

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

**Interaktion von TLR-3 stimuliertem retinalen Pigmentepithel  
und retinaler Mikroglia  
vor dem Hintergrund der altersabhängigen Makuladegeneration**

- Inauguraldissertation -  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der medizinischen Fakultät Kiel

Vorgelegt von:

**TIMOTHY HAMANN**

aus Kiel

Kiel, 2016

1. Berichterstatter: Prof.Dr. A. Klettner, Klinik für Ophthalmologie

2. Berichterstatter: Prof.Dr. M. Bleich, Physiologisches Institut

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Oktober 2017

Zum Druck genehmigt, Kiel, den

gez.:

Vorsitzender der Prüfungskommission

## Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis.....	S.1
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>S.3</b>
<b>1.1. Altersabhängige Makuladegeneration.....</b>	<b>S.3</b>
1.1.1. Epidemiologie und gesellschaftliche Bedeutung.....	S.3
1.1.2. Ätiologie, Pathogenese und klinische Klassifikation.....	S.4
1.1.3. Alterung der Retina.....	S.5
1.1.4. Parainflammation, Grenzen der homöostatischen Kapazität.....	S.7
<b>1.2. Mikroglia.....</b>	<b>S.8</b>
<b>1.3. Retinales Pigmentepithel.....</b>	<b>S.10</b>
<b>1.4. Toll-like Rezeptor 3.....</b>	<b>S.12</b>
<b>1.5. Zytokine und Enzyme.....</b>	<b>S.15</b>
<b>1.6. Fragestellung der Arbeit.....</b>	<b>S.17</b>
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>S.17</b>
<b>2.1. Material.....</b>	<b>S.17</b>
2.1.1. Chemikalien und Reagenzien.....	S.17
2.1.2. Enzyme.....	S.18
2.1.3. Primer.....	S.18
2.1.4. Zellkulturmedium.....	S.19
2.1.5. Lösungen.....	S.19
2.1.6. Antikörper.....	S.19
2.1.7. Geräte.....	S.20
2.1.8. Verbrauchsmaterialien.....	S.20
<b>2.2. Methoden.....</b>	<b>S.21</b>
2.2.1. Zellkultur retinaler Mikroglia.....	S.21
2.2.2. Zellkultur retinalen Pigmentepithels.....	S.22
2.2.3. Immunzytochemie.....	S.22
2.2.4. Stimulation des retinalen Pigmentepithels.....	S.23
2.2.5. Stimulation retinaler Mikroglia.....	S.24
2.2.6. Isolation der mRNA.....	S.25
2.2.7. Quantifizierung der extrahierten mRNA.....	S.25
2.2.8. RT-PCR – Synthese und Amplifikation von cDNA.....	S.26
2.2.9. <i>real-time</i> RT-PCR und relative Quantifikation.....	S.27
2.2.10. $\Delta\Delta$ CP-Methode.....	S.29

2.2.11. Statistische Analyse.....	S.30
2.2.12. Textverarbeitung und Layout.....	S.30
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>S.31</b>
3.1. Etablierung Mikrogliakultur aus porcinen Retinae.....	S.31
3.1.1. Lichtmikroskopische Beobachtungen.....	S.31
3.1.2. Immunzytochemie.....	S.31
<b>3.2. Ergebnisse <i>real-time</i> RT-PCR – Aufbau und Auswertung.....</b>	<b>S.33</b>
<b>3.3. Ergebnisse <i>real-time</i> RT-PCR – Zytokine.....</b>	<b>S.33</b>
3.3.1. Expression von IL-6 in retinaler Mikroglia nach 6 h Stimulation .....	S.33
3.3.2. Expression von IL-6 in retinaler Mikroglia nach 24 h Stimulation.....	S.35
3.3.3. Expression von IL-1 $\beta$ in retinaler Mikroglia nach 6 h Stimulation.....	S.36
3.3.4. Expression von IL-1 $\beta$ in retinaler Mikroglia nach 24 h Stimulation.....	S.37
3.3.5. Expression von TNF- $\alpha$ in retinaler Mikroglia nach 6 h Stimulation.....	S.38
3.3.6. Expression von TNF- $\alpha$ in retinaler Mikroglia nach 24 h Stimulation.....	S.39
3.3.7. Expression von IL-10 in retinaler Mikroglia nach 6 h Stimulation.....	S.40
3.3.8. Expression von IL-10 in retinaler Mikroglia nach 24 h Stimulation.....	S.41
<b>3.4. Ergebnisse <i>real-time</i> RT-PCR – Enzyme.....</b>	<b>S.42</b>
3.4.1. Expression von COX-2 in retinaler Mikroglia nach 6 h Stimulation.....	S.42
3.4.2. Expression von COX-2 in retinaler Mikroglia nach 24 h Stimulation.....	S.43
3.4.3. Expression von iNOS in retinaler Mikroglia nach 6 h Stimulation.....	S.44
3.4.4. Expression von iNOS in retinaler Mikroglia nach 24 h Stimulation.....	S.45
<b>3.5. Übersicht Ergebnisse <i>real-time</i> RT-PCR.....</b>	<b>S.46</b>
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>S.47</b>
4.1. Vorbemerkung.....	S.47
4.2. Etablierung der Zellkultur retinaler Mikroglia.....	S.49
4.3. Interaktion von RPE und retinaler Mikroglia.....	S.50
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>S.55</b>
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>S.57</b>
<b>7. Anhang.....</b>	<b>S.69</b>
<b>8. Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>S.70</b>
<b>9. Danksagung.....</b>	<b>S.71</b>
<b>10. Lebenslauf.....</b>	<b>S.71</b>
<b>11. Veröffentlichungen, Vortragspreis.....</b>	<b>S.72</b>

## I. Abkürzungsverzeichnis:

Ak	Antikörper
AMD	Altersabhängige Makuladegeneration
BCVA	<i>best corrected visual acuity</i>
BF	Komplementfaktor B
BRB	Blut-Retina-Barriere
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius, Physikalische Größe – Temperatur
C2	Komplementfaktor 2
C3	Komplementfaktor 3
C9	Komplementfaktor 9
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFH	Komplementfaktor H
CFI	Komplementfaktor I
CNV	Choroidale Neovaskularisation
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CP-Wert	<i>crossing point</i>
Ct	<i>threshold cycle</i>
DAMP	<i>damage associated molecular pattern</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosid-Triphosphate
dsRNA	<i>double stranded</i> Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
FCS	Fetales Kälberserum
FRET	Förster Resonanzenergietransfer
GCL	Ganglionzellschicht
G	Gauge, Maßeinheit für die Größe einer Kanüle
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
h	Stunde – Zeiteinheit, 1h=3600 Sekunden (s)
hs-CRP	<i>high-sensitivity C-reactive protein</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethyl piperazine-N'-2-ethane sulphonic acid
HKG	<i>house keeping</i> Gen
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$

IL-6	Interleukin-6
IL-10	Interleukin-10
MAC	Membran attackierender Komplex
MARCO	<i>macrophage receptor with collagenous structure</i>
MGB	<i>minor groove binder</i>
MPEG-1	<i>macrophage expressed gene 1</i>
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NFL	Nervenfaserschicht
PEDF	<i>pigment epithelium derieved factor</i>
Poly I:C	<i>Polyinosinic polycitidylic acid</i>
Quencher	Akzeptorfluorochrom
RAGE	<i>receptor of advanced glycation</i>
real-time RT-PCR	real-time reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
RT-PCR	reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
ROX	6-Carboxy-X-rhodamin
RPE	Retinales Pigmentepithel
RQ-Wert	<i>relative quantification</i> Wert
s	Sekunde – SI-Zeiteinheit
S	Svedberg Sedimentationskoeffizient
SI	<i>Système international d'unités</i>
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SRR	subretinaler Raum
TGF- $\alpha$	<i>transforming groth factor-<math>\alpha</math></i>
TGF- $\beta$	<i>transforming groth factor-<math>\beta</math></i>
TLR	<i>toll-like</i> Rezeptor
Tm	Oligonucleotid Schmelztemperatur
UV	ultraviolett
VEGF	<i>Vascular Endothelial Groth Factor</i>
ZNS	Zentralnervensystem
6-FAM™	6-Carboxyfluorescin

## 1. Einleitung

### 1.1. Altersabhängige Makuladegeneration

#### 1.1.1. Epidemiologie und gesellschaftliche Bedeutung

Die steigende Lebenserwartung stellt die westlichen Industrienationen vor große Herausforderungen medizinischer, ethischer und wirtschaftlicher Natur (Hirneiß et al., 2014). Epidemiologisch lässt sich eine Korrelation zwischen zunehmendem Alter und der Inzidenz von „Volkskrankheiten“ wie Diabetes mellitus Typ II oder altersabhängiger Makuladegeneration (AMD) feststellen (Coleman et al., 2008), (Rathmann et al., 2013). Die AMD ist Hauptursache schwerer Sehstörung und Blindheit bei über 65-jährigen mit europäischer Abstammung (Friedman et al., 2004) deren Zahl in Deutschland bei etwa 20,6% der Gesamtbevölkerung liegt (Eurostat, 2011). Nach einer Studie von Finger et al., (2011) war die AMD in Deutschland in 2010 in 50% der Fälle ursächlich für schwere Sehstörung und Blindheit, gefolgt von Glaukom (15%) und Diabetes assoziierten Augenerkrankungen (10%). Es wird erwartet, dass die Inzidenz aller oben erwähnten ophthalmologischen Krankheitsbilder bis 2030 ansteigen wird, wobei der größte Anstieg bei der AMD erwartet wird – dann ursächlich für 57% aller Fälle schwerer Sehstörung und Blindheit (Finger et al., 2011). Blindheit ist in Deutschland gesetzlich geregelt in [Teil A Absatz 6 der Versorgungsmedizin-Verordnung vom 10. Dezember 2008 (BGBl. I S. 2412), die zuletzt durch Artikel 1 der Verordnung vom 11. Oktober 2012 (BGBl. I S. 2122) geändert worden ist] und ist definiert unter Anderem als maximale Sehschärfe des besser sehenden Auges von 0,02 oder einer äquivalenten Sehstörung. Die schwere Sehstörung ist nicht gesetzlich definiert, wird aber gemeinhin als Sehschärfe von 0,03 bis 0,05 oder als äquivalente Sehstörung angenommen (Finger et al., 2012). Eine Sehstörung erhöht das Risiko von Stürzen, Fehlmedikation, senkt die Lebensqualität und ist bei zunehmender Ausprägung der Erkrankung der Makula assoziiert mit Einschränkung der kognitiven Funktionen (Johnson et al., 2014). Harrabi et al., (2015) konnten zeigen, dass Patienten mit AMD niedrigere kognitive *scores* erreichten, als Individuen ohne Sehstörung – der kognitive Status wurden mit dem *mini-mental exam blind version* erhoben (Harrabi et al., 2015). Eine Korrelation mit der Entwicklung von Demenz wird diskutiert (Wong et al., 2002), (Johnson et al., 2014). Fehlsichtigkeit wird ebenfalls als signifikanter Risikofaktor für die Entwicklung von Depression beschrieben (Brody et al., 2001). Zudem konnte ein möglicher direkter Effekt zwischen Fehlsichtigkeit und erhöhtem Suizidrisiko (Lam et al., 2008), (Johnson et al., 2014) gezeigt werden - die Autoren betonen die Verantwortung des Ophthalmologen auch die psychosoziale Komponente der Fehlsichtigkeit, wie sie aus der AMD resultieren kann zu berücksichtigen. Fehlsichtigkeit ist nach *der international classification of diseases* definiert als *best corrected visual acuity* (BCVA) von 6/18 bis 3/60 entsprechend einer Sehschärfe von 0,3 bis 0,05 dezimal skaliert. Zusammenfassend ist die Fähigkeit zum Sehen ein elementarer Bestandteil der aktiven sozialen

Teilhabe an unserer Gesellschaft, deren Einschränkung oder Verlust nicht nur eine somatische Pathologie beschreibt, sondern auch eine schwere psychosoziale und gesellschaftliche Herausforderung darstellt.

### 1.1.2. Ätiologie, Pathogenese und Klinische Klassifikationen

Die Pathogenese der AMD ist multifaktoriell und nicht abschließend geklärt. Erklärungsmodelle wie Parainflammation (s.u.) oder Nekroptose (s.u.) werden als Pathomechanismen diskutiert. Konsens besteht darin, dass höheres Alter, eine positive Familienanamnese, Rauchen, verstärkte Sonnenlichtexposition und bestimmte genetische Varianten als Risikofaktoren der AMD gelten (Thornton et al., 2005), (Moshfeghi and Blumenkranz, 2007), (Xu et al., 2009), (Klettner et al., 2013). Retinale Mikroglia (s.u.) und retinales Pigmentepithel (s.u.) stehen ebenso wie die *toll-like* Rezeptor (TLR) Familie – insbesondere auch der TLR-3 (s.u.) (Yang et al., 2008) im Verdacht eine tragende Rolle in der Pathogenese der AMD zu spielen (Xu et al., 2009), (Lin et al., 2013), (Karlstetter et al., 2015; Karlstetter and Langmann, 2012; Langmann, 2007). Für genetische Varianten des Komplementfaktor H (CFH) auf Chromosom 1q ist eine starke Assoziation mit Empfänglichkeit für die AMD beschrieben (Zarepari et al., 2005), (Edwards et al., 2005; Hageman et al., 2005; Haines et al., 2005; Klein et al., 2005). Weitere Risikovarianten zur Entstehung der AMD wurden in mehreren Genloci gefunden – neben CFH unter anderem in Komplementfaktor (C2), Komplementfaktor B (BF), Komplementfaktor I (CFI), Komplementfaktor 3 (C3) und Komplementfaktor (C9) (Helgason et al., 2013), (Gold et al., 2006), (Seddon et al., 2013), (Yates et al., 2007). Aktuelle Studien und Metaanalysen haben Risikovarianten für fortgeschrittene AMD in 19 Suszeptibilitätsloci identifiziert (Fritsche et al., 2013). Fritsche et al., (2013) schlussfolgern, dass mit Hilfe ähnlicher *scores*, wie den 19 genetischen Risikovarianten für die fortgeschrittene AMD Individuen mit erhöhtem Risiko für AMD identifiziert und einer präventiven Therapie zugeführt werden könnten (Seddon et al., 2011).

Es gibt eine Vielzahl von Klassifikationssystemen für die AMD, die sich teils in der grundlegenden Terminologie unterscheiden (Bird et al., 1995; Davis et al., 2005; Ferris et al., 2013, 2005; Klaver et al., 2001; Klein et al., 2007; Seddon et al., 2011; van Leeuwen et al., 2003; Wang et al., 2007; Zweifel et al., 2010). Klinisch wird die AMD nach der von (Ferris et al., 2013) vorgeschlagenen *clinical classification of age related macular disease* in frühe, intermediäre und späte AMD eingeteilt. Die fortgeschrittene AMD wird phänotypisch in die trockene (atrophische) Form mit vordergründiger Atrophie des Pigmentepithels und der sensorischen Netzhaut, sowie die feuchte Form mit choroidaler Neovaskularisation (CNV) unterteilt. Die späte trockene AMD ist gekennzeichnet durch Areale atrophischen RPEs mit Schädigung der benachbarten Photorezeptorzellen und schwerer Sehstörung (Kivinen et al., 2014), (Grehn, 2012). Bis heute gibt es keine effektive Therapie gegen die

trockene/atrophische Form der AMD. In der feuchten Form der altersabhängigen Makuladegeneration kommt es zum Einsproßen von Gefäßen aus den choroidalen Kapillaren (die Choroidea ist eine gefäßführende Schicht, die über die Bruch-Membran an das RPE grenzt) durch die Bruch-Membran, die zur Bildung subretinaler Membranen, retinalen Ödemen, Blutungen und zur Schädigung der Photorezeptoren führen kann – auch bezeichnet als choroidale Neovaskularisation (CNV) (Kivinen et al. 2014), (Grehn, 2012). Der Verlauf der unbehandelten feuchten AMD ist gekennzeichnet durch raschen Visusverlust. Ein wesentlicher Auslöser der Neovaskularisation ist der *Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) A*, der gleichzeitig ein pharmakologisches *target* in der feuchten Form der AMD darstellt (Kivinen et al., 2014), (Klettner, 2014). Das klinische Klassifikationssystem nach (Ferris et al., 2013) schließt ein Alterskollektiv von Patienten über 55 Jahre und die funduskopische Untersuchung der Retina bis zu einem Abstand von 2 Papillendurchmessern (Papilla nervi optici) zur Fovea centralis ein (Ferris et al., 2013), ohne Berücksichtigung des Visus. Kleine Drusen (s.u.) (<63 µm) werden als normale altersabhängige Veränderungen, ohne ein klinisch relevant erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer späten AMD angesehen (Ferris et al., 2013). Drusen imponieren funduskopisch als gelb-weißliche Ablagerungen (Curcio et al., 2009). Sie werden typischerweise in harte und weiche Drusen kategorisiert (Curcio et al., 2009; Sarks et al., 1980). Histologisch sind Drusen definiert als fokale, domförmige Läsionen zwischen der Basalmembran des RPEs und der inneren Kollagenschicht der Bruch-Membran (Curcio et al., 2009). Mittlere Drusen (≥63 bis ≤125 µm), ohne AMD-abhängige Pigmentveränderungen der Retina sind Kriterien der frühen AMD. Individuen mit großen Drusen oder Pigmentveränderungen assoziiert mit zumindest mittleren Drusen können als Patienten mit indermediärer AMD betrachtet werden. Zeigen sich in der funduskopischen Untersuchung Läsionen assoziiert mit neovaskulärer AMD oder geographischer Atrophie sind die Kriterien der späten AMD erfüllt. Das Risiko zum Fortschreiten der intermediären AMD in die späte AMD mit Neovaskularisation oder geographischer AMD beträgt für die fortgeschrittenste intermediäre AMD 50% (Ferris et al., 2013).

### **1.1.3. Alterung der Retina**

Degenerative Prozesse sind Bestandteil des Alterungsprozesses des Menschen. Davon abzugrenzen sind Pathologien, die im Alter zu zum Teil rasch progredienten und dabei pathologisch-degenerativen Prozessen führen können. Alterung kann im Rahmen der oxidativen Hypothese des Alterns (Harman, 1956) als Prozess, der in 3 Schritten erfolgt beschrieben werden; erstens fallen in den essentiellen metabolischen Prozessen unseres Organismus reaktive Sauerstoffspezies (ROS) ( $O_2^{\cdot-}$  Hyperoxid-Anionen,  $H_2O_2$  Wasserstoffperoxide und  $HO\cdot$  Hydroxyl-Radikale) an (Ardeljan and Chan, 2013; Liu et al., 2014), (Zealley and de Grey, 2013). Im zweiten Schritt kann ein Teil der durch die Toxine

verursachten Schäden nicht mehr durch die endogenen Reparatursysteme behoben werden; es kommt zu deren Akkumulation (Ardeljan and Chan, 2013; Liu et al., 2014), (Zealley and de Grey, 2013). Dies kann drittens in altersabhängige pathologische Prozesse münden, entweder direkt über die Beeinträchtigung des Metabolismus zum Beispiel durch die Oxidation mitochondrialer DNA (Khurana et al., 2008) oder indirekt durch überschießende Anpassungsreaktionen auf die insuffizienten körpereigenen Reperatursysteme (Zealley and de Grey, 2013), (Ardeljan and Chan, 2013; Liu et al., 2014). Durch die hochgradige metabolische Aktivität der Retina werden während des Lichteinfalls und des Sehvorgangs große Mengen an reaktiven Sauerstoffspezies freigesetzt (Xu et al., 2009), (Balaiya et al., 2010), (Whitcup et al., 2013). Hauptquellen reaktiver Sauerstoffspezies der Retina sind neben der mitochondrialen Atmung der inneren Photorezeptorsegmente und des retinalen Pigmentepithels, die beide dicht mit Mitochondrien besetzt sind (Nita et al., 2014), die Phagozytose der äußeren Photorezeptorsegmente durch das RPE und die Phototoxizität des Lipofuscin (Lipofuscin ist ein alterungsbedingtes, fototoxisches Pigmentmaterial, „Abfall“-Material der humanen Retina) (Xu et al., 2009). Die Akkumulation von Lipofuscin in der alternden Retina steht im Verdacht die Bildung von Drusen, die Atrophie von RPE und die Entwicklung der AMD mitauszulösen (Sparrow and Boulton, 2005). Die hohe Reaktivität der ROS beeinträchtigt die physiologische Zellfunktion durch Interaktion mit Nukleinsäuren, Lipiden, Proteinen, Lipoproteinen und Komponenten der Extrazellulärmatrix wie Hyaluron – sie stehen im Verdacht den Zelltod von Photorezeptorzellen, Ganglionzellen und RPE unter pathologischen Bedingungen zu verursachen (Krishnamoorthy et al., 1999), (Cai et al., 2000), (Sanvicens et al., 2004), (Li and Osborne, 2008), (Xu et al., 2009). Die altersabhängige Akkumulation von ROS mitochondrialen Ursprungs führt zur Freisetzung von *damage associated molecular patterns* (DAMPs) (Tang et al., 2011), (Huang et al., 2015) die ihrerseits über *pattern recognition receptors* (PRR) wie den *toll-like* Rezeptoren (TLR) zur Aktivierung retinaler Mikroglia führen können (Lehnardt, 2010), (Karlstetter and Langmann, 2012). Reaktive Sauerstoffspezies sind in der Lage gewebsständige Makrophagen (in der Retina – die Mikroglia) zu aktivieren und zur Sekretion proinflammatorischer Faktoren zu stimulieren (Xu et al., 2009). Entzündungsreaktionen sind als wesentlicher Pathomechanismus der AMD beschrieben (Rodrigues, 2007), (Patel and Chan, 2008), (Xu et al., 2009), (Nita et al., 2014).

In der nicht invasiven ophthalmologischen Untersuchung, dem Spiegeln des Augenhintergrunds, lassen sich pathophysiologische Korrelate der AMD wie Drusen als Teil der *clinical classification of age related macular disease* und basale *deposits* am RPE/Bruch'sche-Membran-Komplex, die einen direkten Einfluss auf die Vitalität von RPE und Photorezeptoren ausüben finden (Green and Enger, 1993), (Sarks, 1976), (Curcio et al., 2009). Drusen enthalten diverse proinflammatorische Stoffe, unter Anderem oxidierte Lipide und Lipoproteine, Komplement-Proteine und doppelsträngige RNA (ds-RNA) (Hageman et al., 2001), (Curcio et al., 2009), (Kaneko et al., 2011), (Murakami et al., 2014),

sowie  $\beta$ -Amyloid (Johnson et al., 2002), (Crabb et al., 2002), (Mullins et al., 2000). Je größer und zahlreicher sich diese Drusen darstellen, desto höher ist das Risiko des Fortschreitens in die trockene oder die feuchte Form der AMD (Yang et al., 2008). Drusen der trockenen AMD weisen ultrastrukturelle Schnittmengen mit arteriosklerotischen Plaques auf (Mullins et al., 2000), (Karlstetter and Langmann, 2012), die enthaltenen Proteine des Komplementsystems, Lipide, sowie Apolipoprotein B und E und sind ein Fokus der Aktivierung des angeborenen Immunsystems (Karlstetter and Langmann, 2012), (Johnson et al., 2001) zu dem zum Beispiel PRRs wie die Gruppe der TLRs gehören.

#### **1.1.4. Parainflammation, Grenzen der homöostatischen Kapazität**

Homöostase kann als Prozess beschrieben werden in dem sich ein dynamisches System in einem stabilen Gleichgewicht befindet. Im Rahmen der AMD kippt diese Balance. Einflussnehmende Faktoren der okulären Homöostase beinhalten die Interaktion zwischen altersabhängigen Gewebsveränderungen (s.o.) und die stärker werdende Bürde der Parainflammation auf die Retina (Ardeljan and Chan, 2013).

Das klassische Entzündungsmodell – Infektion oder Verletzung führt zur Entzündung, wird erweitert durch ein Stufenmodell, das einen intermediären Status zwischen manifester Inflammation und basalem Zellstatus beschreibt – Parainflammation, die durch Faktoren wie oxidativer Stress, Hyperglykämie und Hypercholesterinämie ausgelöst wird (Medzhitov, 2008), (Ardeljan and Chan, 2013). Ziel dieser dosierten Immunantwort auf zum Beispiel erhöhte Konzentration von ROS oder veränderter Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix (EZM) ist die Wiederherstellung von Gewebefunktionalität und -homöostase (Medzhitov, 2008). Hervorzuheben ist, dass die Rolle der Entzündung primär eine physiologische, die Gewebshomöostase wiederherstellende ist, eine Reaktion auf einen dysfunktionalen Gewebszustand. Parainflammation beinhaltet die Aktivierung der gewebständigen Makrophagen die in einer Art *housekeeping* Funktion unterstützend die Abfallprodukte des Metabolismus abräumen und im Zentralnervensystem (ZNS) zusätzlich die neuronale Integrität erhalten (Medzhitov, 2008). Die Parainflammation kann dabei als graduerter Prozess betrachtet werden. Auf der einen Seite des Spektrums ist sie ähnlich dem basalen Gewebestatus, auf der anderen Seite beginnt der Übergang in einen entzündlichen Prozess mit der Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin-1 (Medzhitov, 2008), das an der Pathogenese der AMD beteiligt ist (Lin et al., 2013) und der Induktion des Komplementsystems in der chronifizierten Parainflammation (Parmeggiani et al., 2013). Die AMD wird als Zustand einer chronischen geringgradigen Inflammation, einer pathologischen Parainflammation beschrieben, die sich im Alter intensiviert (Nita et al., 2014), (Ardeljan and Chan, 2013). Parainflammation ist nach

dieser Hypothese an jeder Form der AMD beteiligt (Nita et al., 2014). Viele inflammatorische Faktoren, zum Beispiel TNF- $\alpha$  und IL-6 haben ebenfalls wichtige homöostatische Funktionen, wie die Reparatur von Geweben und die Kontrolle des Metabolismus (Werner and Grose, 2003), (Tedgui and Mallat, 2006). Parainflammatorische Prozesse können die homöostatische Kapazität des Organismus erweitern, indem sie das Aufrechterhalten der Gewebshomöostase auch unter widrigen Bedingungen ermöglichen (Medzhitov, 2008). Persistierender Stress auf ein Gewebe kann zu einer chronifizierten (pathologischen) Parainflammation führen, die unter anderem durch Verstellen der homöostatischen Sollwerte zum weiteren Fortschreiten der Krankheit und reduzierter Gewebsfunktionalität führen kann (Ardeljan et al., 2014; Ardeljan and Chan, 2013; Karlstetter and Langmann, 2012; Xu et al., 2009).

Diabetes mellitus Typ 2, Arteriosklerose, Adipositas, Asthma und AMD sind Krankheiten, die mit einer chronischen Parainflammation assoziiert sind (Medzhitov, 2008), (Xu et al., 2009). Der im Alter akkumulierende oxidative Stress führt zur erhöhten Prävalenz retinalen Zelltods; die entstehenden Produkte sind Liganden der PRRs wie dem TLR und stellen Trigger der Parainflammation in der alternden Retina dar (Xu et al., 2009). TLRs insbesondere der TLR-3 stehen im Verdacht eine wichtige Rolle in der Pathogenese der AMD zu spielen (Xu et al., 2009), (Lin et al., 2013), (Yang et al., 2008).

## **1.2. Mikroglia**

Mikroglia stellt die mononukleäre Phagozyten-Population des ZNS dar (Graeber and Streit, 2010) zu dem auch die Retina zählt. Sie kann frühe Gefahrensignale ihrer lokalen Umgebung detektieren (Hanisch, 2002), (Hanisch and Kettenmann, 2007), (Xu et al., 2009) und auf Grund ihrer extremen Plastizität in sehr kurzer Zeit auf Gewebsstress/-verletzung reagieren; dies geschieht unter normalen Bedingungen ohne die immunologische Balance zu beeinträchtigen (Gehrmann et al., 1995), (Xu et al., 2009). Im gesunden Gehirn überwacht die ramifizierte Mikroglia beständig ihre Umgebung (Nimmerjahn et al., 2005) und kommuniziert mit den sie umgebenden Zellen wie Astrozyten oder leptomeningealen Zellen (Tanuma et al., 2006; Wu et al., 2005). In der Retina findet sich die Mikroglia physiologischerweise in der inneren und äußeren plexiformen Schicht (Karlstetter and Langmann, 2012). Aktivierte Mikroglia transformiert phänotypisch von der ramifizierten in die amöboide Form (Karlstetter and Langmann, 2012) und ist zu Migration und Phagozytose befähigt (Langmann, 2007). Die morphologische Veränderung der Mikroglia vom ramifizierten zum aktivierten amöboiden Typ wird von der Expression zahlreicher Oberflächenantigene begleitet wie zum Beispiel CD68 (Langmann, 2007). Ein wesentlicher Triggermechanismus zur Aktivierung dieses Zelltyps sind die oben erwähnten DAMP's, zum Beispiel auf Nukleinsäurebasis wie DNA und RNA (Bianchi, 2007). DAMPs können die evolutionär hochgradig konservierten TLRs der Mikroglia aktivieren (Lehnardt, 2010), (Karlstetter and Langmann, 2012). Mikroglia exprimiert die TLRs 1-9 (Langmann, 2007), (Olson

and Miller, 2004). Es konnte ein altersabhängiger Anstieg der Expression für TLR-3 in retinaler Mikroglia nachgewiesen werden (Xu et al., 2009). TLR-3 wird von doppelsträngiger RNA aktiviert (Jacobs and Langland, 1996), (Yang et al., 2008). Für dsRNA, die auch Bestandteil von Drusen ist, ist eine Beteiligung an der Pathogenese der altersabhängigen Makuladegeneration beschrieben (Curcio et al., 2009; Green and Enger, 1993; Murakami et al., 2014). Die enge Assoziation von Phagozyten mit Drusen in den Retinae von Patienten mit früher AMD lässt vermuten, dass diese mit internalisierten membranösen Partikeln beladenen Mikrogliazellen, sowie weitere Makrophagen einen Migrationsreiz durch die Ablagerungen in Drusen erhalten (Karlstetter et al., 2015), (Penfold et al., 1991), (Killingsworth et al., 1990). Die Untersuchung der Transkriptome humaner Augen mit AMD zeigt die deutlich erhöhte Expression der mit Mikroglia/Makrophagen assoziierten Transkripte für *macrophage receptor with collagenous structure* (MARCO), *macrophage expressed gene 1* (MPEG1), sowie für weitere Chemokin-mRNA (Karlstetter et al., 2015), (Newman et al., 2012). Neben der Assoziation zu Drusen und basalen Deposits, die am RPE/Bruch'sche Membran-Komplex lokalisiert sind und ein histopathologisches Zeichen der AMD darstellen (Curcio et al., 2009; Green and Enger, 1993; Sarks, 1976), führt die Aktivierung von Mikroglia im Rahmen der AMD zu ihrer Akkumulation im subretinalen Raum (SRR) (Xu et al., 2009), (Xu et al., 2007), (Zeiss and Johnson, 2004) zwischen der apikalen Seite des RPE und den Photorezeptoraußensegmenten (Ma et al., 2009).

Der SRR ist geschützt durch die äußere Blut-Retina Barriere (äußere BRB), die gebildet wird von *tight junctions* des RPE, sowie durch die innere BRB aus *tight junctions* retinalen Gefäßendothels und ist unter physiologischen Bedingungen frei von Immunzellen (Xu et al., 2009), (Xu et al., 2007). Die Makulae von AMD-Patienten zeigen im Bereich der degenerierten Netzhaut subretinal ausgeprägte Ansammlungen amöboider (aktivierter) Mikroglia (Gupta et al., 2003), die zytoplasmatische Einschlüsse mit rhodopsinhaltigen Partikeln tragen (Gupta et al., 2003), (Karlstetter and Langmann, 2012). Gupta et al., (2003) folgern, dass Mikroglia als Reaktion auf den Zelltod von Photorezeptoren aktiviert wird und die Überreste der Photorezeptoren inklusive des Rhodopsins phagozytiert (Newman et al., 2012). Mikroglia im SRR ist CD68, einem Marker aktivierter Makrophagen (Ramprasad et al., 1995) und Iba-1 positiv (Xu et al., 2009), (Xu et al., 2007).

