifikanzen im Bezug zur Kontrolle des jeweiligen Tages: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, Signifikanzen im Bezug zur Initialmessung: ! = $p < 0,05$; !! = $p < 0,01$; !!! = $p < 0,001$, Signifikanzen vom Fucoidan in Kombination mit dem Entzündungsmediator im Bezug zur alleinigen Stimulation mit dem Entzündungsmediator: ++ = $p < 0,01$. Anzahl der unabhängigen Experimente: $n \geq 4$.

c) Interleukin-6-Ausschüttung:

Die apikale und basale IL-6-Ausschüttung wurde im polaren Zellmodell drei Tage nach Stimulation mit den Extrakten E112, E126 und E127 und mit dem Entzündungsmediator TNF- α gemessen. Apikal wurde die Zytokinausschüttung durch Zugabe von TNF- α ($1121 \pm 648\%$, 0,018) und E112 mit TNF- α ($988 \pm 79\%$, $p = 0,036$) signifikant erhöht (Abb. 39a). Basal konnten keine signifikanten Zytokinausschüttungen beobachtet werden (Abb. 39b).

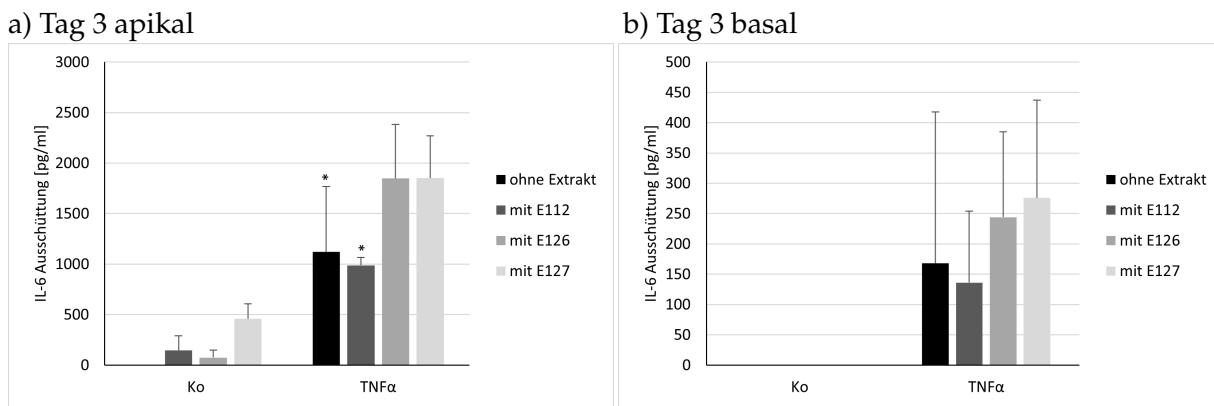


Abbildung 39: danpikale (a) und basale (b) Interleukin-6-Ausschüttung von RPE-Zellen nach dreitägiger Stimulation mit E112, E126, E127 und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α): IL-6-Ausschüttung durch E112 (500 μ g/ml), E126 (500 μ g/ml), E127 (500 μ g/ml) und TNF- α (500 ng/ml) wurde mittels ELISA analysiert. Diese wird in pg/ml angegeben. Die Daten sind nach Shapiro-Wilk-Test normalverteilt und nach einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) signifikant. Sie wurden mittels *Students t-test* auf zweiseitige Signifikanz getestet. Signifikanzen im Bezug zur Kontrolle: * = $p < 0,05$. Anzahl der unabhängigen Experimente: $n \geq 2$.

d) Interleukin-8-Ausschüttung:

Die apikale und basale Zytokinausschüttung von IL-8 wurde drei Tage nach Stimulation mit E112, E126, E127 und TNF- α gemessen.

Unter TNF- α ($2817 \pm 669\%, p = 0,001$) und TNF- α mit E112 ($2828 \pm 84\%, p = 0,019$) wurde die apikale Zytokinausschüttung erhöht (Abb. 40a). Durch E127 mit TNF- α ($1789 \pm 62\%, p = 0,022$) wurde die basale IL-8-Ausschüttung nach drei Tagen signifikant erhöht (Abb. 40b).

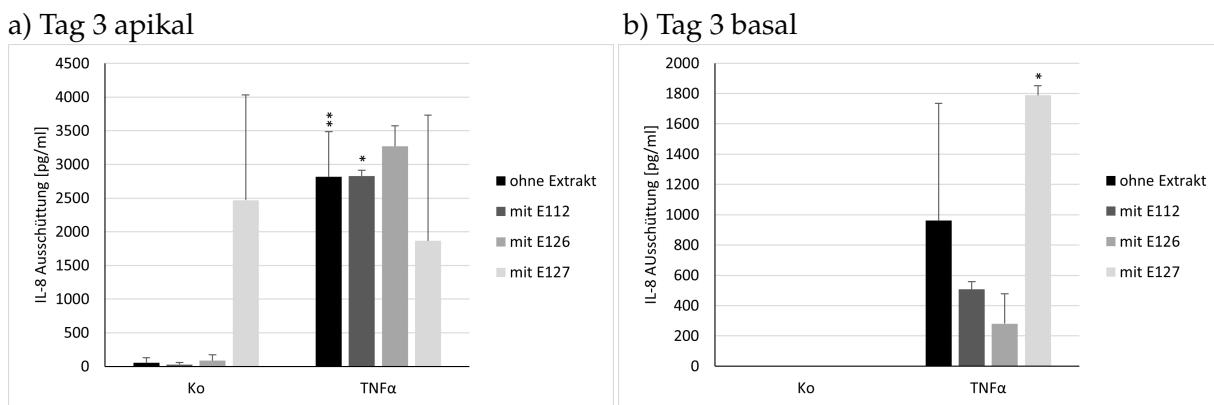


Abbildung 40: apikale (a) und basale (b) Interleukin-8-Ausschüttung von RPE-Zellen nach dreitägiger Stimulation mit E112, E126, E127 und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α): IL-8-Ausschüttung durch E112 (500 μ g/ml), E126 (500 μ g/ml), E127 (500 μ g/ml) und TNF- α (500 ng/ml) wurde mittels ELISA analysiert. Diese wird in pg/ml angegeben. Die Daten sind nach Shapiro-Wilk-Test normalverteilt und nach einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) signifikant. Sie wurden mittels *Students t-test* auf zweiseitige Signifikanz getestet. Signifikanzen im Bezug zur Kontrolle: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$. Anzahl der unabhängigen Experimente: $n \geq 2$.

7 Diskussion

Fucoidane sind aus Algen extrahierte Polysaccharide mit einer Vielzahl an besonderen biologischen und physiologischen Eigenschaften, wodurch sie in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung hinsichtlich eines möglichen medizinischen Nutzens gewonnen haben [202]. Aufgrund ihrer vielfältigen Eigenschaften werden Fucoidane auch als mögliche Therapie bei der AMD untersucht, welche aktuell eine der häufigsten Ursachen für Erblindung in der westlichen Welt ist [188]. Zu den wesentlichen Pathomechanismen der AMD zählen vor allem vier Faktoren: Generierung von Lipofuszin (mit ihrer Verbindung zu oxidativem Stress), Drusogenese, lokale Entzündung und Neovaskularisation (bei der feuchten Form) [63, 66, 67]. Aktuelle Therapieoptionen zielen derzeit nur auf die Verhinderung der Angiogenese ab und sind zudem sehr teuer und aufwändig, da sie intravitreal injiziert werden müssen [60]. Daher besteht die Hoffnung, mit Fucoidanen eine Therapiemöglichkeit zu haben, die auch auf die anderen pathogenetischen Faktoren der AMD wie beispielsweise die antiinflammatorische Wirkung einwirkt. Schwerpunkt dieser Arbeit war der Einfluss von Fucoidanen auf die Zellviabilität, die Barrierefunktion und die Zytokinausschüttung von IL-6, IL-8, IL-1 β und TNF- α von porcinen RPE-Zellen.

7.1 Diskussion der Methoden

Als Zellmodell dienten RPE-Zellen, welche aus Schweineaugen präpariert wurden. Dieses porcine RPE kann als gutes Zellmodell mit großer Ähnlichkeit zu humanem RPE genutzt werden und ist im Gegensatz zu humanem RPE in ausreichenden Mengen vorhanden [203]. Problematisch bei allen RPE-Zellen verschiedener Spezies ist die unterschiedliche Barrierefunktion aufgrund differenter Tight Junctions [30]. Der Vorteil von Schweine-RPE gegenüber dem Mäuse-RPE ist die Exprimierung von Claudin-19, welches auch in humanem RPE zu finden ist [30]. Zu berücksichtigen ist jedoch, dass die Zellen von mehreren unterschiedlichen Schweinen und nicht von einer Zelllinie stammen, was zu einer höheren Variabilität der Ergebnisse geführt haben kann [203]. Diese höhere Variabilität liegt jedoch auch bei den Menschen vor, da kein Auge dem anderen gleicht. Daher führt dieser Faktor zu einer vermehrten Realitätsnähe. Außerdem muss bedacht werden, dass die genutzten Zellen von jungen Individuen stammt und die AMD eher ein Krankheitsbild des höheren Alters ist. Es kann verschiedene Mutationen geben, die bis heute noch nicht bekannt sind, aber eine Rolle bei der Pathogenese spielen. Diese werden bei den Experimenten nicht mit berücksichtigt.

7.2 Einfluss von Fucoidanen auf die Barrierefunktion des RPE

Die Barrierefunktion des RPE spielt eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der AMD, da sie an der Regulierung des Austausches von Stoffen zwischen der Choroidea und den Lichtsinneszellen als auch beim Schutz der Netzhaut vor dem Eindringen von Zytokinen aus dem Blutkreislauf beteiligt ist [33, 34]. Im polaren Zellmodell konnte nachgewiesen werden, dass der TEER unter Stimulation mit der Referenzsubstanz F2 (F.v.) zusammen mit LPS bis zu Tag 14

im Vergleich zur Initialmessung signifikant reduziert wurde und im Verlauf bis Tag 28 wieder anstieg. Außerdem wurde auch die TEER von Zellen, welche mit dem Fucoidan F2 (F.v.) und LPS stimuliert wurden, einen Tag und sieben Tage nach Stimulation signifikant im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit LPS reduziert, an Tag 28 jedoch erhöht. Das könnte auf einen negativen Effekt von Fucoidanen in Kombination mit einem Entzündungsmediator hinweisen. In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass bei 24-stündigen Stimulationen, der TLR-4-Agonist LPS einen negativen Effekt auf den TEER hatte [27]. Jedoch konnten Klettner et al. nach dreitägiger Stimulation mit LPS am polaren RPE-Zellmodell keine signifikante Reduktion der Barrierefunktion feststellen [29]. Unter Stimulation mit Poly I:C kam es sieben, 21 und 28 Tage und unter Poly I:C mit der Referenzsubstanz F2 (F.v.) nach Stimulation zu einer Reduktion der Barriere im Vergleich zur Initialmessung. Unter E127 (*Laminaria hyperborea* (L.h.)) und Poly I:C wurde der TEER im Gegensatz zur alleinigen Stimulation mit Poly I:C nach einem Tag signifikant reduziert. Auch hier liegt ein barrierereduzierender Effekt vom Entzündungsmediator Poly I:C nahe, welcher bereits in einer 24-stündigen Stimulation mit Poly I:C in einem anderen Versuch gezeigt worden ist [27]. In anderen dreitägigen Versuchen konnte jedoch kein signifikanter Einfluss von Poly I:C auf die Barrierefunktion festgestellt werden [29]. Unter TNF- α kam es bis Tag 21 zu einer signifikanten Reduktion des TEER, bei leichtem Anstieg an Tag 28. Ähnliches zeigte sich auch unter Stimulation mit F2 (F.v.) und TNF- α . Durch die Kombination von TNF- α mit dem Fucoidan F2 (F.v.) zeigte sich an Tag 28 eine signifikante Reduktion gegenüber alleiniger Stimulation mit TNF- α . Auch in Kombinationen mit anderen Fucoidanen zeigte sich eine Reduktion der Barriere: Unter TNF- α mit E112 (*Saccharina latissima* (S.l.)) wurde der TEER nach einem Tag und unter TNF- α mit E126 (S.l.) oder E127 (L.h.) nach einem Tag und nach drei Tagen reduziert. Einen Tag nach Stimulation wurde der TEER durch E127 (L.h.) mit TNF- α gegenüber der alleinigen Stimulation mit TNF- α reduziert. Das könnte einen negativen Effekt von Fucoidanen auf die Barrierefunktion zeigen. Frühere Studien unterlegen diese Ergebnisse [29, 30]. Das könnte damit zusammenhängen, dass Zytokine wie TNF- α die Zonula occludens der RPE-Zellen beeinträchtigen und somit einen negativen Einfluss auf die Barriere haben könnten [32]. In einigen Studien konnte der negative Zusammenhang zwischen Barriere und TNF- α nicht nachgewiesen werden, was damit erklärt werden kann, dass keine polarisierte Zellen genutzt wurden, was jedoch zu diskutieren ist, da auch bei fortgeschrittener AMD die meisten Zellen noch nicht ihren Polarität verloren hätten [30]. Unter Pam wurde der TEER sieben, 14 und 21 Tage reduziert, unter Pam mit F2 (F.v.) an Tag sieben, bei leichtem Wiederanstieg an Tag 14, 21 und 28. Im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Pam wurde an Tag sieben der TEER mit Pam in Kombination mit F2 (F.v.) reduziert. In vorherigen Studien zeigte sich unter Pam ein reduzierter TEER nach 24 Stunden [27]. Die signifikante Reduktion des TEER der RPE-Zellen, welche mit verschiedenen Fucoidanen in Kombination mit Entzündungsfaktoren gegenüber den Zellen, welche alleine mit Entzündungsfaktoren stimuliert worden sind, kann einen eventuellen negativen Effekt der Fucoidane auf die Barriere nahelegen. Es sollte jedoch auch beachtet werden, dass es sein könnte, dass auch Zellen ohne Zugabe von Fucoidanen oder Entzündungsfaktoren über die Zeit aus unterschiedlichen Gründen an Barrierefähigkeit verlieren könnten. In diesem Versuch konnten jedoch nur wenige signifikante Ergebnisse für