Iba-1, das wir als immunologisches Target zur Identifizierung der Mikroglia in der Etablierung der retinalen Mikroglia Kultur verwandten, verursacht ein Rac-abhängiges Umgestalten des Aktinzytoskeletts, das zu einer Fältelung der Zellmembran führt, welches für die effiziente Phagozytose benötigt wird (Imai and Kohsaka, 2002). Iba-1 positive, subretinal lokalisierte Mikroglia trägt eine große Menge Lipofuscin Granula und hat neben ihrer patho/physiologischen Rolle wesentlichen Anteil an der Fundus-Autofluoreszenz, wie sie für die Diagnose und das *Monitoring* ophthalmologischer Krankheitsbilder, wie der AMD und Makuladystrophien verwendet wird (Xu et al., 2008). Zusammenfassend scheint die Aktivierung von Mikroglia und Makrophagen ein frühes und

lang anhaltendes chronisches Merkmal der Pathogenese der AMD zu sein (Karlstetter et al., 2015). Im Rahmen der Alterung und inflammatorischer Prozessen steht subretinal lokalisierte Mikroglia im direkten Kontakt mit dem ortsständigen RPE (Xu et al., 2009). Die Interaktion dieser für die Pathogenese der AMD bedeutsamen Zellpopulationen ist noch wenig untersucht – ein mögliches Modell der Kommunikation ist die Zytokin gestützte Koregulation und Aktivierung (Xu et al., 2009), die im Rahmen der in dieser Arbeit experimentell untersuchten TLR-3 stimulierten retinalen Mikroglia, des RPEs und einer Reihe ihrer pro- und antiinflammatorischen Zytokine und Enzyme Abbildung findet.

### 1.3. Retinales Pigmentepithel

Das RPE ist Teil der Netzhaut und bildet ihre äußerste Schicht. Als einschichtiger Zellverband umgibt es mit seinen langen apikalen Mikrovilli die lichtsensitiven äußeren Segmente der Photorezeptoren. Basolateral des RPE liegt die Bruch Membran, die an die fenestrierten Kapillaren der Choriokapillaris grenzt. Von innen nach außen bilden Bruch Membran, Choriokapillaris, Lamina vasculosa und Lamina suprachoroidea die Choroidea (Aderhaut), welche der Ernährung der Photorezeptoren und der Temperaturregulation während der photochemischen Prozesse dient (Lüllmann-Rauch, 2006), (Strauss, 2005). Der pigmentierte einschichtige Zellverband aus RPE absorbiert Lichtenergie (Strauss, 2005), (Dayhaw-Barker, 2002), (Bok, 1993), hat Transportfunktionen von der Retina zur Choroidea und umgekehrt (Strauss, 2005), sowie ein breites Spektrum immunologischer Funktionen (Klettner, 2015). Die Phagozytose verbrauchter Photorezeptoraußensegmente, das Recycling des all trans in 11-cis-Retinal als Teil des Sehzyklus und die Stabilisierung der Ionenzusammensetzung im SRR trägt zur Aufrechterhaltung der Erregbarkeit der Photorezeptoren und damit der Sehfähigkeit bei (Strauss, 2005), (Bok, 1993), (Finnemann, 2003), (Dornonville de la Cour, 1993), (Steinberg, 1985). An dieser Schaltstelle zwischen Zentralnervensystem (Retina) und dem umgebenden Gefäßsystem (Choroidea) bildet das RPE mit seinen *tight-junctions* und spezialisierten Transportsystemen die äußere Blut-Retina Schranke und Grenze der immunprivilegierten Zone der Retina gegenüber blutständigen Leukozyten und *danger signals* wie den DAMP's (Klettner, 2015). In der Retina erhalten die angeborenen Immunmechanismen (darunter Mikroglia und TLRs) die Funktionalität des Gewebes, während das RPE die erworbene Immunantwort (darunter Lymphozyten und Antikörper) durch lösliche Faktoren und direkte T-Zell Interaktion dämpft und so maßgeblich am Erhalt des Auges als immunprivilegierte Zone beteiligt ist (Klettner, 2015).

Das RPE ist trotz seines epitheloiden Phänotyps embryologisch Teil des Neuroektoderms und exprimiert viele Oberflächen- und Zellmarker, sowie Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, wie TLRs (Howes et al., 2004), (Kumar et al., 2004), (Klettner et al., 2013). Es ist in der Lage diverse pro- und antiinflammatorische Zytokine und Chemokine zu synthetisieren (Xu et al., 2009). Durch die

Sekretion von *transforming growth factor  $\beta$*  (TGF $\beta$ ), das in Mikroglia die Expression des antiinflammatorischen Interleukin 10 (IL-10) induziert, trägt das RPE auf Zytokinebene physiologischerweise zum Erhalt des Überwachungs-/surveillance- Phänotyps der Mikroglia bei (Klettner, 2015; Langmann, 2007).

Ist die Grenze der homöostatischen Kapazität des RPE's erreicht, kann dieses Funktionen, wie Transportprozesse, die Phagozytose und Prozessierung abgestoßener Scheibchen der Photorezeptoraußensegmente nicht mehr oder nur noch eingeschränkt ausüben (Grehn, 2012); Abbauprodukte akkumulieren, in der Bruch-Membran entstehen Spalte und das RPE ändert das synthetisierte Zytokinmuster – während es unter physiologischen Bedingungen antiinflammatorische Zytokine wie *transforming growth factor  $\alpha$*  (TGF- $\alpha$ ), Somatostatin, Thrombospondin und *pigment epithelium derived factor* (PEDF) (Klettner, 2015), (Zamiri et al., 2007), (Xu et al., 2009) synthetisiert, kommt es zum Beispiel im vermehrten Kontakt mit oxidierten Lipiden (wie oxLDL, das vom RPE in großen Mengen internalisiert werden kann (Gordiyenko et al., 2004)), oxidativem Stress und peroxidierten Photorezeptoraußensegmenten zur vermehrten Expression proinflammatorischer Zytokine wie IL1- $\beta$  und einer Abnahme der Expression von CFH, hinweisend auf ein höheres Risiko der subretinalen Aktivierung der Komplementkaskade in Form des Membran attackierenden Komplexes (MAC) (Higgins et al., 2003), (Klettner, 2012), (Kauppinen et al., 2012). Abbauprodukte, wie Lipofuscin, das im alternden RPE akkumuliert, steht ebenso wie dsRNA als Bestandteil von Drusen im Verdacht, das RPE zur Synthese proinflammatorischer Zytokine und Chemokine zu stimulieren (Xu et al., 2009). Die Stimulation des TLR-3 des RPEs führt zur Steigerung der Expression von VEGF (Klettner et al., 2013), das eine wesentliche Rolle in der Pathogenese der feuchten Form der AMD spielt (Grehn, 2012).

Dem RPE als Hüter der Blut-Retina-Schranke kommt nach aktuellen Untersuchungen in der Pathogenese der AMD eine entscheidende Rolle zu (Grehn, 2012), (Klettner et al., 2013). Aufgrund seiner besonderen Lokalisation an der Grenze zwischen dem zirkulierendem Blut des großen Körperkreislaufs und der immunprivilegierten Neuroretina kann das RPE als erste Verteidigungslinie gegenüber hämatogenen Erregern betrachtet werden (Klettner, 2015). Das RPE muss sich einer Vielzahl viraler Erreger wie Varicella zoster (Humanes Herpesvirus-3), Zytomegalievirus (Humanes Herpesvirus-5) und Herpes simplex (Humanes Herpesvirus-1,2) erwehren (Milikan et al., 2009), (Scholz et al., 2003), (Klettner, 2015), deren doppelsträngige virale RNA (dsRNA) vom TLR-3 des RPEs erkannt wird (s.u.) – der TLR-3 ist der am stärksten exprimierte TLR des RPEs (Ebihara et al., 2007; Klettner et al., 2013; Kumar et al., 2004; Wörnle et al., 2011); ebenfalls vom RPE exprimiert werden TLR 1-7, sowie TLR 9 und 10 (Kumar et al., 2004), (Ebihara et al., 2007).

### 1.4. Toll-like Rezeptor 3

*Toll-like* Rezeptoren sind eine phylogenetisch hochgradig konservierte Rezeptorengruppe, die das angeborene Immunsystem als Teil der PRRs befähigt mikrobielle Pathogene zu erkennen und Abwehrreaktionen zu induzieren (Medzhitov and Janeway, 2000a). Die PRRs, werden in endozytotische, humorale und *signalling receptors* zu denen die TLRs zählen kategorisiert (Medzhitov and Janeway, 2000b). TLRs können molekulare Muster, die mit mikrobiellen Pathogenen assoziiert sind erkennen und eine antimikrobielle Immunantwort induzieren (Medzhitov and Janeway, 2000), (Akira, 2001).

Bis heute sind 10 TLRs im Menschen identifiziert (De Nardo, 2015). TLRs sind Transmembranproteine bestehend aus einer Amino (N)-terminalen extrazellulären Domäne, deren *leucine rich repeats* (LRR) zur Ligandenerkennung dienen, einem einfachen transmembran-Abschnitt und einem *carboxyl* (C) – *terminal globular cytoplasmic Toll/Interleukin-1 (IL1) Receptor* (TIR), der aufgrund der Homologie zur zytoplasmatischen Domäne des Interleukin-1 Rezeptors (IL-1R) als Toll/IL-1R (TIR) Domäne bezeichnet wird (Kopp and Medzhitov, 1999), (Medzhitov and Janeway, 2000b), (De Nardo, 2015). Doppelsträngige RNA (dsRNA) wird von den meisten Viren während ihrer Replikation synthetisiert, stellt ein mit viraler Infektion assoziiertes molekulares Muster dar und ist Ligand des TLR-3 (Jacobs and Langland, 1996), (Alexopoulou et al., 2001). Der TLR-3 ist im RPE und in der Mikroglia überwiegend intrazellulär lokalisiert (Jack et al., 2005), (Ebihara et al., 2007), (Kumar et al., 2004). Die intrazelluläre Lokalisation dient auch zum Schutz vor Kontakt mit extrazellulären „Selbst“-Nukleinsäuren, ein Prozess der andernfalls das Risiko von Autoimmunerkrankungen erhöhen würde (Kawai and Akira, 2011). Der TLR-3 ist hauptsächlich in den frühen Endosomen lokalisiert und nur in wenigen Zelltypen an der Zelloberfläche (Funami et al., 2004; Kawai and Akira, 2011; Matsumoto et al., 2003). Die Aktivierung von TLRs führt zu einer proinflammatorischen Antwort der betroffenen Zelle (Nita et al., 2014).

Neben Zellen wie retinale Mikroglia und RPE stehen Rezeptoren wie die TLRs im Verdacht eine tragende Rolle in der Pathogenese der AMD zu spielen (Xu et al., 2009), (Lin et al., 2013). TLRs werden für viele Modelle – einschließlich der DAMP-Hypothese (in der DAMPs als molekulare Ausgangspunkte, die mit Alterung und Krebs assoziiert sind angesehen werden) – der Parainflammation und der Nekroptose herangezogen (Ardeljan et al., 2014; Ardeljan and Chan, 2013; Murakami et al., 2014; Xu et al., 2009). Murakami et al., (2014) zeigten, dass die subretinale Injektion von *polyinosinic polycitidylic acid* (Poly I:C)(s.u.) zur programmierten Nekrose des RPE, zu nekrotischen und apoptotischen Prozessen der Photorezeptoren, zur Makrophagen-Infiltration des SRR und zur gesteigerten TNF $\alpha$  und IL-6 Produktion in Makrophagen führt – Prozesse wie sie für die fortschreitende AMD beschrieben sind (Xu et al., 2009), (Xu et al., 2007). Für TLR-3 aktivierte

Mikroglia konnte TRIF (einem *TIR-domain-containing* Adaptorprotein der TLR Signalkaskade) abhängige und RIP3 programmierte Nekropose beschrieben werden (Kim and Li, 2013). Yang et al., (2008) beschrieben in einer viel diskutierten multizentrischen Studie die genetische Assoziation der trockenen Form der altersabhängigen Makuladegeneration mit einem *hypomorphic single nucleotide polymorphism* im TLR-3 Gen 412Phe, wonach Individuen, die Träger dieses genetischen Polymorphismus sind vor der trockenen Form der altersabhängigen Makuladegeneration geschützt seien. Zugleich zeigten die Autoren den potentiell retinotoxischen Effekt der TLR-3 Aktivierung auf (Yang et al., 2008), (Kleinman and Ambati, 2012). Kleinman and Ambati, (2012) beschrieben ebenfalls die Bedeutung des TLR-3 für die trockene Form der AMD. Einige systemische Effekte des TLR-3 bei CMV-Infektion sind für das Mausmodell von TLR-3 negativen mit CMV infizierten Tieren beschrieben – so konnte ein signifikanter Anstieg der Virustiter in der Milz, signifikant niedrigere Serum Level der Interferone  $\beta$  und  $\gamma$ , erniedrigte Aktivierung von natürlichen Killerzellen und natürlichen Killer T-Zellen, sowie eine leicht erhöhte Mortalität gegenüber dem Wildtyp aufgedeckt werden (O'Neill and Bowie, 2007), (Tabeta et al., 2004). In vitro konnte gezeigt werden, dass mononukleäre Zellen und Fibroblasten von TLR-3 L412F positiven Menschen eine verminderte Sekretion von TNF- $\alpha$ , INF- $\beta$ , INF- $\gamma$  und INF- $\lambda$  gegenüber TLR-3 L412F negativen Individuen als Reaktion auf Stimulation mit ds-RNA (TLR-3 Ligand) und Cytomegalievirus (CMV = Humanes Herpesvirus 5) aufweisen (Nahum et al., 2012). Nahum et al., (2012, 2011) beschreiben die Assoziation der TLR3 L412F Variante mit einer erhöhten Anfälligkeit für das Cytomegalievirus (CMV) und kutaner Candidiasis. Der klinische Effekt der genetischer Polymorphismen des TLR-3, wie auch Studien zur zum Teil terminalen Wirkung des TLR-3 auf das RPE und die Mikroglia verdeutlicht das Spektrum und die zentrale Rolle des TLR-3 in der Pathogenese viraler und degenerativer Prozesse. Weitere Relevanz finden TLRs in der altersabhängige Akkumulation von ROS mitochondrialen Ursprungs, die zur Freisetzung von DAMPs führt (Tang et al., 2011), (Huang et al., 2015), die ihrerseits über PRRs wie TLRs zur Aktivierung retinaler Mikroglia führen können (Lehnardt, 2010), (Karlstetter and Langmann, 2012). Ma et al., (2013) zeigten, dass mit zunehmendem Alter die Expression von MyD88 (einem gemeinsamen Adaptorprotein der meisten TLRs) in retinaler Mikroglia steigt, was als Veränderung eines homöostatischen Sollwerts im Sinne einer parainflammatorischen Reaktion betrachtet werden kann, die die Entstehung der AMD begünstigt (Xu et al., 2009).

Die Stimulation des TLR-3 des RPEs führt zur erhöhten Sekretion von Interferon- $\beta$ , das einen starken antiviralen Effekt im RPE vermittelt (Klettner, 2015). Zusätzlich wird das RPE zur Expression einer Reihe von Zytokinen und Chemokinen stimuliert – unter anderem die proinflammatorischen Faktoren IL-8, IL-6 und TNF- $\alpha$  (Klettner, 2015), (Kumar et al., 2004), (Klettner et al., 2013), (Wörnle et al., 2011). In Drusen von mit AMD betroffenen Augen findet sich neben oxidierten Lipiden, Lipoproteinen und Komplement-Proteinen auch dsRNA (Curcio et al., 2009), (Kaneko et al., 2011),

(Murakami et al., 2014). Die TLR-3 abhängige Stimulation von Mikroglia mit dsRNA führt zu einer konzentrationsabhängigen Induktion der Expression von IL-6, TNF $\alpha$  und Interferon- $\beta$  (Kettenmann et al., 2011), (Hanisch and Kettenmann, 2007), (Alexopoulou et al., 2001), (Jack et al., 2005). Relevanz findet dsRNA nicht nur als Ligand des TLR-3 Rezeptors und in der Nekroptose, sondern auch im Rahmen experimenteller Pharmakotherapie – der RNA Interferenz (RNAi). Die Bezeichnung RNAi resultiert aus der Beobachtung, dass die Injektion von dsRNA in *Caenorhabditis elegans* mit der Expression von Genen komplementär zur eingebrachten dsRNA interferiert (Fire et al., 1998). Doppelsträngige RNA (dsRNA) wird von den meisten Viren während ihrer Replikation synthetisiert und stellt ein mit viraler Infektion assoziiertes molekulares Muster dar (Jacobs and Langland, 1996), (Alexopoulou et al., 2001). Einen Abwehrmechanismus gegen dsRNA stellt RNA-Interferenz (RNAi) dar – ein evolutionär hochkonservierter post-transkriptionaler *gene-silencing pathway* (Mello and Conte, 2004), (Fire et al., 1998), (Guzman-Aranguez et al., 2013), der nach Aktivierung durch dsRNA (Ketting et al., 2001) die gezielte Bindung und nachfolgende Ausschaltung hunderter komplementärer mRNAs ermöglicht (Elbashir et al., 2001), (Rand et al., 2005), (Rand et al., 2004), (Guzman-Aranguez et al., 2013).

VEGF ist ein tragender Faktor der Angiogenese und der Gefäßpermeabilität in der choroidalen und retinalen Neovaskularisation der feuchten Form der AMD (Miller et al., 2013). Das pharmakologische Arsenal gegen die feuchte Form der AMD richtet sich derzeit gegen die VEGFs und ihren Rezeptor den *Vascular Endothelial Groth Factor Receptor* (VEGFR) (Grehn, 2012). Neben der etablierten Antikörpertherapie in Form von Biologicals wie Bevacizumab (Avastin), Ranibizumab (Lucentis), Aflibercept (Eylea) und Pegaptanib (Macugen) – die das VEGF Protein bzw. den VEGF Rezeptor als pharmakologisches Ziel haben (Guzman-Aranguez et al., 2013), gibt es mit der siRNA, die gegen die mRNA von VEGF gerichtet ist einen weiteren potentiellen Therapieansatz. Synthetische 21-nucleotid small interfering RNA (siRNA) wirkt als selektiver, sequenzspezifischer Inhibitor des Ziel-Gens (Elbashir et al., 2001), (Wall and Shi, 2003).

Nach dieser Annahme wurde siRNA generiert und schließlich in an feuchter AMD erkrankten Menschen in Phase II und III Studien getestet (Guzman-Aranguez et al., 2013). Noch während die ersten Studien am Patienten durchgeführt wurden fanden Kleinman et al., (2008), dass 21nt siRNA, die nicht VEGF spezifisch ist ebenfalls einen antiangiogentischen Effekt hat, der durch die Bindung der 21nt siRNA an den TLR-3 vermittelt wird. Im weiteren konnte gezeigt werden, dass 21-nucleotid si-RNA (si-RNA mit einer Länge von 21 Nukleotiden) per se in ihrer „nackten“ Form, wie sie für die ersten klinischen Studien verwandt wurde über die Aktivierung des TLR-3 Rezeptors zum *Interferon regulatory factor 3* abhängigen Zelltod und retinaler Degeneration führt (Kleinman et al., 2012). Ein Teil der laufenden Studien wurde abgebrochen – eine Anpassung des *Designs* der Pharmaka auf die neue Datenlage bleibt abzuwarten (Guzman-Aranguez et al., 2013). Dies unterstreicht die Bedeutung

des TLR-3 und seine Wirkung auf retinale Zellen nicht nur für das Verständnis der Pathophysiologie, sondern ultimativ auch für die Therapie der AMD.

### 1.5. Zytokine und Enzyme

Zytokine vermitteln neben Zell-Zell-Interaktionen die Kommunikation der Körperzellen. Sie können als Botenstoffe der Abwehr beschrieben werden und haben Bedeutung für Differenzierungs- und Wachstumsvorgänge (Horn, 2009). Es gibt noch keine einheitliche Nomenklatur der Zytokine. Als Interleukine werden Zytokine bezeichnet die Effekte zwischen Leukozyten vermitteln (Horn, 2009). Zytokine fördern ihre eigene Synthese – TNF- $\alpha$  induziert TNF- $\alpha$  und IL-1 induziert IL-1 (Descoteaux and Matlashewski, 1990; Dinarello et al., 1987; Tedgui and Mallat, 2006).

IL-1 und TNF- $\alpha$  induzieren eine Reihe von anderen Faktoren in Form einer proinflammatorischen Signalkaskade die auch regulative Schleifen enthält wie IL-10, das aktivierte Makrophagen hemmt und von diesen im Rahmen einer negativen Rückkopplung selbst gebildet werden kann (Horn, 2009; Tedgui and Mallat, 2006). Die Stimulation von TLRs führt zur Expressionssteigerung der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 in der betreffenden Zelle (Janeway C., 2011). TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-1 $\beta$  als Teil der IL-1 Familie sind entscheidenden Zytokine der frühen Abwehr und von Entzündungsreaktionen (Horn, 2009; Tedgui and Mallat, 2006). Sie sind endogene Pyrogene und induzieren die Synthese von Zytokinen, von Akut-Phase-Proteinen wie C-reaktives Protein (CRP) und Komplementfaktoren (Horn, 2009; Tedgui and Mallat, 2006).

Der Effekt von IL-1 und TNF- $\alpha$  wird über die Aktivierung von Mitogen-aktivierter Phosphorylase-Kinase (MAP-Kinase) und Kernfaktor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) vermittelt, der wenn aktiviert in den Zellkern migriert, an die DNA bindet und die Transkription proinflammatorischer Proteine induziert (Horn, 2009). TNF- $\alpha$  wird von verschiedenen Zelltypen, unter anderem von aktivierten Makrophagen produziert (Rivest et al., 2000). Es ist eines der ersten Zytokine, die im Rahmen entzündlicher Reaktion sekretiert werden und kann neben seinen proinflammatorischen Effekten die Bildung von Faktoren wie IL-6 und IL-1 regulieren (Fong et al., 1989).

Die Wirkung von IL-6 wird über die Janus-Kinase, sowie Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription (JAK/STAT-Weg) vermittelt (Horn, 2009). Neben der Aktivierung der Akut-Phase-Reaktion und der Stimulation von Lymphozyten ist IL-6 ein zentrales Element im Übergang der Immunantwort der angeborenen Abwehr hin zur erworbenen Abwehr (Jones, 2005; Kishimoto et al., 1995). Die Bedeutung von IL-6 und TNF- $\alpha$  findet bereits Ausdruck in der Pharmakotherapie zum Beispiel der rheumatoiden Arthritis mit Tocilizumab (Anti-IL-6 Rezeptor-Ak) und Infliximab (Anti-TNF $\alpha$ -Ak) (Jones, 2005; Maini et al., 2006; Singh et al., 2009). Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  können neurotoxische Effekte auslösen, die unter anderem durch die Expression des Enzyms induzierbare NO-Synthase (iNOS) über den Mediator Stickstoffmonoxid (NO) vermittelt werden (Chao et al.,

1995), (Downen et al., 1999; Hanisch, 2002; Horn, 2009). Die iNOS ist eine von 3 NOS-Isoformen, die durch die Reaktion von Arginin zu Citrullin Stickstoffmonoxid (NO) generieren (Horn, 2009). NO ist ein Neurotransmitter, vermittelt Vasodilatation und kann von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten im Rahmen der unspezifischen Immunantwort produziert werden, wo es zu Hydroxyradikalen (s.o.) und Peroxynitrit  $\text{ONOO}^-$  (s.u.) reagiert, die es den Abwehrzellen ermöglichen körperfremde Organismen oder Bakterien abzutöten (Horn, 2009), (Pacher et al., 2007). Peroxynitrit  $\text{ONOO}^-$  kann zu neurotoxischen Reaktionen wie Demyelinisierung, Verlust von Neuronen und Oligodendrozyten führen (Pacher et al., 2007; Pannu and Singh, 2006; Radi et al., 1994), (Bö et al., 1994; Merrill et al., 1993). iNOS steht im Verdacht neurodegenerative Effekte des Enzyms Cyclooxygenase 2 (COX-2) zu vermitteln (Nagayama et al., 1999), (Ju et al., 2003). COX-2 ist im Gegensatz zur konstitutiv exprimierten COX-1 induzierbar; ihre Expression wird hauptsächlich bei Entzündungsreaktionen durch Zytokine und andere Faktoren stimuliert (Horn, 2009). COX wandelt Arachidonsäure durch Cyclooxygenaseaktivität in Prostaglandin G<sub>2</sub>, das durch die Peroxidaseaktivität der COX zu Prostaglandin H<sub>2</sub> reagiert, aus dem die Prostaglandine E<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>, F<sub>2α</sub>, I<sub>2</sub> (= Prostazyklin) und Thromboxan A<sub>2</sub> generiert werden (Horn, 2009).

Prostaglandine und Thromboxane sind Teil der Gruppe der Eikosanoide (Horn, 2009). COX-2 vermittelt über Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) und I<sub>2</sub> die klassische Entzündungsreaktion mit Sensibilisierung für Schmerzen durch Sekretion von Bradykinin und Histamin (dolor) (Horn, 2009). Bei systemischen Entzündungsreaktionen vermittelt (PGE<sub>2</sub>) im Organum vasculosum laminae terminalis (rostral des Hypothalamus lokalisiert) eine Sollwertverstellung der Körpertemperatur mit Fieber als Konsequenz (calor); Prostazyklin und (PGE<sub>2</sub>) vermitteln über Vasodilatation Gewebsschwellung und Rötung (tumor, rubor) (Horn, 2009). Neurotoxische Effekte von COX-2 sind für die Genese neurodegenerativer Erkrankungen wie Parkinson oder amyotrophe Lateralsklerose beschrieben (Teismann et al., 2003; Xia et al., 2015).

## 1.6. Fragestellung der Arbeit

Ziel der Arbeit ist es erstens eine Zellkultur retinaler Mikroglia zu etablieren; um zweitens den Nachweis eines Einflusses von RPE auf retinale Mikroglia zu erbringen und eine mögliche Interaktion aufzudecken, aus der gegebenenfalls Rückschlüsse auf die Pathogenese und mögliche Therapieoptionen der AMD und viraler Infektionen der Retina gewonnen werden sollen.

### 1. Etablierung einer Zellkultur retinaler Mikroglia, Immunhistochemie

- a) Gelingt es Mikroglia aus porcinen Retinae zu generieren und den immunhistochemischen Nachweis einer adäquaten Reinheit der Zellkultur zu erbringen?

### 2. TLR-3 Stimulation, mRNA-Isolation, *real-time* RT-PCR

- a) Wie wirkt sich die Stimulation des TLR-3 auf die Expression ausgewählter Zytokine und Effektorenzyme retinaler Mikroglia aus?
- b) Welchen Effekt hat unstimuliertes, sowie TLR-3 stimuliertes RPE auf retinale Mikroglia?

Die experimentelle Bestimmung von 2. a) und 2 b) erfolgt über die Isolation und quantitative Bestimmung spezifischer mRNA von IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , IL-10 und der Enzyme COX-2 und iNOS in der *real-time* RT-PCR.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Chemikalien und Reagenzien

Aceton	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Aqua bidest	Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg
Betaisodona	Mundipharma GmbH, Limburg
bisBenzimid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Bovines Serum Albumin (BSA)	Fluka Chemie AG, Schweiz, Buchs
Chloroform	Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt
dNTP-Mix, 10mM	5 Prime, Hilden
Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)	Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad
Ethanol	Büfa Chemikalien GmbH & Co.KG, Hude
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Fetales Kälberserum (FCS)	Linaris GmbH, Wertheim-Bettingen

Glykogen	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
HEPES	Carl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe
Immuno-Mount	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Isopropanol	PAA Laboratories GmbH, Österreich, Pasching
Kaisers Glyceringelatine	Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt
Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAA Laboratories GmbH, Österreich, Pasching
Penicillin	Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt
Polyinosinic polycitidylic acid (Poly I:C)	Merck
Trypanblau	Serva, Heidelberg
Random Primer	Fermentas, Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot
RQ1 DNase 10x Reaction Buffer	Fermentas, Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot
RQ1 DNase Stop Solution	Fermentas, Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot
Streptomycin	Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt
Trizol Reagenz	Life Technologies, USA, Carlsbad
Trypanblau	Serva, Heidelberg
Trypsin from porcine pancreas	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
5x Reaction Buffer for M-MuLV RT	Fermentas, Thermo Scientific, St. Leon-Rot

### 2.1.2. Enzyme

DNase	Roche, Mannheim
RQ1 RNase free DNase	Promega GmbH, Mannheim
TaqMan Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Life Technologies, Darmstadt
RevertAid™	Fermentas, Thermo Scientific, St. Leon-Rot

### 2.1.3. Primer

18s	Hs999999_01s1	Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad
IL-1 $\beta$	Ss03393804_m1	Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad
IL-6	Ss03384604_u1	Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad
IL-10	Ss03382372_u1	Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad
TNF- $\alpha$	Ss03391319_g1	Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad
COX-2	Ss03394695_g1	Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad
iNOS	Ss03374608_u1	Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad

#### 2.1.4. Zellkulturmedium

Zellkulturmedium – Mikroglia

DMEM  
10% FCS  
1% Penicillin/Streptomycin

Zellkulturmedium – RPE

DMEM  
HEPES 25mM  
Natrium Pyruvat 110g/ml  
10% FCS

Stimulationsmedium

DMEM  
1% Aminosäuren  
1% Penicillin / Streptomycin

#### 2.1.5. Lösungen:

Dissoziationslösung

DMEM  
0,24% HEPES  
0,1% Trypsin  
0,02% EDTA

Zambonie-Fixierlösung

2l Aqua bidest  
17,5% Pikrinsäure  
4% Paraformaldehyd  
2,24% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O  
0,331% Phosphatpuffer  
NaOH-Lösung (tropfenweise bis das Paraformaldehyd gelöst vorliegt)

#### 2.1.6. Antikörper:

Anti Iba-1 Antikörper (rabbit)

Wako Chemicals, Neuss

Alexa Fluor 488 (goat – anti rabbit)

Invitrogen, life technologies, Carlsbad

### 2.1.7. Geräte:

Abzug Systemlabor	Köttermann GmbH&Co.KG, Uetze
Apotom	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Axio Imager Z1	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Axiocam MRm	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Axiovert 1000	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Axiovert 200M	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Biofuge Fresco	Heraeus Instruments, Hanau
Brutschrank	Labotec, Göttingen
Centrifuge 5414	Eppendorf AG, Hamburg
Epoch Microplate Spectrophotometer	BioTek, Bad Friedrichshall
Gefrierschrank (-70°C)	Heraeus Instruments, Hanau
Lampe X-Cite Series 120 EXFO	EXFO Photonic Solutions Inc.
Microzentrifuge	Microcentrifuge, Carl Roth GmbH&Co.KG
Gene Amp. PCR-System 9700	Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA
Pipetten	Research, Eppendorf AG, Hamburg
Pipettus	Hirschmann Laborgeräte GmbH
Sorvall Centrifuge ST 40	Thermo Fisher Scientific
Saugpumpe, Vacusafe Comfort	Integra Bioscience AG, Zizers, Schweiz
Sterilwerkbank	Sterilwerkbank
Thermoblock TDB 120 Thermostat	Biosan, Riga, Litauen,
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik
Zählkammer	Neubauer
7500 Fast Real Time-PCR System	Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA

### 2.1.8. Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen	Menzel-Gläser, Braunschweig
Kanüle Sterican® Gr. 1,	Sterican, B. Braun, Melsungen
Gauge (G) 20 x 1 1/2" / ø 0,90 x 40 mm gelb	
Objektträger	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen
Nunc-Zellkultur-Schalen	Fisher Scientific GmbH, Thermo Fisher, Schwerte

Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber	G.Kisker Products
Zentrifugenröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
6-Well-Zellkulturplatte	Sarstedt, Nümbrecht
12-Well-Zellkulturplatte	Sarstedt, Nümbrecht
96-Well-Platte	Sarstedt, Nümbrecht

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Zellkultur retinaler Mikroglia

In Kooperation mit Prof. Dr. rer. nat Lucius (Direktor des anatomischen Instituts der Christian – Albrechts-Universität zu Kiel) gelang es - aufbauend auf der Arbeit von (Richardson et al., 1993) der zeigte, dass primäre Astrozytenkulturen stets Mikroglia progenitorzellen enthalten – Mikroglia-kulturen aus porcinen Retinae anzulegen. Wie in anderen Teilen des Zentralnervensystems finden sich in der Retina *glial fibrillary acid* (GFAP) positive Astrozyten, die histologisch in der Nervenfaserschicht (Stratum neurofibrarum) und der Ganglienzellschicht (Stratum ganglionicum) lokalisiert sind und auch die regulären intraretinalen Blutgefäße ummanteln (Ramirez et al., 1994; Schnitzer, 1988), (Lüllmann-Rauch, 2006).

Bezogen wurden die nötigen Augen von einer regionalen Schlachtereier. Maximal 4 Stunden (h) nach Schlachtung und Organentnahme wurden die Bulbi in der Augenklinik des UKSH, Campus Kiel von adhärentem Gewebe befreit und kurzzeitig in antiseptische Lösung verbracht. Die Bulbi wurden unter sterilen Bedingungen zirkulär entlang der Ora serrata eröffnet; der vordere Augenabschnitt wurde entfernt. Die Retina wurde unter Abheben des Glaskörpers extrahiert. Der verbleibende Augenbecher wurde der RPE-Kultur zugeführt siehe unten (s.u.). Es folgte die enzymatische und mechanische Dissoziation der Retinae. Jeweils 2 der präparierten Retinae wurden in separate 5 ml PBS Puffer enthaltende Petrischalen überführt und unter einer Sterilwerkbank mit Einmalskalpell zerteilt. Die zerkleinerten Retinae aus je einer Petrischale wurden in je ein 12 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert. Der Überstand von PBS wurde abgesaugt und 3 ml Dissoziationslösung unter Zugabe von 35 µl ( 1mg/ml) DNase pro Zentrifugenröhrchen hinzugegeben. Es folgte die Inkubation des Ansatzes für 30 Minuten bei 37°C unter 5,0% CO<sub>2</sub> Begasung. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Dissoziationslösung abgesaugt und die Trypsinaktivität durch Zugabe von 2 ml serumhaltigen Zellkulturmediums gestoppt, weitere 50 µl DNase wurden hinzugefügt. Verbleibende Gewebesteilchen wurden durch mehrfaches Auf- und Absaugen mit einer Pipette resuspendiert; die weitere Vereinzelung der Zellen erfolgte durch wiederholtes Resuspendieren mit einer gelben Kanüle (20 Gauge). Anschließend wurde die Zellsuspension in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen überführt. Zur

Kultivierung wurden die Zellen bei 37 °C unter 5% CO<sub>2</sub> Begasung inkubiert. Der Mediumwechsel erfolgte am 3., 4., 7. und 11. Tag der Kultur.

14 Tage nach initialer Befüllung der Zellkulturflaschen mit der Zellsuspension wurden die locker auf dem Astrozytenrasen sitzenden bzw. frei flottierenden Mikrogliazellen durch Schwenken der Zellkulturflasche in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde das Zellpellet in 1 ml Zellkulturmedium resuspendiert und die Mikrogliazellen entsprechend der Versuchsplanung in der zu verwendenden Anzahl auf die Ansätze verteilt.

Zur Bestimmung der Reinheit der Mikrogliakultur wurde immunzytochemisch mit dem *Ionized Calcium Binding Acceptor Molecule* (Iba-1) Antikörper gefärbt.

### **2.2.2. Zellkultur retinalen Pigmentepithels**

Die Kultur des RPEs gelang ebenfalls aus porcinen Retinae wie durch (Wiencke et al., 2003), (Klettner and Roider, 2008) beschrieben. In die aus der Mikrogliakultur gewonnenen Augenbecher siehe oben (s.o.) wurde Trypsin (0,25 % in PBS ) gegeben und diese 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurde die Trypsin Lösung abgenommen und durch Trypsin-EDTA (0,25 % und 0,02 % in PBS) ersetzt und für 45 Minuten bei 37 °C inkubiert. Im nächsten Schritt konnten die RPE-Zellen vorsichtig von der Choroidea abpipetiert und in RPE-Zellkulturmedium s.o. gesammelt werden. Anschließend wurden die RPE-Zellen in Nunc-Zell-Kulturschalen kultiviert. Das Zellkulturmedium wurde 2 Mal pro Woche gewechselt. Die RPE-Zellen wurden kultiviert, bis sie einen konfluierenden Zellrasen bildeten. Für die Experimente wurden nur Zellen der zweiten Generation verwendet. Zur Vermehrung der RPE Zellen wurde der Zellkulturmediumüberstand aus den Zellkulturschalen abgesaugt. Das in den Schalen enthaltene RPE wurde zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 1,5 ml Trypsin-EDTA bei 37°C für 7 Minuten inkubiert worunter sich die Zellen von den Zellkulturschalen lösten. Im nächsten Schritt wurde die Zellsuspension abpipetiert, in einem Falcon gesammelt und bei 900 rpm über 5 min zentrifugiert. Nach Abnehmen des im Falcon enthaltenen Flüssigkeitsüberstands wurde das Zellpellet in RPE-Zellkulturmedium gelöst und in mit 2 ml Zellkulturmedium befüllte Kulturschalen gegeben.

### **2.2.3. Immunzytochemie**

Iba-1 ist ein Marker für Mikrogliazellen (Graeber and Streit, 2010). Zur Bestimmung der Reinheit der Mikrogliakultur wurden Fluoreszenzfärbungen mit dem Mikrogliamarker Anti Iba-1-Ak als 1. Antikörper (Ak) und Alexa-Fluor 488 als fluoreszierender 2. Ak vorgenommen. Nachdem der 1. Ak an sein Antigen (Ag) – in diesem Fall Iba-1 gebunden hat soll der fluoreszierende 2. Ak spezifisch an den 1. Ak binden und das Fluoreszenzsignal die erfolgreiche Bindung von 1. und 2. Ak messbar machen

(Ohsawa et al., 2004). Bei Zellen ohne Iba-1 als mikroglia-spezifisches immunhistochemisches *target* ist bei vergleichbarer Belichtungszeit keine Fluoreszenz nachweisbar. Der Quotient aus fluoreszierenden zu nicht fluoreszierenden Zellen gab Aufschluss über die Reinheit der Mikroglia-kultur. BisBenzimid diente zur Färbung der Zellkerne und zur Bestimmung der Gesamtzahl der ausgewerteten Zellen. BisBenzimid ist ein membranpermeabler, fluoreszierender, die DNA in A-T-Regionen interkalierender Farbstoff. Drei Färbungen mit  $100 \times 10^3$  Mikrogliazellen pro Deckglas wurden mit 1., 2. Antikörper und bisBenzimid gefärbt, als Kontrolle dienten 3 mit denselben Kulturen durchgeführte Färbungen, die nur mit dem 2. Antikörper gefärbt wurden. Die Kontrollen wurden mit derselben Belichtungszeit wie die Iba-1-Färbungen ausgewertet, um unspezifische Bindungen des 2. Antikörpers auszuschließen.

Die Mikrogliazellen wurden zentral auf  $24 \times 24$  mm, entfetteten Deckgläsern in 6-Well Zellkulturplatten in  $100 \mu\text{l}$  Zellkulturmedium ausgesät. Um mögliche Verunreinigungen mit Zellkulturrückständen zu beseitigen wurde der Zellrasen drei Mal mit je 2 ml PBS gespült. Daraufhin wurden die Zellen mit 1 ml Zamboni-Fixierlösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur behandelt. Es folgte ein erneutes 3 maliges Spülen des Zellrasens mit je 2 ml PBS. Um die Fixierung sicherzustellen wurde mit je 2 ml Aceton nachfixiert. Die Zellen wurden wiederum drei Mal mit je 2 ml PBS gewaschen. Unspezifische Bindungen der fixierten Mikrogliazellen wurden durch Zugabe von jeweils  $150 \mu\text{l}$  0,75%-igen BSA-PBS Lösung und anschließender Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur blockiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Mikrogliazellen anschließend 3 Mal mit je 2 ml PBS gewaschen. Für den Iba-1 Ag Nachweis wurde Iba-1 1:500 in 0,75 %igen BSA gelöst und als 1. Antikörper für 60 Minuten auf die fixierte Mikroglia gegeben. Nachfolgend wurden die Mikrogliazellen 3 Mal mit je 2 ml PBS gewaschen.

Der 2. Antikörper wurde in 0,75% PBS verdünnt, auf die Deckgläser gegeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Zellen drei Mal mit je 2 ml PBS gespült. Die Zellkerne wurden durch Färbung mit  $100 \mu\text{l}$  bisBenzimid Lösung dargestellt, die Zellen anschließend drei Mal mit je 2 ml PBS und 1 Mal mit 2 ml destilliertem Wasser gewaschen. Zum Eindecken wurden Objektträger mit Immuno-Mount, 1 Tropfen pro Deckglas, behandelt. Abschließend wurden die Deckgläser mit einer Pinzette luftblasenfrei auf die Objektträger gelegt, die Zellseite war dabei auf die Objektträger ausgerichtet. Die Auswertung von 8 Bildern pro Färbung wurde mit dem Fluoreszenzmikroskop Axio Imager Z1 der Firma Carl Zeiss durchgeführt.

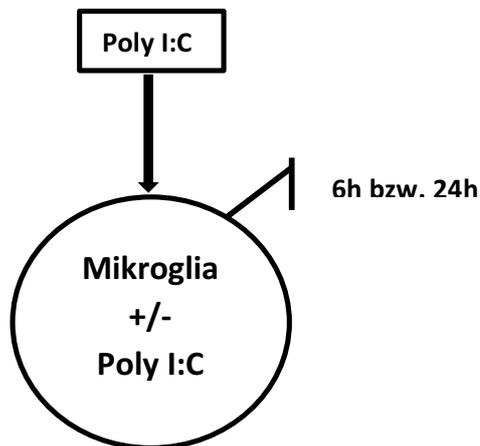
#### **2.2.4. Stimulation des retinalen Pigmentepithels**

Zur Stimulation des RPEs wurde der Überstand des Zellmediums abpipetiert und 3 ml Stimulationsmedium versetzt mit Polyinosinic polycytidylic acid (Poly I:C) in ansteigenden Konzentrationen [0 g/ml], [100 ng/ml], [1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ], [10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ], [100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ] für 24 Stunden auf den

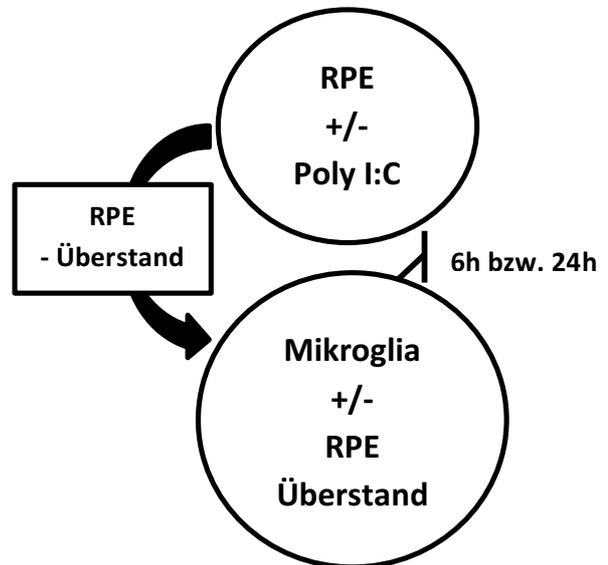
Zellrasen aus RPE gegeben. Im nächsten Schritt wurde der Überstand abgenommen, zentrifugiert und durch einen Filter mit 0,4 µm Porenweite filtriert.

## 2.2.5. Stimulation retinaler Mikroglia

### a) Kontrolle



### b) Experiment



#### a) Kontrollgruppe:

400 x 10<sup>3</sup> aus der Kultur gewonnene Mikrogliazellen wurden in 6er Well Platten ausgesät und in der Kontrollgruppe mit Stimulationsmedium, dass in ansteigenden Konzentrationen ([0 g/ml], [100 ng/ml], [1 µg/ml], [10 µg/ml], [100 µg/ml]) mit Poly I:C versetzt wurde, stimuliert. Die Stimulation mit Poly I:C erfolgte abhängig vom Aufbau des Experiments für 6 bzw. 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> Begasung.

#### b) Experimentgruppe:

400 x 10<sup>3</sup> aus der Kultur gewonnene Mikrogliazellen wurden in 6er Well Platten ausgesät und in der Experimentgruppe mit dem Überstand von mit in aufsteigender Poly I:C Konzentration ([0 g/ml], [100 ng/ml], [1 µg/ml], [10 µg/ml], [100 µg/ml]) stimulierten RPE behandelt. Die Stimulation der Mikroglia mit dem Überstand von mit Poly I:C behandelten RPE erfolgte abhängig vom Aufbau des Experiments für 6 bzw. 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> Begasung.

Abb.2.1. Stimulation retinaler Mikroglia

### 2.2.6. Isolation der mRNA

Um den Effekt der Interaktion zwischen RPE und Mikroglia messbar zu machen wurde die Methode der *real-time* Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (*real-time* RT-PCR) gewählt. Dafür wurde die *messenger* RNA (mRNA) aus der stimulierten Mikroglia isoliert, quantifiziert und in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Zur Isolierung der mRNA wurde der Mediumüberstand des Versuchsansatzes abgenommen, die Zellen lysiert und die enthaltene RNA wie von Ribaudo et al., (2001) beschrieben isoliert.

Zu Beginn des Verfahrens wurde die Mikroglia drei Mal mit 500 µl PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Trizol Reagenz lysiert (Klettner et al., 2001). Die Lysate wurden mit einem Zellschaber vom Boden der Zellkulturplatten gelöst und in Eppendorfreaktionsgefäße überführt. Anschließend wurden 20 µl Chloroform pro Eppendorfreaktionsgefäß hinzugefügt. Die Gefäße wurden per Hand 15 Sekunden lang aufgeschüttelt und anschließend für 2 Minuten bei 15 bis 30 °C inkubiert. Daraufhin wurden die Ansätze für 15 Minuten bei 12000 x g und 2-8 °C zentrifugiert. Nach diesem Schritt zeigte sich jeder Ansatz in 3 Phasen aufgeteilt. In eine untere rote Phenolphase, die DNA und Proteine enthielt, in eine mittlere Interphase, ebenfalls DNA und Proteine, sowie eine obere wässrige Phase, die RNA enthielt. Die obere RNA enthaltene Phase wurde in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Es folgt die Zugabe von je 1 µl Glycogen (70 mg/ml) pro Ansatz. Jeder Ansatz wurde daraufhin per Hand aufgeschüttelt. Im weiteren wurde 500 µl Isopropylalkohol pro Ansatz hinzugefügt, die Ansätze erneut aufgeschüttelt und nach 10-minütiger Inkubation bei 15-30°C für 10 Minuten bei 12000 x g und 8-10 °C zentrifugiert. Die RNA stellte sich als gelartiges Pellet am Boden der Reaktionsgefäße dar. Die Überstände der Ansätze wurden entfernt und die RNA-Pellets mit je 1 ml Ethanol (75 %) pro Ansatz gewaschen und anschließend 5 Minuten bei 7500 x g und 2-8 °C zentrifugiert. Daraufhin wurden die Überstände abgenommen und die RNA-Pellets unter der Sterilwerkbank luftgetrocknet. Abschließend wurden die RNA-Pellets abhängig von ihrer Größe in je 20-50 µl RNase-freiem und 2-fach destillierten Wasser durch 10 minütige Inkubation bei 55-60 °C im Heizblock gelöst und die isolierte RNA quantifiziert.

### 2.2.7. Quantifizierung der extrahierten RNA

Die Bestimmung der RNA-Menge und Reinheit erfolgte durch ultraviolette (UV) – Spektrophotometrie mit dem Epoche Microplate Spectrophotometer. Die Absorbtionsspektren von je 2 µl der isolierten RNA Proben wurden den Spektren der Kontrollen, je 2 µl destillierten Wassers gegenübergestellt. Wellenlängen von 260 nm ( $A_{260}$ ) dienten der Quantifikation der RNA, während Wellenlängen von 280 nm ( $A_{280}$ ) der Bestimmung des Proteinanteils und der Qualitätskontrolle der

RNA Proben dienen. Der Quotient aus beiden Werten  $A_{260} / A_{280}$  gab die Reinheit der Probe an. Gefordert sind Werte zwischen 2,0 und 1,7 (Delidow et al., 1996). Proben die diesem Reinheitsgrad entsprachen wurden in die weiteren Experimente mit einbezogen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Gen5™.

### 2.2.8. RT-PCR – Synthese und Amplifikation von cDNA

Um die mRNA in stabilere cDNA umzuschreiben wurde die Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) durchgeführt. Die RT-PCR besteht aus 2 Schritten. Erstens der reversen Transkription von mRNA in cDNA und zweitens der Amplifikation der cDNA in der PCR (Ohan and Heikkila, 1993). In dieser Arbeit wurde die *one-step* RT-PCR verwandt, in der beide Schritte nacheinander in einem Ansatz ablaufen. Nach Bestätigung der Reinheit der isolierten mRNA wurde diese zunächst in einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Zur Generierung von cDNA macht man sich die Fähigkeit der Retro-Viren zu Nutze, die Richtung der normalen Transkription umzukehren (Baltimore, 1970; Temin and Mizutani, 1970). Dies ermöglicht es, aus mRNA die stabilere cDNA zu gewinnen. Bei höheren Temperaturen denaturiert die RNA. Während des nachfolgenden Abkühlens hybridisieren die hinzugegebenen *random* Primer (Oligonucleotide) mit der mRNA. Die Primer dienen als Startpunkt für die reverse Transkriptase. Sie synthetisiert mit der mRNA als Vorlage (Matrize) in 5'-3' Richtung unter Zugabe von Desoxyribonukleosid-Triphosphaten (dNTPs) cDNA. Die entstandene cDNA wird in der PCR weiter nach dem Zyklus – Denaturierung der cDNA, Annealing – Bindung der Primer an die komplementären Einzelstränge und Elongation – Synthese von cDNA in 5'-3' Richtung amplifiziert (Ishmael and Stellato, 2008; Mullis et al., 1986; Ohan and Heikkila, 1993; Towbin, 1995). Die erhaltene cDNA kann für die nachfolgenden *real-time* RT-PCRs als Vorlage für die spezifische Amplifikation und Messung der Expression einzelner Faktoren genutzt werden.

Zur Herstellung der cDNA wurde zu jeweils 1 µg der gewonnenen mRNA 8 µl RNase freies 2-fachdestilliertes Wasser pipettiert und gegebenenfalls in den Ansätzen anfallende genomische DNA-Reste, durch Hinzufügen von 1 µl DNase (10000 units), 1 µl DNase Puffer und nachfolgender Inkubation im Thermocycler für 15 Minuten bei 37 °C, verdaut. Zum Unterbinden der DNase Aktivität wurden 1 µl Stopplösung (EDTA 25 mM) zu jedem Ansatz zugegeben und diese bei 65 °C im Thermocycler inkubiert. Nachfolgend wurde pro Ansatz 1 µl eines Random Primer Gemisches (0,2µg/µl) zu den Ansätzen pipettiert. Anschließend wurden die Ansätze für 5 Minuten bei 70°C in einem Thermocycler inkubiert. Im weiteren wurden je 7 µl eines Transkriptionsmixes bestehend aus 4 µl Reaktion Buffer, 2 µl dNTP – Mix 10 mM und 1 µl 2-fach destillierten Wassers zu den Ansätzen gegeben und diese anschließend für 5 Minuten bei 25 °C im Thermocycler inkubiert. Abschließend

wurden je 1 µl reverse Transkriptase zu den Ansätzen pipettiert, so dass sich in diesem Schritt der cDNA-Herstellung das Gesamtvolumen jedes Ansatzes auf 20 µl belief.

Im Thermocycler durchliefen die Ansätze zur RT-PCR folgendes Programm:

- 10 Minuten bei 25°C
- 60 Minuten bei 42°C
- 10 Minuten bei 70°C

Das Enzym wurde anschließend hitzeinaktiviert (Lorenz, 2012). Die gewonnene stabile cDNA wurde im Folgenden für die *real-time* RT-PCR verwendet (Overbergh et al., 2003).

### **2.2.9. *real-time* RT-PCR und relative Quantifikation**

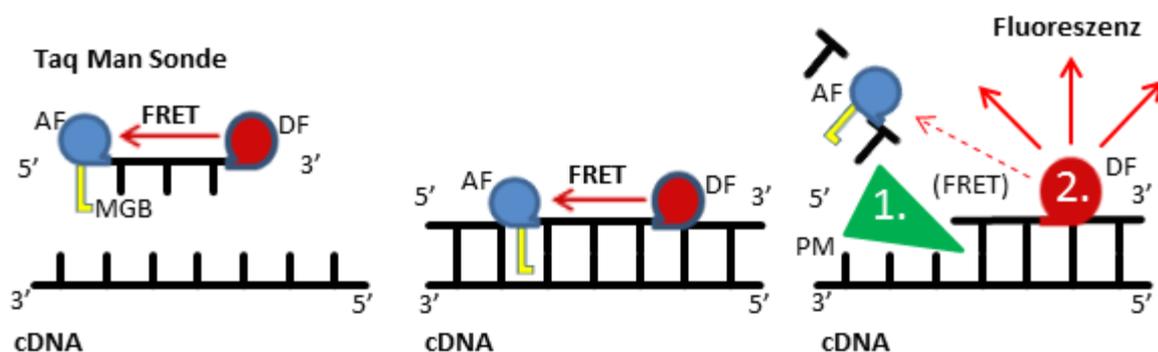
Um den Effekt der Interaktion Poly I:C stimuliertem RPE und retinaler Mikroglia messbar zu machen, untersuchten wir die Expression ausgewählter inflammatorischer und antiinflammatorischer Faktoren in der *real-time* RT-PCR. Wir wählten die Methode der relativen Quantifikation. Es wurden spezifische Primer verwendet, die exakt eine DNA Region begrenzen, um ausgewählte Abschnitte der cDNA zu amplifizieren. Diese werden relativ, das heißt in Relation zu einem konstitutiv exprimierten, nicht regulierten *housekeeping* Gen (HKG) – hier 18S – quantifiziert; dies gelingt durch Fluoreszenzmessung in Echt-Zeit (Pfaffl et. al, 2004). Die *real-time* RT-PCR beruht auf dem Prinzip der PCR: Denaturierung, Annealing, Elongation; in der Methode der relativen Quantifikation wird nicht die absolute Anzahl an Start-DNA bestimmt, sondern die Expression von Genen zu einander ins Verhältnis gesetzt (Kubista et al., 2006; Pfaffl et. al, 2004). Resultate dieser Methode erlauben den Rückschluss auf die relative Expression der zuvor aus den Zellen isolierten mRNA und somit der Expression der durch die Primer definierten Faktoren (Wong and Medrano, 2005), (Overbergh et al., 2003). Dies ermöglicht es uns Aussagen über die Interaktion von Mikroglia und RPE auf Zytokin- und Enzymebene zu treffen. Die Reaktionsansätze für die *real-time* RT-PCR setzten sich aus 10µl Taq-Man Universal master mix, 5 µl 2-fach destilliertem Wasser, 1µl *Assay on demand* (spezifischer Primer) und 4 µl zu untersuchender cDNA (2,5 µg/ml) zusammen. Es wurden stets doppelte Ansätze jedes Faktors quantifiziert. Die Amplifikationen erfolgten in 96-Well-Platten mit dem Applied Biosystems 7500/7500 *fast real-time* RT-PCR-System. Die Software ABI-PRISM 7500 diente zur Auswertung.

Im Gegensatz zur RT-PCR gelingt in der *real-time* RT-PCR nicht nur ein qualitativer, sondern auch ein quantitativer Nachweis spezifischer mRNA (Pfaffl et. al, 2004; Wong and Medrano, 2005). Die Expression des zu untersuchenden Faktors wird über die Fluoreszenz bestimmt (Pfaffl et. al, 2004). Es wird in jeder Probe zunächst der *Crossing Point* (CP-Wert), auch *threshold cycle* (Ct) bestimmt, der die Anzahl von Amplifikationszyklen angibt, ab dem ein definiertes Fluoreszenzniveau der Proben

vorliegt; in einer ideal funktionierenden *real-time* RT-PCR verdoppelt sich die Menge an cDNA pro Zyklus und entsprechend auch das Fluoreszenzsignal (Lorenz, 2012; Overbergh et al., 2003; Pfaffl et al., 2004), (Rasmussen, 2001). Ein um eine Einheit höherer CP-Wert bedeutet somit die Hälfte an initial eingesetzter cDNA. Der in diesem Schritt gemessene Fluoreszenzwert wird der Fluoreszenz bzw. der Expression einer endogenen Amplifikationskontrolle des *housekeeping* Gens (HKG) (aktive Referenz) gegenübergestellt (Pfaffl et al., 2004). Das konstitutionell exprimierte HKG wird somit co-amplifiziert. Durch die Gegenüberstellung dieser Fluoreszenzwerte werden die Ergebnisse normalisiert (Rasmussen, 2001). Der Vorteil dieser Methode liegt in der geringeren Varianz der Expressionsresultate, da Matrix und Gewebseffekte, sowie eventuelle Qualitätsschwankungen in der *real-time* RT PCR sowohl die Expression des HKG, als auch die des zu untersuchenden Faktors derselben Probe betreffen (Pfaffl et al., 2004; Rasmussen, 2001). Als HKG wurde in dieser Arbeit 18S (S=Svedberg Sedimentationskoeffizient) eukaryotische ribosomale RNA (rRNA) gewählt. Die 18S rRNA ist Teil der kleinen eukaryoten zytoplasmatischen ribosomalen 40S Untereinheit des Ribosoms und somit integraler Bestandteil des Proteinbiosyntheseapparats der eukaryoten Zelle. 18S zeigt unabhängig vom Status der untersuchten Zelle stabile Expressionslevel (Kianianmomeni and Hallmann, 2013).

Eine zusätzliche exogene Amplifikationskontrolle (auch passive Referenz) mit 6-Carboxy-X-rhodamin (ROX) wurde verwendet, um das Ergebnis beeinflussende Schwankungen in der Fluoreszenz zum Beispiel durch PCR-Inhibitoren wie Hämoglobin und Ethanol zu erfassen (Schrader et al., 2012), (Hartman et al., 2005). Hierzu wurde die Fluoreszenzintensität des Reporters (6-FAM™) der exogenen Amplifikationskontrolle ROX gegenübergestellt; das Ausbleiben des Fluoreszenzsignals der amplifizierten cDNA und der exogenen Amplifikationskontrolle ermöglicht es PCR-Inhibitoren zu detektieren (Hartman et al., 2005) – in diesem Fall wurde der komplette Versuch wiederholt. Die passive Referenz ROX war Teil des TaqMan *Universal PCR Master Mix*. Zur relativen Quantifizierung der cDNA während der *real-time* RT-PCR wurden TaqMan® *Gene expression Assays* verwendet. Ein Assay enthält die Oligonucleotidprimer (Primer) und 6-Carboxyfluorescein (6-FAM™) markierte TaqMan® *Minor Groove Binder* (MGB) Sonden. Diese Sonden binden spezifisch an eine komplementäre DNA-Sequenz auf dem zu amplifizierenden cDNA-Abschnitt, der von den Bindungsabschnitten der jeweiligen Primer umfasst wird; am 5' Ende sind die Sonden mit dem Fluoreszenzfarbstoff 6-FAM™ (Donorfluorochrom, *Reporter*) markiert (Afonina et al., 1997, 2002, Kutuyavin et al., 2000, 1997). Am 3' Ende tragen sie einen Akzeptorfluorochrom (*Quencher*), sowie den MGB. Wenn die Sonde intakt ist, auch im mit der cDNA hybridisierten Zustand, wird die Fluoreszenz von 6-FAM™ (Donorfluorochrom, *Reporter*) durch die räumliche Nähe zum Akzeptorfluorochrom unterdrückt, primär im Rahmen des Förster-Resonanzenergietransfers (FRET) vom Donor- zum Akzeptorfluorochrom (Förster, 1948), (Afonina et al., 2002; Holland et al., 1991). Je

geringer die Distanz zwischen Donor- und Akzeptorfluorochrom ist, desto größer ist der Energietransfer und umso geringer ist die messbare Fluoreszenz des Donorfluorochroms (*Reporter*) – hier 6-FAM™ (Afonina et al., 2002; Holland et al., 1991). Die Elongation der Primer durch die TaqMan DNA-Polymerase erfolgt analog zur RT-PCR in der Polymerisationsphase. Erst durch die 5′-3′-Exonuclease-Aktivität der TaqMan DNA- Polymerase werden 3′-wärts gelegene hybridisierte Sonden aufgespalten (Holland et al., 1991). Die Distanz von Donorfluorochrom und Akzeptorfluorochrom nimmt zu, der FRET lässt nach und die Reporter Fluoreszenz von 6-FAM™ nimmt messbar zu. Nur wenn die Zielsequenz auf der cDNA, an die die Sonde bindet, komplementär zur Sequenz der Sonde ist und dieser Abschnitt während der *real-time* RT-PCR amplifiziert wird kommt es zur Trennung von Donorfluorochrom und Akzeptorfluorochrom und zur Registrierung des Anstiegs der Fluoreszenz, der Ausdruck der Expression der betreffenden mRNA ist (Holland et al., 1991; Kubista et al., 2006; Overbergh et al., 2003; Pfaffl et. al, 2004; Wong and Medrano, 2005), (Afonina et al., 2002). MGBs binden von außen in die kleinen Furchen der DNA, meist an AT-reichen Regionen und erhöhen sowohl die Stabilität der Bindung, als auch die Spezifität der Sonde (Kutyavin et al., 2000),(Kutyavin et al., 1997) (Afonina et al., 2002). Dies ermöglicht eine Erhöhung der Oligonucleotid Schmelztemperatur ( $T_m$ ), wodurch eine für die *real-time* PCR optimale  $T_m$  von 65-67°C erreicht werden kann (Afonina et al., 1997, 2002).