diese These gefunden werden. Dieser Effekt konnte jedoch bereits in früheren Versuchen festgestellt werden, in denen der TEER auch in den Kontrollen nach drei Tagen reduziert worden ist [29]. Die Barrierestörung und damit die Störung der Blut-Retina-Schranke spielt eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der AMD [27, 31]. Da die Barrierefunktion als abhängig von der Funktion der Tight Junctions gilt, ist anzunehmen, dass der Einfluss von Zytokinen und Fucoidanen auf die Tight Junctions als fundamental bedeutsam für die Pathogenese der AMD anzusehen ist [204]. Tight Junctions bestehen aus vielen verschiedenen Proteinen wie Claudinen, Occludinen und JAM, welche unter anderem an Zonula occludens befestigt werden [205]. Um den Einfluss von Fucoidanen auf die Barrierefunktion von RPE-Zellen besser zu verstehen, sollte deren Wirkung auf die verschiedenen Bestandteile der Tight Junctions, wie Occludine, Claudine und JAMs auf molekularer Ebene weiter untersucht werden.

7.3 Einfluss von Fucoidanen auf die Zellviabilität des RPE

Damit Fucoidane in der Medizin überhaupt als Therapeutikum eingesetzt werden können, dürfen sie in der verwendeten Konzentration keine toxischen Effekte auf die Zellen des Körpers haben. Daher wurde der Einfluss von Fucoidanen alleine und zusammen mit Entzündungsfaktoren auf die Zellviabilität der RPE-Zellen untersucht. Die Zellviabilität wurde sowohl im polaren als auch im unpolaren Zellmodell bis 28 Tage nach Stimulation mittels MTT-Test getestet. Zunächst wurde im unpolaren Zellmodell die Zellviabilität unter Stimulation mit den Entzündungsmediatoren ohne Fucoidan getestet. Dort zeigte sich bis 28 Tage nach Stimulation keine signifikante Reduktion der Viabilität. Auch Dietrich et al. untersuchten die Zellviabilität von RPE-Zellen nach Zugabe verschiedener Konzentrationen LPS, Poly I:C und Pam im MTT-Assay [206]. Nach 24 Stunden konnte keine signifikante Toxizität nachgewiesen werden [206]. In anderen Studien konnte jedoch ein Effekt von Entzündungsmediatoren auf die Zellviabilität von RPE-Zellen festgestellt werden. Dort zeigte sich unter anderem ein negativer Einfluss von LPS und TNF- α nach einem Tag, zwei und sieben Tagen [29, 207, 208]. Klettner et al. zeigten außerdem, dass Poly I:C konzentrationsabhängig eine sowohl kurzfristige Toxizität nach 24 Stunden als auch eine langfristige Toxizität nach sieben und 28 Tagen hervorruft [50, 29]. Neben den möglichen zytotoxischen Effekten von Entzündungsmediatoren wurde auch die Bedeutung von Fucoidanen hinsichtlich Zellviabilität untersucht. Unter dem Fucoidan F2 (F.v.) kam es bis 28 Tage im unpolaren Zellmodell nach Stimulation zu keiner signifikanten Reduktion der Viabilität. Diese Daten stimmen mit der Literatur überein, der sich entnehmen lässt, dass F2 bis eine Woche keine toxischen Effekte auf RPE-Zellen aufweist [175, 186, 188, 201]. Unter den Extrakten der Spezies S.l. (E93, E112, E125, E126) konnten im unpolaren Zellmodell signifikante Reduktionen der Viabilität beobachtet werden: Es kam unter E93 alleine und mit Entzündungsmediator nach sieben Tagen, unter E112 alleine und mit Entzündungsmediator nach 28 Tagen und unter E125 alleine und mit Entzündungsmediator nach drei Tagen zu einer signifikanten Viabilitätsreduktion. Im polaren Zellmodell wurde der Extrakt E112 mit TNF- α und E126 mit TNF- α untersucht. Dabei konnte kein signifikantes Ergebnis festgestellt werden. Nach 24 Stunden wiesen alle mit S.l. behandelten RPE-Zellen keine

Toxizität auf. Diese Daten stimmen mit Vorversuchen von Bittkau et al. und Dörschmann et al. überein, welche zeigten, dass Fucoidane aus S.l. gegenüber der retinalen Pigmentepithel-Zelllinie (ARPE-19) und RPE-Zellen nach 24 Stunden keine Toxizität zeigen [201, 190]. Es ist nicht bekannt, ob vorher bereits Langzeit-Versuche mit den verschiedenen S.l.-Extrakten an RPE-Zellen durchgeführt worden sind. Daher können diese Daten nicht mit der Literatur bestätigt oder widerlegt werden, weshalb weitere Versuche mit dieser Fragestellung durchgeführt werden sollten. Für die Extrakte des Fucoidans L.h. (E81 und E127) konnten keine signifikanten Reduktionen der Zellviabilität im unpolaren Zellmodell festgestellt werden. Im polaren Zellmodell kam es unter E127 und E127 mit Poly I:C zu einer signifikanten Zellviabilitätsreduktion nach sieben Tagen. Dörschmann et al. konnten in früheren Versuchen ein, drei und sieben Tage nach Stimulation keine signifikante Toxizität der mit Extrakt aus L.h.-Fucoidanen stimulierten Zellen nachweisen, was mit den Daten dieser Arbeit übereinstimmt [190, 209]. Ursache der Unterschiede in den Zellviabilitäten verschiedener Fucoidane kann die hohe Variabilität in der Zusammensetzung auf molekularer Ebene sein. Unterschiede bei den Ergebnissen verschiedener Studien hinsichtlich des Einflusses von Fucoidanen auf die Zellviabilität können dadurch entstanden sein, dass uneinheitliche Assays verwendet wurden. Zudem wurden Fucoidane mit unterschiedlichen Konzentrationen, Reinheiten und biologischen Aktivitäten getestet. Zudem spielt auch die verwendete Zelllinie eine Rolle. Es bestehen Unterschiede zwischen RPE-Zellen, ARPE- und uvealer-Melanom- (OMM-1) Zelllinie. Bezuglich des Einflusses der Zellviabilität durch verschiedene Fucoidanspezies lassen sich hinsichtlich des Sulfatgehalts, des molaren Sulfatierungsgrades und des Phenolgehalts keine Korrelationen feststellen (Daten nicht gezeigt). Jedoch fällt eine positive Korrelation zwischen hohem Fucosegehalt (Maß für die Reinheit des Extraktes) und hoher Zellviabilität auf (siehe Tabelle 7). Diese Eigenschaft ist bereits in früheren Studien aufgefallen [201]. Dort wurde auch keine Korrelation zwischen chemischer Eigenschaft und Viabilität gefunden bis auf den Effekt, dass reinere Extrakte zu einem höheren Zellüberleben führen [201]. Erklärt werden könnte dieser Effekt dadurch, dass mit steigendem Fucosegehalt und damit steigender Reinheit der Anteil an potentiell antiproliferativen Nebenbestandteilen reduziert wird. Daher sollten für die weitere Forschung, aber auch für die medizinische Anwendung eher Fucoidane mit möglichst hohem Fucosegehalt verwendet werden. Innerhalb der Gruppe der S.l.-Fucoidane zeigte sich eine negative Korrelation zwischen Sulfatgehalt und Viabilität. Diese Aussage lässt sich jedoch nicht auf die Fucoidanspezies untereinander beziehen. Auch in der Literatur ist diese Korrelation bisher nicht beschrieben. Möglicherweise stören Sulfatgruppen der Fucoidane durch ihre negative Ladung, ihr Bindungsverhalten oder die Bindung an die Oberfläche des Wells die Integrität der RPE-Zellen untereinander. Um weitere Aussagen darüber treffen zu können, sollten weitere Versuche mit unterschiedlich sulfatierten Fucoidanen durchgeführt werden. Dörschmann et al. konnten bei verschiedenen Fucoidanen der Spezies L.h. eine negative Korrelation zwischen Molekulargewicht und Viabilität bei der Uvealen-Melanom-Zelllinie (OMM-1) nachweisen [190]. Dieser Effekt konnte jedoch bei menschlichen RPE-Zellen nach 24 Stunden nicht festgestellt werden [190]. Auch in dieser Arbeit konnte kein signifikanter Effekt von Molekulargewicht der Extrakte L.h. auf die Viabilität ausgemacht werden. In anderen Zellen hatten hohe

Molekulargewichte von Fucoidanen sogar positive Effekte. Jang et al. fanden heraus, dass Fucoidane mit hohem Molekulargewicht antitoxische Effekte bei Milzzellen aufwiesen und deren Viabilität erhöht haben [210]. Der Einfluss des Molekulargewichts der Fucoidane scheint unterschiedlich auf verschiedene Zellarten zu wirken.

7.4 Einfluss von Fucoidanen auf die Entzündungsantwort des RPE

Neben Barrierefunktion und Zellviabilität wurde in dieser Arbeit außerdem der Einfluss von verschiedenen Fucoidanen auf die Entzündungsantwort am unpolaren und polaren Zellmodell untersucht. Eine anhaltende Entzündung, z.B. durch hohe IL-1 β , -6, -8 und TNF- α Spiegel, gilt als eine der wichtigsten Ursachen bei der Entstehung der AMD [29, 211, 212, 213]. Als Entzündungsmediatoren dienten LPS (als TLR-4-Aktivator), Poly I:C (als TLR-3-Aktivator), Pam (als TLR-1/2-Aktivator) und TNF- α als Aktivator des TNF- α -Rezeptor-Signalwegs. Unter den Entzündungsmediatoren wurden die IL-1 β , IL-6, IL-8- und TNF- α -Sekretionen an verschiedenen Tagen der Stimulation mittels ELISA-Test untersucht.