**Abb. 2.2. *real-time* RT-PCR:** DF = Donorfluorochrom, AF=Akzeptorfluorochrom, MGB = Minor Groove Binder, FRET = Förster Resonanzenergietransfer, PM (grün) = TaqMan DNA-Polymerase, 1. Spaltung der Taq Man Sonde durch 5′-3′-Exonuclease-Aktivität der TaqMan DNA-Polymerase, 2. Anstieg der Fluoreszenz nach Trennung von Akzeptor- und Donorfluorochrom

### 2.2.10. $\Delta\Delta CP$ -Methode

Bei der relativen Quantifikation mit der  $\Delta\Delta CP$ -Methode wird nicht die absolute Anzahl an Startkopien von cDNA bestimmt, sondern die Expression von Genen zu einander ins Verhältnis gesetzt. Ergebnisse dieser Methode erlauben den Rückschluss auf die relative Expression der aus den Zellen isolierten mRNA und damit der Expression der durch die Primer definierten Faktoren (Pfaffl et. al, 2004; Wong and Medrano, 2005). Die Quantifizierung gelingt durch Echtzeit-

fluoreszenzmessungen während der exponentiellen Phase nach Überschreiten des *crossing points* (CP) der *real-time* RT-PCR. Der CP beschreibt den PCR-Zyklus zu dem die Fluoreszenz signifikant über der Hintergrund-Fluoreszenz liegt. In einer idealen *real-time* RT-PCR bildet ein um eine Einheit höherer CP, die doppelte Startmenge von cDNA ab. Wie beschrieben wird die Expression eines Gens auf die Expression eines HKGs bezogen und damit normalisiert; dadurch sinkt die Varianz der Expressionsergebnisse (Pfaffl et. al, 2004; Rasmussen, 2001).

Zur Berechnung des *relative quantification* Wertes (RQ-Wert) wird zunächst für jede Probe der CP-Wert des Referenzgens vom CP-Wert des betreffenden Zielgens subtrahiert, entsprechend  $\Delta CP = CP\text{-Zielgen} - CP\text{-Referenzgen}$  (Livak and Schmittgen, 2001; Pfaffl et. al, 2004). Dieser Schritt beinhaltet die Normalisierung der Expressionsergebnisse (Pfaffl et. al, 2004). Im Folgenden wird der  $\Delta CP$  Wert der Kontrolle vom  $\Delta CP$  Wert des Experiments abgezogen; dadurch erhalten wir den  $\Delta\Delta CP$  Wert, entsprechend  $\Delta\Delta CP = \Delta CP\text{-Experiment} - \Delta CP\text{-Kontrolle}$  (Livak and Schmittgen, 2001; Pfaffl et. al, 2004). Ausgehend vom  $\Delta\Delta CP$ -Wert kann über die Formel  $2^{-\Delta\Delta CP}$  (Livak and Schmittgen, 2001) der RQ-Wert bestimmt werden. Es handelt sich dabei um den relativen Expressionsunterschied eines Ansatzes zwischen dem Experiment und der Kontrolle, entsprechend  $RQ = 2^{-\Delta\Delta CP}$  (Livak and Schmittgen, 2001; Pfaffl et. al, 2004).

### **2.2.11. Statistische Analyse**

Alle Experimente wurden unabhängig voneinander 3-5 Mal wiederholt. Die Signifikanz wurde mit ungepaarten Student's t-tests mit der Software Microsoft Office 2010 für Windows™ mit dem Programm Excel bestimmt.

### **2.2.12. Textverarbeitung und Layout**

Zur Textverarbeitung wurde die Software Microsoft Office 2010 für Windows™ mit dem Programm Microsoft Word verwendet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Etablierung der Mikrogliakultur aus porcinen Retinae

In enger Kooperation mit Prof. Dr. rer. nat Lucius (Direktor des anatomischen Instituts der Christian-Albrechts-Universität Kiel) gelang es - aufbauend auf der Arbeit von (Richardson et al., 1993), der zeigte, dass primäre Astrozytenkulturen stets Mikroglia progenitorzellen enthalten, Mikroglia kulturen aus porcinen Retinae anzulegen.

##### 3.1.1. Lichtmikroskopische Beobachtungen

Nach Aussaat der Zellen erfolgte in regelmäßigen Abständen der lichtmikroskopische Nachweis eines adäquaten Zellrasens (*feederlayer*) aus Astrozyten am Boden der Zellkulturflaschen. Die hellen, lose dem *feederlayer* aufgelagerten oder frei flottierenden Zellen sind Mikrogliazellen. Regelmäßige pH-Wert und lichtmikroskopische Kontrollen wurden zum frühzeitigen Ausschluss einer Kontamination der Kultur verwandt

Abb.3.1.

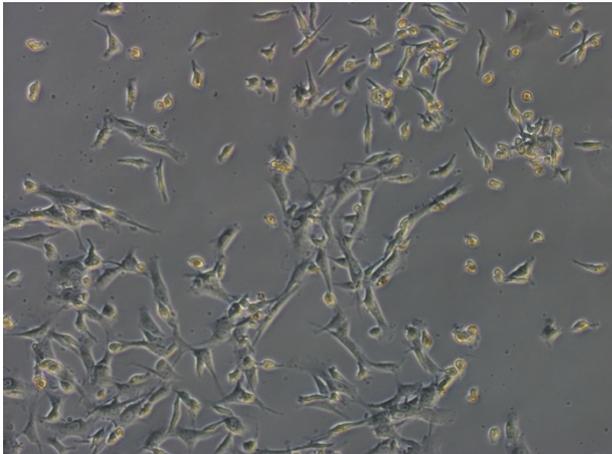


Abb.3.2.

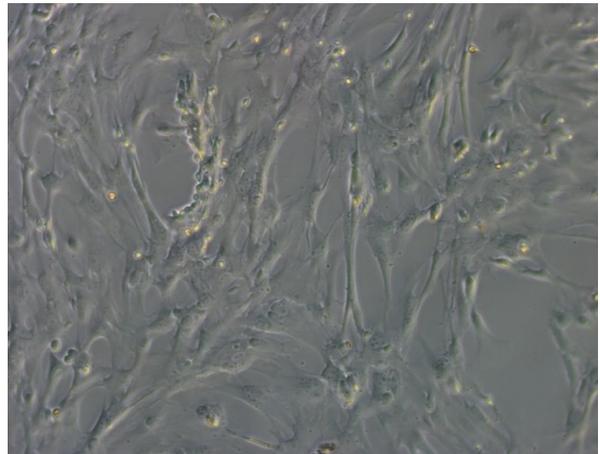
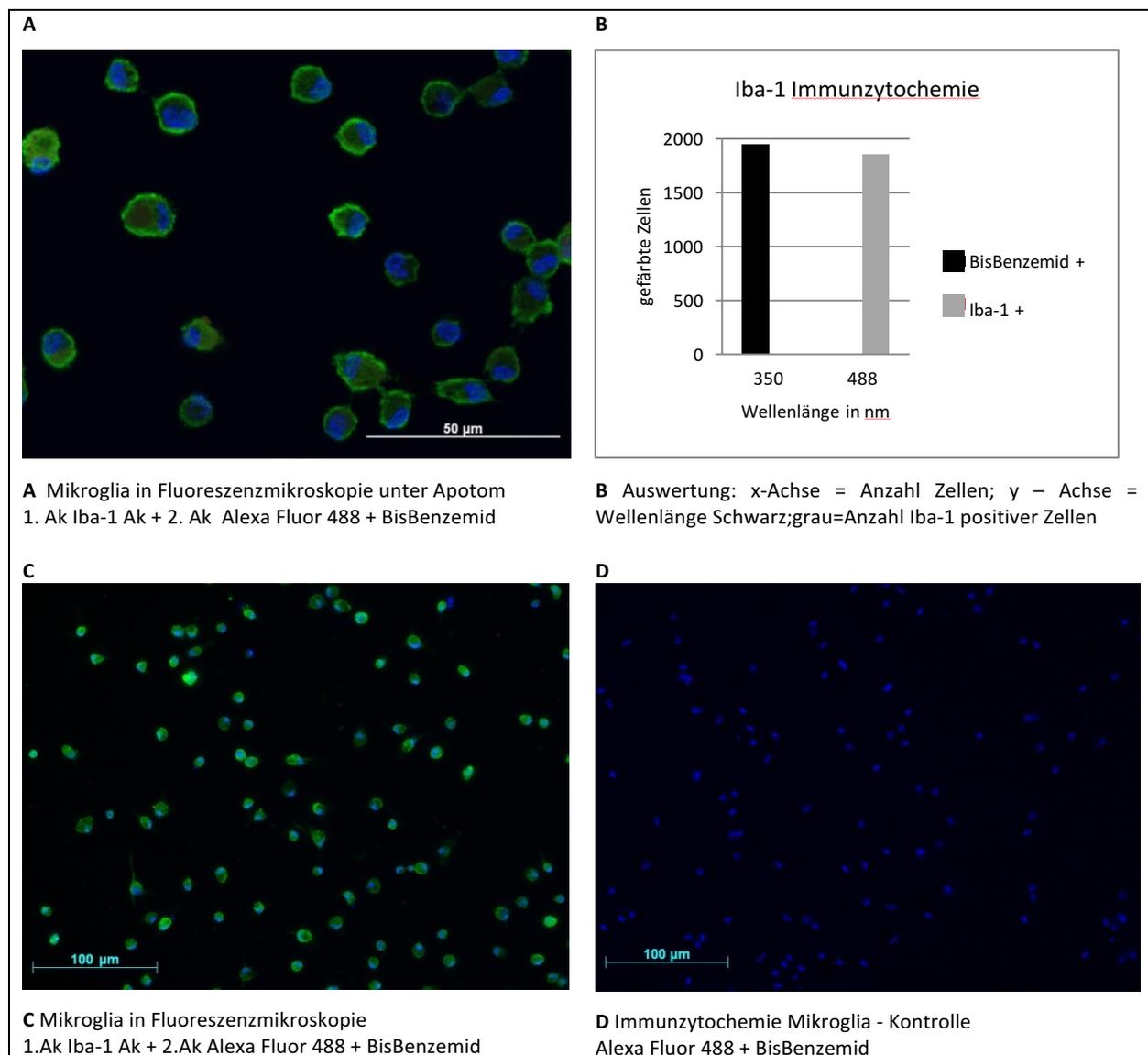


Abb.3.1., Abb.3.2. retinale Mikroglia und *feederlayer* im Lichtmikroskop 20x vergrößert; Abb.3.1. am 13. Kulturtag, Abb 3.2. am 15. Kulturtag

##### 3.1.2. Immunzytochemie

Bei erfolgreicher Kultur wurden die Mikrogliazellen aus den Zellkulturflaschen gewonnen. Der Mikroglia-Nachweis erfolgte wie oben beschrieben immunzytochemisch mit dem Anti-Iba-1 Antikörper als 1. und Alexa Fluor 488 als 2. Antikörper. BisBenzimid diente als Kernfärbung. Als Kontrolle dienten zeitgleich erfolgte Färbungen die ohne 1. Antikörper, nur mit 2. Antikörper Alexa Fluor 488 und bisBenzimid behandelt wurden. Es wurden 3 verschiedene Mikroglia kulturen, die auch Teil der *real-time* RT-PCR Experimente waren und nach identischem Protokoll generiert wurden getestet. Die

Auswertung von mindestens 8 Bildern pro Färbung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop. Die Kontrollen wurden mit derselben Belichtungszeit wie die Iba-1-Färbungen ausgewertet, um unspezifische Bindungen des 2. Antikörpers in der Beurteilung der Iba-1 positiven Färbungen auszuschließen. Von den 1945 ausgezählten mit 1.,2. Antikörper und bisBenzimid behandelten Zellen zeigten 1855, 95% ein deutlich positives Färbeverhalten für Iba-1. Auch bei höherer Bildanzahl pro Färbung ergab sich ein vergleichbares Ergebnis. Für 11 Bilder pro Färbung zeigte sich in den oben beschriebenen Färbungen ein Verhältnis von 2387 Zellen mit positiven Färbeverhalten für Iba-1 gegenüber einer Gesamtzellzahl von 2510 entsprechend einem Mikrogliaanteil von 95%. In der Kontrollgruppe zeigten von 1075 ausgezählten mit 2. Antikörper und bisBenzimid gefärbten Zellen in <1% eine erkennbare Fluoreszenz bei gegenüber der Iba-1-Färbung identischen Belichtungszeit und Wellenlänge.



**Abb. 3.3.: Ergebnisse Immunzytochemie retinaler Mikroglia**

### 3.2. Ergebnisse *real-time* RT-PCR – Aufbau und Auswertung

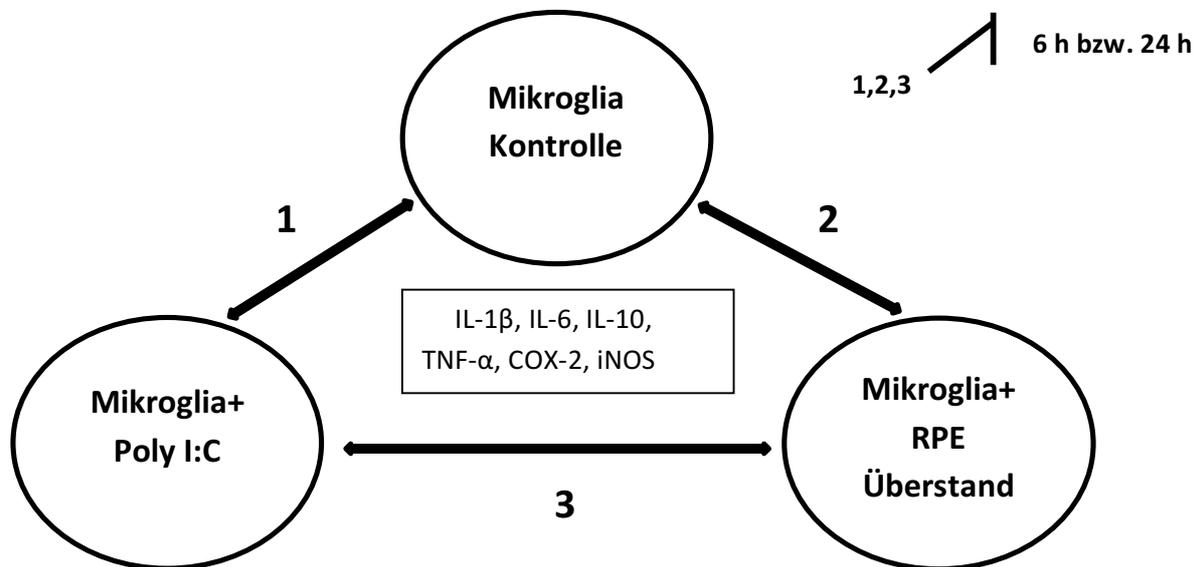


Abb.3.4. Aufbau und Auswertung der Versuche

1 Mikroglia + Poly I:C gegenüber unstimulierter Mikroglia (Kontrolle); 2 Mikroglia + RPE Überstand gegenüber unstimulierter Mikroglia (Kontrolle) 3 Mikroglia + RPE Überstand gegenüber Mikroglia + Poly I:C 1,2,3 jeweils für 6 h bzw. 24 h Stimulation

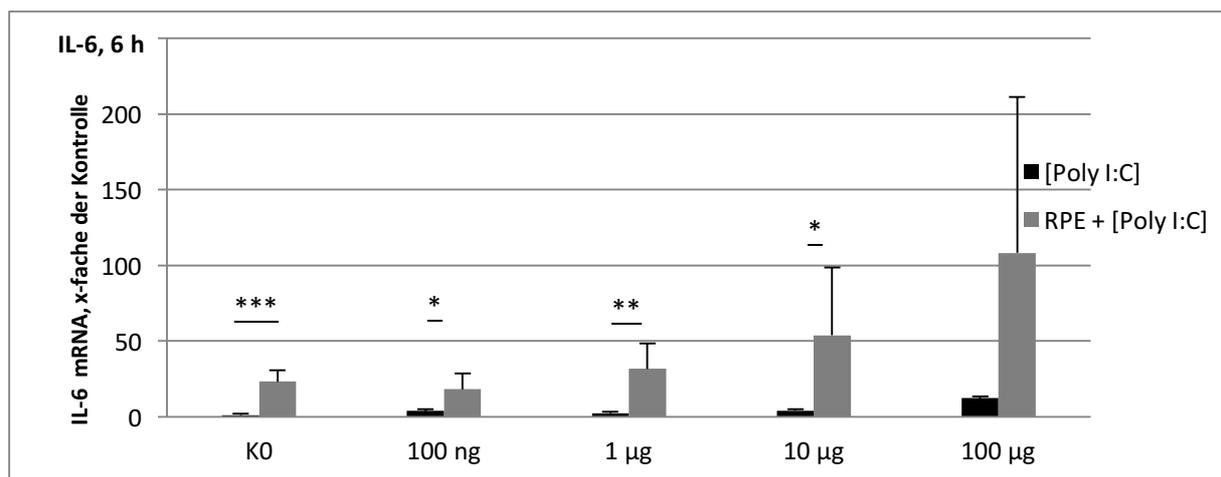
### 3.3. Ergebnisse *real-time* RT-PCR – Zytokine

#### 3.3.1. Expression von IL-6 in retinaler Mikroglia nach 6 h Stimulation

Die Stimulation von Mikroglia mit Poly I:C über 6 Stunden zeigte einen konzentrationsabhängigen signifikanten Anstieg der Expression von IL-6 ab einer Poly I:C – Konzentration von 1 µg/ml Stimulationsmedium ([Poly I:C] = 1 µg/ml). Bei Stimulation der retinalen Mikroglia mit einer Poly I:C Konzentration von 100 ng/ml zeigte sich ein Anstieg der Expression um das  $3,78 \pm 3,73$ -fache,  $0,05 < p < 0,1$  des Kontrollwerts. Ab [Poly I:C] 1 µg/ml zeigte sich eine signifikante Steigerung der IL-6 Expression um das  $2,35 \pm 0,84$ -fache,  $p < 0,05$  gegenüber der Kontrolle. Bei den höher konzentrierten Werten stellte sich eine weitere Steigerung der IL-6 Expression dar. In den Ansätzen mit [Poly I:C] = 10 µg/ml fand sich die  $4,13 \pm 2,41$ -fache,  $p < 0,05$  und mit [Poly I:C] = 100 µg/ml die  $12,26 \pm 8,44$ -fache,  $p < 0,05$  Expression von IL-6 gegenüber der Kontrolle. Die über 6 Stunden mit Überständen von RPE behandelten Mikroglia-Ansätze zeigten einen statistisch signifikanten Anstieg der IL-6 Expression. Die Expression von IL-6 mRNA stieg bei Stimulation mit RPE-Überständen, ohne Zugabe von Poly I:C um das  $23,29 \pm 7,33$ -fache,  $p < 0,001$ . Bei

der Stimulation von Mikroglia mit Überständen von mit [Poly I:C] = 100 ng/ml stimuliertem RPE zeigte sich eine Expressionssteigerung um das  $18,20 \pm 10,46$ -fache,  $p < 0,05$ . Die Stimulation mit RPE + [Poly I:C] = 1 µg/ml ergab eine signifikante Zunahme der Expression von IL-6, um das  $31,60 \pm 16,77$ -fache,  $p < 0,05$ . Die Stimulation der Mikroglia mit RPE + [Poly I:C] = 10 µg/ml führte zur  $53,90 \pm 44,65$ -fachen,  $p > 0,05$ , die Stimulation mit RPE + [Poly I:C] = 100 µg/ml zur  $108,215 \pm 103,20$ -fachen,  $p > 0,05$  Expression von IL-6.

Im nächsten Schritt wurden die Ergebnisse der mit Überständen von TLR-3 stimulierten RPE behandelten Mikroglia denen der mit Poly I:C stimulierten Mikroglia gegenübergestellt. Es zeigte sich eine signifikante Steigerung der Expression des proinflammatorischen IL-6 in der mit RPE Überstand stimulierten Mikroglia gegenüber der mit Poly I:C stimulierten Mikroglia für [Poly I:C]= 100 ng/ml,  $p < 0,05$ ; 1 µg/ml  $p < 0,01$ ; 10 µg/ml,  $p < 0,05$ .



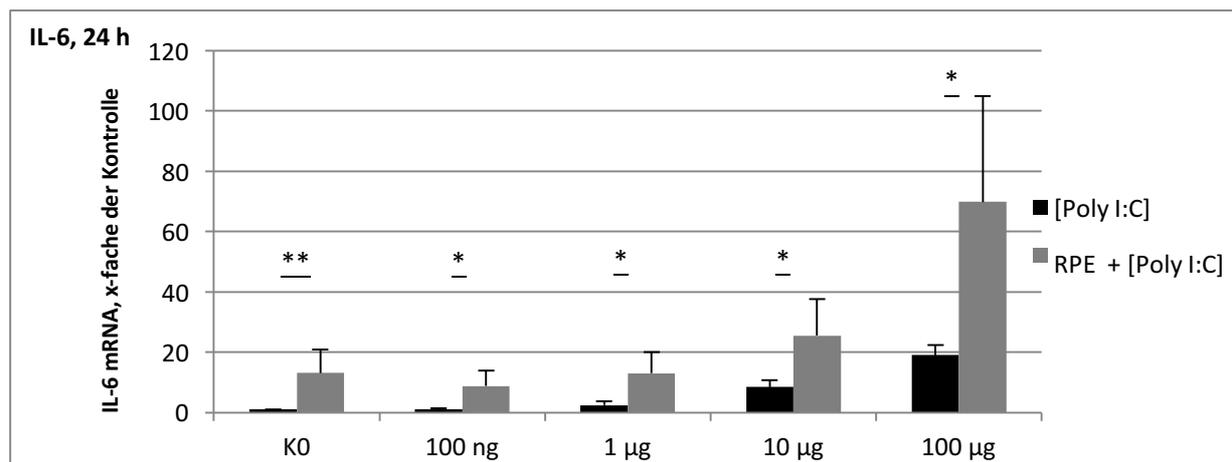
**Abb.3.5. real-time RT-PCR IL-6, 6 h:** Bestimmung der Expression von IL-6 in retinaler Mikroglia nach 6 h Stimulation. x-Achse Konzentration Poly I:C/ml Stimulationsmedium, y-Achse IL-6 mRNA, x-fache der Kontrolle. Die Zielgenexpression wurde gegenüber dem HKG 18S normalisiert. Die Berechnung der Daten erfolgte mit der  $\Delta\Delta C_P$ -Methode. Retinale Mikroglia wurde mit Poly I:C (schwarz) oder Überständen von mit Poly I:C behandeltem RPE stimuliert (grau). Die markierten Signifikanzen zwischen Mikroglia + Poly I:C und Mikroglia + RPE Überstand wurden mit dem *student's t-test* bestimmt. \* =  $0,01 > p < 0,05$ ; \*\* =  $0,001 > p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$

### 3.3.2. Expression von IL-6 in retinaler Mikroglia nach 24 h Stimulation

In der über 24 Stunden mit Poly I:C stimulierten retinalen Mikroglia zeigte sich ein konzentrationsabhängiger, signifikanter Anstieg der IL-6 Expression ab einer Poly I:C – Konzentration von 10 µg/ml. Für [Poly I:C] = 100 ng/ml ergab sich eine  $1,01 \pm 0,35$ -fache,  $p > 0,05$ , für [Poly I:C] = 1 µg/ml eine  $2,43 \pm 1,31$ -fache,  $p > 0,05$  Verstärkung der IL-6 Expression. Für [Poly I:C] = 10 µg/ml zeigte sich ein signifikante Steigerung der IL-6 Expression, um das  $8,41 \pm 2,27$ -fache,  $p < 0,01$ , für [Poly I:C] = 100 µg/ml um das  $19,07 \pm 3,31$ -fachen,  $p < 0,001$  Expression von IL-6 gegenüber der Kontrolle.

Die 24-stündige Stimulation der Mikroglia mit Überständen von Poly I:C stimulierten RPE ergab einen statistisch signifikanten, konzentrationsabhängiger Anstieg in der Expression von IL-6. Die mit RPE Überstand, ohne Poly I:C-Stimulation behandelten Ansätze zeigten die  $13,14 \pm 7,64$ -fache,  $p < 0,001$  Menge von für IL-6 codierender mRNA. Für RPE + [Poly I:C]=100 ng/ml wurde die  $8,75 \pm 5,09$ -fache,  $p < 0,01$ , für RPE + [Poly I:C] = 1 µg/ml die  $13,00 \pm 7,05$ -fache  $p < 0,01$  und für RPE + [Poly I:C] = 10 µg/ml die  $25,51$ -fache  $\pm 12,03$ -fache,  $p < 0,01$  Expression von IL-6 bestimmt. Wie auch in der mit Poly I:C behandelten Mikroglia fand sich in der mit RPE-Überstand behandelten Gruppe die deutlichste Steigerung der Expression von IL-6 bei der höchsten Poly I:C-Konzentration. In mit RPE + [Poly I:C]=100 µg/ml stimulierter Mikroglia zeigte sich eine  $69,85 \pm 35,06$ -fache,  $p < 0,01$  Steigerung der Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-6.

In der Gegenüberstellung der 24 Stunden-Werte der mit RPE-Überständen behandelten gegenüber der mit Poly I:C behandelten Mikroglia zeigten sich für alle Konzentrationswerte signifikante Unterschiede. Bei [Poly I:C] = 100 ng/ml  $p < 0,05$ ; 1 µg/ml  $p < 0,05$ ; 10 µg/ml  $p < 0,05$ ; 100 µg/ml  $p < 0,05$ .



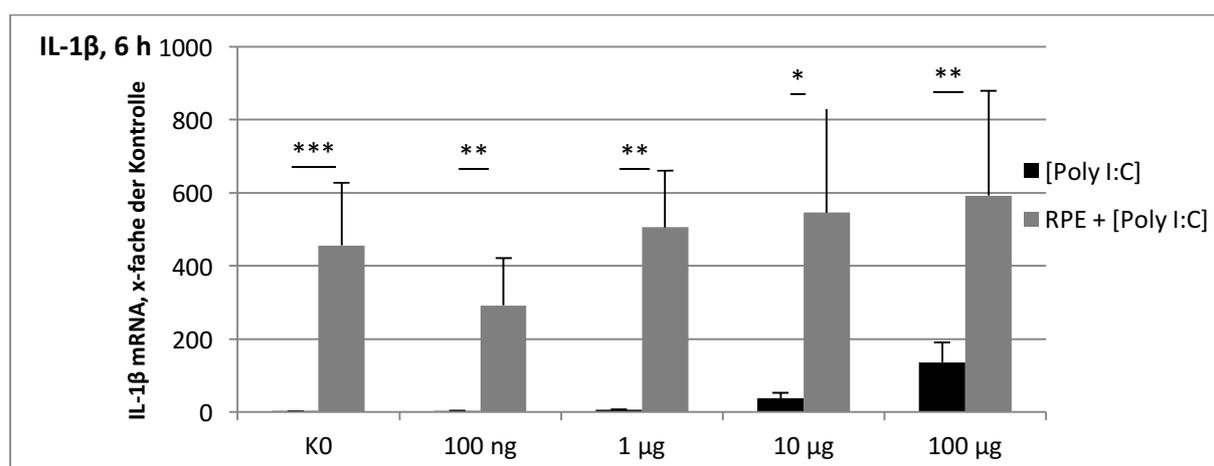
**Abb.3.6. real-time RT-PCR IL-6, 24 h:** Bestimmung der Expression von IL-6 in retinaler Mikroglia nach 24 h Stimulation. x-Achse Konzentration Poly I:C/ml Stimulationsmedium; y-Achse IL-6 mRNA, x-fache der Kontrolle. Die Zielgenexpression wurde gegenüber dem HKG 18S normalisiert. Die Berechnung der Daten erfolgte mit der  $\Delta\Delta\text{CP}$ -Methode. Retinale Mikroglia wurde mit Poly I:C (schwarz) oder Überständen von mit Poly I:C behandeltem RPE stimuliert (grau). Die markierten Signifikanzen zwischen Mikroglia + Poly I:C und Mikroglia + RPE Überstand wurden mit dem *student's t-test* bestimmt. \* =  $0,01 > p < 0,05$ ; \*\* =  $0,001 > p < 0,01$

### 3.3.3. Expression von IL-1 $\beta$ in retinaler Mikroglia nach 6 h Stimulation

In der 6-stündigen Stimulation von Mikroglia mit Poly I:C bestimmten wir eine signifikante, konzentrationsabhängige Steigerung der Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-1 $\beta$  bei [Poly I:C] = 1  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml und 100  $\mu$ g/ml. Für [Poly I:C]=100 ng/ml zeigte sich eine  $2,08 \pm 1,6$ -fache,  $p > 0,05$  erhöhte Expression. Eine signifikante Steigerung, um das  $5,64 \pm 1,03$ -fache,  $p < 0,01$  zeigte sich für [Poly I:C]=1  $\mu$ g/ml. Die mit [Poly I:C]=10  $\mu$ g/ml bzw. 100  $\mu$ g/ml behandelten Ansätze zeigten eine  $36,80 \pm 16,14$ -fache bzw.  $135,47 \pm 54,88$ -fache mit jeweils signifikanter  $p < 0,05$  Expressionssteigerung von IL-1 $\beta$ .

Die Stimulation der Mikroglia mit Überständen von Poly I:C behandeltem RPE zeigte in jeder getesteten Gruppe eine statistisch signifikante Zunahme der IL-1 $\beta$  Expression. In der nur mit RPE-Überständen behandelten Mikroglia fand sich eine  $455,48 \pm 171,59$ -fache,  $p < 0,01$  Steigerung der Expression. Für die mit RPE+[Poly I:C] = 100 ng/ml stimulierte Mikroglia zeigte sich ein Anstieg um das  $291,71 \pm 129,08$ -fache,  $p < 0,001$  und für RPE+[Poly I:C]=1  $\mu$ g/ml, um das  $505,80 \pm 155,42$ -fache,  $p < 0,001$  behandelten Mikroglia. Die Gruppen RPE+[Poly I:C]=10  $\mu$ g/ml und RPE+[Poly I:C]=100  $\mu$ g/ml zeigten Erhöhungen der IL-1 $\beta$  Expression, um das  $545,79 \pm 285,71$ -fache bzw. um das  $592,33 \pm 287,32$ -fache des Kontrollwerts,  $p < 0,01$ .

Im Vergleich der mit Poly I:C stimulierten Mikroglia gegenüber der mit Überständen von Poly I:C stimulierten RPE behandelten Mikroglia ließen sich für alle getesteten Poly I:C-Konzentrationen signifikante Werte erfassen. Die Signifikanz lag für [Poly I:C]= 100ng/ml bei  $p < 0,01$ , für 1  $\mu$ g/ml bei  $p < 0,01$ , für 10  $\mu$ g/ml bei  $p < 0,05$  und für 100  $\mu$ g/ml bei  $p < 0,05$ .