Zur Untersuchung des Einflusses von Fucoidanen auf die durch verschiedene Entzündungsmediatoren ausgelöste Zytokinproduktion musste zunächst einmal bestätigt werden, dass diese Entzündungsmediatoren im RPE-Zellmodell überhaupt eine Interleukinproduktion hervorrufen. In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass verschiedene Konzentrationen LPS, Poly I:C und TNF- α signifikant die IL-6 und IL-8-Sekretion bis 28 Tage nach Stimulation erhöht haben [29, 206]. Zudem konnte eine signifikante IL-1 β -Produktion nach einem Tag unter LPS und Poly I:C und eine TNF- α -Sekretion durch LPS und Poly I:C festgestellt werden [29, 206]. Pam als TLR-1/2-Agonist wurde in diesen Versuchen nicht untersucht. Mai et al. konnten jedoch eine proinflammatorische Wirkung von Pam auf die Interleukinproduktion menschlicher RPE-Zellen beobachten [214]. In dieser Arbeit konnten die Ergebnisse der Vorversuche bestätigt werden. Im unpolaren Zellmodell wurde die IL-6- und IL-8-Ausschüttung durch LPS, Poly I:C, TNF- α und Pam in den meisten Fällen einen Tag, drei, sieben und 28 Tage nach Stimulation signifikant erhöht. Eine IL-1 β -Ausschüttung konnte nur unter LPS einen Tag nach Stimulation beobachtet werden, anders als in den Vorversuchen nicht jedoch durch Poly I:C [29]. Es konnte zudem eine signifikante TNF- α -Ausschüttung durch LPS und Poly I:C nach einem Tag beobachtet werden, was sich mit den Versuchen von Klettner et al. deckt [29]. Terheyden et al. untersuchten den Einfluss von LPS, Poly I:C und Pam auf die Entzündungsantwort im polaren Zellmodell [27]. Dabei konnte eine IL-6 und TNF- α Produktion durch basale Stimulation mit LPS, Poly I:C und Pam und eine IL-6-Sekretion durch LPS und Pam, nicht jedoch durch Poly I:C beobachtet werden [27]. Im Gegensatz dazu konnte in dieser Arbeit im polaren Zellmodell keine IL-6-Sekretion durch einen der getesteten Entzündungsfaktoren festgestellt werden. Eine IL-8-Ausschüttung fand sich nur bis sieben Tage nach Stimulation durch die Entzündungsmediatoren und auch nur im apikalen, nicht im basalen Well. Die Zellviabilität der polaren Zellen war nach 28 Tagen nicht signifikant herabgesetzt, sodass dies als Ursache für die niedrige Zytokinsekretion ausgeschlossen werden kann. Aus diesem Grund sollten weitere Versuche im polaren Zellmodell erfolgen, um den Grund für die Diskrepanzen aufzu-

klären.

Unter Stimulation mit dem Referenzfucoidan F2 (F.v.) kam es zu einer Verringerung der durch Poly I:C, einem TLR-3-Agonisten, induzierten IL-6- und zu einer Verringerung der durch TNF- α und Poly I:C verursachten IL-8-Produktion. Die Fucoidane E81 (L.h.), E93 (S.I.) und E125 (S.I.) selbst führten zu einer IL-6 und -8 Ausschüttung. Sie reduzierten nicht die durch die Entzündungsmediatoren verursachte Zytokinproduktion. Unter E112 (S.I.) wurde die Poly I:C induzierte IL-8- und unter E126 (S.I.) die Poly I:C induzierte IL-6- und -8-Produktion reduziert. E127 (L.h.) selbst induzierte keine IL-6-, jedoch eine IL-8-Sekretion einen Tag nach Stimulation. Zudem reduzierte E127 (L.h.) die durch Poly I:C induzierte IL-6- und -8-Produktion und führte zu einer Verminderung der durch LPS induzierten IL-8-Sekretion. Bezuglich der TNF- α - und IL-1- β -Ausschüttung konnten keine signifikanten Daten gefunden werden. Es lässt sich feststellen, dass die verschiedenen Fucoidane vor allem die Poly I:C induzierten Zytokinsekretionen reduzieren. Nur E127 verringerte zusätzlich die LPS-induzierte Interleukin-Produktion.

Die antiinflammatorische Wirkung von Fucoidanen auch in anderen Zellen als RPE-Zellen konnten bereits in früheren Studien nachgewiesen werden. Ahmad et al. untersuchten den Einfluss verschiedener Fucoidane (*Undaria pinnatifida*, *Fucus vesiculosus*, *Macrocystis pyrifera*, *Ascochyllum nodosum* und *Laminaria japonica*) auf die Zytokinproduktion von IL-1 β , IL-6 und TNF- α bei der humanen Monozyten-Zelllinie THP-1, welche vorher mit LPS stimuliert worden sind [215]. Dabei konnte eine signifikante Reduktion der Zytokinproduktion durch die Fucoidane festgestellt werden, wobei diejenigen mit niedrigem Molekulargewicht ihre maximale Wirkung bei niedriger Stimulationskonzentration aufwiesen [215]. Auch bei in-vitro-Experimenten bei Zebrafischlarven konnten Fucoidane eine entzündungshemmende Wirkung zeigen [216]. Jeong et al. untersuchten die Zytokinausschüttung von mit Fucoidanen und LPS stimulierten Makrophagen in Zebrafischen [216]. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Fucoidane die LPS-induzierte Produktion von TNF- α , IL-1 β , Stickstoffmonoxid und Prostaglandin E2 unterdrückt haben und somit antientzündlich wirkten [216]. Es wird davon ausgegangen, dass dieser Effekt durch Fucoidane durch Verringerung der Genexpression auf Transkriptionsebene und durch Hemmung der Translation von NF- κ B abläuft [216]. NF- κ B ist ein wichtiger proinflammatorischer Geninduktor [217, 218, 219]. Dabei wirkt NF- κ B sowohl auf das angeborene als auch das adaptive Immunsystem, indem es die Transkription von Zytokinen und die Differenzierung entzündlicher T-Zellen initiiert [217, 218, 219]. In einer weiteren Studie wurde der Entzündungsmechanismus an einer mit LPS und dem Fucoidan *Saccharina japonica* behandelten Makrophagenzelllinie RAW264.7 und an Zebrafischen untersucht [220]. Es wurde gezeigt, dass das Fucoidan Entzündungsreaktionen hemmt, indem es zu einer verminderten Stickstoffmonoxid, Cyclooxygenase (COX)-2 und Zytokinproduktion wie IL-1 β , IL-6 und TNF- α führte [220]. Als Wirkmechanismus wird, wie bereits bei Jeong et al. beschrieben, die Herunterregulierung des NF- κ B, des Januskinase (JAK)-2-, des *Signal Transducers and Activators of Transcription*, dt.: Signalwandler und Aktivatoren der Transkription (STAT)-1/3- und des MAP-Kinase-Signalweges angenommen [220, 221]. Die Ergebnisse dieser Studien lassen vermuten, dass Fucoidane über TLR wirken, damit den NF- κ B-Signalweg stören und in Folge dessen die Zytokinproduktion sinkt [215, 216, 220, 159]. Makarenkova et al. testeten die Interaktion

zwischen Fucoidanen und menschlichen TLR, welche auf Membranen menschlicher Nierenzellen exprimiert wurden [222]. Dabei wirkten die Fucoidane durch Bindung an TLR-2 (bspw. Aktivierbar durch Pam) und -4 (bspw. Aktivierbar durch LPS) [222]. An TLR-5 hätten die Fucoidane keine Wirkung gehabt [222]. In dieser Studie konnte nur der Extrakt E127 (L.h.) die durch LPS am TLR-4 induzierte Zytokinproduktion senken. Alle andere getesteten Fucoidane wirkten nicht entzündungshemmend oder wirkten v.a. über den TLR-3-Agonisten Poly I:C entzündungshemmend. Ursache für die Abweichung von den Ergebnissen in der Literatur könnte die Spezies der Algen sein. Es wurden Fucoidane mit ganz anderen chemischen Eigenschaften verwendet als in diesem Versuch. Das lässt vermuten, dass spezifische Eigenschaften der Fucoidane für das Bindungsverhalten an TLR verantwortlich gemacht werden können. In diesem Fall lässt sich als Besonderheit an den Fucoidanen der Art L.h. ihr hohes Molekulargewicht und ihr niedriger Phenolgehalt im Gegensatz zu den S.l.- und den F.v.-Fucoidanen beobachten. Diese Merkmale könnten eine Rolle auf molekularer Ebene bei der Aktivierung des TLR-4 spielen. Demgegenüber steht jedoch das Ergebnis von Ahmad et al., welche eine Korrelation zwischen niedrigem Molekulargewicht der Fucoidane und entzündungshemmender Wirkung LPS-induzierter Inflammation zeigten [215]. Ein Unterschied zu den Ergebnissen in der Literatur könnte dadurch zustande kommen, dass keine RPE-Zellen, sondern v.a. Makrophagenzelllinie verwendet wurde, was die Wirkweise verändern kann [215, 216, 220, 159]. Die größte antiinflammatorische Wirkung bei diesen getesteten Fucoidanen wurde für die Poly I:C vermittelte Zytokinausschüttung über den TLR-3 beobachtet. Allgemein ist über die Wirkung von Fucoidanen am TLR-3 bisher nicht viel bekannt [223]. In einer Arbeit von Dutot et al. wurde die Wirkung von Fucoidanen auf die Poly I:C induzierte Entzündungsreaktion an primären menschlichen Bronchialepithelzellen untersucht [224]. Dabei wurde festgestellt, dass Fucoidane die Poly I:C-induzierte mRNA-Expression verschiedener Zytokine wie IL-1- β , IL-6, TNF- α , verschiedener Chemokine und Prostaglandinen senkten [224]. Neben LPS wird auch die durch Poly I:C induzierte Aktivierung von TLR-3 auf eine langfristige Entzündungsreaktion und damit auf die Entstehung der AMD vermutet [45]. Daher sind die getesteten Fucoidane F2, E112, E126 und E127 sehr vielversprechend bezüglich einer möglichen Therapieoption der AMD. Es sind jedoch weitere Experimente an menschlichen RPE-Zellen nötig, um die Ergebnisse dieser Arbeit weiter zu validieren und um zu prüfen, in wieweit Fucoidane auf menschliche Zellen anders wirken als auf porcine Zellen [223]. Zudem sollte der genaue Wirkmechanismus auf molekularer Ebene und damit der Einfluss von unterschiedlichen chemischen Eigenschaften der Fucoidane auf TLR weiter untersucht werden. Im polaren Zellmodell konnte keine entzündungshemmende Wirkung der Fucoidane beobachtet werden. Ursache dafür kann sein, dass auch durch die Entzündungsmediatoren selbst kaum eine signifikante Zytokinproduktion erreicht werden konnte.

Zusammenfassend haben Fucoidane verschiedener Spezies unterschiedlichen Einfluss auf die Zellviabilität, Zytokinproduktion und Barrierefunktion von RPE-Zellen. Die Barrierefunktion wurde eher negativ beeinflusst, wobei der Effekt auf Zellviabilität und Reduktion der Zytokinproduktion zum Teil sehr positiv beeinflusst wurde. Dabei scheint die Wirkung auf verschiedene Toll-like-Rezeptoren eine große Rolle zu spielen. Zukünftige Experimente sollten

die molekulare Wirkweise von Fucoidanen auf die Toll-like-Rezeptoren untersuchen. Für eine mögliche klinische Anwendung bei der AMD haben Fucoidane ein großes Potential, da sie bei in-vitro-Experimenten zum Teil positive Eigenschaften bezüglich der Entzündungsreaktion gezeigt haben, was eine wichtige Säule in der Pathogenese der AMD darstellt. Es müssten weitere Experimente in-vivo erfolgen. Zudem muss untersucht werden, in welcher Applikationsform Fucoidane eingesetzt werden können, um die Blut-Retina-Schranke zu durchdringen um an ihren Wirkort zu gelangen.

8 Zusammenfassung

Die altersbedingte Makuladegeneration ist die häufigste Ursache für Erblindung in der westlichen Welt, wobei die Behandlungsoptionen sehr begrenzt sind. Aktuell gibt es nur krankheitsverlangsamende Behandlungsmethoden, jedoch keine Heilung. Zu den wichtigsten pathogenetischen Faktoren gehören unter anderem eine chronische Entzündung und Störung der Barrierefunktion. Fucoidane sind aus Braunalgen extrahierte Polysaccharide, welche in verschiedenen Studien an unterschiedlichsten Zellmodellen und auch bereits *in-vivo* vielversprechende antiinflammatorische Eigenschaften aufwiesen. Daher besteht für die Fucoidane ein großes Potential als mögliches Therapeutikum bei der Behandlung der altersbedingten Makuladegeneration. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Fucoidanen auf die Zellviabilität, die Barrierefunktion und die Entzündungsantwort des retinalen Pigmentepithels untersucht. Es wurde versucht, ein Fucoidan zu finden, welches gleichzeitig antiinflammatorisch, nicht zytotoxisch und barrierefördernd wirkt. Hierfür wurden als Zellmodell retinale Pigmentepithelzellen aus Schweineaugen verwendet. Die Zellen wurden mit den verschiedenen Entzündungsmediatoren und Fucoidanen stimuliert. Es wurde die Zellviabilität, die Zytokinausschüttung und die Barrierefunktion untersucht. In der Barrieremessung konnte festgestellt werden, dass die getesteten Fucoidane allgemein eher barrierereduzierend wirken. Auch Zellen unter F2 mit Entzündungsmediatoren wiesen eine im Vergleich zu Zellen, welche nur mit dem Entzündungsmediator stimuliert wurden, eine reduzierte Barriere auf. Das könnte auf einen negativen Effekt von Fucoidanen in Kombination mit einem Entzündungsmediator hinweisen.

Die Ergebnisse zur Untersuchung der Zellviabilität zeigten im unpolaren Zellmodell, dass Entzündungsmediatoren die Zellviabilität bis 28 Tage nach Stimulation der retinalen Pigmentepithelzellen nicht reduzieren. Unter dem Fucoidan F2 (*Fucus vesiculosus*) kam es bis 28 Tage im unpolaren Zellmodell nach Stimulation zu keiner signifikanten Reduktion der Viabilität. Unter den Extrakten der Spezies *Saccharina latissima* (E93, E112, E125, E126) konnten im unpolaren Zellmodell signifikante Reduktionen der Viabilität beobachtet werden. Im polaren Zellmodell wurde der Extrakt E112 mit Tumornekrosefaktor- α und E126 mit Tumornekrosefaktor- α untersucht. Dabei konnte kein signifikantes Ergebnis festgestellt werden. Für die Extrakte des Fucoidans *Laminaria hyperborea* E81 und E127 konnten keine signifikanten Reduktionen der Zellviabilität im unpolaren Zellmodell festgestellt werden. Im polaren Zellmodell kam es unter E127 und E127 mit Polyinosinsäure:Polycytidylsäure zu einer signifikanten Zellviabilitätsreduktion nach sieben Tagen. Als Ursache der Unterschiede in den Zellviabilitäten verschiedener Fucoidane kann die hohe Variabilität in der Zusammensetzung auf molekularer Ebene diskutiert werden. Es fällt eine positive Korrelation zwischen hohem Fucosegehalt (Maß für die Reinheit des Extraktes) und hoher Zellviabilität auf.

Im unpolaren Zellmodell wurde die Interleukin-6- und Interleukin-8-Ausschüttung durch Entzündungsmediatoren signifikant erhöht. Unter Stimulation mit dem Referenzfucoidan F2 (*Fucus vesiculosus*) kam es zu einer Verringerung der durch Polyinosinsäure:Polycytidylsäure induzierten Interleukin-6- und zu einer Verringerung der durch Tumornekrosefaktor- α und Polyinosinsäure:Polycytidylsäure verursachten Interleukin-8-Produktion. Die Fucoidane E81 (*Lami-*

naria hyperborea), E93 (*Saccharina latissima*) und E125 (*Saccharina latissima*) selbst führten zu einer Interleukin-6 und -8 Ausschüttung. Sie reduzierten nicht die durch die Entzündungsmediatoren verursachte Zytokinproduktion. Unter E112 (*Saccharina latissima*) wurde die Polyinosinsäure:Polycytidylsäure induzierte Interleukin-8- und unter E126 (*Saccharina latissima*) die Polyinosinsäure:Polycytidylsäure induzierte Interleukin-6- und -8-Produktion reduziert. E127 (*Laminaria hyperborea*) selbst induzierte keine Interleukin-6-, jedoch eine Interleukin-8-Sekretion einen Tag nach Stimulation. Zudem reduzierte E127 (*Laminaria hyperborea*) die durch Polyinosinsäure:Polycytidylsäure induzierte Interleukin-6- und -8-Produktion und führte zu einer Verminderung der durch Lipopolysaccharid induzierten Interleukin-8-Sekretion. Es lässt sich zusammenfassen, dass die verschiedenen Fucoidane vor allem die Polyinosinsäure:Polycytidylsäure induzierten Zytokinsekretionen reduzieren. E127 verringerte zusätzlich die Lipopolysaccharid-induzierte Interleukin-Produktion. In diesem Fall lässt sich als Besonderheit an den Fucoidanen der Spezies *Laminaria hyperborea* ihr hohes Molekulargewicht und ihr niedriger Phenolgehalt im Gegensatz zu den *Saccharina latissima*- und den *Fucus vesiculosus*-Fucoidanen beobachten. Neben Lipopolysaccharid wird auch die durch Polyinosinsäure:Polycytidylsäure induzierte Aktivierung von Toll-like-Rezeptor-3 auf eine langfristige Entzündungsreaktion vermuten. Daher sind die getesteten Fucoidane F2, E112, E126 und E127 sehr vielversprechend bezüglich einer möglichen Therapieoption der altersbedingten Makuladegeneration. Im polaren Modell konnte keine entzündungshemmende Wirkung der Fucoidane beobachtet werden.

Fucoidane haben weiterhin großes Potential als Therapeutikum bei der Behandlung der altersbedingten Makuladegeneration, da einige Spezies nicht toxisch sind und vielversprechende antientzündliche Eigenschaften besitzen. Der negative Einfluss auf die Barrierefunktion sollte jedoch weiter untersucht werden. Es sind weitere Versuche notwendig um den Einfluss der Fucoidane auf die anderen Säulen der altersbedingten Makuladegeneration zu klären und um diese Ergebnisse weiter auf molekularer Ebene zu verstehen.

9 Literaturverzeichnis

Literatur

- [1] R. Lüllmann-Rauch; E. Asan. Taschenlehrbuch Histologie. Thieme, Stuttgart, 6., vollständig überarbeitete auflage edition, 2019.
- [2] U. Welsch; W. Kummer; T. Deller. Histologie - Lehrbuch und Atlas: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie. Urban & Fischer in Elsevier, München, 6. auflage edition, 2022.
- [3] H. J. Kaplan. Anatomy and function of the eye. Chemical immunology and allergy, 92:4–10, 2007.
- [4] Heimo; S. Frings; S. Grissmer J. C. Behrends; J. Bischofberger; R. Deutzmann; H. Ehmke. Physiologie. Duale Reihe. Thieme, Stuttgart, 4., unveränderte auflage edition, 2021.
- [5] J. Esser; O. Gareis; G. F. Lang; D. Recker; C. W. Spraul; P. Wagner. Augenheilkunde. Georg Thieme Verlag, Stuttgart and New York, 6., überarbeitete auflage edition, 2019.
- [6] R. H. Masland. The fundamental plan of the retina. Nature neuroscience, 4(9):877–886, 2001.
- [7] H. E. Grossniklaus; E. E. Geisert; J. M. Nickerson. Introduction to the retina. In Progress in Molecular Biology and Translational Science, pages 383–396. Elsevier, 2015.
- [8] M. Hoon; H. Okawa; L. Della Santina; R. O. L. Wong. Functional architecture of the retina: Development and disease. Progress in retinal and eye research, 42:44–84, 2014.
- [9] F. Rieke. Mechanisms of single-photon detection in Rod photoreceptors. 2000.
- [10] O. Strauss. The retinal pigment epithelium in visual function. Physiological reviews, 85(3):845–881, 2005.
- [11] E. Obert; R. Strauss; C. Brandon; C. Grek; G. Ghatnekar; R. Gourdie; B. Rohrer. Targeting the tight junction protein, zonula occludens-1, with the connexin43 mimetic peptide, act1, reduces vegf-dependent rpe pathophysiology. Journal of molecular medicine (Berlin, Germany), 95(5):535–552, 2017.
- [12] U. Kellner; H. Heimann; J. Wachtlin; A. P. Lommatsch; T. Barth; N. E. Bechrakis. Atlas des Augenhintergrundes. Georg Thieme Verlag, Stuttgart and New York, 2., vollständig überarbeitete auflage edition, 2021.
- [13] O. Strauss. Die rolle des retinalen pigmentepithels im rahmen visueller funktionen. Der Ophthalmologe, 106(4):299–304, 2009.
- [14] F. G. Holz; D. Pauleikhoff; R. Klein; A. C. Bird. Pathogenesis of lesions in late age-related macular disease. American Journal of Ophthalmology, 137(3):504–510, 2004.

- [15] S. Hamann. Molecular mechanisms of water transport in the eye. International review of cytology, 215:395–431, 2002.
- [16] W. Baehr; S. M. Wu; A. C. Bird; K. Palczewski. The retinoid cycle and retina disease. Vision Research, 43(28):2957–2958, 2003.
- [17] P. D. Kiser; M. Golczak; K. Palczewski. Chemistry of the retinoid (visual) cycle. Chemical Reviews, 114(1):194–232, 2014.
- [18] F. Mazzoni; H. Safa; S. C. Finnemann. Understanding photoreceptor outer segment phagocytosis: use and utility of rpe cells in culture. Experimental eye research, 126:51–60, 2014.
- [19] E. F. Nandrot; Y. Chang; S. C. Finnemann. Alphavbeta5 integrin receptors at the apical surface of the rpe: one receptor, two functions. Advances in experimental medicine and biology, 613:369–375, 2008.
- [20] M. M. LaVail. Rod outer segment disk shedding in rat retina: relationship to cyclic lighting. Science (New York, N.Y.), 194(4269):1071–1074, 1976.
- [21] I. A. Bhutto; D. S. McLeod; T. Hasegawa; S. Y. Kim; C. Merges'; P. Tong; G. A. Lutty. Pigment epithelium-derived factor (pedf) and vascular endothelial growth factor (vegf) in aged human choroid and eyes with age-related macular degeneration. Experimental eye research, 82(1):99–110, 2006.
- [22] R. Rosenthal; H. Heimann; H. Agostini; G. Martin; L. L. Hansen; O. Strauss. Ca²⁺ channels in retinal pigment epithelial cells regulate vascular endothelial growth factor secretion rates in health and disease. Molecular Vision, 13:443–456, 2007.
- [23] B. Detrick; J. J. Hooks. The rpe cell and the immune system. Retinal Pigment Epithelium in Health and Disease, pages 101–114.
- [24] F. Horn. Biochemie des Menschen: Das Lehrbuch für das Medizinstudium. Georg Thieme Verlag, Stuttgart and New York, 2019.
- [25] R. H. Quinn; S. S. Miller. Ion transport mechanisms in native human retinal pigment epithelium. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 33(13):3513–3527, 1992.
- [26] Liu; J. Pu; G. Milne; M. Chen; H. Xu; A. Shipley; J. V. Forrester; C. D. McCaig; N. Lois L. Cao; J. Polarized retinal pigment epithelium generates electrical signals that diminish with age and regulate retinal pathology. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 22(11):5552–5564, 2018.
- [27] L. Terheyden; J. Roider; A. Klettner. Basolateral activation with tlr agonists induces polarized cytokine release and reduces barrier function in rpe in vitro. Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie, 259(2):413–424, 2021.

- [28] S. Touhami; F. Beguier; S. Augustin; H. Charles-Messance; L. Vignaud; E. F. Nandrot; S. Reichman; V. Forster; T. Mathis; J. Sahel; B. Bodaghi; X. Guillonneau; F. Sennlaub. Chronic exposure to tumor necrosis factor alpha induces retinal pigment epithelium cell dedifferentiation. *Journal of neuroinflammation*, 15(1):85, 2018.
- [29] A. Klettner; A. Brinkmann; K. Winkelmann; T. Käckenmeister; J. Hildebrandt; J. Roider. Effect of long-term inflammation on viability and function of rpe cells. *Experimental eye research*, 200:108214, 2020.
- [30] M. Shirasawa; S. Sonoda; H. Terasaki; N. Arimura; H. Otsuka; T. Yamashita; E. Uchino; T. Hisatomi; T. Ishibashi; T. Sakamoto. Tnf-alpha disrupts morphologic and functional barrier properties of polarized retinal pigment epithelium. *Experimental eye research*, 110:59–69, 2013.
- [31] J. Cunha-Vaz; R. Bernardes; C. Lobo. Blood-retinal barrier. *European journal of ophthalmology*, 21 Suppl 6:S3–9, 2011.
- [32] R. Li; A. Maminishkis; F. E. Wang; S. S. Miller. Pdgf-c and -d induced proliferation/migration of human rpe is abolished by inflammatory cytokines. *Investigative ophthalmology & visual science*, 48(12):5722–5732, 2007.
- [33] E. A. Runkle; D. A. Antonetti. The blood-retinal barrier: structure and functional significance. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 686:133–148, 2011.
- [34] Z. Xue; C. Xue Changhu; C. Yuepiao; W. Dongfeng; F. Yu. The study of antioxidant activities of fucoidan from laminaria japonica. *undefined*, 2005.
- [35] N. S. Harhaj; A. J. Barber; D. A. Antonetti. Platelet-derived growth factor mediates tight junction redistribution and increases permeability in mdck cells. *Journal of Cellular Physiology*, 193(3):349–364, 2002.
- [36] P. Dersch; T. Eitinger; J. Heider; E. Kothe M: Bramkamp. *Allgemeine Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart and New York, 11., vollständig überarbeitete auflage edition, 2022.
- [37] H. Li; T. Liao; A. W. Debowski; H. Tang; H. O. Nilsson; K. A. Stubbs; B. J. Marshall; M. Benghezal. Lipopolysaccharide structure and biosynthesis in helicobacter pylori. *Helicobacter*, 21(6):445–461, 2016.
- [38] X. Qin; H. Zou. The role of lipopolysaccharides in diabetic retinopathy. *BMC Ophthalmology*, 22(1):86, 2022.
- [39] J. B. Soares; P. Pimentel-Nunes; R. Roncon-Albuquerque; A. Leite-Moreira. The role of lipopolysaccharide/toll-like receptor 4 signaling in chronic liver diseases. *Hepatology International*, 4(4):659–672, 2010.