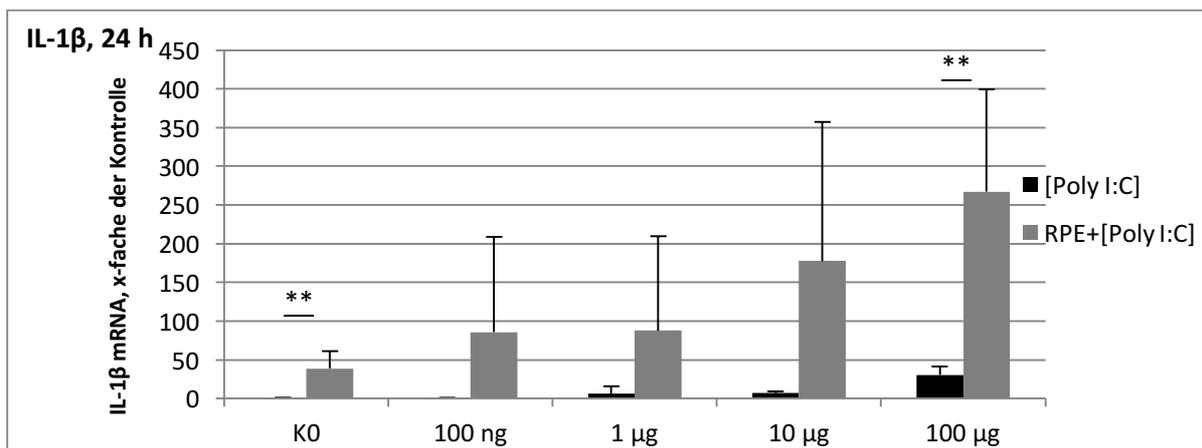
**Abb.3.7. real-time RT-PCR IL-1 $\beta$ , 6 h:** Bestimmung der Expression von IL-1 $\beta$  in retinaler Mikroglia nach 6 h Stimulation. x-Achse Konzentration Poly I:C/ml Stimulationsmedium; y-Achse IL-1 $\beta$  mRNA, x-fache der Kontrolle. Die Zielgenexpression wurde gegenüber dem HKG 18S normalisiert. Die Berechnung der Daten erfolgte mit der  $\Delta\Delta$ CP-Methode. Retinale Mikroglia wurde mit Poly I:C (schwarz) oder Überständen von mit Poly I:C behandeltem RPE stimuliert (grau). Die markierten Signifikanzen zwischen Mikroglia + Poly I:C und Mikroglia + RPE Überstand wurden mit dem *student's t-test* bestimmt. \* =  $0,01 > p < 0,05$ ; \*\* =  $0,001 > p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$

### 3.3.4. Expression von IL-1 $\beta$ in retinaler Mikroglia nach 24 h Stimulation

Bei 24-stündiger Stimulation zeigte sich in Poly I:C stimulierter Mikroglia eine signifikante, konzentrations-abhängige Zunahme in der Expression von IL-1 $\beta$  ab einer Poly I:C-Konzentration von 10  $\mu$ g/ml. Für [Poly I:C] = 100 ng/ml fand sich die  $0,50 \pm 0,25$ -fache; für 1  $\mu$ g/ml die  $6,02 \pm 9,68$ -fache,  $p > 0,05$  Expression. Mikroglia die mit [Poly I:C]=10  $\mu$ g/ml bzw. 100  $\mu$ g/ml behandelt wurde exprimierte die  $6,87 \pm 2,11$ -fache bzw.  $30,47 \pm 10,69$ -fache Anzahl für IL-1 $\beta$  codierende mRNA – p jeweils  $< 0,01$ .

Die Stimulation der Mikroglia mit Überständen von mit Poly I:C behandeltem RPE zeigte einen konzentrationsabhängigen Anstieg in der Expression von IL-1 $\beta$ , der bei [Poly I:C]=100  $\mu$ g/ml ein signifikantes Ausmaß erreichte. In den mit RPE-Überstand behandelten Ansätzen fand sich eine Steigerung der Expression um das  $38,71 \pm 22,64$ -fache,  $p < 0,05$ ; bei RPE+[Poly I:C]=100 ng/ml das  $85,94 \pm 122,50$ -fache,  $p > 0,05$ ; bei RPE+[Poly I:C]=1  $\mu$ g/ml das  $87,83 \pm 121,72$ -fache,  $p > 0,05$ . Bei Stimulation mit RPE+[Poly I:C]=10  $\mu$ g/ml ließ sich die  $177,845 \pm 179,10$ -fache,  $p > 0,05$ ; bei [Poly I:C]=100  $\mu$ g/ml die  $267,31 \pm 131,65$ -fache,  $p < 0,05$  Expression von IL-1 $\beta$  gegenüber der Kontrolle bestimmen.

In der Gegenüberstellung der Ergebnisse der mit Poly I:C stimulierten Mikroglia und der Überständen von TLR-3 stimulierten RPE behandelten Mikroglia konnten wir eine konzentrationsabhängige Zunahme der IL-1 $\beta$  Expression erfassen, die bei [Poly I:C]=100  $\mu$ g/ml, ein signifikantes Niveau erreichte,  $p < 0,05$ .



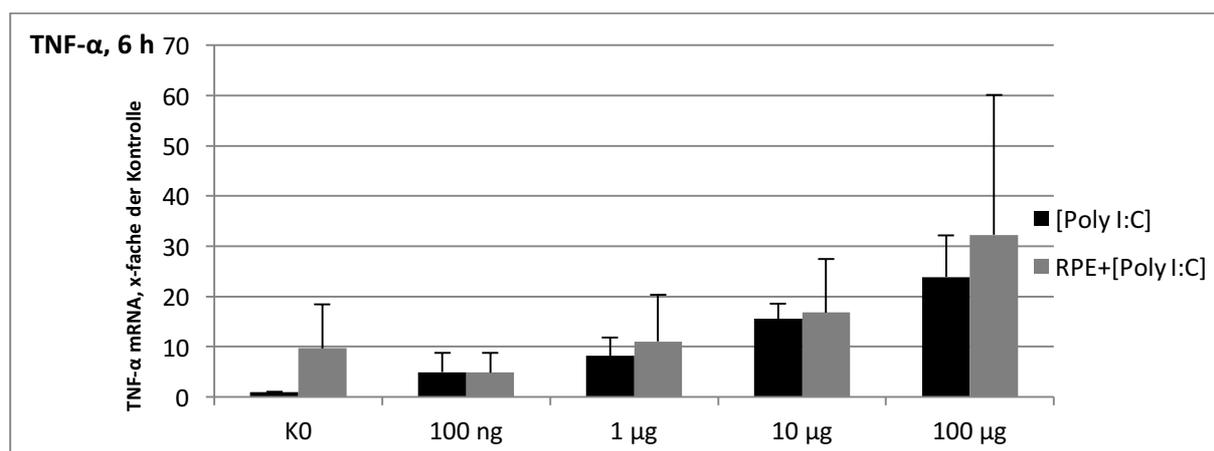
**Abb.3.8. real-time RT-PCR IL-1 $\beta$ , 24 h:** Bestimmung der Expression von IL-1 $\beta$  in retinaler Mikroglia nach 24 h Stimulation. x-Achse Konzentration Poly I:C/ml Stimulationsmedium; y-Achse IL1 $\beta$  mRNA, x-fache der Kontrolle. Die Zielgenexpression wurde gegenüber dem HKG 18S normalisiert. Die Berechnung der Daten erfolgte mit der  $\Delta\Delta$ CP-Methode. Retinale Mikroglia wurde mit Poly I:C (schwarz) oder Überständen von mit Poly I:C behandeltem RPE stimuliert (grau). Die markierten Signifikanzen zwischen Mikroglia + Poly I:C und Mikroglia + RPE Überstand wurden mit dem *student's t-test* bestimmt. \* =  $0,01 > p < 0,05$ ; \*\* =  $0,001 > p < 0,01$

### 3.3.5. Expression von TNF- $\alpha$ in retinaler Mikroglia nach 6 h Stimulation

In über 6 Stunden mit Poly I:C stimulierter Mikroglia ließ sich ein konzentrationsabhängiger, ab [Poly I:C]=1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  signifikanter Anstieg in der Expression für TNF- $\alpha$  codierender mRNA feststellen. Für [Poly I:C]=100 ng/ml ergab sich eine Zunahme der Expression um den Faktor  $4,97 \pm 3,80$ ,  $p > 0,05$ ; für [Poly I:C]=1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  zeigte sich eine signifikante Steigerung um den Faktor  $8,18 \pm 3,71$   $p < 0,05$ . Bei [Poly I:C]=10  $\mu\text{g}$  konnten wir eine signifikante Zunahme um den Faktor  $15,55 \pm 3,08$   $p < 0,01$  gegenüber der Kontrolle nachweisen. Die Stimulation mit [Poly I:C]=100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ergab eine signifikante Erhöhung der Expression von TNF- $\alpha$  um das  $23,89 \pm 8,32$ -fache,  $p < 0,01$ .

Mikroglia, die über 6 Stunden mit Überständen von mit Poly I:C stimuliertem RPE behandelt wurde, exprimierte ab [Poly I:C]=1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  signifikant mehr TNF- $\alpha$  als die unbehandelte Kontrolle. Für die mit RPE-Überstand behandelte Gruppe ließ sich eine Steigerung der Expression um das  $9,69 \pm 8,80$ -fache,  $p > 0,05$  und für die mit RPE+[Poly I:C] =100 ng/ml behandelte Gruppe um das  $4,91 \pm 3,89$ -fache,  $p > 0,05$  des Kontrollwerts bestimmen. Bei RPE+[Poly I:C]=1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  konnten wir eine signifikante Steigerung der Expression um den Faktor  $11,01 \pm 9,28$  erfassen,  $p < 0,05$ . Für RPE+[Poly I:C]=10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ließ sich eine signifikante Zunahme um den Faktor  $16,83 \pm 10,61$ ,  $p < 0,05$ , für RPE+[Poly I:C]=100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  um den Faktor  $32,28 \pm 27,84$ ,  $p < 0,05$  nachweisen.

Im Vergleich der Werte von mit Überständen von TLR-3 stimuliertem RPE behandelter Mikroglia und mit Poly I:C behandelter Mikroglia zeigte sich kein signifikanter Unterschied – in beiden Gruppen zeigte sich ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Expression von TNF- $\alpha$ .



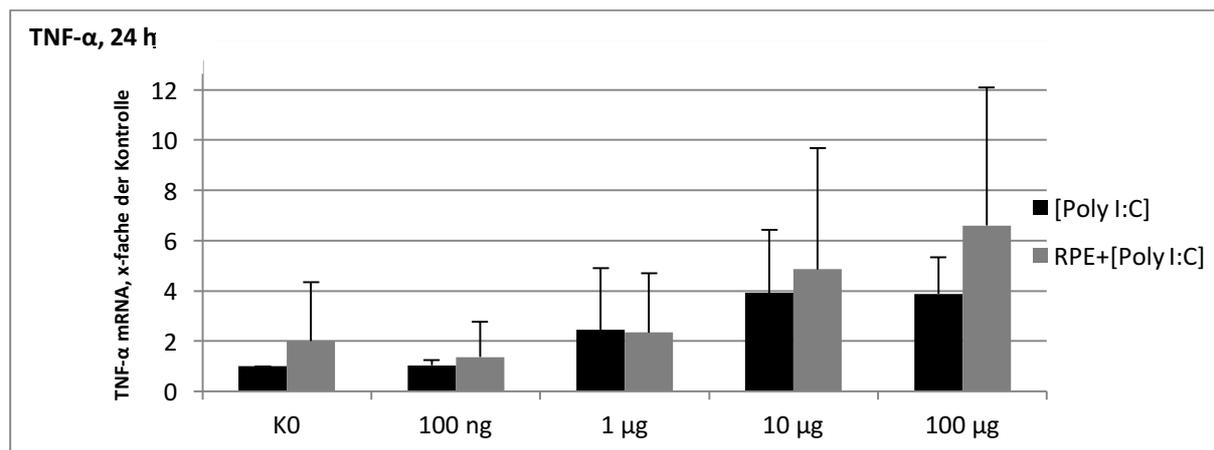
**Abb.3.9. real-time RT-PCR TNF- $\alpha$ , 6 h:** Bestimmung der Expression von TNF- $\alpha$  in retinaler Mikroglia nach 6h Stimulation. x-Achse Konzentration Poly I:C/ml Stimulationsmedium; y-Achse TNF- $\alpha$  mRNA, x-fache der Kontrolle. Die Zielgenexpression wurde gegenüber dem HKG 18S normalisiert. Die Berechnung der Daten erfolgte mit der  $\Delta\Delta\text{C}_\text{T}$ -Methode. Retinale Mikroglia wurde mit Poly I:C (schwarz) oder Überständen von mit Poly I:C behandeltem RPE stimuliert (grau).

### 3.3.6. Expression von TNF- $\alpha$ in retinaler Mikroglia nach 24 h Stimulation

In den über 24 Stunden mit Poly I:C behandelten Mikroglia-Zellen ließ sich ein moderater Anstieg der TNF- $\alpha$  Expression nachweisen, der bei [Poly I:C]=100  $\mu$ g/ml statistisch signifikant wurde,  $p < 0,05$ . Für [Poly I:C]=100 ng/ml wurde das  $1,04 \pm 0,21$ -fache,  $p > 0,05$ ; für [Poly I:C]=1  $\mu$ g/ml das  $2,44 \pm 2,45$ -fache,  $p > 0,05$  der Expression von TNF- $\alpha$  gegenüber der Kontrolle ermittelt. Die Stimulation mit [Poly I:C]=10  $\mu$ g/ml führte zu einer Expressionssteigerung um den Faktor  $3,92 \pm 2,52$ ,  $p > 0,05$ . Für [Poly I:C]=100  $\mu$ g/ml konnte eine signifikante Erhöhung der Expression von TNF- $\alpha$ , um den Faktor  $3,88 \pm 1,46$ ,  $p < 0,05$  erfasst werden.

Bei 24-stündiger Stimulation von Mikroglia mit Überständen von mit Poly I:C-stimuliertem RPE deuten die Daten auf eine konzentrationsabhängige Steigerung der TNF- $\alpha$  Expression hin. In mit RPE ohne Poly I:C-Zusatz behandelte Mikroglia fand sich eine Expressionssteigerung um das  $2,01 \pm 2,32$ -fache,  $p > 0,05$ . Für RPE+[Poly I:C]=100 ng/ml bzw. RPE+[Poly I:C]=1  $\mu$ g/ml ließ sich ein Anstieg um das  $1,37 \pm 1,41$ -fache,  $p > 0,05$  bzw. das  $2,34 \pm 2,36$ -fache,  $p > 0,05$  ermitteln. Die Stimulation mit RPE+[Poly I:C]=10  $\mu$ g/ml ergab eine Zunahme der Expression um den Faktor  $4,86 \pm 4$ ,  $p > 0,05$ . RPE+[Poly I:C] = 100  $\mu$ g/ml ergab eine Steigerung der Expression von TNF- $\alpha$  um den Faktor  $6,60 \pm 5,49$ ,  $p > 0,05$ .

In der Gegenüberstellung der von mit Überständen von TLR-3 stimuliertem retinalen Pigmentepithel behandelten Mikroglia gegenüber der mit Poly I:C stimulierten Mikroglia ließ sich ein konzentrationsabhängiger Anstieg der TNF- $\alpha$  Expression, ohne signifikante Unterschiede in beiden Gruppen erfassen.



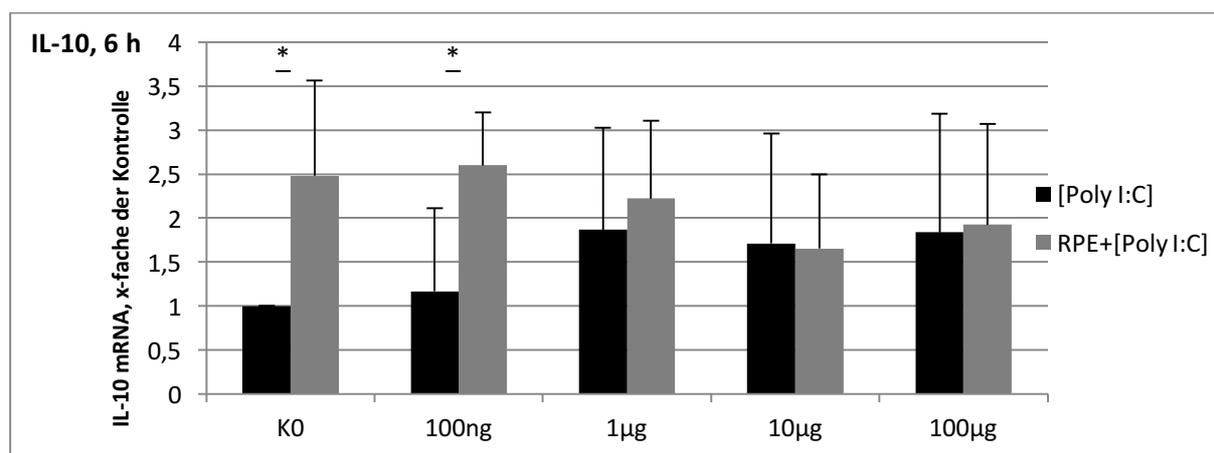
**Abb.3.10. real-time RT-PCR TNF- $\alpha$ , 24 h:** Bestimmung der Expression von TNF- $\alpha$  in retinaler Mikroglia nach 24 h Stimulation. x-Achse Konzentration Poly I:C/ml Stimulationsmedium; y-Achse TNF- $\alpha$  mRNA, x-fache der Kontrolle. Die Zielgenexpression wurde gegenüber dem HKG 18S normalisiert. Die Berechnung der Daten erfolgte mit der  $\Delta\Delta$ CP-Methode. Retinale Mikroglia wurde mit Poly I:C (schwarz) oder Überständen von mit Poly I:C behandeltem RPE stimuliert (grau).

### 3.3.7. Expression von IL-10 in retinaler Mikroglia nach 6 h Stimulation

Mikroglia, die für 6 Stunden mit Poly I:C stimuliert wurde zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Expression von IL-10 im Vergleich zur Kontrolle. Für [Poly I:C]=100 ng/ml ließ sich ein Anstieg der Expression um den Faktor  $1,17 \pm 0,95, p > 0,05$ ; für [Poly I:C]=1 µg/ml um den Faktor  $1,87 \pm 1,16$ ; für [Poly I:C]=10 µg/ml um den Faktor  $1,71 \pm 1,25, p > 0,05$  und für [Poly I:C]=100 µg/ml um den Faktor  $1,83 \pm 1,35, p > 0,05$  gegenüber der Kontrolle messen.

Im Gegensatz dazu konnten wir einen signifikanten Anstieg der Expression von IL-10 in Mikroglia, die mit unbehandeltem RPE Überstand oder mit RPE+[Poly I:C]=100 ng/ml und mit RPE+[Poly I:C]=1 µg/ml stimuliert wurde nachweisen. In der mit RPE-Überstand, ohne Poly I:C-Stimulation behandelten Mikroglia zeigte sich eine signifikante Zunahme der Expression des antiinflammatorischen IL-10 um das  $2,48 \pm 2,08$ -fache,  $p < 0,05$ . Bei Stimulation mit RPE+[Poly I:C]=100 ng/ml bzw. RPE+[Poly I:C]=1 µg/ml ließ sich eine Steigerung der Expression um den Faktor  $2,60 \pm 0,95, p < 0,01$  bzw.  $2,22 \pm 0,89, p < 0,05$  nachweisen. Für RPE+[Poly I:C]=10 µg/ml ließ sich ein Anstieg um das  $1,65 \pm 0,84$ -fache,  $p > 0,05$ , für [Poly I:C]=100 µg/ml ein Anstieg um das  $1,92 \pm 1,15$ -fache,  $p > 0,05$  gegenüber der Kontrolle erfassen.

In der Gegenüberstellung von mit Poly I:C behandelte Mikroglia gegenüber der mit Überständen von TLR-3 aktiviertem RPE stimulierten Mikroglia zeigte sich eine signifikante Steigerung der Expression des antiinflammatorischen IL-10. Erstens bei Stimulation von Mikroglia mit Überständen von unbehandeltem RPE gegenüber der Kontrolle und zweitens bei Stimulation mit moderater Poly I:C Konzentration - RPE+[Poly I:C]=100 ng/ml,  $p < 0,05$ .

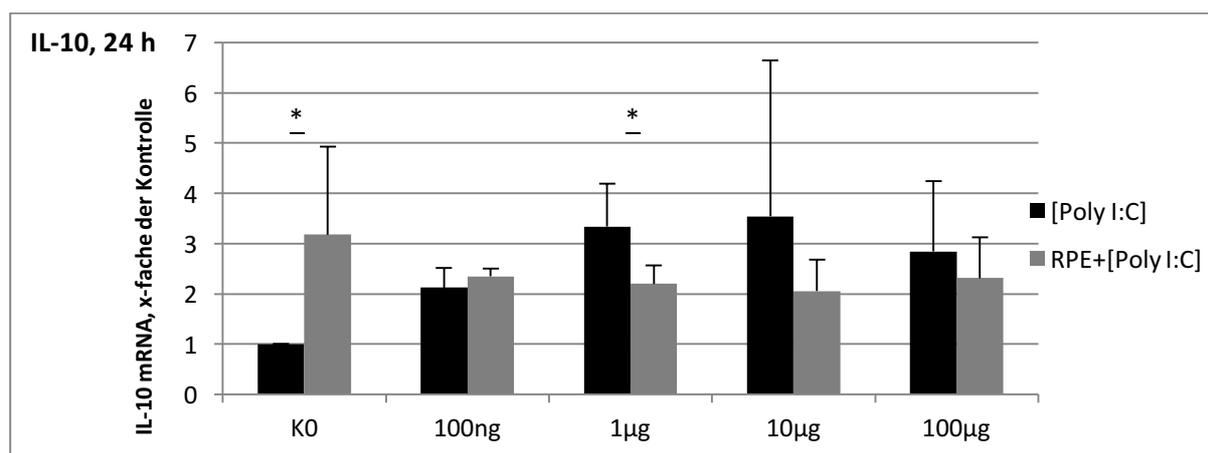


**Abb.3.11. real-time RT-PCR IL-10, 6 h:** Bestimmung der Expression von IL-10 in retinaler Mikroglia nach 6 h Stimulation. x-Achse Konzentration Poly I:C/ml Stimulationsmedium; y-Achse IL-10 mRNA, x-fache der Kontrolle. Die Zielgenexpression wurde gegenüber dem HKG 18S normalisiert. Die Berechnung der Daten erfolgte mit der  $\Delta\Delta\text{CP}$ -Methode. Retinale Mikroglia wurde mit Poly I:C (schwarz) oder Überständen von mit Poly I:C behandeltem RPE stimuliert (grau). Die markierten Signifikanzen zwischen Mikroglia + Poly I:C und Mikroglia + RPE Überstand wurden mit dem *student's t-test* bestimmt. \* =  $0,01 < p < 0,05$

### 3.3.8. Expression von IL-10 in retinaler Mikroglia nach 24 h Stimulation

Die 24-stündige Stimulation von Mikroglia mit Poly I:C in unterschiedlichen Konzentrationen zeigte einen signifikanten Anstieg in der IL-10 Expression bei moderaten Poly I:C-Konzentrationen von 100 ng/ml bzw. 1 µg/ml. Hier ließ sich für [Poly I:C]=100 ng/ml eine Steigerung der Expression um den Faktor  $2,13 \pm 0,39, p < 0,01$  und für [Poly I:C]=1 µg/ml eine Zunahme um den Faktor  $3,34 \pm 0,85, p < 0,01$  gegenüber der Kontrolle bestimmen. Bei [Poly I:C]=10 µg/ml stieg die Expression um das  $3,53 \pm 3,10$ -fache,  $p > 0,05$ , bei [Poly I:C]=100 µg/ml um das  $2,84 \pm 1,40$ -fache,  $p > 0,05$ .

In Mikroglia, die mit Überständen von TLR-3 stimulierten RPE behandelt wurden konnte für alle getesteten Poly I:C Konzentration ein signifikanter Anstieg in der Expression von IL-10 bestimmt werden. Für Mikroglia die mit Überständen von RPE ohne Poly I:C Behandlung stimuliert wurden zeigte sich eine Zunahme der Expression um das  $3,18 \pm 1,75$ -fache,  $p > 0,05$ . Eine signifikante Zunahme der Expression von IL-10 um den Faktor  $2,35 \pm 0,16, p < 0,001$  wurde für RPE+[Poly I:C]=100 ng/ml erfasst. Für RPE+[Poly I:C]=1 µg/ml bzw. RPE+[Poly I:C]=10 µg/ml ließen sich signifikante Steigerungen der Expression um den Faktor  $2,20 \pm 0,36, p < 0,01$  bzw.  $2,05 \pm 0,63, p < 0,05$  nachweisen. Im Vergleich der Expression von IL-10 zwischen mit Poly I:C stimulierter Mikroglia und Mikroglia, die mit Überständen von mit Poly I:C stimuliertem RPE behandelt wurde, zeigten sich signifikante Unterschiede. Erstens bei der Gegenüberstellung von mit unstimulierten RPE-Überständen behandelte Mikroglia gegenüber der Kontrolle (K0),  $p < 0,05$  und zweitens bei mit RPE+[Poly I:C]=1 µg/ml behandelte Mikroglia gegenüber mit [Poly I:C]=1 µg/ml stimulierter Mikroglia,  $p < 0,05$ .



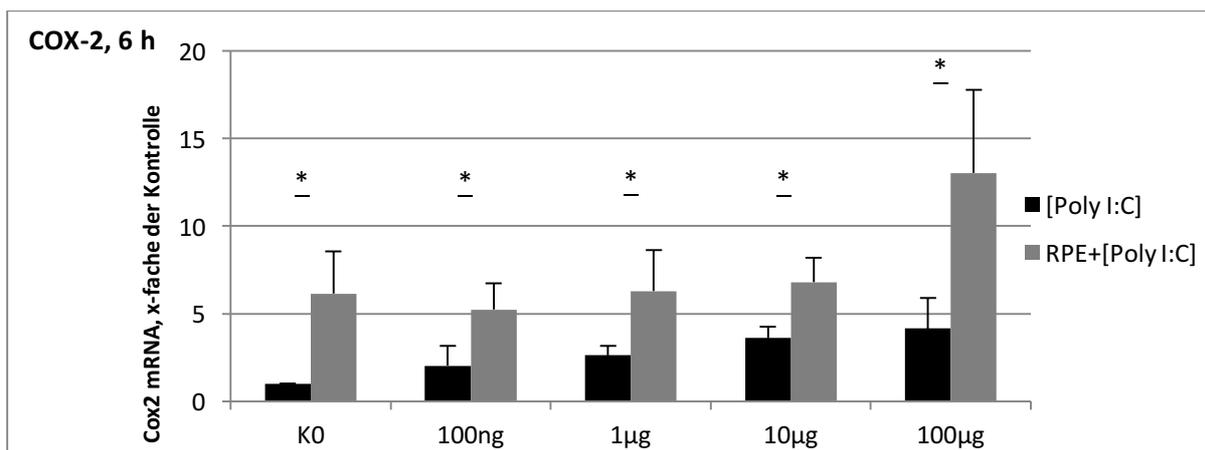
**Abb.3.12. real-time RT-PCR IL-10, 24 h:** Bestimmung der Expression von IL-10 in retinaler Mikroglia nach 24 h Stimulation. x-Achse Konzentration Poly I:C/ml Stimulationsmedium; y-Achse IL-10 mRNA, x-fache der Kontrolle. Die Zielgenexpression wurde gegenüber dem HKG 18S normalisiert. Die Berechnung der Daten erfolgte mit der  $\Delta\Delta C_P$ -Methode. Retinale Mikroglia wurde mit Poly I:C (schwarz) oder Überständen von mit Poly I:C behandeltem RPE stimuliert (grau). Die markierten Signifikanzen zwischen Mikroglia + Poly I:C und Mikroglia + RPE Überstand wurden mit dem *student's t-test* bestimmt. \* =  $0,01 > p < 0,05$

### 3.4. Ergebnisse *real-time* RT-PCR – Enzyme

#### 3.4.1. Expression von COX-2 in retinaler Mikroglia nach 6 h Stimulation

Für Mikroglia, die über 6 Stunden mit Poly I:C stimuliert wurde zeigte sich ab [Poly I:C] = 1 µg/ml ein statistisch signifikant erhöhtes Expressionsniveau von COX-2 gegenüber der Kontrolle. In den Ansätzen mit [Poly I:C]=100 ng/ml wurde eine Zunahme der Expression um das  $2,02 \pm 1,15$ -fache,  $p > 0,05$  und in Proben mit [Poly I:C]=1 µg/ml eine signifikante Steigerung um das  $2,62 \pm 0,54$ -fache,  $p < 0,01$  bestimmt. Mikroglia, die mit [Poly I:C]=10 µg/ml bzw. [Poly I:C]=100 µg/ml stimuliert wurde exprimierte das  $3,60 \pm 0,64$ -fache,  $p < 0,05$  bzw.  $4,15 \pm 1,75$ ,  $p < 0,05$  der COX-2 mRNA der Kontrolle.

In Mikroglia, die mit Überständen von mit TLR-3 stimulierten RPE behandelt wurde fand sich eine signifikante Steigerung der Expression der COX-2 in allen getesteten Poly I:C-Konzentrationen. Die mit RPE Überstand, ohne Poly I:C-Stimulation behandelte Mikroglia exprimierte das  $6,14 \pm 1,98$ -fache,  $p < 0,05$ , die mit RPE+[Poly I:C]=100 ng/ml stimulierte Mikroglia das  $5,22 \pm 1,23$ -fache,  $p < 0,01$  der COX-2 mRNA des Kontrollwerts. Für RPE+[Poly I:C]=1 µg/ml wurde ein Anstieg der Expression um den Faktor  $6,28 \pm 1,92$ ,  $p < 0,05$ , für RPE+[Poly I:C]=10 µg/ml eine Steigerung um den Faktor  $6,80 \pm 1,15$ ,  $p < 0,05$  erfasst. Eine ebenfalls signifikante Zunahme der Expression von COX-2 um das  $13,04 \pm 3,87$ -fache,  $p < 0,05$  gegenüber der unbehandelten Kontrolle zeigte sich bei RPE+[Poly I:C]=100 µg/ml. Die Unterschiede der Expression von COX-2 in Mikroglia, die mit Überständen von mit Poly I:C behandeltem RPE stimuliert wurde war gegenüber der mit Poly I:C behandelten Mikroglia für die Ansätze mit 1 µg/ml, 10 µg/ml und 100 µg/ml Poly I:C signifikant – jeweils  $p < 0,05$ .



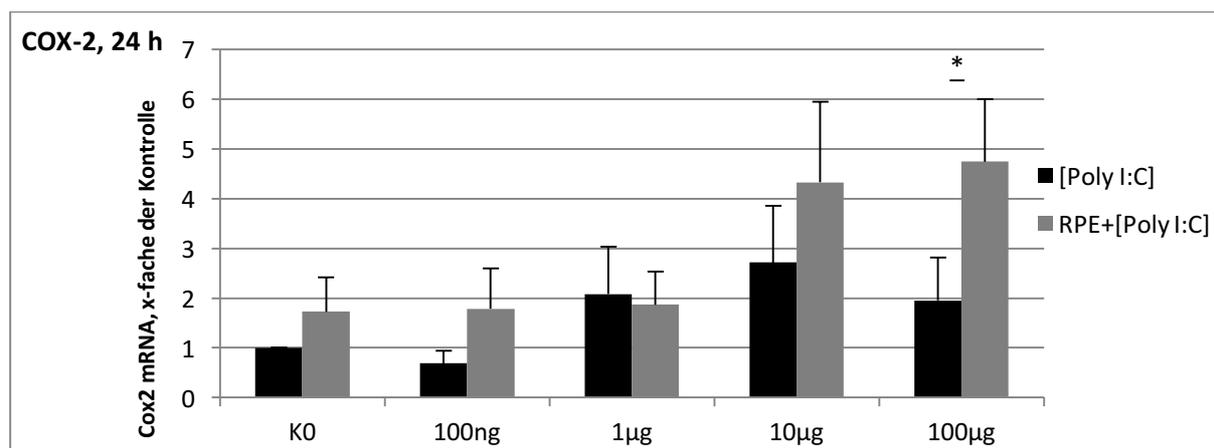
**Abb.3.13. *real-time* RT-PCR COX-2, 6 h:** Bestimmung der Expression von COX-2 in retinaler Mikroglia nach 6 h Stimulation. x-Achse Konzentration Poly I:C/ml Stimulationsmedium; y-Achse COX-2 mRNA, x-fache der Kontrolle. Die Zielgenexpression wurde gegenüber dem HKG 18S normalisiert. Die Berechnung der Daten erfolgte mit der  $\Delta\Delta\text{CP}$ -Methode. Retinale Mikroglia wurde mit Poly I:C (schwarz) oder Überständen von mit Poly I:C behandeltem RPE stimuliert (grau). Die markierten Signifikanzen zwischen Mikroglia + Poly I:C und Mikroglia + RPE Überstand wurden mit dem *student's t-test* bestimmt. \* =  $0,01 > p < 0,05$

### 3.4.2. Expression von COX-2 in retinaler Mikroglia nach 24 h Stimulation

Die 24-stündige Stimulation von Mikroglia mit Poly I:C ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede gegenüber der Kontrolle. Bei [Poly I:C]=100 ng/ml konnte das  $0,69 \pm 0,26$ -fache,  $p > 0,05$ , bei [Poly I:C]=1 µg/ml das  $0,95 \pm 0,77$ ,  $p > 0,05$  und für [Poly I:C]=10 µg/ml das  $2,71 \pm 1,14$ -fache,  $p > 0,05$  der Expression von COX-2 gegenüber der Kontrolle nachgewiesen werden. Bei [Poly I:C]=100 µg/ml fand sich eine Erhöhung der Expression um das  $1,95 \pm 0,86$ -fache,  $p > 0,05$  gegenüber dem Kontrollwert.