- [40] Y. Wu; Y. Sun; X. Dong; J. Chen; Z. Wang; J. Chen; G. Dong. The synergism of pgn, lta and lps in inducing transcriptome changes, inflammatory responses and a decrease in lactation as well as the associated epigenetic mechanisms in bovine mammary epithelial cells. *Toxins*, 12(6), 2020.
- [41] T. Kawai; S. Akira. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on toll-like receptors. *Nature immunology*, 11(5):373–384, 2010.
- [42] T. Kawai; S. Akira. Signaling to nf-kappab by toll-like receptors. *Trends in molecular medicine*, 13(11):460–469, 2007.
- [43] E. M. Y. Moresco; D. LaVine; B. Beutler. Toll-like receptors. *Current biology : CB*, 21(13):R488–93, 2011.
- [44] L. Yu; L. Wang; S. Chen. Endogenous toll-like receptor ligands and their biological significance. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(11):2592–2603, 2010.
- [45] A. Klettner; J. Roider. Retinal pigment epithelium expressed toll-like receptors and their potential role in age-related macular degeneration. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 2021.
- [46] T. Kawai; S. Akira. Tlr signaling. *Cell Death & Differentiation*, 13(5):816–825, 2006.
- [47] M. Molteni; S. Gemma; C. Rossetti. The role of toll-like receptor 4 in infectious and noninfectious inflammation. *Mediators of Inflammation*, 2016:6978936, 2016.
- [48] K. W. Leung; C. J. Barnstable; J. Tombran-Tink. Bacterial endotoxin activates retinal pigment epithelial cells and induces their degeneration through il-6 and il-8 autocrine signaling. *Molecular immunology*, 46(7):1374–1386, 2009.
- [49] L. Alexopoulou; A. C. Holt; R. Medzhitov; R.A. Flavell. Recognition of double-stranded rna and activation of nf-kappab by toll-like receptor 3. *Nature*, 413(6857):732–738, 2001.
- [50] A. Klettner; S. Koinzer; T. Meyer; J. Roider. Toll-like receptor 3 activation in retinal pigment epithelium cells - mitogen-activated protein kinase pathways of cell death and vascular endothelial growth factor secretion. *Acta ophthalmologica*, 91(3):e211–8, 2013.
- [51] N. Ebihara; L. Chen; T. Tokura; H. Ushio; M. Iwatsu; A. Murakami. Distinct functions between toll-like receptors 3 and 9 in retinal pigment epithelial cells. *Ophthalmic research*, 39(3):155–163, 2007.
- [52] M. V. Kumar; C. N. Nagineni; M. S. Chin; J. J. Hooks; B. Detrick. Innate immunity in the retina: Toll-like receptor (tlr) signaling in human retinal pigment epithelial cells. *Journal of neuroimmunology*, 153(1-2):7–15, 2004.
- [53] J. J. Hooks; C. N. Nagineni; L. C. Hooper; K. Hayashi; B. Detrick. Ifn-beta provides immuno-protection in the retina by inhibiting icam-1 and cxcl9 in retinal pigment epithelial cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 180(6):3789–3796, 2008.

- [54] L. Feng; M. Ju; K. Y. Lee; A. Mackey; M. Evangelista; D. Iwata; P. Adamson; K. Lashkari; R. Foxton; D. Shima; Y. S. Ng. A proinflammatory function of toll-like receptor 2 in the retinal pigment epithelium as a novel target for reducing choroidal neovascularization in age-related macular degeneration. *The American journal of pathology*, 187(10):2208–2221, 2017.
- [55] L. Oliveira-Nascimento; P. Massari; L. M. Wetzler. The role of tlr2 in infection and immunity. *Frontiers in immunology*, 3:79, 2012.
- [56] E. A. Carswell; L. J. Old; R. L. Kassel; S. Green; N. Fiore; B. Williamson. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(9):3666–3670, 1975.
- [57] H. Zelová; J. Hoše. Tnf-alpha signalling and inflammation: interactions between old acquaintances. *Inflammation Research*, 62(7):641–651, 2013.
- [58] Z. I. Johnson; Z.R. Schoepflin; H. Choi; I. M. Shapiro; M. V. Risbud. Disc in flames: Roles of tnf-alpha and il-1beta in intervertebral disc degeneration. *European Cells & Materials*, 30:104–16; discussion 116–7, 2015.
- [59] W. L. Wong; X. Su; X. Li; C. M. G. Cheung; R. Klein; C. Y. Cheng; T. Y. Wong. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Global Health*, 2(2):e106–e116, 2014.
- [60] U. Schmidt-Erfurth; V. Chong; A. Loewenstein; M. Larsen; E. Souied; R. Schlingemann; B. Eldem; J. Monés; G. Richard; F. Bandello. Guidelines for the management of neovascular age-related macular degeneration by the european society of retina specialists (euretina). *British Journal of Ophthalmology*, 98(9):1144–1167, 2014.
- [61] C. Hirneiß; A. Kampik; A. S. Neubauer. Volkswirtschaftliche kosten von augenerkrankungen. *Der Ophthalmologe*, 111(5):420–427, 2014.
- [62] L. S. Lim; P. Mitchell; J. M. Seddon; F. G. Holz; T. Y. Wong. Age-related macular degeneration. *The Lancet*, 379(9827):1728–1738, 2012.
- [63] J. Z. Nowak. Age-related macular degeneration (amd): pathogenesis and therapy. *Pharmacological reports : PR*, 58(3):353–363, 2006.
- [64] W. Mathenge. Age-related macular degeneration. *Community Eye Health*, 27(87):49–50, 2014.
- [65] U. Chakravarthy; T. Y. Wong; A. Fletcher; E. Piault; C. Evans; G. Zlateva; R. Buggage; A. Pleil; P. Mitchell. Clinical risk factors for age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. *BMC Ophthalmology*, 10(1):31, 2010.

- [66] J. W. Miller. Beyond vegf-the weisenfeld lecture. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 57(15):6911–6918, 2016.
- [67] S. Datta; M. Cano; K. Ebrahimi; L. Wang; J. T. Handa. The impact of oxidative stress and inflammation on rpe degeneration in non-neovascular amd. *Progress in retinal and eye research*, 60:201–218, 2017.
- [68] J. R. Sparrow; M. Boulton. Rpe lipofuscin and its role in retinal pathobiology. *Experimental eye research*, 80(5):595–606, 2005.
- [69] N. P. Boyer; D. Higbee; M. B. Currin; L. R. Blakeley; C. Chen; Z. Ablonczy; R. K. Crouch; Y. Koutalos. Lipofuscin and n-retinylidene-n-retinylethanolamine (a2e) accumulate in retinal pigment epithelium in absence of light exposure: their origin is 11-cis-retinal. *The Journal of biological chemistry*, 287(26):22276–22286, 2012.
- [70] J. Blasiak. Senescence in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(5):789–805, 2020.
- [71] M. L. Katz. Potential role of retinal pigment epithelial lipofuscin accumulation in age-related macular degeneration. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 34(3):359–370, 2002.
- [72] A. Alaimo; G. G. Liñares; J. M. Bujamer; R. M. Gorodjod; S. P. Alcon; J. H. Martínez; A. Baldessari; H. E. Grecco; M. L. Kotler. Toxicity of blue led light and a2e is associated to mitochondrial dynamics impairment in arpe-19 cells: implications for age-related macular degeneration. *Archives of Toxicology*, 93(5):1401–1415, 2019.
- [73] J. Liu; Y. Itagaki; S. Ben-Shabat; K. Nakanishi; J. R. Sparrow. The biosynthesis of a2e, a fluorophore of aging retina, involves the formation of the precursor, a2-pe, in the photoreceptor outer segment membrane. *The Journal of biological chemistry*, 275(38):29354–29360, 2000.
- [74] P. V. Algvere; A. Kvanta; S. Seregard. Drusen maculopathy: a risk factor for visual deterioration. *Acta ophthalmologica*, 94(5):427–433, 2016.
- [75] N. M. Bressler; J. C. Silva; S. B. Bressler; S. L. Fine; W. R. Green. Clinicopathologic correlation of drusen and retinal pigment epithelial abnormalities in age-related macular degeneration. *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 14(2):130–142, 1994.
- [76] S. L. Fine; J. W. Berger; M. G. Maguire; A. C. Ho. Age-related macular degeneration. *The New England journal of medicine*, 342(7):483–492, 2000.
- [77] D. H. Anderson; R. F. Mullins; G. S. Hageman; L. V. Johnson. A role for local inflammation in the formation of drusen in the aging eye. *American Journal of Ophthalmology*, 134(3):411–431, 2002.

- [78] A. Das; P.G. McGuire. Retinal and choroidal angiogenesis: pathophysiology and strategies for inhibition. Progress in retinal and eye research, 22(6):721–748, 2003.
- [79] A. Kijlstra; E. La Heij; F. Hendrikse. Immunological factors in the pathogenesis and treatment of age-related macular degeneration. Ocular immunology and inflammation, 13(1):3–11, 2005.
- [80] A. Klettner. Physiological functions of VEGF in the retina and its possible implications prolonged anti-VEGF therapy. 2013.
- [81] P. A. Campochiaro. Ocular neovascularisation and excessive vascular permeability. Expert opinion on biological therapy, 4(9):1395–1402, 2004.
- [82] A. Kauppinen; J. J. Paterno; J. Blasiak; A. Salminen; K. Kaarniranta. Inflammation and its role in age-related macular degeneration. Cellular and Molecular Life Sciences, 73(9):1765–1786, 2016.
- [83] W. Tan; J. Zou; S. Yoshida; B. Jiang; Y. Zhou. The role of inflammation in age-related macular degeneration. International journal of biological sciences, 16(15):2989–3001, 2020.
- [84] B. N. Lambrecht; H. Hammad. The airway epithelium in asthma. Nature medicine, 18(5):684–692, 2012.
- [85] G. Hageman. 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. Progress in retinal and eye research, 20(6):705–732, 2001.
- [86] J. Spindler; S. Zandi; I. B. Pfister; C. Gerhardt; J. G. Garweg. Cytokine profiles in the aqueous humor and serum of patients with dry and treated wet age-related macular degeneration. PLOS ONE, 13(8):e0203337, 2018.
- [87] S. L. Masters; D. de Nardo. Innate immunity. Current opinion in immunology, 26:v–vi, 2014.
- [88] J. S. Roh; D. H. Sohn. Damage-associated molecular patterns in inflammatory diseases. Immune Network, 18(4):e27, 2018.
- [89] H. Kumar; T. Kawai; S. Akira. Pathogen recognition by the innate immune system. International reviews of immunology, 30(1):16–34, 2011.
- [90] G. Lopez-Castejon; D. Brough. Understanding the mechanism of il-1beta secretion. Cytokine & Growth Factor Reviews, 22(4):189–195, 2011.
- [91] Y. Wooff; S. M. Man; R. Aggio-Bruce; R. Natoli; N. Fernando. Il-1 family members mediate cell death, inflammation and angiogenesis in retinal degenerative diseases. Frontiers in Immunology, 10:1618, 2019.

- [92] A. M. Gressner; O. A. Gressner. Tumornekrosefaktor-alpha. In Axel M. Gressner and Torsten Arndt, editors, *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*, Springer Reference Medizin, pages 2380–2382. Springer, Berlin and Heidelberg, 2019.
- [93] M. U. Martin; K. Resch. *Immunologie*, volume 3174 of *utb-studi-e-book*. Ulmer and UTB GmbH, Stuttgart, 1. auflage edition, 2009.
- [94] N. A. Thornberry; H. G. Bull; J. R. Calaycay; K. T. Chapman; A. D. Howard; M. J. Kostura; D. K. Miller; S. M. Molineaux; J. R. Weidner; J. Aunins. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature*, 356(6372):768–774, 1992.
- [95] C. M. Eandi; H. Charles Messance; S. Augustin; E. Dominguez; S. Lavalette; V. Forster; S. J. Hu; L. Siquieros; C. M. Craft; J. A. Sahel; R. Tadayoni; M. Paques; X. Guillonneau; F. Sennlaub. Subretinal mononuclear phagocytes induce cone segment loss via il-1beta. *eLife*, 5, 2016.
- [96] R. Natoli; N. Fernando; M. Madigan; J. A. Chu-Tan; K. Valter; J. Provis; M. Rutar. Microglia-derived il-1beta promotes chemokine expression by müller cells and rpe in focal retinal degeneration. *Molecular neurodegeneration*, 12(1):31, 2017.
- [97] C. A. Dinarello; N. Savage. Interleukin-1 and its receptor. *Critical reviews in immunology*, 9(1):1–20, 1989.
- [98] B. Conti; I. Tabarean; C. Andrei; T. Bartfai. Cytokines and fever. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 9:1433–1449, 2004.
- [99] L. Sun; X. Zhang; S. Wu; Y. Liu; C. F. Guerrero-Juarez; W. Liu; J. Huang; Q. Yao; M. Yin; J. Li; R. Ramos; Y. Liao; R. Wu; T. Xia; X. Zhang; Y. Yang; F. Li; S. Heng; W. Zhang; M. Yang; C. M. Tzeng; C. Ji; M. V. Plikus; R. L. Gallo; L. J. Zhang. Dynamic interplay between il-1 and wnt pathways in regulating dermal adipocyte lineage cells during skin development and wound regeneration. *Cell reports*, 42(6):112647, 2023.
- [100] H. Jiao; R. Natoli; K. Valter; J. M. Provis; M. Rutar. Spatiotemporal cadence of macrophage polarisation in a model of light-induced retinal degeneration. *PLOS ONE*, 10(12):e0143952, 2015.
- [101] T. Tanaka; M. Narazaki; T. Kishimoto. Il-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(10):a016295, 2014.
- [102] A. M. Gressner; T. Arndt, editor. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Springer Reference Medizin. Springer, Berlin and Heidelberg, 2019.
- [103] H. Kojima; T. Inoue; H. Kunimoto; K. Nakajima. Il-6-stat3 signaling and premature senescence. *JAK-STAT*, 2(4):e25763, 2013.

- [104] K. Izumi-Nagai; N. Nagai; Y. Ozawa; M. Mihara; Y. Ohsugi; T. Kurihara; T. Koto; S. Sato-fuka; M. Inoue; K. Tsubota; H. Okano; Y. Oike; S. Ishida. Interleukin-6 receptor-mediated activation of signal transducer and activator of transcription-3 (stat3) promotes choroidal neovascularization. *The American journal of pathology*, 170(6):2149–2158, 2007.
- [105] T. Ishibashi; H. Kimura; Y. Shikama; T. Uchida; S. Kariyone; T. Hirano; T. Kishimoto; F. Takatsuki; Y. Akiyama. Interleukin-6 is a potent thrombopoietic factor in vivo in mice. *Blood*, 74(4):1241–1244, 1989.
- [106] M. J. Waldner; S. Wirtz; A. Jefremow; M. Warntjen; C. Neufert; R. Atreya; C. Becker; B. Weigmann; M. Vieth; S. Rose-John; M. F. Neurath. Vegf receptor signaling links inflammation and tumorigenesis in colitis-associated cancer. *The Journal of Experimental Medicine*, 207(13):2855–2868, 2010.
- [107] S. Droho; C. M. Cuda; H. Perlman; J. A. Lavine. Macrophage-derived interleukin-6 is necessary and sufficient for choroidal angiogenesis. *Scientific Reports*, 11(1):18084, 2021.
- [108] A. Kanda; G. Abecasis; A. Swaroop. Inflammation in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *British Journal of Ophthalmology*, 92(4):448–450, 2008.
- [109] M. Baggioolini; B. Dewald; B. Moser. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines–cxc and cc chemokines. *Advances in immunology*, 55:97–179, 1994.
- [110] K. Xie. Interleukin-8 and human cancer biology. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 12(4):375–391, 2001.
- [111] H. Petering; O. Götze; D. Kimmig; R. Smolarski; A. Kapp; J. Elsner. The biologic role of interleukin-8: Functional analysis and expression of cxcr1 and cxcr2 on human eosinophils. *Blood*, 93(2):694–702, 1999.
- [112] P. M. Murphy; H. L. Tiffany. Cloning of complementary dna encoding a functional human interleukin-8 receptor. *Science (New York, N.Y.)*, 253(5025):1280–1283, 1991.
- [113] W. E. Holmes; J. Lee; W. J. Kuang; G. C. Rice; W. I. Wood. Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. *Science (New York, N.Y.)*, 253(5025):1278–1280, 1991.
- [114] Bristol myers acquire cormorant for anti-il-8 cancer drug | cancer biology, 04.11.2022.
- [115] Y. Y. Tsai; J. M. Lin; L. Wan; H. J. Lin; Y. Tsai; C. C. Lee; C. H. Tsai; F. J. Tsai; S. H. Tseng. Interleukin gene polymorphisms in age-related macular degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science*, 49(2):693–698, 2008.
- [116] K. Murphy; C. Weaver. *Janeway Immunologie*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 9. aufl. 2018 edition, 2018.

- [117] M. M. Rahman; G. McFadden. Modulation of tumor necrosis factor by microbial pathogens. *PLOS Pathogens*, 2(2):e4, 2006.
- [118] H. T. Idriss; J. H. Naismith. Tnf? and the tnf receptor superfamily: Structure-function relationship(s). *Microscopy research and technique*, 50(3):184–195, 2000.
- [119] C. A. Dinarello. The biological properties of interleukin-1. *European cytokine network*, 5(6):517–531, 1994.
- [120] T. Horiuchi; H. Mitoma; S. Harashima; H. Tsukamoto; T. Shimoda. Transmembrane tnf-alpha: structure, function and interaction with anti-tnf agents. *Rheumatology (Oxford, England)*, 49(7):1215–1228, 2010.
- [121] J. Huyghe; D. Priem; M. J. M. Bertrand. Cell death checkpoints in the tnf pathway. *Trends in immunology*, 44(8):628–643, 2023.
- [122] O. Micheau; J. Tschopp. Induction of tnf receptor i-mediated apoptosis via two sequential signalling complexes. *Cell*, 114(2):181–190, 2003.
- [123] B. B. Aggarwal. Signalling pathways of the tnf superfamily: a double-edged sword. *Nature Reviews Immunology*, 3(9):745–756, 2003.
- [124] S. Mocellin; C. R. Rossi; P. Pilati; D. Nitti. Tumor necrosis factor, cancer and anticancer therapy. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 16(1):35–53, 2005.
- [125] N. Parameswaran; S. Patial. Tumor necrosis factor-alpha signaling in macrophages. *Critical reviews in eukaryotic gene expression*, 20(2):87–103, 2010.
- [126] K. S. Mark; W. J. Trickler; D. W. Miller. Tumor necrosis factor-alpha induces cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin release in brain microvessel endothelial cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 297(3):1051–1058, 2001.
- [127] E. Giraudo; L. Primo; E. Audero; H. P. Gerber; P. Koolwijk; S. Soker; M. Klagsbrun; N. Ferrara; F. Bussolino. Tumor necrosis factor-alpha regulates expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 and of its co-receptor neuropilin-1 in human vascular endothelial cells. *The Journal of biological chemistry*, 273(34):22128–22135, 1998.
- [128] H. Wang; X. Han; E. S. Wittchen; M. E. Hartnett. Tnf-alpha mediates choroidal neovascularization by upregulating vegf expression in rpe through ros-dependent beta-catenin activation. *Molecular Vision*, 22:116–128, 2016.
- [129] Y. Wang; J. Xu; X. Zhang; C. Wang; Y. Huang; K. Dai; X. Zhang. Tnf-alpha-induced lrg1 promotes angiogenesis and mesenchymal stem cell migration in the subchondral bone during osteoarthritis. *Cell Death & Disease*, 8(3):e2715, 2017.

- [130] S. G. Robbins; R. N. Mixon; D. J. Wilson; C. E. Hart; J. E. Robertson; I. Westra; S. R. Planck; J. T. Rosenbaum. Platelet-derived growth factor ligands and receptors immuno-localized in proliferative retinal diseases. *Investigative ophthalmology & visual science*, 35(10):3649–3663, 1994.
- [131] C. Zehetner; R. Kirchmair; S. B. Neururer; M. T. Kralinger; N. E. Bechrakis; G. F. Kieselbach. Systemic upregulation of pdgf-b in patients with neovascular amd. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 55(1):337–344, 2014.
- [132] N. A. Turner; R. S. Mughal; P. Warburton; D. J. O'Regan; S. G. Ball; K. E. Porter. Mechanism of tnfalpha-induced il-1alpha, il-1beta and il-6 expression in human cardiac fibroblasts: effects of statins and thiazolidinediones. *Cardiovascular research*, 76(1):81–90, 2007.
- [133] S. J. Smart; T. B. Casale. Tnf-alpha-induced transendothelial neutrophil migration is il-8 dependent. *The American journal of physiology*, 266(3 Pt 1):L238–45, 1994.
- [134] F. G. Holz; E. C. Strauss; S. Schmitz-Valckenberg; M. van Lookeren Campagne. Geographic atrophy: clinical features and potential therapeutic approaches. *Ophthalmology*, 121(5):1079–1091, 2014.
- [135] C. Cukras; S. L. Fine. Thermal laser treatment in amd: therapeutic and prophylactic. *International Ophthalmology Clinics*, 47(1):75–93, 2007.
- [136] D. M. Brown; M. Michels; P. K. Kaiser; J. S. Heier; J. P. Sy; T. Ianchulev. Ranibizumab versus verteporfin photodynamic therapy for neovascular age-related macular degeneration: Two-year results of the anchor study. *Ophthalmology*, 116(1):57–65.e5, 2009.
- [137] M. Kliffen; H. S. Sharma; C. M. Mooy; S. Kerkvliet; P. T. de Jong. Increased expression of angiogenic growth factors in age-related maculopathy. *The British journal of ophthalmology*, 81(2):154–162, 1997.
- [138] A. Klettner; J. Roider. Mechanisms of pathological vegf production in the retina and modification with vegf-antagonists. In *Studies on Retinal and Choroidal Disorders*, pages 277–305. Humana Press, 2012.
- [139] M. Hollaus; W. Bühl; U. Schmidt-Erfurth; S. Sacu. Herausforderungen bei der behandlung der neovaskulären altersbedingten makuladegeneration. *Klinische Monatsblatter fur Augenheilkunde*, 239(8):1033–1042, 2022.
- [140] J. Liu; S. Luthuli; Y. Yang; Y. Cheng; Y. Zhang; M. Wu; J. I. Choi; H. Tong. Therapeutic and nutraceutical potentials of a brown seaweed sargassum fusiforme. *Food Science & Nutrition*, 8(10):5195–5205, 2020.
- [141] E. Shannon; N. Abu-Ghannam. Seaweeds as nutraceuticals for health and nutrition. *Phycologia*, 58(5):563–577, 2019.