Für Mikroglia die mit Überständen von Poly I:C stimulierten RPE behandelt konnte ein signifikanter Anstieg der COX-2-Expression für RPE+[Poly I:C]=10 µg/ml und 100 µg/ml bestimmt werden. In mit Überständen von RPE ohne Poly I:C-Stimulation behandelte Mikroglia stieg die Expression von COX-2 um das  $1,73 \pm 0,69$ -fache,  $p > 0,05$ . Mikroglia die mit RPE+[Poly I:C]=100 ng/ml behandelt wurde exprimierte das  $1,79 \pm 0,81$ -fache,  $p > 0,05$ , mit RPE+[Poly I:C]=1 µg/ml exprimierte die Mikroglia das  $1,87 \pm 0,67$ -fache,  $p > 0,05$  der Menge für COX-2 codierender mRNA der Kontrolle. Für RPE+[Poly I:C]=10 µg/ml ließ sich eine signifikante Zunahme der Expression von COX-2 um den Faktor  $4,32 \pm 1,62$ ,  $p < 0,05$  und für RPE+[Poly I:C]=100 µg/ml eine ebenfalls signifikante Steigerung um den Faktor  $4,74 \pm 1,25$ ,  $p < 0,01$  erfassen.

Im Vergleich der Ergebnisse von mit Poly I:C behandelte Mikroglia zu mit Überständen von RPE behandelte Mikroglia konnte bei hoher Poly I:C Konzentration – 100 µg/ml,  $p < 0,05$  ein statistisch signifikanter Unterschied beider Gruppen erfasst werden.

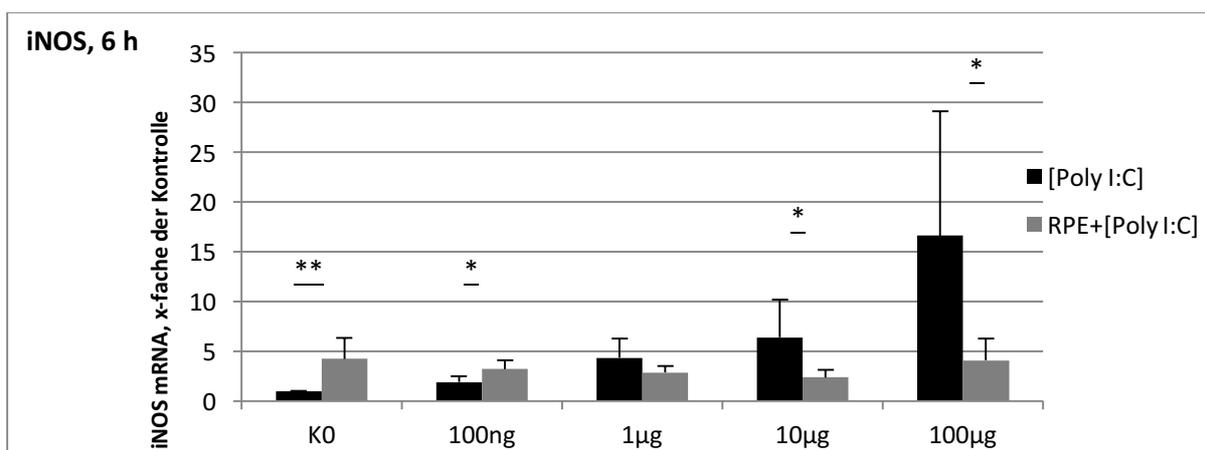


**Abb.3.14. real-time RT-PCR COX-2, 24 h:** Bestimmung der Expression von COX-2 in retinaler Mikroglia nach 24 h Stimulation. x-Achse Konzentration Poly I:C/ml Stimulationsmedium; y-Achse COX-2 mRNA, x-fache der Kontrolle. Die Zielgenexpression wurde gegenüber dem HKG 18S normalisiert. Die Berechnung der Daten erfolgte mit der  $\Delta\Delta C_P$ -Methode. Retinale Mikroglia wurde mit Poly I:C (schwarz) oder Überständen von mit Poly I:C behandeltem RPE stimuliert (grau). Die markierten Signifikanzen zwischen Mikroglia + Poly I:C und Mikroglia + RPE Überstand wurden mit dem *student's t-test* bestimmt. \* =  $0,01 > p < 0,05$

### 3.4.3. Expression von iNOS in retinaler Mikroglia nach 6 h Stimulation

In der *real-time* RT-PCR von Mikroglia, die über 6 Stunden mit Poly I:C stimuliert wurde konnte für alle getesteten Poly I:C-Konzentrationen ein signifikanter, konzentrationsabhängiger Anstieg der iNOS-Expression bestimmt werden. Für [Poly I:C]=100 ng/ml zeigte sich eine Steigerung der Expression um das  $1,89 \pm 0,63$ -fache,  $p < 0,05$ . Bei [Poly I:C]=1  $\mu$ g/ml fand sich eine Zunahme um den Faktor  $4,34 \pm 1,92$ ,  $p < 0,05$ , bei [Poly I:C]=10  $\mu$ g/ml. Die Stimulation mit [Poly I:C]=100  $\mu$ g/ml resultierte in einer Expressionssteigerung von iNOS um den Faktor  $16,60 \pm 12,50$ ,  $p < 0,05$  gegenüber der Kontrolle. Mikroglia, die mit Überständen von retinalem Pigmentepithel behandelt wurde exprimierte in Ansätzen mit RPE+[Poly I:C]=100 ng/ml, RPE+[Poly I:C]=1  $\mu$ g/ml und RPE+[Poly I:C]=10  $\mu$ g/ml signifikant höhere iNOS-Level, als die Kontrolle. Für Mikroglia, die mit Überständen von RPE, ohne Poly I:C Stimulation behandelt wurde zeigte sich eine Zunahme der Expression um das  $4,22 \pm 2,11$ -fache,  $p > 0,05$ . Für RPE+[Poly I:C]=100 ng/ml bzw. RPE+[Poly I:C]=1  $\mu$ g/ml konnten wir signifikante Steigerungen in der Expression von iNOS um den Faktor  $3,23 \pm 0,84$ ,  $p < 0,05$  bzw. um den Faktor  $2,87 \pm 0,66$ ,  $p < 0,01$  bestimmen. Bei RPE+[Poly I:C]=10  $\mu$ g/ml fand sich ein Anstieg der Expression um das  $2,38 \pm 0,75$ -fache,  $p < 0,05$ , bei RPE+[Poly I:C]=100  $\mu$ g/ml um das  $4,09 \pm 2,17$ -fache,  $p > 0,05$ .

In der Gegenüberstellung der Ergebnisse der mit Poly I:C stimulierten Mikroglia auf der einen und der mit Überständen von RPE behandelten Mikroglia auf der anderen Seite konnten wir signifikante Unterschiede bei 0 ng/ml = KO, 100 ng/ml, 1  $\mu$ g/ml und 10  $\mu$ g/ml nachweisen jeweils  $p < 0,05$ . Eine signifikante Abnahme der Expression für iNOS fand sich in den Ansätzen mit RPE+[Poly I:C]=10  $\mu$ g/ml und RPE+[Poly I:C]=100  $\mu$ g/ml.



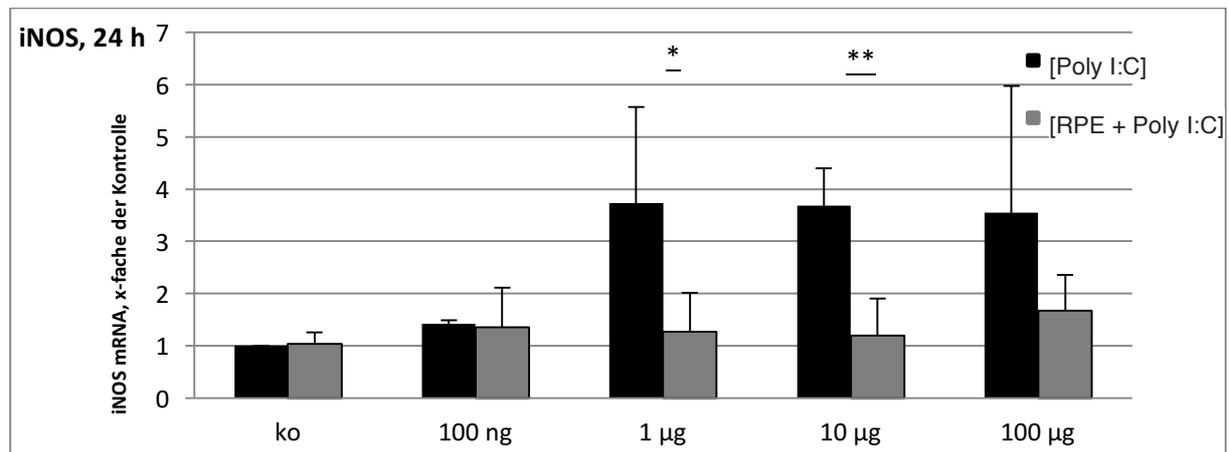
**Abb.3.15. *real-time* RT-PCR iNOS, 6 h:** Bestimmung der Expression von iNOS in retinaler Mikroglia nach 6 h Stimulation. x-Achse Konzentration Poly I:C/ml Stimulationsmedium; y-Achse iNOS mRNA, x-fache der Kontrolle. Die Zielgenexpression wurde gegenüber dem HKG 18S normalisiert. Die Berechnung der Daten erfolgte mit der  $\Delta\Delta$ CP-Methode. Retinale Mikroglia wurde mit Poly I:C (schwarz) oder Überständen von mit Poly I:C behandeltem RPE stimuliert (grau). Die markierten Signifikanzen zwischen Mikroglia + Poly I:C und Mikroglia + RPE Überstand wurden mit dem *student's t-test* bestimmt. \* =  $0,01 > p < 0,05$ ; \*\* =  $0,001 > p < 0,01$

### 3.4.4. Expression von iNOS in retinaler Mikroglia nach 24 h Stimulation

In Mikroglia, die über eine Periode von 24 Stunden mit Poly I:C stimuliert wurde zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Expression von iNOS bei [Poly I:C]=100 ng/ml und [Poly I:C]=10 µg/ml. Für [Poly I:C]=100 ng/ml konnte ein Anstieg der Expression um den Faktor  $1,42 \pm 0,07$ ,  $p < 0,01$ , für [Poly I:C]=1 µg/ml um den Faktor  $3,73 \pm 1,84$ ,  $p > 0,05$  und für [Poly I:C]=10 µg/ml um den Faktor  $3,68 \pm 0,72$ ,  $p < 0,01$  erfasst werden. Bei [Poly I:C]=100 µg/ml stieg die Expression von iNOS um das  $3,55 \pm 2,42$ -fache,  $p > 0,05$  der Kontrolle.

Mikroglia, die mit Überständen retinalen Pigmentepithels behandelt wurde zeigte keinen signifikanten Anstieg der iNOS-Expression. In Mikrogliaansätzen die mit Überständen retinalen Pigmentepithels ohne Poly I:C-Stimulation behandelt wurde konnte das  $1,04 \pm 0,22$ -fache,  $p > 0,05$  der iNOS mRNA gegenüber der Kontrolle bestimmt werden. Bei RPE+[Poly I:C]=100 ng/ml ließ sich das  $1,35 \pm 0,76$ -fache,  $p > 0,05$ ; für RPE+[Poly I:C]=1 µg/ml das  $1,27 \pm 0,74$ -fache,  $p > 0,05$  und für RPE+[Poly I:C]=10 µg/ml das  $1,19 \pm 0,71$ -fache,  $p > 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle erfassen. In mit RPE+[Poly I:C]=100 µg/ml behandelte Mikroglia zeigte sich das  $1,67 \pm 0,68$ -fache,  $p > 0,05$  der Expression von iNOS gegenüber der Kontrolle.

Im Vergleich der mit Poly I:C stimulierten und der mit Überständen von RPE behandelten Mikroglia zeigte sich bei Poly I:C Konzentrationen von 10 µg/ml ein signifikant niedrigeres Niveau,  $p < 0,05$  der iNOS-Expression in der mit RPE-Überstand behandelten Gruppe - RPE+[Poly I:C]=10 µg/ml gegenüber der mit [Poly I:C]=10 µg/ml stimulierten Mikroglia.



**Abb.3.16. real-time RT-PCR iNOS, 24 h:** Bestimmung der Expression von iNOS in retinaler Mikroglia nach 24h Stimulation. x-Achse Konzentration Poly I:C/ml Stimulationsmedium; y-Achse iNOS mRNA, x-fache der Kontrolle. Die Zielgenexpression wurde gegenüber dem HKG 18S normalisiert. Die Berechnung der Daten erfolgte mit der  $\Delta\Delta C_P$ -Methode. Retinale Mikroglia wurde mit Poly I:C (schwarz) oder Überständen von mit Poly I:C behandeltem RPE stimuliert (grau). Die markierten Signifikanzen zwischen Mikroglia + Poly I:C und Mikroglia + RPE Überstand wurden mit dem *student's t-test* bestimmt. \* =  $0,01 > p < 0,05$ ; \*\* =  $0,001 > p < 0,01$

### 3.5. Übersicht Ergebnisse *real-time* RT-PCR

Experiment Expression	Poly I:C vs unstimuliert	RPE vs unstimuliert	Poly I:C + RPE vs Poly I:C
<b>IL-6</b>	Induktion	Induktion	Steigerung (24h)
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Induktion	Induktion	Steigerung (24h)
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Induktion (24h)	keine signifikante Induktion	keine signifikante Steigerung
<b>IL-10</b>	Induktion	Induktion	Steigerung (bei basaler und geringradiger Stimulation)
<b>COX-2</b>	Induktion	Induktion	Steigerung
<b>iNOS</b>	Induktion	Induktion	Verminderte Steigerung

**Abb. 3.17. Signifikante Unterschiede im Expressionsmuster in der *real-time* RT-PCR**

**horizontal:** Versuchsaufbau: Poly I:C vs unstimuliert = mit Poly I:C stimulierte retinale Mikroglia versus unstimulierte Mikroglia; RPE vs unstimuliert = mit Zellmediumüberständen unstimulierten RPE's behandelte retinale Mikroglia gegenüber un behandelter Mikroglia; Poly I:C + RPE = retinale Mikroglia die mit Zellmediumüberständen Poly I:C stimulierten RPE's behandelt wurde gegenüber mit Poly I:C stimulierter Mikroglia;

**vertikal:** Expressionsmuster der in der *real-time* RT-PCR getestete Faktoren: IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\beta$ , IL-10, COX-2, iNOS

## 4. Diskussion

### 4.1. Vorbemerkung

Die altersabhängige Makuladegeneration (AMD) ist die häufigste Ursache für Erblindung in der westlichen Welt. Es finden sich eine Reihe von Hypothesen zur Pathogenese der Erkrankung, die unter anderem para/inflammatorische, degenerative, nekroptotische, epi/genetische und umweltbedingte Konzepte umfassen und auf eine gemeinsame multifaktorielle Genese hindeuten.

Inflammatorische Prozesse, wie die Parainflammation haben Teil an jeder Form der AMD (Nita et al., 2014). In der Beaver Dam Eye Study wurde über 20 Jahre an 975 Individuen ohne Zeichen einer AMD

das Verhältnis von Entzündungsfaktoren im Blut der Probanden gegenüber der kumulativen Inzidenz von früher AMD getestet (Klein et al., 2014). Dabei fanden Klein et al., (2014) eine Assoziation von erhöhter Serum-Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-6, des Entzündungsmarkers *high-sensitivity C-reactive protein* (hs-CRP) und des *TNF- $\alpha$  receptor 2* (TNF- $\alpha$ R2) zur kumulativen Inzidenz früher AMD über den 20 jährigen Beobachtungszeitraum unabhängig von Geschlecht, Übergewicht oder physischer Aktivität. Nassar et al., (2015) konnten zeigen, dass Patienten mit AMD signifikant höhere Blut-Serum Level von IL-1 $\beta$  als die nicht betroffenen Kontrollgruppe aufweisen. Die Autoren schließen, dass es sich bei der frühen AMD um ein entzündliches Geschehen handelt – ohne jedoch mikro/ bzw. ultrastrukturelle Untersuchungen durchgeführt zu haben (Klein R et al., 2014). Ardeljan et al., (2014) beschreiben die AMD in einem immunpathologischen und ultrastrukturellen Modell als Prozess vor dem Hintergrund eines sich ständig wandelnden Immunsystems, der sich an der Expression von Zytokinen und Komplement, der Akkumulation von Mikroglia und anderen Veränderungen abbilden lässt. Genauer zeigt sich eine Hochregulation und Überexpression entzündlicher Zytokine wie IL-1 $\beta$  und von Mikroglia, die eng mit dem angeborenen Immunsystem assoziiert sind (Ardeljan et al., 2014). Ein wesentlicher Teil des angeborenen Immunsystems stellen die PRRs und unter ihnen die TLRs dar. Die AMD kann als altersabhängige Suszeptibilität für die aberrante Aktivierung des angeborenen Immunsystems betrachtet werden - Ardeljan et al., (2014) führen aus, dass durch altersabhängige Veränderungen endogene Proteine Muster (*patterns*) aufweisen können, die von den PRRs des angeborenen Immunsystems als fremd erkannt werden und entsprechende Signalkaskaden initiieren. Ursächlich für derartige Muster kann die altersabhängige Akkumulation von *reactive oxygen species* (ROS) mitochondrialen Ursprungs, die zur Freisetzung von DAMPs führt, sein (Tang et al., 2011), (Huang et al., (2015), die ihrerseits über PRRs wie TLRs zur Aktivierung retinaler Mikroglia führen können (Lehnardt, 2010), (Karlstetter and Langmann, 2012). Ma et al., (2013) haben gezeigt, dass mit zunehmendem Alter die Expression von MyD88 (einem gemeinsamen Adaptorprotein der meisten TLRs) in retinaler Mikroglia steigt, was als eine Veränderung des homöostatischen *setpoints* im Sinne einer aberranten Aktivierung des angeborenen Immunsystems (Ardeljan et al., 2014) mit parainflammatorischer Reaktion betrachtet werden kann, die die Entstehung der AMD begünstigt (Xu et al., 2009). Mikroglia ist Teil des angeborenen Immunsystems; sie ist die Abwehrzelle der Retina und ihre Aktivierung scheint ein frühes und lang anhaltendes chronisches Merkmal der Pathogenese der AMD darzustellen (Karlstetter et al., 2015).

Die retinale Mikroglia ist Teil unseres experimentellen Modells, um in dessen Limitationen Aussagen über eine mögliche Beteiligung an der Pathogenese der AMD und viraler Infektionen der Retina ableiten zu können. In enger Kooperation mit Prof. Dr. Lucius und Mitarbeitern etablierten wir die retinale Mikroglia kultur, ergänzend zur bereits bestehenden RPE Kultur der Klinik für Ophthalmologie

des UKSH Campus Kiel. Die Interaktion von RPE und retinaler Mikroglia wird in der Literatur als ein Baustein in der Pathogenese der AMD (Xu et al., 2009), (Ma et al., 2009) diskutiert. Mit unseren Experimenten wollten wir feststellen, welchen Effekt die Interaktion von RPE und retinaler Mikroglia als Teil des angeborenen Immunsystems hat, ob sich die oben beschriebenen Theorien mit dem exprimierten Zytokin- und Enzymmuster unserer Versuche vereinbaren lassen und welchen Einfluss die Stimulation des TLR-3 einem PRR, ebenfalls Teil des angeborenen Immunsystems auf dieses System hat. In einer multizentrischen Studie konnten (Yang et al., 2008) die genetische Assoziation der trockenen Form der altersabhängigen Makuladegeneration mit einem *hypomorphic single nucleotide polymorphism* im TLR-3 Gen 412Phe beschreiben, wonach Individuen, die Träger dieses genetischen Polymorphismus sind vor der trockenen Form der altersabhängigen Makuladegeneration geschützt seien. Zugleich zeigten die Autoren den potentiell retinotoxischen Effekt der TLR-3 Aktivierung auf (Yang et al., 2008), (Kleinman and Ambati, 2012), (Klettner et al., 2013).

Nahum et al., (2012, 2011) deckten die Assoziation der TLR3 L412F Variante mit einer erhöhten Anfälligkeit für den Cytomegalievirus (CMV – Humanes-Herpes Virus 5) auf. Der TLR-3 scheint, wenn man diesen Beobachtungen folgt eine entscheidende Rolle in der Pathogenese von AMD und viralen Erkrankungen der Retina einzunehmen, wobei diese Prozesse in Rahmen der AMD miteinander assoziiert sein können (Mukhamed'ianova et al., 2014). In Drusen von mit AMD betroffenen Augen findet sich neben oxidierten Lipiden, Lipoproteinen und Komplement-Proteinen auch dsRNA (Curcio et al., 2009), (Kaneko et al., 2011), (Murakami et al., 2014). Die subretinale Injektion von *polyinosinic polycitidylic acid* (Poly I:C) einem synthetischen Analogon von *double stranded ribonucleic acid* (dsRNA), einem Liganden des TLR-3 führt im Mäusemodell zur programmierten Nekrose von RPE und Photorezeptoren, sowie zur Migration von Makrophagen in die äußere Retina und in den subretinalen Raum – (dsRNA wird von den meisten Viren während der Replikation synthetisiert) (Murakami et al., 2014), (Jacobs and Langland, 1996), (Alexopoulou et al., 2001). Poly I:C stimuliert das RPE über den TLR-3 zur erhöhten Sekretion von Interferon- $\beta$ , das einen starken antiviralen Effekt im RPE vermittelt (Klettner, 2015). Zusätzlich induziert die Aktivierung über den TLR-3 im RPE die Expression einer Reihe von Zytokinen und Chemokinen – unter anderem die proinflammatorischen Faktoren IL-8, IL-6 und TNF- $\alpha$  (Klettner, 2015), (Kumar et al., 2004), (Klettner et al., 2013), (Wörnle et al., 2011). Die TLR-3 abhängige Stimulation von Mikroglia mit dsRNA führt zu einer konzentrationsabhängigen Induktion der Expression von IL-6, TNF $\alpha$  und Interferon- $\beta$  (Kettenmann et al., 2011), (Hanisch and Kettenmann, 2007), (Alexopoulou et al., 2001), (Jack et al., 2005). Beobachtungen von TLR-3 stimuliertem RPE und TLR-3 stimulierter gehirnständiger Mikroglia wurden bereits getrennt voneinander durchgeführt s.o. Im Rahmen der AMD kommt es zur Aktivierung von Mikroglia, sowie ihrer Migration und Akkumulation im eigentlich immunprivilegierten subretinalen

Raum (SRR) (Xu et al., 2009), (Xu et al., 2007), (Zeiss and Johnson, 2004) in direkter Nachbarschaft zur apikalen Seite des RPE und den Photorezeptoraußensegmenten (Ma et al., 2009). Unser Versuchsaufbau zielte darauf ab diese pathologischen Prozesse in den Limitationen eines in vitro Modells mit der *real-time* RT-PCR messbar zu machen und damit Aussagen über eine mögliche Interaktion von RPE und retinaler Mikroglia vor dem Hintergrund der AMD und viraler Infektionen der Retina zu treffen

#### **4.2. Etablierung der Zellkultur retinaler Mikroglia**

Die Retina ist ein hochgradig differenziertes Gewebe. In vitro kann diese Struktur auf Grund ihrer Komplexität noch nicht abgebildet werden. Da für unsere Fragestellung zwei Zellpopulationen der Retina im Vordergrund standen – das RPE und die retinale Mikroglia – nutzten wir Zellkulturen, um ihre Interaktion abzubilden. Mikroglia des Gehirns und retinale Mikroglia weisen ähnliche Oberflächenantigene und Enzyme auf, leben aber in anderen Mikromilieus und sind unterschiedlichen pathophysiologischen Prozessen ausgesetzt (Devarajan et al., 2014; Giulian and Baker, 1986; Gupta et al., 2003; Minagar et al., 2002; Terubayashi et al., 1984). Retinale Mikroglia stellt eine andere Mikroglia population als Mikroglia des Gehirns dar (Yuan et al., 2015) und weist ihr gegenüber unterschiedliche immunologische Eigenschaften auf (Jerri Y. Niederkorn and Harry J. Kaplan, 2007). Um die Prozesse in der Retina in vitro möglichst aussagekräftig abzubilden sind daher bestehende Mikroglia kulturen mit gehirnständiger Mikroglia weniger geeignet, sodass für diese Arbeit eine eigene Kultur retinaler Mikroglia etabliert wurde. Zur Qualitätskontrolle dienten wie oben beschrieben Färbungen mit dem Mikroglia marker Iba-1 – Mikroglia im SRR ist Iba-1 positiv (Xu et al., 2009). Die Färbungen erfolgten mit retinalen Mikroglia kulturen, die nach identischem Protokoll generiert und immunzytochemisch identifiziert wurden. Es konnte gezeigt werden, dass 95% der in der Zellkultur generierten Zellen Mikroglia Zellen waren. Zudem ergab die *real-time* RT-PCR der mRNA von Mikroglia die mit Poly I:C über 6 Stunden stimuliert wurde einen konzentrationsabhängigen signifikanten Anstieg der Expression von IL-6 ab einer Poly I:C Konzentration von 1 µg/ml Stimulationsmedium ([Poly I:C] =1 µg/ml) ein Ergebnis, das mit vorangegangenen Beobachtungen an Mikroglia gut vereinbar ist (Alexopoulou et al., 2001), (Jack et al., 2005), (Kettenmann et al., 2011). Dies untermauert neben den Ergebnissen der Immunzytochemie die Qualität unserer Mikroglia kultur.

#### **4.3. Interaktion von RPE und retinaler Mikroglia**

Die Interaktion von RPE und retinaler Mikroglia wird in der Literatur als Baustein in der Genese einer Reihe von Erkrankungen am Auge (Xu et al., 2009), (Ma et al., 2009) diskutiert. In den oben angegebenen Modellen wird die AMD unter anderem als Zustand einer chronischen geringgradigen

Entzündung, die sich im Alter intensiviert beschrieben (Nita et al., 2014), (Ardeljan and Chan, 2013), (Xu et al., 2009), der eine abberante Aktivierung des angeborenen Immunsystems zu Grunde liegen kann (Ardeljan and Chan, 2013). In dieser Arbeit wurden eine Reihe Zytokine und Effektorenzyme mittels *real-time* RT-PCR bestimmt, um offenzulegen, ob und in welcher Form pro- oder antiinflammatorische Reaktionen in der Interaktion von RPE und retinaler Mikroglia auftreten. Dies gelang in den Limitationen unseres *in vitro* Modells auf signifikantem Niveau.

Unsere Untersuchungen zeigen, dass über den TLR-3 aktivierte retinale Mikroglia mit einer konzentrationsabhängigen Expressionssteigerung der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und der Effektorenzyme COX-2 und iNOS reagiert. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit vorangegangenen Untersuchungen von Mikroglia des Zentralnervensystems jenseits der Retina, die eine Poly I:C induzierte TLR-3 abhängige Antwort der Zellen zeigten (Olson and Miller, 2004) inklusive der Sekretion von TNF $\alpha$  (Steelman and Li, 2011) und der verstärkten Expression von IL-1 $\beta$  und IL-6 (Suh et al., 2009). Einerseits verdeutlichen diese Ergebnisse die Wirkung von dsRNA am TLR-3 retinaler Mikroglia, wie sie im Rahmen von Viruserkrankungen und altersabhängigen Veränderungen wie Drusen auftreten kann (Curcio et al., 2009), (Kaneko et al., 2011), (Murakami et al., 2014), (Nahum et al., 2012, 2011); zum anderen dienten sie als Kontrolle gegenüber der weiteren Fragestellung nach der Interaktion unstimulierten und TLR-3 stimulierten RPEs mit retinaler Mikroglia. Kommt retinale Mikroglia in Kontakt mit Überständen von TLR-3 stimuliertem RPE steigt die Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und des Effektorenzyms COX-2 gegenüber der Kontrollgruppe von TLR-3 stimulierter retinaler Mikroglia an – es zeigt sich ein signifikanter Effekt unstimulierten, sowie TLR-3 stimulierten RPEs auf retinale Mikroglia.

Das RPE findet sich histologisch in direkter Nachbarschaft zur Choroidea – der blutführenden Aderhaut und ist am Aufbau der Blut-Retina Schranke beteiligt. An dieser Grenze zwischen der immunprivilegierten Zone der Retina, in der sich die retinale Mikroglia befindet und der mit dem systemischen Blutkreislauf verbundenen Choroidea kann das RPE *danger signals* viraler, bakterieller oder von Protozoen Infektionen zum Beispiel Herpes Viren oder Toxoplasmen ausgesetzt sein. Es konnte gezeigt werden, dass leptomeningeale Zellen der äußeren Barriere der Blut-Hirn Schranke auf systemische inflammatorische Signale reagieren, diese an die Mikroglia weiterleiten und damit aktivieren (Wu et al., 2005). Die in den Limitationen unseres *in vitro* Modells gewonnenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass das RPE die Signaltransduktion systemischer inflammatorischer Reize an retinale Mikroglia vermitteln könnte; entsprechend einer Weiterleitung proinflammatorischer Signale in die immunprivilegierte Zone der inneren Retina zum Beispiel über lösliche Faktoren (*soluble factors*) wie Zytokine. Darüber hinaus zeigte die Aktivierung retinaler Mikroglia durch das

RPE nicht nur eine reine Induktion der proinflammatorischen Antwort retinaler Mikroglia sondern eine differenzierte, vom Grad der Aktivierung abhängige Immunantwort. Während die Induktion von IL-1 $\beta$ , IL-6 und COX-2 durch die Zugabe von RPE Überstand zu retinaler Mikroglia verstärkt wurde, zeigte sich eine Reduktion für iNOS, sowie eine indifferente Antwort für TNF $\alpha$ . Die Expression des antiinflammatorischen IL-10 in retinaler Mikroglia stieg bei Behandlung mit Überständen von nicht und basal Poly I:C stimulierten RPE signifikant an; in der Behandlung mit Überständen von stärker TLR-3 stimuliertem RPE verlor sich dieser antiinflammatorische Effekt. Diese Ergebnisse deuten auf einen stimulusabhängigen proinflammatorischen Effekt hin. Proinflammatorische Zytokine wie TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  können neurotoxische Effekte auslösen insbesondere synergistisch und in höheren Konzentrationen (Chao et al., 1995), (Downen et al., 1999; Hanisch, 2002). Als Mediator der neurotoxischen Effekte von IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  ist Stickstoffmonoxid (NO) über die Expression von iNOS beschrieben (Chao et al., 1995). Demgegenüber führt IL-6 nicht zu einer Steigerung der Expression von iNOS (Muñoz-Fernández and Fresno, 1998), ist im Gegenteil als neuroprotektiv beschrieben (Sanchez et al., 2003). In unseren Experimenten wurde die Expression von IL-6, IL1 $\beta$  und IL-10 in retinaler Mikroglia durch das RPE und abhängig von der Stärke der Stimulation des RPE (siehe oben) erhöht, während wir einen indifferenten Effekt für TNF $\alpha$  und eine Reduktion der Expression von iNOS feststellen konnten. Die Immunantwort weist durch das gezeigte Expressionsmuster neben der führenden inflammatorischen zugleich eine die Neurotoxizität limitierende Komponente auf. Für COX-2 zeigte sich eine Erhöhung der Expression in mit Überständen von TLR-3 stimulierten RPE behandelte Mikroglia gegenüber TLR-3 stimulierter Mikroglia ohne Zugabe von RPE Überständen. Neurodegenerative Effekte von Cox-2 sind beschrieben (Ju et al., 2003), sollen aber durch iNOS vermittelt werden (Nagayama et al., 1999), womit die beobachtete gleichzeitige verminderte Expression von iNOS die neurotoxischen Effekte von COX-2 dämpfen würde. Darüber hinaus wird die Beteiligung von COX-2 an neurodegenerativen Prozessen weiterhin diskutiert (Minghetti, 2004). Neuroprotektive Effekte von COX-2 wurden ebenfalls beschrieben (Aid et al., 2008). Für TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  zeigte sich eine verminderte Induktion der Expression in den 24h Werten verglichen mit 6 stündiger TLR-3 Aktivierung. Während für die längere Exposition mit TNF- $\alpha$  neurotoxische Effekte beschrieben sind, zeigte kurzzeitige Aktivierung unter demselben Stimulus neuroprotektive Effekte; ähnliche Ergebnisse konnten für IL-1 $\beta$  gezeigt werden (Chao and Hu, 1994; Dolga et al., 2008; Song et al., 2013). Die gewonnenen Daten unserer Experimente deuten auf eine differenzierte Immunantwort des RPEs im Zusammenspiel mit der retinalen Mikroglia hin; einer bei moderaten Stimulation effizienten zwischen pro- und antiinflammatorischen Faktoren balancierten Immunantwort, die erst bei starker Stimulation effektiv exazerbiert. Neben der chronischen Parainflammation und altersabhängigen Veränderungen der zellulären Oberflächen/Muster mit Aktivierung des angeborenen Immunsystems (Nita et al., 2014; Xu et al., 2009), (Ardeljan and Chan, 2013) wird auch

die okuläre Herpes simplex Virus Infektion als relevant für die Pathogenese der AMD beschrieben (Mukhamed'ianova et al., 2014). Es gibt eine Reihe von Theorien zur Pathogenese der AMD, die sich jedoch nicht gegenseitig ausschließen müssen, sondern sich logisch ergänzen können. Der multifaktoriellen Genese der AMD folgend könnten neben genetischen Polymorphismen, altersabhängigen Veränderungen des endogenen Proteinmuster/*patterns* und virale Infektionen zur abberanten Aktivierung des Immunsystems mit proinflammatorischem Effekt – wie die von uns bestimmte Interaktion TLR-3 stimuliertem RPEs und retinaler Mikroglia führen. Dieser Prozess könnte über eine chronifizierte parainflammatorische Immunantwort mit begleitenden nekroptotischen Prozessen, lokal exazerbiert, zur Entwicklung einer AMD führen.