- [142] J. M. Cock; A. F. Peters; S. M. Coelho. Brown algae. *Current biology : CB*, 21(15):R573–5, 2011.
- [143] P. Ruperez. Mineral content of edible marine seaweeds. *Food Chemistry*, 79(1):23–26, 2002.
- [144] T. Bito; E. Okumura; M. Fujishima; F. Watanabe. Potential of chlorella as a dietary supplement to promote human health. *Nutrients*, 12(9), 2020.
- [145] C. J. Diaz; K. J. Douglas; K. Kang; A. L. Kolarik; R. Malinovski; Y. Torres-Tiji; J. V. Molino; A. Badary; S. P. Mayfield. Developing algae as a sustainable food source. *Frontiers in Nutrition*, 9:1029841, 2022.
- [146] P. H. Raven; H. Curtis; R. F. Evert. *Biologie der Pflanzen*. De Gruyter, Berlin and Boston, reprint 2019 edition, 2020.
- [147] H. Kylin. Zur biochemie der meeressalgen. *Hoppe-Seylers Zeitschrift für physiologische Chemie*, 83(3):171–197, 1913.
- [148] B. Li; F. Lu; X. Wei; R. Zhao. Fucoidan: structure and bioactivity. *Molecules*, 13(8):1671–1695, 2008.
- [149] H. R. Fletcher; P. Biller; A. B. Ross; J. M. M. Adams. The seasonal variation of fucoidan within three species of brown macroalgae. *Algal Research*, 22:79–86, 2017.
- [150] Y. Yuan; D. Macquarrie. Microwave assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoidan) from *ascophyllum nodosum* and its antioxidant activity. *Carbohydrate polymers*, 129:101–107, 2015.
- [151] T. U. Jayawardena; D. P. Nagahawatta; I. P. S. Fernando; Y. T. Kim; J. S. Kim; W. S. Kim; J. S. Lee; Y. J. Jeon. A review on fucoidan structure, extraction techniques, and its role as an immunomodulatory agent. *Marine drugs*, 20(12), 2022.
- [152] A. V. Skriptsova. Fucoidans of brown algae: Biosynthesis, localization, and physiological role in thallus. *Russian Journal of Marine Biology*, 41(3):145–156, 2015.
- [153] M. Ale; J. Mikkelsen; A. S. Meyer. Important determinants for fucoidan bioactivity: a critical review of structure-function relations and extraction methods for fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds. *Marine drugs*, 9(10):2106–2130, 2011.
- [154] A. Kasai; S. Arafuka; N. Koshiba; D. Takahashi; K. Toshima. Systematic synthesis of low-molecular weight fucoidan derivatives and their effect on cancer cells. *Organic & biomolecular chemistry*, 13(42):10556–10568, 2015.
- [155] T. Nagamine; K. Hayakawa; T. Kusakabe; H. Takada; K. Nakazato; E. Hisanaga; M. Iha. Inhibitory effect of fucoidan on huh7 hepatoma cells through downregulation of cxcl12. *Nutrition and Cancer*, 61(3):340–347, 2009.

- [156] Z. Zhang; K. Teruya; H. Eto; S. Shirahata. Induction of apoptosis by low-molecular-weight fucoidan through calcium- and caspase-dependent mitochondrial pathways in mda-mb-231 breast cancer cells. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 77(2):235–242, 2013.
- [157] W. Wang; J. Wu; X. Zhang; C. Hao; X. Zhao; G. Jiao; X. Shan; W. Tai; G. Yu. Inhibition of influenza a virus infection by fucoidan targeting viral neuraminidase and cellular egfr pathway. *Scientific Reports*, 7:40760, 2017.
- [158] H. Li; J. Li; Y. Tang; L. Lin; Z. Xie; J. Zhou; L. Zhang; X. Zhang; X. Zhao; Z. Chen; D. Zuo. Fucoidan from fucus vesiculosus suppresses hepatitis b virus replication by enhancing extracellular signal-regulated kinase activation. *Virology journal*, 14(1):178, 2017.
- [159] E. Apostolova; P. Lukova; A. Baldzhieva; P. Katsarov; M. Nikolov; I. Iliev; Ilia; L. Peychev; B. Trica; F. Oancea; C. Delattre; V. Kokova. Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of fucoidan: A review. *Polymers*, 12(10), 2020.
- [160] K.G.M.M. Alberti; P. Z. Zimmet. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. provisional report of a who consultation. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*, 15(7):539–553, 1998.
- [161] X. Shan; X. Liu; J. Hao; C. Cai; F. Fan; Y. Dun; X. Zhao; X. Liu; C. Li; G. Yu. In vitro and in vivo hypoglycemic effects of brown algal fucoidans. *International Journal of Biological Macromolecules*, 82:249–255, 2016.
- [162] Y. T. Jeong; Y. D. Kim; Y. M. Jung; D. C. Park; D. S. Lee; S. K. Ku; X. Li; Y. Lu; G. H. Chao; K. J. Kim; J. Y. Lee; M. C. Baek; W. Kang; S. L. Hwang; H. W. Chang. Low molecular weight fucoidan improves endoplasmic reticulum stress-reduced insulin sensitivity through amp-activated protein kinase activation in l6 myotubes and restores lipid homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Molecular pharmacology*, 84(1):147–157, 2013.
- [163] J. A. Parnell; R. A. Reimer. Prebiotic fiber modulation of the gut microbiota improves risk factors for obesity and the metabolic syndrome. *Gut microbes*, 3(1):29–34, 2012.
- [164] H. E. Lebovitz. Alpha-glucosidase inhibitors. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 26(3):539–551, 1997.
- [165] F. Alam; A. Islam; I. Khalil; S. H. Gan. Metabolic control of type 2 diabetes by targeting the glut4 glucose transporter: Intervention approaches. *Current pharmaceutical design*, 22(20):3034–3049, 2016.
- [166] S. Matou; D. Helley; D. Chabut; A. Bros; A. M. Fischer. Effect of fucoidan on fibroblast growth factor-2-induced angiogenesis in vitro. *Thrombosis research*, 106(4-5):213–221, 2002.

- [167] C. E. Luyt; A. Meddahi-Pellé; B. Ho-Tin-Noe; S. Collicec-Jouault; J. Guezennec; L. Louedec; H. Prats; M. P. Jacob; M. Osborne-Pellegrin; D. Letourneur; J. B. Michel. Low-molecular-weight fucoidan promotes therapeutic revascularization in a rat model of critical hindlimb ischemia. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 305(1):24–30, 2003.
- [168] F. Liu; J. Wang; A. K. Chang; B. Liu; L. Yang; Q. Li; P. Wang; X. Zou. Fucoidan extract derived from undaria pinnatifida inhibits angiogenesis by human umbilical vein endothelial cells. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 19(8-9):797–803, 2012.
- [169] L. Wang; R. Cui; K. Wang; X. Fu; J. Xu; X. Gao; Y. J. Jeon. Anti-inflammatory effect of fucoidan isolated from fermented sargassum fusiforme in in vitro and in vivo models. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022.
- [170] H. Y. Park; M. H. Han; C. Park; C. Y. Jin; G. Y. Kim; I. W. Choi; N. D. Kim; T. J. Nam; T. K. Kwon; Y. H. Choi. Anti-inflammatory effects of fucoidan through inhibition of nf-kb, mapk and akt activation in lipopolysaccharide-induced bv2 microglia cells. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 49(8):1745–1752, 2011.
- [171] J. W. Yang; S. Y. Yoon; S. J. Oh; S. K. Kim; K. W. Kang. Bifunctional effects of fucoidan on the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biochemical and biophysical research communications*, 346(1):345–350, 2006.
- [172] F. Liu; G. Luo; Q. Xiao; L. Chen; X. Luo; J. Lv; L. Chen. Fucoidan inhibits angiogenesis induced by multiple myeloma cells. *Oncology reports*, 36(4):1963–1972, 2016.
- [173] X. Chen; L. Sun; X. Wei; H. Lu; Y. Tan; Z. Sun; J. Jiang. Antitumor effect and molecular mechanism of fucoidan in nsclc. *BMC complementary medicine and therapies*, 21(1):25, 2021.
- [174] C. Oliveira; S. Granja; N. M. Neves; R. L. Reis; F. Baltazar; T. H. Silva; A. Martins. Fucoidan from fucus vesiculosus inhibits new blood vessel formation and breast tumor growth in vivo. *Carbohydrate polymers*, 223:115034, 2019.
- [175] M. Dithmer; S. Fuchs; Y. Shi; H. Schmidt; E. Richert; J. Roider; A. Klettner. Fucoidan reduces secretion and expression of vascular endothelial growth factor in the retinal pigment epithelium and reduces angiogenesis in vitro. *PLOS ONE*, 9(2):e89150, 2014.
- [176] S. Koyanagi; N. Tanigawa; H. Nakagawa; S. Soeda; H. Shimeno. Oversulfation of fucoidan enhances its anti-angiogenic and antitumor activities. *Biochemical pharmacology*, 65(2):173–179, 2003.

- [177] M. M. Atef; N. M. Shafik; Y. M. Hafez; M. M. Watany; A. Selim; H. M. Shafik; O. Safwat El-Deeb. The evolving role of long noncoding rna hif1a-as2 in diabetic retinopathy: a cross-link axis between hypoxia, oxidative stress and angiogenesis via mapk/vegf-dependent pathway. *Redox Report : Communications in Free Radical Research*, 27(1):70–78, 2022.
- [178] A. Klettner. Fucoidan as a potential therapeutic for major blinding diseases—a hypothesis. *Marine drugs*, 14(2), 2016.
- [179] M. C. Chen; W. L. Hsu; P. A. Hwang; T. C. Chou. Low molecular weight fucoidan inhibits tumor angiogenesis through downregulation of hif-1/vegf signaling under hypoxia. *Marine drugs*, 13(7):4436–4451, 2015.
- [180] W. Yang; X. Yu; Q. Zhang; Q. Lu; J. Wang; W. Cui; Z. Zheng; X. Wang; D. Luo. Attenuation of streptozotocin-induced diabetic retinopathy with low molecular weight fucoidan via inhibition of vascular endothelial growth factor. *Experimental eye research*, 115:96–105, 2013.
- [181] M. Dithmer; A. M. Kirsch; E. Richert; S. Fuchs; F. Wang; H. Schmidt; S. E. Coupland; J. Roider; A. Klettner. Fucoidan does not exert anti-tumorigenic effects on uveal melanoma cell lines. *Marine drugs*, 15(7), 2017.
- [182] J Wang; Q. Zhang; Z. Zhang; Z. Li. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from laminaria japonica. *International Journal of Biological Macromolecules*, 42(2):127–132, 2008.
- [183] R. Abu; Z. Jiang; M. Ueno; T. Okimura; K. Yamaguchi; T. Oda. In vitro antioxidant activities of sulfated polysaccharide ascophyllan isolated from ascophyllum nodosum. *International Journal of Biological Macromolecules*, 59:305–312, 2013.
- [184] T. Marudhupandi; T. T. Kumar; S. L. Senthil; K. N. Devi. In vitro antioxidant properties of fucoidan fractions from sargassum tenerrimum. *Pakistan journal of biological sciences : PJBS*, 17(3):402–407, 2014.
- [185] A. Klettner; J. Roider. Constitutive and oxidative-stress-induced expression of vegf in the rpe are differently regulated by different mitogen-activated protein kinases. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie*, 247(11):1487–1492, 2009.
- [186] X. Li; H. Zhao; Q. Wang; H. Liang; X. Jiang. Fucoidan protects arpe-19 cells from oxidative stress via normalization of reactive oxygen species generation through the Ca^{2+} -dependent erk signaling pathway. *Molecular medicine reports*, 11(5):3746–3752, 2015.
- [187] M. Dittmar P. Dörschmann. *Charakterisierung von fucoidanhaltigen Braunalgenextrakten hinsichtlich ihrer Wirkung auf okuläre Zellen des Augenhintergrunds*. Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, 2022.

- [188] P. Dörschmann; A. Klettner. Fucoidans as potential therapeutics for age-related macular degeneration-current evidence from in vitro research. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), 2020.
- [189] P. Dörschmann; S. Apitz; I. Hellige; S. Neupane; S. Alban; G. Kopplin; S. Ptak; X. Fretté; J. Roider; M. Zille; A. Klettner. Evaluation of the effects of fucoidans from fucus species and laminaria hyperborea against oxidative stress and iron-dependent cell death. *Marine drugs*, 19(10):557, 2021.
- [190] P. Dörschmann; G. Kopplin; J. Roider; A. Klettner. Effects of sulfated fucans from laminaria hyperborea regarding vegf secretion, cell viability, and oxidative stress and correlation with molecular weight. *Marine drugs*, 17(10), 2019.
- [191] ; A. B. Rasin; H. T. T. Cao; T. T. T. Van; A. S. Meyer T. T. Nguyen; M. D. Mikkelsen; V. H. N. Tra; V. T. D. Trang; N. Rhein-Knudsen; J. Holck. Enzyme-assisted fucoidan extraction from brown macroalgae fucus distichus subsp. evanescens and saccharina latissima. *Marine drugs*, 18(6), 2020.
- [192] P. Dörschmann; T. Thalenhorst; C. Seeba; M. T. Tischhäuser; S. Neupane; J. Roider; S. Alban; A. Klettner. Comparison of fucoidans from saccharina latissima regarding age-related macular degeneration relevant pathomechanisms in retinal pigment epithelium. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(9), 2023.
- [193] A. K. Wiencke; J. F. Kiilgaard; J. Nicolini; M. Bundgaard; C. Röpke; M. La Cour. Growth of cultured porcine retinal pigment epithelial cells. *Acta Ophthalmologica Scandinavica*, 81(2):170–176, 2003.
- [194] Epithelial volt/ohm meter, 02.04.2021.
- [195] E. Engvall; P. Perlmann. Enzyme-linked immunosorbent assay (elisa) quantitative assay of immunoglobulin g. *Immunochemistry*, 8(9):871–874, 1971.
- [196] DuoSet elisa development systems assay principle, 02.04.2021.
- [197] Tocris Bioscience. Porcine il-6 duoSet elisa, 02.04.2021.
- [198] Tocris Bioscience. Porcine il-8/cxcl8 duoSet elisa, 02.04.2021.
- [199] T. Mosmann. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2):55–63, 1983.
- [200] J. van Meerloo; G. J. L. Kaspers; J. Cloos. Cell sensitivity assays: The mtt assay. In Ian A. Cree, editor, *Cancer Cell Culture*, SpringerLink Bücher, pages 237–245. Springer Science+Business Media LLC, Totowa, NJ, 2011.

- [201] K. Bittkau; P. Dörschmann; M. Blümel; D. Tasdemir; J. Roider; A. Klettner; S. Alban. Comparison of the effects of fucoidans on the cell viability of tumor and non-tumor cell lines. *Marine drugs*, 17(8), 2019.
- [202] M. Saeed; M. A. Arain; S. Ali Fazlani; I. B. Marghazani; M. Umar; J. Soomro; Z. A. Bhutto; F. Soomro; A. E. Noreldin; M. E. Abd ElHack; S. S. Elnesr; M. R. Farag; K. Dhama; S. Chao; M. Alagawany. A comprehensive review on the health benefits and nutritional significance of fucoidan polysaccharide derived from brown seaweeds in human, animals and aquatic organisms. *Aquaculture Nutrition*, 27(3):633–654, 2021.
- [203] S. Schnichels; F. Paquet-Durand; M. Löscher; T. Tsai; J. Hurst; S. C. Joachim; A. Klettner. Retina in a dish: Cell cultures, retinal explants and animal models for common diseases of the retina. *Progress in retinal and eye research*, 81:100880, 2021.
- [204] J. C. Zech; I. Povreau; A. Cotinet; O. Goureau; B. Le Varlet; Y. de Kozak. Effect of cytokines and nitric oxide on tight junctions in cultured rat retinal pigment epithelium. *Investigative ophthalmology & visual science*, 39(9):1600–1608, 1998.
- [205] C. Zihni; C. Mills; K. Matter; M. S. Balda. Tight junctions: from simple barriers to multi-functional molecular gates. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 17(9):564–580, 2016.
- [206] L. Dietrich; R. Lucius; J. Roider; A. Klettner. Interaction of inflammatorily activated retinal pigment epithelium with retinal microglia and neuronal cells. *Experimental eye research*, 199:108167, 2020.
- [207] H. B. Juel; C. Faber; S. G. Svendsen; A. N. Vallejo; M. H. Nissen. Inflammatory cytokines protect retinal pigment epithelial cells from oxidative stress-induced death. *PLOS ONE*, 8(5):e64619, 2013.
- [208] M. V. Mateos; C. B. Kamerbeek; N. M. Giusto; G. A. Salvador. The phospholipase d pathway mediates the inflammatory response of the retinal pigment epithelium. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 55:119–128, 2014.
- [209] P. Dörschmann; G. Kopplin; J. Roider; A. Klettner. Interaction of high-molecular weight fucoidan from laminaria hyperborea with natural functions of the retinal pigment epithelium. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 2023.
- [210] J. Jang; S. Moon; H. Joo. Differential effects of fucoidans with low and high molecular weight on the viability and function of spleen cells. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 68:234–238, 2014.
- [211] F. Ricci; G. Staurenghi; T. Lepre; F. Missiroli; S. Zampatti; R. Cascella; P. Borgiani; L. T. Marsella; C. M. Eandi; A. Cusumano; G. Novelli; E. Giardina. Haplotypes in il-8 gene are associated to age-related macular degeneration: A case-control study. *PLOS ONE*, 8(6):e66978, 2013.

- [212] J. E. Knickelbein; C. C. Chan; H. N. Sen; F. L. Ferris; R. B. Nussenblatt. Inflammatory mechanisms of age-related macular degeneration. *International Ophthalmology Clinics*, 55(3):63–78, 2015.
- [213] S. Datta; M. Cano; K. Ebrahimi; L. Wang; J. T. Handa. The impact of oxidative stress and inflammation on rpe degeneration in non-neovascular amd. *Progress in retinal and eye research*, 60:201–218, 2017.
- [214] K. Mai; J. J. Chui; N. Di Girolamo; P. J. McCluskey; D. Wakefield. Role of toll-like receptors in human iris pigment epithelial cells and their response to pathogen-associated molecular patterns. *Journal of inflammation (London, England)*, 11:20, 2014.
- [215] T. Ahmad; M. S. Eapen; M. Ishaq; A. H. Park; S. S. Karpiniec; D. N. Stringer; S. S. Sohal; J. H. Fitton; N. Guven; V. Caruso; R. Eri. Anti-inflammatory activity of fucoidan extracts in vitro. *Marine drugs*, 19(12), 2021.
- [216] J. W. Jeong; S. J. Hwang; M. H. Han; D. S. Lee; J. S. Yoo; I. W. Choi; H. J. Cha; S. Kim; H. S. Kim; G. Y. Kim; Y. J. Jeon; H. J. Lee; H. Park; Y. H. Yoo; Y. H. Choi. Fucoidan inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in raw 264.7 macrophages and zebrafish larvae. *Molecular & Cellular Toxicology*, 13(4):405–417, 2017.
- [217] T. Liu; L. Zhang; D. Joo; S. Sun. Nf-kb signaling in inflammation. *Signal transduction and targeted therapy*, 2:17023–, 2017.
- [218] S. C. Sun; J. H. Chang; J. Jin. Regulation of nuclear factor-kb in autoimmunity. *Trends in immunology*, 34(6):282–289, 2013.
- [219] S. Ghosh; M. Karin. Missing pieces in the nf-kappab puzzle. *Cell*, 109 Suppl:S81–96, 2002.
- [220] L. Ni; L. Wang; X. Fu; D. Duan; Y. J. Jeon; J. Xu; X. Gao. In vitro and in vivo anti-inflammatory activities of a fucose-rich fucoidan isolated from *saccharina japonica*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 156:717–729, 2020.
- [221] J. Ye; D. Chen; Z. Ye; Y. Huang; N. Zhang; E. M. K. Lui; C. Xue; M. Xiao. Fucoidan isolated from *saccharina japonica* inhibits lps-induced inflammation in macrophages via blocking nf-kb, mapk and jak-stat pathways. *Marine drugs*, 18(6), 2020.
- [222] I. D. Makarenkova; D. Y. Logunov; A. I. Tukhvatalin; I. B. Semenova; N. N. Besednova; T. N. Zvyagintseva. Interactions between sulfated polysaccharides from sea brown algae and toll-like receptors on hek293 eukaryotic cells in vitro. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 154(2):241–244, 2012.
- [223] P. Dörschmann; C. Seeba; T. Thalenhorst; J. Roider; A. Klettner. Anti-inflammatory properties of antiangiogenic fucoidan in retinal pigment epithelium cells. *Heliyon*, 9(4):e15202, 2023.

- [224] M. Dutot; S. Grassin-Delyle; H. Salvator; M. Brollo; P. Rat; R. Fagon; E. Naline; P. Devillier. A marine-sourced fucoidan solution inhibits toll-like-receptor-3-induced cytokine release by human bronchial epithelial cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 130:429–436, 2019.

10 Anhänge

10.1 Grafiken und Tabellen

Tabelle 10: Barriere von F2 und Entzündungsmediatoren in $\Omega * \text{cm}^2$

	K	F2	LPS	F2 + LPS	Poly-I:C	F2 + Poly I:C	TNF- α	F2 + TNF- α	Pam	F2 + Pam
Tag 0	199	253	204	258	199	216	202	241	163	182
Tag 1	198	226	232	178	200	231	159	183	125	129
Tag 3	170	189	199	169	181	247	116	135	132	133
Tag 7	210	160	105	76	157	113	54	65	96	64
Tag 14	169	143	109	74	164	141	64	64	76	79
Tag 21	186	183	101	87	114	110	50	57	76	85
Tag 28	137	149	113	87	102	118	70	75	72	64

Alle Angaben in $\Omega * \text{cm}^2$

K = Kontrolle, LPS = Lipopolysaccharid, Poly I:C = Polyinosinsäure:Polycytidylsäure, TNF- α = Tumornekrosefaktor- α , Pam = Pam2CysSerLys4

Tabelle 11: Barriere von E112, E126, E127 und Entzündungsmediatoren in $\Omega * \text{cm}^2$

	K	E112	E126	E127	Poly-I:C	E127 + Poly I:C	TNF- α	E112 + TNF- α	E126 + TNF- α	E127 + TNF- α
Tag 0	199	231	238	199	199	200	202	272	251	264
Tag 1	198	174	183	159	200	176	159	172	168	167
Tag 3	170	183	193	153	181	188	116	160	132	109

Alle Angaben in $\Omega * \text{cm}^2$

K = Kontrolle, Poly I:C = Polyinosinsäure:Polycytidylsäure, TNF- α = Tumornekrosefaktor- α

11 Danksagung

Im Folgenden möchte ich den Personen danken, die mich bei der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt haben:

Herrn **Prof. Dr. Johann Roider** danke ich für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und die Möglichkeit, diese Promotion in seiner Klinik durchzuführen. Ganz herzlich möchte ich mich bei meiner Doktormutter **Prof. Dr. Alexa Klettner** für ihre fachliche Expertise und die wissenschaftliche Betreuung während der Schreibphase bedanken. Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer **Dr. Philipp Dörschmann**, der mir im Labor immer zur Seite stand und jederzeit ein offenes Ohr für Fragen und Probleme hatte. Dem Laborteam **Jana Heumann** und **Marina Kovaleva** danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei den Experimenten. Herzlichen Dank an meine **Familie und Freunde**, die mich immer wieder aufs Neue unterstützt und motiviert haben.

12 Erklärung zum selbstständigen Verfassen der Arbeit

Hiermit erkläre ich, Tabea Sophie Thalenhorst, geboren am 01.06.1999 in Bünde, dass ich die vorliegende Arbeit, abgesehen von der Beratung durch meine Betreuerin, eigenständig und ohne fremde Hilfe verfasst und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen verwendet habe. Insbesondere versichere ich, dass ich alle wörtlichen und sinngemäßen Übernahmen aus anderen Werken als solche kenntlich gemacht habe. Zudem erkläre ich, dass meine Arbeit bisher an keiner anderen Hochschule im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt worden ist.

Kirchlengern, 10.06.2024

13 Veröffentlichungen

13.1 Kongressbeiträge

Thalenhorst T., Dörschmann P., Kopplin G., Alban S., Roider J., Klettner A., Wirkung von Fucoideanen auf die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen im porcinen RPE

Poster-Präsentation auf dem Kongress der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft, Berlin, 29.09.2022

13.2 Publikationen

Lewis L., Dörschmann P., Seeba C., **Thalenhorst T.**, Roider J., Assanga S., Ruiz J., Del Castillo Castro T., Rosas-Burgos E., Plascencia-Jatomea M., Brauer J., Klettner A. (2022) Properties of cephalopod skin ommochromes to inhibit free radicals, and the maillard reaction and retinoprotective mechanisms in cellular models concerning oxidative stress, angiogenesis, and inflammation. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*

<https://doi.org/10.3390/antiox11081574>

Dörschmann P., Seeba C., **Thalenhorst T.**, Roider J., Klettner A. (2023) Anti-inflammatory properties of antiangiogenic fucoidan in retinal pigment epithelium cells. *Heliyon*, 2023.

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e15202>

Dörschmann P., **Thalenhorst T.**, Seeba C., Tischhäuser M., Neupane S., Roider, J. et al. (2023) Comparison of Fucoidans from Saccharina latissima Regarding Age-Related Macular Degeneration Relevant Pathomechanisms in Retinal Pigment Epithelium. *International Journal of Molecular Sciences*.

<https://doi.org/10.3390/ijms24097939>