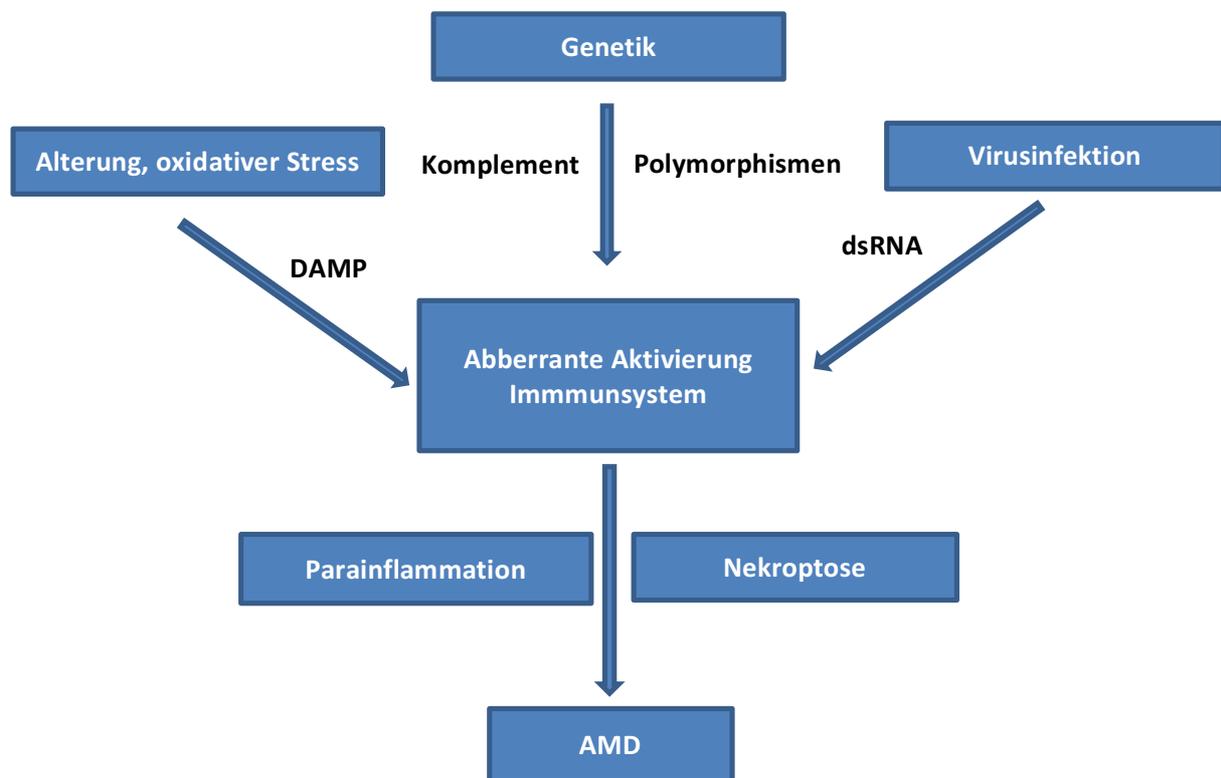


Abb. 4.1. Modell zur Pathogenese der AMD

Die Projektion unserer in vitro gewonnenen Ergebnisse auf die Pathogenese der AMD in vivo deutet auf die mögliche Aktivierung des RPEs durch Bestandteile von Drusen wie ds-RNA (Ebihara et al., 2007; Kumar et al., 2004) (Xu et al., 2009), DAMPs und veränderter Oberflächeneigenschaften der Zellen (Ardeljan and Chan, 2013) die auch TLR-3 vermittelt, einen *feed-forward* Mechanismus über lösliche Faktoren an die in den inneren und äußeren plexiformen Schicht gelegene retinale Mikroglia moderiert hin. Die dadurch aktivierte Mikroglia könnte dann in den immunprivilegierten SRR migrieren und dort ihrerseits, stimulusabhängig eine differenzierte Immunantwort induzieren, die wir in Ausschnitten anhand des in der *real-time* RT-PCR dargestellten Zytokin- und Effektorenzymmusters aufzeigen konnten. Die Bestimmung der exakten Pathophysiologie der AMD

und viraler Infektionen des Auges wird mit fortgeschritteneren retinalen Modellen möglich sein – aktuelle Modelle können eine Facette abbilden, bleiben aber von der Interpretation des Betrachters abhängig.

Die therapeutische, pharmakologische Relevanz der Interaktion TLR-3 stimulierter Zellen zeigen klinischen Studien zur si-RNA (kurze Fragmente von dsRNA) vermittelten Pharmakotherapie der AMD. Synthetische 21-nucleotid *small interfering* RNA (siRNA) wirkt als selektiver, sequenzspezifischer Inhibitor des Ziel-Gens (Elbashir et al., 2001), (Wall and Shi, 2003). Nach dieser Annahme wurde siRNA designed und schließlich in an feuchter AMD erkrankten Menschen getestet. Eine Phase III Studie an 330 Patienten die die Kombinationstherapie von Bevasiranib (siRNA mit VEGFA als pharmakologischem Target) in Kombination mit dem etablierten Ranibizumab der Monotherapie mit Ranibizumab gegenüberstellte deutete auf eine Überlegenheit der Kombinationstherapie hin (Clinical Trails, 2008), (Guzman-Aranguez et al., 2013) – die Studie wurde nie zu Ende geführt. Noch während die ersten Studien am Patienten durchgeführt wurden fanden (Kleinman et al., 2008), dass die Suppression von Neovaskularisation eine allgemeine Eigenschaft von 21nt siRNA ist – unabhängig von ihrer Sequenz und der Ziel mRNA. Dieser Effekt wird über die Bindung von siRNA an den TLR-3 vermittelt (Kleinman et al., 2008). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass siRNAs von  $\geq 21$  nt Länge zur dsRNA, TLR-3 abhängigen retinalen Degeneration führt (Kleinman et al., 2012), ein Effekt der bei siRNA  $< 21$ nt Länge ausblieben soll. Weitere klinische Studien von siRNA wie zu AGN211745 mit VEGFR1 als pharmakologischem *target* wurden trotz initial positiver Ergebnisse ebenfalls abgebrochen (Guzman-Aranguez et al., 2013). *Ultrashort-interfering* RNA (usiRNA) von 16-nt Länge sind Gegenstand aktueller Forschung, mit ihnen soll die sequenzspezifische Pharmakotherapie über iRNA unter Umgehung des potentiell retinotoxischen Effekts der TLR-3 Aktivierung möglich gemacht werden. Wie beschrieben – die TLR-3 getriggerte Immunantwort ist Teil des angeborenen Immunsystems und dient der Abwehr viraler Infektionen; die Effekte synthetischer iRNA mit  $\geq 21$  nt scheint eine TLR-3 abhängige exazerbierte antivirale Immunantwort auszulösen (Kleinman et al., 2012). Unsere in vitro gewonnenen Ergebnisse, die auch eine Exazerbation der proinflammatorischen Immunantwort retinaler Mikroglia bei höhergradiger Poly I:C Stimulation zeigen, können einen potentiell retinotoxischen Effekt abbilden der neben der AMD und der pharmakologischen RNA Interferenz auch Relevanz für Pathogenese viraler Infektionen haben kann. Um die potentielle Retinotoxizität der Mikroglia stimulation genauer zu untersuchen sind weitere Experimente erforderlich. Neben der experimentellen Stimulation und den oben beschriebenen Prozessen in der theoretischen Pathogenese der AMD findet die TLR-3 Aktivierung hauptsächlich durch virale dsRNA statt (Jacobs and Langland, 1996), (Alexopoulou et al., 2001). Herpes Viren sind die Hauptursache der retinalen Nekrose (Hillenkamp et al., 2009), die eine fulminante Form retinaler Degeneration, ein hochakutes Krankheitsbild mit akuter Visusgefährdung

darstellt. Die Rolle des TLR-3, der in der ersten Reihe der körpereigenen angeborenen Virusabwehr steht scheint vor dem Hintergrund der durch (Kleinman et al., 2012), (Murakami et al., 2014) beobachteten TLR-3 vermittelten Retinotoxizität von immanenter Bedeutung in der Pathophysiologie dieses Krankheitsbildes zu sein; und dabei gleichzeitig eine mögliche therapeutische Zielstruktur darzustellen. In der Literatur finden sich aktuell keine Aussagen über die die Interaktion von HHV mit dem TLR-3 vor dem Hintergrund der retinalen Nekrose. Grundlagenforschung zu diesem Thema bleibt notwendig, auch um zu evaluieren, ob eine therapeutische Verminderung der Rezeptordichte des TLR-3 zum Beispiel im Rahmen der RNA Interferenz eine Therapieoption darstellt und ob die programmierte Nekrose wie von Murakami et al., (2014) vorgeschlagen ein wirksamer therapeutischer Angriffspunkt ist. Zusammenfassend zeigt sich die Bedeutung des TLR-3 und seiner Wirkung nicht nur im Hinblick auf das Verständnis der Pathophysiologie der AMD und viraler Infektionen des Auges. Die Pharmakotherapie retinaler Erkrankungen muss auch auf Ebene der RNA Interferenz, um Wirksamkeit zu erreichen die differenzierte Immunantwort der Retina auf TLR-3 Stimulation berücksichtigen.

## 5. Zusammenfassung

Die altersabhängige Makuladegeneration (AMD) ist Hauptursache für schwere Sehstörungen in der westlichen Welt. Es ist eine Volkskrankheit, deren Pathomechanismus noch nicht offengelegt werden konnte. Entzündliche Prozesse werden neben genetischer Prädisposition für die Genese der AMD verantwortlich gemacht. Im Fokus dieser Arbeit steht die noch unklare Interaktion retinalen Pigmentepithels (RPE) und retinaler Mikroglia, deren proinflammatorische Aktivität für die Pathogenese der AMD und viraler Infektionen mitverantwortlich gemacht wird. Das Ziel der Arbeit war es den Effekt von *toll like* Rezeptor-3 (TLR-3) stimuliertem RPE auf retinale Mikroglia anhand des Expressionsmusters pro/antiinflammatorischer Zytokine und Enzyme darzulegen, deren quantitative Bestimmung auf mRNA-Ebene in der *real-time* RT-PCR erfolgte. Die Versuche wurden an primären RPE- und retinalen Mikroglia Kulturen durchgeführt. Das RPE fungiert als Schnittstelle zwischen der Aderhaut (Choroidea) die mit dem systemischen Blutfluss verbunden ist und der immunprivilegierten Retina. Die retinale Mikroglia ist die gewebeständige Abwehrzelle. Der TLR-3 ist Teil des angeborenen Immunsystems und vermutlich an der Genese der AMD beteiligt. Mit viraler doppelsträngiger RNA (dsRNA) als Ligand dient er zudem der Virusabwehr. Da retinale Mikroglia und Mikroglia des restlichen ZNS unterschiedliche immunologische Eigenschaften aufweisen, wurde eine Zellkultur retinaler Mikroglia etabliert. Zum Mikroglia-nachweis und zur Qualitätskontrolle der Zellkultur dienten immunzytochemische Färbungen mit dem Mikroglia-Marker Anti-Iba-1-Antikörper, die den Kulturerfolg bestätigten. Unsere Experimente zeigen, dass durch *polyinosinic polycitidylic acid* (Poly I:C – synthetische dsRNA) TLR-3 stimulierte retinale Mikroglia mit einer signifikanten, konzentrationsabhängigen Induktion der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  und der Effektorenzyme COX-2 und iNOS reagiert. In der Untersuchung der Interaktion TLR-3 stimulierten RPEs und retinaler Mikroglia zeigte sich eine signifikante Expressionssteigerung der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und des Effektorenzyms COX-2 gegenüber der mit identischer Poly I:C-Konzentration behandelten Kontrollgruppe retinaler Mikroglia. Die Immunantwort der vom RPE aktivierten Mikroglia ist nicht rein proinflammatorisch. Wir fanden eine Reduktion der Expression für iNOS, ein indifferentes Expressionsniveau für TNF- $\alpha$ , sowie ein signifikant erhöhtes Expressionsniveau für das antiinflammatorische Zytokin IL-10 bei Kontakt mit unbehandeltem RPE. Die Ergebnisse der Experimente deuten auf eine differenzierte Immunantwort des RPEs und retinaler Mikroglia hin, die erst bei starker Stimulation exazerbiert. Für Zytokine wie IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ , sowie das Enzym COX-2 sind neurodegenerative Effekte beschrieben – vermittelt über den Mediator Stickstoffmonoxid (NO) durch die Expression der iNOS. Wir beobachteten eine Reduktion der Expression von iNOS bei gleichzeitiger Induktion von COX-2 und IL-1 $\beta$  eine Entzündungsreaktion mit gleichzeitiger Limitation der Neurotoxizität. Das RPE kann an der Blut-

Retina-Barriere *danger signals* von Infektionen zum Beispiel viraler oder bakterieller Genese ausgesetzt sein. Eine Aktivierung kann zusätzlich durch Bestandteile von Drusen, wie dsRNA, DAMPs oder veränderte Oberflächeneigenschaften der Zellen erfolgen. Ein *feed-forward* Mechanismus, vermittelt über lösliche Faktoren, wie Zytokine, könnte die im Rahmen der AMD im subretinalen Raum in direkter Nachbarschaft zum RPE lokalisierte retinale Mikroglia aktivieren und die stimulusabhängige, differenzierte Immunantwort, die wir in Ausschnitten anhand des in der *real-time* RT-PCR dargestellten Zytokin- und Effektorenzymmusters aufzeigen konnten, induzieren. Mikroglia steht in der potentiellen Therapie neurodegenerativer Erkrankungen schon länger im Fokus der Forschung. Eine Modulation der Immunantwort von RPE und retinaler Mikroglia wäre ein Schritt vorwärts in der Therapie chronischer Krankheitsbilder wie der AMD, aber auch akuter Prozesse, wie viraler Infektionen.

## 6. Literaturverzeichnis

- Afonina**, I.A., Reed, M.W., Lusby, E., Shishkina, I.G., Belousov, Y.S., 2002. Minor groove binder-conjugated DNA probes for quantitative DNA detection by hybridization-triggered fluorescence. *BioTechniques* 32, 940–944, 946–949.
- Afonina, I., Zivarts, M., Kutayavin, I., Lukhtanov, E., Gamper, H., Meyer, R.B., 1997. Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Res.* 25, 2657–2660. doi:10.1093/nar/25.13.2657
- Aid, S., Langenbach, R., Bosetti, F., 2008. Neuroinflammatory response to lipopolysaccharide is exacerbated in mice genetically deficient in cyclooxygenase-2. *J. Neuroinflammation* 5, 17. doi:10.1186/1742-2094-5-17
- Akira, S., 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Adv. Immunol.* 78, 1–56.
- Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R., Flavell, R.A., 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- $\kappa$ B by Toll-like receptor 3. *Nature* 413, 732–738. doi:10.1038/35099560
- Ardeljan, C.P., Ardeljan, D., Abu-Asab, M., Chan, C.-C., 2014. Inflammation and Cell Death in Age-Related Macular Degeneration: An Immunopathological and Ultrastructural Model. *J. Clin. Med.* 3, 1542–1560. doi:10.3390/jcm3041542
- Ardeljan, D., Chan, C.-C., 2013. Aging is not a disease: Distinguishing age-related macular degeneration from aging. *Prog. Retin. Eye Res.* 37, 68–89. doi:10.1016/j.preteyeres.2013.07.003
- Balaiya**, S., Murthy, R.K., Brar, V.S., Chalam, K.V., 2010. Evaluation of ultraviolet light toxicity on cultured retinal pigment epithelial and retinal ganglion cells. *Clin. Ophthalmol. Auckl. NZ* 4, 33–39.
- Baltimore, D., 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 226, 1209–1211.
- Bianchi, M.E., 2007. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J. Leukoc. Biol.* 81, 1–5. doi:10.1189/jlb.0306164
- Bird, A.C., Bressler, N.M., Bressler, S.B., Chisholm, I.H., Coscas, G., Davis, M.D., de Jong, P.T., Klaver, C.C., Klein, B.E., Klein, R., 1995. An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. The International ARM Epidemiological Study Group. *Surv. Ophthalmol.* 39, 367–374.
- Bö, L., Dawson, T.M., Wesselingh, S., Mörk, S., Choi, S., Kong, P.A., Hanley, D., Trapp, B.D., 1994. Induction of nitric oxide synthase in demyelinating regions of multiple sclerosis brains. *Ann. Neurol.* 36, 778–786. doi:10.1002/ana.410360515
- Bok, D., 1993. The retinal pigment epithelium: a versatile partner in vision. *J. Cell Sci. Suppl.* 17, 189–195.
- Brody, B.L., Gamst, A.C., Williams, R.A., Smith, A.R., Lau, P.W., Dolnak, D., Rapaport, M.H., Kaplan, R.M., Brown, S.I., 2001. Depression, visual acuity, comorbidity, and disability associated with age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 108, 1893-1900-1901.
- Cai**, J., Nelson, K.C., Wu, M., Sternberg, P., Jones, D.P., 2000. Oxidative damage and protection of the RPE. *Prog. Retin. Eye Res.* 19, 205–221.
- Chao, C.C., Hu, S., 1994. Tumor necrosis factor-alpha potentiates glutamate neurotoxicity in human fetal brain cell cultures. *Dev. Neurosci.* 16, 172–179.
- Chao, C.C., Hu, S., Ehrlich, L., Peterson, P.K., 1995. Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha synergistically mediate neurotoxicity: involvement of nitric oxide and of N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain. Behav. Immun.* 9, 355–365.
- Coleman, H.R., Chan, C.-C., Ferris III, F.L., Chew, E.Y., 2008. Age-related macular degeneration. *The Lancet* 372, 1835–1845. doi:10.1016/S0140-6736(08)61759-6
- Crabb, J.W., Miyagi, M., Gu, X., Shadrach, K., West, K.A., Sakaguchi, H., Kamei, M., Hasan, A., Yan, L., Rayborn, M.E., Salomon, R.G., Hollyfield, J.G., 2002. Drusen proteome analysis: an approach

- to the etiology of age-related macular degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 14682–14687. doi:10.1073/pnas.222551899
- Curcio, C.A., Johnson, M., Huang, J.-D., Rudolf, M., 2009. Aging, age-related macular degeneration, and the response-to-retention of apolipoprotein B-containing lipoproteins. *Prog. Retin. Eye Res.* 28, 393–422. doi:10.1016/j.preteyeres.2009.08.001
- Davis**, M.D., Gangnon, R.E., Lee, L.-Y., Hubbard, L.D., Klein, B.E.K., Klein, R., Ferris, F.L., Bressler, S.B., Milton, R.C., Age-Related Eye Disease Study Group, 2005. The Age-Related Eye Disease Study severity scale for age-related macular degeneration: AREDS Report No. 17. *Arch. Ophthalmol.* 123, 1484–1498. doi:10.1001/archophth.123.11.1484
- Dayhaw-Barker, P., 2002. Retinal pigment epithelium melanin and ocular toxicity. *Int. J. Toxicol.* 21, 451–454. doi:10.1080/10915810290169873
- De Nardo, D., 2015. Toll-like receptors: Activation, signalling and transcriptional modulation. *Cytokine*. doi:10.1016/j.cyto.2015.02.025
- Delidow, B.C., Lynch, J.P., Peluso, J.J., White, B.A., 1996. Polymerase chain reaction. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 58, 275–292. doi:10.1385/0-89603-402-X:275
- Descoteaux, A., Matlashewski, G., 1990. Regulation of tumor necrosis factor gene expression and protein synthesis in murine macrophages treated with recombinant tumor necrosis factor. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 145, 846–853.
- Devarajan, G., Chen, M., Muckersie, E., Xu, H., 2014. Culture and characterization of microglia from the adult murine retina. *ScientificWorldJournal* 2014, 894368. doi:10.1155/2014/894368
- Dinareello, C.A., Ikejima, T., Warner, S.J., Orencole, S.F., Lonnemann, G., Cannon, J.G., Libby, P., 1987. Interleukin 1 induces interleukin 1. I. Induction of circulating interleukin 1 in rabbits in vivo and in human mononuclear cells in vitro. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 139, 1902–1910.
- Dolga, A.M., Granic, I., Blank, T., Knaus, H.-G., Spiess, J., Luiten, P.G.M., Eisel, U.L.M., Nijholt, I.M., 2008. TNF-alpha-mediates neuroprotection against glutamate-induced excitotoxicity via NF-kappaB-dependent up-regulation of K2.2 channels. *J. Neurochem.* 107, 1158–1167. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05701.x
- Dornonville de la Cour, M., 1993. Ion transport in the retinal pigment epithelium. A study with double barrelled ion-selective microelectrodes. *Acta Ophthalmol. Suppl.* 1–32.
- Downen, M., Amaral, T.D., Hua, L.L., Zhao, M.L., Lee, S.C., 1999. Neuronal death in cytokine-activated primary human brain cell culture: role of tumor necrosis factor-alpha. *Glia* 28, 114–127.
- Ebihara**, N., Chen, L., Tokura, T., Ushio, H., Iwatsu, M., Murakami, A., 2007. Distinct functions between toll-like receptors 3 and 9 in retinal pigment epithelial cells. *Ophthalmic Res.* 39, 155–163. doi:10.1159/000103235
- Edwards, A.O., Ritter, R., Abel, K.J., Manning, A., Panhuysen, C., Farrer, L.A., 2005. Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science* 308, 421–424. doi:10.1126/science.1110189
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., Tuschl, T., 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494–498. doi:10.1038/35078107
- Eurostat, 2011. European Commission - Eurostat - Population structure and aging.
- Ferris**, F.L., Davis, M.D., Clemons, T.E., Lee, L.-Y., Chew, E.Y., Lindblad, A.S., Milton, R.C., Bressler, S.B., Klein, R., Age-Related Eye Disease Study (AREDS) Research Group, 2005. A simplified severity scale for age-related macular degeneration: AREDS Report No. 18. *Arch. Ophthalmol.* 123, 1570–1574. doi:10.1001/archophth.123.11.1570
- Ferris, F.L., Wilkinson, C.P., Bird, A., Chakravarthy, U., Chew, E., Csaky, K., Sadda, S.R., 2013. Clinical Classification of Age-related Macular Degeneration. *Ophthalmology* 120, 844–851. doi:10.1016/j.ophtha.2012.10.036
- Finger, R.P., Bertram, B., Wolfram, C., Holz, F.G., 2012. Blindness and visual impairment in Germany: a slight fall in prevalence. *Dtsch. Ärztebl. Int.* 109, 484–489. doi:10.3238/arztebl.2012.0484

- Finger, R.P., Fimmers, R., Holz, F.G., Scholl, H.P.N., 2011. Incidence of blindness and severe visual impairment in Germany: projections for 2030. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 4381–4389. doi:10.1167/iovs.10-6987
- Finnemann, S.C., 2003. Focal adhesion kinase signaling promotes phagocytosis of integrin-bound photoreceptors. *EMBO J.* 22, 4143–4154. doi:10.1093/emboj/cdg416
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806–811. doi:10.1038/35888
- Fong, Y., Tracey, K.J., Moldawer, L.L., Hesse, D.G., Manogue, K.B., Kenney, J.S., Lee, A.T., Kuo, G.C., Allison, A.C., Lowry, S.F., 1989. Antibodies to cachectin/tumor necrosis factor reduce interleukin 1 beta and interleukin 6 appearance during lethal bacteremia. *J. Exp. Med.* 170, 1627–1633.
- Förster, T., 1948. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. Phys.* 437, 55–75. doi:10.1002/andp.19484370105
- Friedman, D.S., O'Colmain, B.J., Muñoz, B., Tomany, S.C., McCarty, C., de Jong, P.T.V.M., Nemesure, B., Mitchell, P., Kempen, J., Eye Diseases Prevalence Research Group, 2004. Prevalence of age-related macular degeneration in the United States. *Arch. Ophthalmol.* 122, 564–572. doi:10.1001/archophth.122.4.564
- Fritsche, L.G., Chen, W., Schu, M., Yaspan, B.L., Yu, Y., Thorleifsson, G., Zack, D.J., Arakawa, S., Cipriani, V., Ripke, S., Igo, R.P., Buitendijk, G.H.S., Sim, X., Weeks, D.E., Guymer, R.H., Merriam, J.E., Francis, P.J., Hannum, G., Agarwal, A., Armbrecht, A.M., Aung, I., Aung, T., Barile, G.R., Benchaboune, M., Bird, A.C., Bishop, P.N., Branham, K.E., Brooks, M., Brucker, A.J., Cade, W.H., Cain, M.S., Campochiaro, P.A., Chan, C.-C., Cheng, C.-Y., Chew, E.Y., Chin, K.A., Chowers, I., Clayton, D.G., Cojocaru, R., Conley, Y.P., Cornes, B.K., Daly, M.J., Dhillon, B., Edwards, A.O., Evangelou, E., Fagerness, J., Ferreyra, H.A., Friedman, J.S., Geirsdottir, A., George, R.J., Gieger, C., Gupta, N., Hagstrom, S.A., Harding, S.P., Haritoglou, C., Heckenlively, J.R., Holz, F.G., Hughes, G., Ioannidis, J.P.A., Ishibashi, T., Joseph, P., Jun, G., Kamatani, Y., Katsanis, N., Keilhauser, C., Khan, J.C., Kim, I.K., Kiyohara, Y., Klein, B.E.K., Klein, R., Kovach, J.L., Kozak, I., Lee, C.J., Lee, K.E., Lichtner, P., Lotery, A.J., Meitinger, T., Mitchell, P., Mohand-Said, S., Moore, A.T., Morgan, D.J., Morrison, M.A., Myers, C.E., Naj, A.C., Nakamura, Y., Okada, Y., Orlin, A., Ortube, M.C., Othman, M.I., Pappas, C., Park, K.H., Pauer, G.J.T., Peachey, N.S., Poch, O., Priya, R.R., Reynolds, R., Richardson, A.J., Ripp, R., Rudolph, G., Ryu, E., Sahel, J.-A., Schaumberg, D.A., Scholl, H.P.N., Schwartz, S.G., Scott, W.K., Shahid, H., Sigurdsson, H., Silvestri, G., Sivakumaran, T.A., Smith, R.T., Sobrin, L., Souied, E.H., Stambolian, D.E., Stefansson, H., Sturgill-Short, G.M., Takahashi, A., Tosakulwong, N., Truitt, B.J., Tsironi, E.E., Uitterlinden, A.G., van Duijn, C.M., Vijaya, L., Vingerling, J.R., Vithana, E.N., Webster, A.R., Wichmann, H.-E., Winkler, T.W., Wong, T.Y., Wright, A.F., Zelenika, D., Zhang, M., Zhao, L., Zhang, K., Klein, M.L., Hageman, G.S., Lathrop, G.M., Stefansson, K., Allikmets, R., Baird, P.N., Gorin, M.B., Wang, J.J., Klaver, C.C.W., Seddon, J.M., Pericak-Vance, M.A., Iyengar, S.K., Yates, J.R.W., Swaroop, A., Weber, B.H.F., Kubo, M., Deangelis, M.M., Léveillard, T., Thorsteinsdottir, U., Haines, J.L., Farrer, L.A., Heid, I.M., Abecasis, G.R., AMD Gene Consortium, 2013. Seven new loci associated with age-related macular degeneration. *Nat. Genet.* 45, 433–439, 439–2. doi:10.1038/ng.2578
- Funami, K., Matsumoto, M., Oshiumi, H., Akazawa, T., Yamamoto, A., Seya, T., 2004. The cytoplasmic “linker region” in Toll-like receptor 3 controls receptor localization and signaling. *Int. Immunol.* 16, 1143–1154. doi:10.1093/intimm/dxh115
- Gehrmann, J.**, Matsumoto, Y., Kreutzberg, G.W., 1995. Microglia: intrinsic immune effector cell of the brain. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 20, 269–287.
- Giulian, D., Baker, T.J., 1986. Characterization of amoeboid microglia isolated from developing mammalian brain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 6, 2163–2178.
- Gold, B., Merriam, J.E., Zernant, J., Hancox, L.S., Taiber, A.J., Gehrs, K., Cramer, K., Neel, J., Bergeron, J., Barile, G.R., Smith, R.T., AMD Genetics Clinical Study Group, Hageman, G.S., Dean, M.,

- Allikmets, R., 2006. Variation in factor B (BF) and complement component 2 (C2) genes is associated with age-related macular degeneration. *Nat. Genet.* 38, 458–462. doi:10.1038/ng1750
- Gordiyenko, N., Campos, M., Lee, J.W., Fariss, R.N., Sztein, J., Rodriguez, I.R., 2004. RPE cells internalize low-density lipoprotein (LDL) and oxidized LDL (oxLDL) in large quantities in vitro and in vivo. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45, 2822–2829. doi:10.1167/iovs.04-0074
- Graeber, M.B., Streit, W.J., 2010. Microglia: biology and pathology. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 119, 89–105. doi:10.1007/s00401-009-0622-0
- Green, W.R., Enger, C., 1993. Age-related macular degeneration histopathologic studies. The 1992 Lorenz E. Zimmerman Lecture. *Ophthalmology* 100, 1519–1535.
- Grehn, F., 2012. *Augenheilkunde*, 31st ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin Heidelberg.
- Gupta, N., Brown, K.E., Milam, A.H., 2003. Activated microglia in human retinitis pigmentosa, late-onset retinal degeneration, and age-related macular degeneration. *Exp. Eye Res.* 76, 463–471. doi:10.1016/S0014-4835(02)00332-9
- Guzman-Aranguéz, A., Loma, P., Pintor, J., 2013. Small-interfering RNAs (siRNAs) as a promising tool for ocular therapy. *Br. J. Pharmacol.* 170, 730–747. doi:10.1111/bph.12330
- Hageman**, G.S., Anderson, D.H., Johnson, L.V., Hancox, L.S., Taiber, A.J., Hardisty, L.I., Hageman, J.L., Stockman, H.A., Borchardt, J.D., Gehrs, K.M., Smith, R.J.H., Silvestri, G., Russell, S.R., Klaver, C.C.W., Barbazetto, I., Chang, S., Yannuzzi, L.A., Barile, G.R., Merriam, J.C., Smith, R.T., Olsh, A.K., Bergeron, J., Zernant, J., Merriam, J.E., Gold, B., Dean, M., Allikmets, R., 2005. A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 7227–7232. doi:10.1073/pnas.0501536102
- Hageman, G.S., Luthert, P.J., Victor Chong, N.H., Johnson, L.V., Anderson, D.H., Mullins, R.F., 2001. An integrated hypothesis that considers drusen as biomarkers of immune-mediated processes at the RPE-Bruch's membrane interface in aging and age-related macular degeneration. *Prog. Retin. Eye Res.* 20, 705–732.
- Haines, J.L., Hauser, M.A., Schmidt, S., Scott, W.K., Olson, L.M., Gallins, P., Spencer, K.L., Kwan, S.Y., Nouredine, M., Gilbert, J.R., Schnetz-Boutaud, N., Agarwal, A., Postel, E.A., Pericak-Vance, M.A., 2005. Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science* 308, 419–421. doi:10.1126/science.1110359
- Hanisch, U.-K., 2002. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* 40, 140–155. doi:10.1002/glia.10161
- Hanisch, U.-K., Kettenmann, H., 2007. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat. Neurosci.* 10, 1387–1394. doi:10.1038/nn1997
- Harman, D., 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11, 298–300.
- Harrabi, H., Kergoat, M.-J., Rousseau, J., Boisjoly, H., Schmaltz, H., Moghadaszadeh, S., Roy-Gagnon, M.-H., Freeman, E.E., 2015. Age-related eye disease and cognitive function. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 56, 1217–1221. doi:10.1167/iovs.14-15370
- Hartman, L.J., Coyne, S.R., Norwood, D.A., 2005. Development of a novel internal positive control for Taqman based assays. *Mol. Cell. Probes* 19, 51–59. doi:10.1016/j.mcp.2004.07.006
- Helgason, H., Sulem, P., Duvvari, M.R., Luo, H., Thorleifsson, G., Stefansson, H., Jonsdottir, I., Masson, G., Gudbjartsson, D.F., Walters, G.B., Magnusson, O.T., Kong, A., Rafnar, T., Kiemenev, L.A., Schoenmaker-Koller, F.E., Zhao, L., Boon, C.J.F., Song, Y., Fauser, S., Pei, M., Ristau, T., Patel, S., Liakopoulos, S., van de Ven, J.P.H., Hoyng, C.B., Ferreyra, H., Duan, Y., Bernstein, P.S., Geirsdottir, A., Helgadóttir, G., Stefansson, E., den Hollander, A.I., Zhang, K., Jonasson, F., Sigurdsson, H., Thorsteinsdottir, U., Stefansson, K., 2013. A rare nonsynonymous sequence variant in C3 is associated with high risk of age-related macular degeneration. *Nat. Genet.* 45, 1371–1374. doi:10.1038/ng.2740

- Higgins, G.T., Wang, J.H., Dockery, P., Cleary, P.E., Redmond, H.P., 2003. Induction of angiogenic cytokine expression in cultured RPE by ingestion of oxidized photoreceptor outer segments. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 1775–1782.
- Hillenkamp, J., Nölle, B., Bruns, C., Rautenberg, P., Fickenscher, H., Roeder, J., 2009. Acute retinal necrosis: clinical features, early vitrectomy, and outcomes. *Ophthalmology* 116, 1971–1975.e2. doi:10.1016/j.ophtha.2009.03.029
- Hirneiß, C., Kampik, A., Neubauer, A.S., 2014. [Macroeconomic costs of eye diseases]. *Ophthalmol. Z. Dtsch. Ophthalmol. Ges.* 111, 420–427. doi:10.1007/s00347-013-2921-z
- Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., Gelfand, D.H., 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 7276–7280.
- Horn Florian, 2009. *Biochemie des Menschen*, 4. Auflage, S.407-424, ed. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, Deutschland.
- Howes, K.A., Liu, Y., Dunaief, J.L., Milam, A., Frederick, J.M., Marks, A., Baehr, W., 2004. Receptor for advanced glycation end products and age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45, 3713–3720. doi:10.1167/iovs.04-0404
- Huang, J., Xie, Y., Sun, X., Zeh, H.J., Kang, R., Lotze, M.T., Tang, D., 2015. DAMPs, ageing, and cancer: The “DAMP Hypothesis.” *Ageing Res. Rev.* 24, 3–16. doi:10.1016/j.arr.2014.10.004
- Imai**, Y., Kohsaka, S., 2002. Intracellular signaling in M-CSF-induced microglia activation: role of Iba1. *Glia* 40, 164–174. doi:10.1002/glia.10149
- Ishmael, F.T., Stellato, C., 2008. Principles and applications of polymerase chain reaction: basic science for the practicing physician. *Ann. Allergy Asthma Immunol. Off. Publ. Am. Coll. Allergy Asthma Immunol.* 101, 437–443. doi:10.1016/S1081-1206(10)60323-7
- Jack**, C.S., Arbour, N., Manusow, J., Montgrain, V., Blain, M., McCrea, E., Shapiro, A., Antel, J.P., 2005. TLR Signaling Tailors Innate Immune Responses in Human Microglia and Astrocytes. *J. Immunol.* 175, 4320–4330. doi:10.4049/jimmunol.175.7.4320
- Jacobs, B.L., Langland, J.O., 1996. When two strands are better than one: the mediators and modulators of the cellular responses to double-stranded RNA. *Virology* 219, 339–349. doi:10.1006/viro.1996.0259
- Janeway C., 2011. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. Garland Science; New York, NY, USA.
- Jerri Y. Niederkorn, Harry J. Kaplan, 2007. *Immune Response and the Eye*, 2nd revised edition. ed. Karger.
- Johnson, L.V., Leitner, W.P., Rivest, A.J., Staples, M.K., Radeke, M.J., Anderson, D.H., 2002. The Alzheimer's A beta -peptide is deposited at sites of complement activation in pathologic deposits associated with aging and age-related macular degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 11830–11835. doi:10.1073/pnas.192203399
- Johnson, L.V., Leitner, W.P., Staples, M.K., Anderson, D.H., 2001. Complement activation and inflammatory processes in Drusen formation and age related macular degeneration. *Exp. Eye Res.* 73, 887–896. doi:10.1006/exer.2001.1094
- Johnson, T., Rovner, B., Haller, J., 2014. Suicide and visual loss: a case report reflecting the need for recognition and management in ophthalmological settings. *Semin. Ophthalmol.* 29, 202–204. doi:10.3109/08820538.2013.821500
- Jones, S.A., 2005. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 175, 3463–3468.
- Ju, W.-K., Kim, K.-Y., Neufeld, A.H., 2003. Increased activity of cyclooxygenase-2 signals early neurodegenerative events in the rat retina following transient ischemia. *Exp. Eye Res.* 77, 137–145.
- Kaneko**, H., Dridi, S., Tarallo, V., Gelfand, B.D., Fowler, B.J., Cho, W.G., Kleinman, M.E., Ponicsan, S.L., Hauswirth, W.W., Chiodo, V.A., Karikó, K., Yoo, J.W., Lee, D., Hadziahmetovic, M., Song, Y., Misra, S., Chaudhuri, G., Buaas, F.W., Braun, R.E., Hinton, D.R., Zhang, Q., Grossniklaus, H.E., Provis, J.M., Madigan, M.C., Milam, A.H., Justice, N.L., Albuquerque, R.J.C., Blandford, A.D.,

- Bogdanovich, S., Hirano, Y., Witta, J., Fuchs, E., Littman, D.R., Ambati, B.K., Rudin, C.M., Chong, M.M.W., Provost, P., Kugel, J.F., Goodrich, J.A., Dunaief, J.L., Baffi, J.Z., Ambati, J., 2011. DICER1 deficit induces Alu RNA toxicity in age-related macular degeneration. *Nature* 471, 325–330. doi:10.1038/nature09830
- Karlstetter, M., Langmann, T., 2012. [Immune mechanisms in retinal degeneration]. *Klin. Monatsblätter Für Augenheilkd.* 229, 221–226. doi:10.1055/s-0031-1282050
- Karlstetter, M., Scholz, R., Rutar, M., Wong, W.T., Provis, J.M., Langmann, T., 2015. Retinal microglia: just bystander or target for therapy? *Prog. Retin. Eye Res.* 45, 30–57. doi:10.1016/j.preteyeres.2014.11.004
- Kauppinen, A., Niskanen, H., Suuronen, T., Kinnunen, K., Salminen, A., Kaarniranta, K., 2012. Oxidative stress activates NLRP3 inflammasomes in ARPE-19 cells--implications for age-related macular degeneration (AMD). *Immunol. Lett.* 147, 29–33. doi:10.1016/j.imlet.2012.05.005
- Kawai, T., Akira, S., 2011. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* 34, 637–650. doi:10.1016/j.immuni.2011.05.006
- Kettenmann, H., Hanisch, U.-K., Noda, M., Verkhratsky, A., 2011. Physiology of microglia. *Physiol. Rev.* 91, 461–553. doi:10.1152/physrev.00011.2010
- Ketting, R.F., Fischer, S.E., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G.J., Plasterk, R.H., 2001. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev.* 15, 2654–2659. doi:10.1101/gad.927801
- Khurana, R.N., Parikh, J.G., Saraswathy, S., Wu, G.-S., Rao, N.A., 2008. Mitochondrial oxidative DNA damage in experimental autoimmune uveitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 3299–3304. doi:10.1167/iovs.07-1607
- Kianianmomeni, A., Hallmann, A., 2013. Validation of reference genes for quantitative gene expression studies in *Volvox carteri* using real-time RT-PCR. *Mol. Biol. Rep.* doi:10.1007/s11033-013-2784-z
- Killingsworth, M.C., Sarks, J.P., Sarks, S.H., 1990. Macrophages related to Bruch's membrane in age-related macular degeneration. *Eye Lond. Engl.* 4 ( Pt 4), 613–621. doi:10.1038/eye.1990.86
- Kim, S.J., Li, J., 2013. Caspase blockade induces RIP3-mediated programmed necrosis in Toll-like receptor-activated microglia. *Cell Death Dis.* 4, e716. doi:10.1038/cddis.2013.238
- Kishimoto, T., Akira, S., Narazaki, M., Taga, T., 1995. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* 86, 1243–1254.
- Kivinen Niko, 2014. Bevacizumab does not affect autophagy clearance during proteasomal inhibition in human retinal pigment epithelial cells. *Kivinen N Al J. Bioch Emical Pharmac Ological R Esearch V Ol 2 1 44-53 M Arch 2014.*
- Klaver, C.C., Assink, J.J., van Leeuwen, R., Wolfs, R.C., Vingerling, J.R., Stijnen, T., Hofman, A., de Jong, P.T., 2001. Incidence and progression rates of age-related maculopathy: the Rotterdam Study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 2237–2241.
- Klein, R., Klein, B.E.K., Knudtson, M.D., Meuer, S.M., Swift, M., Gangnon, R.E., 2007. Fifteen-year cumulative incidence of age-related macular degeneration: the Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology* 114, 253–262. doi:10.1016/j.ophtha.2006.10.040
- Klein, R.J., Zeiss, C., Chew, E.Y., Tsai, J.-Y., Sackler, R.S., Haynes, C., Henning, A.K., SanGiovanni, J.P., Mane, S.M., Mayne, S.T., Bracken, M.B., Ferris, F.L., Ott, J., Barnstable, C., Hoh, J., 2005. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science* 308, 385–389. doi:10.1126/science.1109557
- Klein R, Myers CE, Cruickshanks KJ, et al, 2014. Markers of inflammation, oxidative stress, and endothelial dysfunction and the 20-year cumulative incidence of early age-related macular degeneration: The beaver dam eye study. *JAMA Ophthalmol.* 132, 446–455. doi:10.1001/jamaophthalmol.2013.7671
- Kleinman, M.E., Ambati, J., 2012. A Window to Innate Neuroimmunity: Toll-Like Receptor-Mediated Cell Responses in the Retina. *Adv. Exp. Med. Biol.* 723, 3–9. doi:10.1007/978-1-4614-0631-0\_1

- Kleinman, M.E., Kaneko, H., Cho, W.G., Dridi, S., Fowler, B.J., Blandford, A.D., Albuquerque, R.J.C., Hirano, Y., Terasaki, H., Kondo, M., Fujita, T., Ambati, B.K., Tarallo, V., Gelfand, B.D., Bogdanovich, S., Baffi, J.Z., Ambati, J., 2012. Short-interfering RNAs induce retinal degeneration via TLR3 and IRF3. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 20, 101–108. doi:10.1038/mt.2011.212
- Kleinman, M.E., Yamada, K., Takeda, A., Chandrasekaran, V., Nozaki, M., Baffi, J.Z., Albuquerque, R.J.C., Yamasaki, S., Itaya, M., Pan, Y., Appukuttan, B., Gibbs, D., Yang, Z., Karikó, K., Ambati, B.K., Wilgus, T.A., DiPietro, L.A., Sakurai, E., Zhang, K., Smith, J.R., Taylor, E.W., Ambati, J., 2008. Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3. *Nature* 452, 591–597. doi:10.1038/nature06765
- Klettner, A., 2015. Recent advances in eye research, *Eye and Vision Research Developments*. Nova Biomedical.
- Klettner, A., 2012. Oxidative stress induced cellular signaling in RPE cells. *Front. Biosci. Sch. Ed.* 4, 392–411.
- Klettner, A., Baumgrass, R., Zhang, Y., Fischer, G., Bürger, E., Herdegen, T., Mielke, K., 2001. The neuroprotective actions of FK506 binding protein ligands: neuronal survival is triggered by de novo RNA synthesis, but is independent of inhibition of JNK and calcineurin. *Mol. Brain Res.* 97, 21–31. doi:10.1016/S0169-328X(01)00286-8
- Klettner, A., Koinzer, S., Meyer, T., Roider, J., 2013. Toll-like receptor 3 activation in retinal pigment epithelium cells - Mitogen-activated protein kinase pathways of cell death and vascular endothelial growth factor secretion. *Acta Ophthalmol. (Copenh.)*. doi:10.1111/aos.12031
- Klettner, A., Roider, J., 2008. Comparison of Bevacizumab, Ranibizumab, and Pegaptanib In Vitro: Efficiency and Possible Additional Pathways. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 4523–4527. doi:10.1167/iovs.08-2055
- Klettner, Alexa, 2014. VEGF-A and its inhibitors in age-related macular degeneration – pharmacokinetic differences and their retinal and systemic implications. *Klettner J. Biochem. Pharmacol. Res.* Vol 2 1 8-20 March 2014.
- Kopp, E.B., Medzhitov, R., 1999. The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 11, 13–18.
- Krishnamoorthy, R.R., Crawford, M.J., Chaturvedi, M.M., Jain, S.K., Aggarwal, B.B., Al-Ubaidi, M.R., Agarwal, N., 1999. Photo-oxidative stress down-modulates the activity of nuclear factor-kappaB via involvement of caspase-1, leading to apoptosis of photoreceptor cells. *J. Biol. Chem.* 274, 3734–3743.
- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A., Zoric, N., 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Mol. Aspects Med.* 27, 95–125. doi:10.1016/j.mam.2005.12.007
- Kumar, M.V., Nagineni, C.N., Chin, M.S., Hooks, J.J., Detrick, B., 2004. Innate immunity in the retina: Toll-like receptor (TLR) signaling in human retinal pigment epithelial cells. *J. Neuroimmunol.* 153, 7–15. doi:10.1016/j.jneuroim.2004.04.018
- Kutyavin, I.V., Afonina, I.A., Mills, A., Gorn, V.V., Lukhtanov, E.A., Belousov, E.S., Singer, M.J., Walburger, D.K., Lokhov, S.G., Gall, A.A., Dempcy, R., Reed, M.W., Meyer, R.B., Hedgpeth, J., 2000. 3'-Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res.* 28, 655–661.
- Kutyavin, I.V., Lukhtanov, E.A., Gamper, H.B., Meyer, R.B., 1997. Oligonucleotides with conjugated dihydropyrroloindole tripeptides: base composition and backbone effects on hybridization. *Nucleic Acids Res.* 25, 3718–3723. doi:10.1093/nar/25.18.3718
- Lam, B.L., Christ, S.L., Lee, D.J., Zheng, D.D., Arheart, K.L., 2008. Reported visual impairment and risk of suicide: the 1986-1996 national health interview surveys. *Arch. Ophthalmol.* 126, 975–980. doi:10.1001/archophth.126.7.975
- Langmann, T., 2007. Microglia activation in retinal degeneration. *J. Leukoc. Biol.* 81, 1345–1351. doi:10.1189/jlb.0207114

- Lehnardt, S., 2010. Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: the role of microglia in Toll-like receptor-mediated neuronal injury. *Glia* 58, 253–263. doi:10.1002/glia.20928
- Li, G.-Y., Osborne, N.N., 2008. Oxidative-induced apoptosis to an immortalized ganglion cell line is caspase independent but involves the activation of poly(ADP-ribose)polymerase and apoptosis-inducing factor. *Brain Res.* 1188, 35–43. doi:10.1016/j.brainres.2007.10.073
- Lin, T., Walker, G.B., Kurji, K., Fang, E., Law, G., Prasad, S.S., Kojic, L., Cao, S., White, V., Cui, J.Z., Matsubara, J.A., 2013. Parainflammation associated with advanced glycation endproduct stimulation of RPE in vitro: implications for age-related degenerative diseases of the eye. *Cytokine* 62, 369–381. doi:10.1016/j.cyto.2013.03.027
- Liu, Y., Long, J., Liu, J., 2014. Mitochondrial free radical theory of aging: who moved my premise? *Geriatr. Gerontol. Int.* 14, 740–749. doi:10.1111/ggi.12296
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* 25, 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Lorenz, T.C., 2012. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *J. Vis. Exp. JoVE* e3998. doi:10.3791/3998
- Lüllmann-Rauch, R., 2006. Taschenatlas der Histologie, 2.Auflage, S.566-589, Georg Thieme Verlag KG
- Ma, W., Cojocaru, R., Gotoh, N., Gieser, L., Villasmil, R., Cogliati, T., Swaroop, A., Wong, W.T., 2013. Gene expression changes in aging retinal microglia: relationship to microglial support functions and regulation of activation. *Neurobiol. Aging* 34, 2310–2321. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2013.03.022
- Ma, W., Zhao, L., Fontainhas, A.M., Fariss, R.N., Wong, W.T., 2009. Microglia in the mouse retina alter the structure and function of retinal pigmented epithelial cells: a potential cellular interaction relevant to AMD. *PLoS One* 4, e7945. doi:10.1371/journal.pone.0007945
- Maini, R.N., Taylor, P.C., Szechinski, J., Pavelka, K., Bröll, J., Balint, G., Emery, P., Raemen, F., Petersen, J., Smolen, J., Thomson, D., Kishimoto, T., CHARISMA Study Group, 2006. Double-blind randomized controlled clinical trial of the interleukin-6 receptor antagonist, tocilizumab, in European patients with rheumatoid arthritis who had an incomplete response to methotrexate. *Arthritis Rheum.* 54, 2817–2829. doi:10.1002/art.22033
- Matsumoto, M., Funami, K., Tanabe, M., Oshiumi, H., Shingai, M., Seto, Y., Yamamoto, A., Seya, T., 2003. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 171, 3154–3162.
- Medzhitov, R., 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454, 428–435. doi:10.1038/nature07201
- Medzhitov, R., Janeway, C., 2000a. The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends Microbiol.* 8, 452–456.
- Medzhitov, R., Janeway, C., 2000b. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol. Rev.* 173, 89–97.
- Mello, C.C., Conte, D., 2004. Revealing the world of RNA interference. *Nature* 431, 338–342. doi:10.1038/nature02872
- Merrill, J.E., Ignarro, L.J., Sherman, M.P., Melinek, J., Lane, T.E., 1993. Microglial cell cytotoxicity of oligodendrocytes is mediated through nitric oxide. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 151, 2132–2141.
- Milikan, J.C.M., Baarsma, G.S., Kuijpers, R.W.A.M., Osterhaus, A.D.M.E., Verjans, G.M.G.M., 2009. Human ocular-derived virus-specific CD4+ T cells control varicella zoster virus replication in human retinal pigment epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50, 743–751. doi:10.1167/iovs.08-2611
- Miller, J.W., Le Couter, J., Strauss, E.C., Ferrara, N., 2013. Vascular endothelial growth factor a in intraocular vascular disease. *Ophthalmology* 120, 106–114. doi:10.1016/j.ophtha.2012.07.038

- Minagar, A., Shapshak, P., Fujimura, R., Ownby, R., Heyes, M., Eisdorfer, C., 2002. The role of macrophage/microglia and astrocytes in the pathogenesis of three neurologic disorders: HIV-associated dementia, Alzheimer disease, and multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 202, 13–23.
- Minghetti, L., 2004. Cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory and degenerative brain diseases. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 63, 901–910.
- Moshfeghi, D.M., Blumenkranz, M.S., 2007. Role of genetic factors and inflammation in age-related macular degeneration. *Retina Phila. Pa* 27, 269–275. doi:10.1097/IAE.0b013e31802e3e9b
- Mukhamed'ianova, A.S., Aznabaev, R.A., Aznabaeva, A.F., 2014. [Clinical and immunological factors of the onset and development of age-related macular degeneration]. *Vestn. Oftalmol.* 130, 9–13.
- Mullins, R.F., Russell, S.R., Anderson, D.H., Hageman, G.S., 2000. Drusen associated with aging and age-related macular degeneration contain proteins common to extracellular deposits associated with atherosclerosis, elastosis, amyloidosis, and dense deposit disease. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 14, 835–846.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H., 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51 Pt 1, 263–273.
- Muñoz-Fernández, M.A., Fresno, M., 1998. The role of tumour necrosis factor, interleukin 6, interferon-gamma and inducible nitric oxide synthase in the development and pathology of the nervous system. *Prog. Neurobiol.* 56, 307–340.
- Murakami, Y., Matsumoto, H., Roh, M., Giani, A., Kataoka, K., Morizane, Y., Kayama, M., Thanos, A., Nakatake, S., Notomi, S., Hisatomi, T., Ikeda, Y., Ishibashi, T., Connor, K.M., Miller, J.W., Vavvas, D.G., 2014. Programmed necrosis, not apoptosis, is a key mediator of cell loss and DAMP-mediated inflammation in dsRNA-induced retinal degeneration. *Cell Death Differ.* 21, 270–277. doi:10.1038/cdd.2013.109
- Nagayama**, M., Niwa, K., Nagayama, T., Ross, M.E., Iadecola, C., 1999. The cyclooxygenase-2 inhibitor NS-398 ameliorates ischemic brain injury in wild-type mice but not in mice with deletion of the inducible nitric oxide synthase gene. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 19, 1213–1219. doi:10.1097/00004647-199911000-00005
- Nahum, A., Dadi, H., Bates, A., Roifman, C.M., 2012. The biological significance of TLR3 variant, L412F, in conferring susceptibility to cutaneous candidiasis, CMV and autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* 11, 341–347. doi:10.1016/j.autrev.2011.10.007
- Nahum, A., Dadi, H., Bates, A., Roifman, C.M., 2011. The L412F variant of Toll-like receptor 3 (TLR3) is associated with cutaneous candidiasis, increased susceptibility to cytomegalovirus, and autoimmunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 127, 528–531. doi:10.1016/j.jaci.2010.09.031
- Nassar, K., Grisanti, S., Elfar, E., Lüke, J., Lüke, M., Grisanti, S., 2015. Serum cytokines as biomarkers for age-related macular degeneration. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. Albrecht Von Graefes Arch. Für Klin. Exp. Ophthalmol.* 253, 699–704. doi:10.1007/s00417-014-2738-8
- Newman, A.M., Gallo, N.B., Hancox, L.S., Miller, N.J., Radeke, C.M., Maloney, M.A., Cooper, J.B., Hageman, G.S., Anderson, D.H., Johnson, L.V., Radeke, M.J., 2012. Systems-level analysis of age-related macular degeneration reveals global biomarkers and phenotype-specific functional networks. *Genome Med.* 4, 16. doi:10.1186/gm315
- Nita, M., Grzybowski, A., Ascaso, F.J., Huerva, V., 2014. Age-related macular degeneration in the aspect of chronic low-grade inflammation (pathophysiological parainflammation). *Mediators Inflamm.* 2014, 930671. doi:10.1155/2014/930671
- Ohan**, N.W., Heikkila, J.J., 1993. Reverse transcription-polymerase chain reaction: an overview of the technique and its applications. *Biotechnol. Adv.* 11, 13–29.
- Ohsawa, K., Imai, Y., Sasaki, Y., Kohsaka, S., 2004. Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. *J. Neurochem.* 88, 844–856.
- Olson, J.K., Miller, S.D., 2004. Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 173, 3916–3924.

- O'Neill, L.A.J., Bowie, A.G., 2007. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 353–364. doi:10.1038/nri2079
- Overbergh, L., Giulietti, A., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R., Mathieu, C., 2003. The Use of Real-Time Reverse Transcriptase PCR for the Quantification of Cytokine Gene Expression. *J. Biomol. Tech. JBT* 14, 33–43.
- Pacher**, P., Beckman, J.S., Liaudet, L., 2007. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiol. Rev.* 87, 315–424. doi:10.1152/physrev.00029.2006
- Pannu, R., Singh, I., 2006. Pharmacological strategies for the regulation of inducible nitric oxide synthase: neurodegenerative versus neuroprotective mechanisms. *Neurochem. Int.* 49, 170–182. doi:10.1016/j.neuint.2006.04.010
- Parmeggiani, F., Sorrentino, F.S., Romano, M.R., Costagliola, C., Semeraro, F., Incorvaia, C., D'Angelo, S., Perri, P., De Nadai, K., Bonomo Roversi, E., Franceschelli, P., Sebastiani, A., Rubini, M., 2013. Mechanism of Inflammation in Age-Related Macular Degeneration: An Up-to-Date on Genetic Landmarks. *Mediators Inflamm.* 2013. doi:10.1155/2013/435607
- Patel, M., Chan, C.-C., 2008. Immunopathological aspects of age-related macular degeneration. *Semin. Immunopathol.* 30, 97–110. doi:10.1007/s00281-008-0112-9
- Penfold, P.L., Madigan, M.C., Provis, J.M., 1991. Antibodies to human leucocyte antigens indicate subpopulations of microglia in human retina. *Vis. Neurosci.* 7, 383–388.
- Pfaffl et. al, M.W., 2004. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung BIOSpectrum, Springer Verlag GmbH, Springer Spektrum, Heidelberg, S.92.
- Radi**, R., Rodriguez, M., Castro, L., Telleri, R., 1994. Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* 308, 89–95. doi:10.1006/abbi.1994.1013
- Ramirez, J.M., Triviño, A., Ramirez, A.I., Salazar, J.J., Garcia-Sanchez, J., 1994. Immunohistochemical study of human retinal astroglia. *Vision Res.* 34, 1935–1946.
- Ramprasad, M.P., Fischer, W., Witztum, J.L., Sambrano, G.R., Quehenberger, O., Steinberg, D., 1995. The 94- to 97-kDa mouse macrophage membrane protein that recognizes oxidized low density lipoprotein and phosphatidylserine-rich liposomes is identical to macrosialin, the mouse homologue of human CD68. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 9580–9584.
- Rand, T.A., Ginalski, K., Grishin, N.V., Wang, X., 2004. Biochemical identification of Argonaute 2 as the sole protein required for RNA-induced silencing complex activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 14385–14389. doi:10.1073/pnas.0405913101
- Rand, T.A., Petersen, S., Du, F., Wang, X., 2005. Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell* 123, 621–629. doi:10.1016/j.cell.2005.10.020
- Rasmussen, R., 2001. Quantification on the LightCycler, in: Meuer, P.D. med S., Wittwer, P.D.C., Nakagawara, D.K.-I. (Eds.), *Rapid Cycle Real-Time PCR*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 21–34.
- Rathmann, W., Scheidt-Nave, C., Roden, M., Herder, C., 2013. Type 2 diabetes: prevalence and relevance of genetic and acquired factors for its prediction. *Dtsch. Ärztebl. Int.* 110, 331–337. doi:10.3238/arztebl.2013.0331
- Ribaudo, R., Gilman, M., Kingston, R.E., Chomczynski, P., Sacchi, N., 2001. Preparation of RNA from Tissues and Cells, in: *Current Protocols in Neuroscience*. John Wiley & Sons, Inc.
- Richardson, A., Hao, C., Fedoroff, S., 1993. Microglia progenitor cells: a subpopulation in cultures of mouse neopallial astroglia. *Glia* 7, 25–33. doi:10.1002/glia.440070107
- Rivest, S., Lacroix, S., Vallières, L., Nadeau, S., Zhang, J., Laflamme, N., 2000. How the blood talks to the brain parenchyma and the paraventricular nucleus of the hypothalamus during systemic inflammatory and infectious stimuli. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y.* N 223, 22–38.
- Rodrigues, E.B., 2007. Inflammation in dry age-related macular degeneration. *Ophthalmol. J. Int. Ophthalmol. Int. J. Ophthalmol. Z. Für Augenheilkd.* 221, 143–152. doi:10.1159/000099293
- Sanchez**, R.N., Chan, C.K., Garg, S., Kwong, J.M.K., Wong, M.J., Sadun, A.A., Lam, T.T., 2003. Interleukin-6 in retinal ischemia reperfusion injury in rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 4006–4011.

- Sanvicens, N., Gómez-Vicente, V., Masip, I., Messeguer, A., Cotter, T.G., 2004. Oxidative stress-induced apoptosis in retinal photoreceptor cells is mediated by calpains and caspases and blocked by the oxygen radical scavenger CR-6. *J. Biol. Chem.* 279, 39268–39278. doi:10.1074/jbc.M402202200
- Sarks, S.H., 1976. Ageing and degeneration in the macular region: a clinico-pathological study. *Br. J. Ophthalmol.* 60, 324–341.
- Sarks, S.H., Van Driel, D., Maxwell, L., Killingsworth, M., 1980. Softening of drusen and subretinal neovascularization. *Trans. Ophthalmol. Soc. U. K.* 100, 414–422.
- Schnitzer, J., 1988. Astrocytes in the guinea pig, horse, and monkey retina: their occurrence coincides with the presence of blood vessels. *Glia* 1, 74–89. doi:10.1002/glia.440010109
- Scholz, M., Doerr, H.W., Cinatl, J., 2003. Human cytomegalovirus retinitis: pathogenicity, immune evasion and persistence. *Trends Microbiol.* 11, 171–178.
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., Johne, R., 2012. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J. Appl. Microbiol.* 113, 1014–1026. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x
- Seddon, J.M., Reynolds, R., Yu, Y., Daly, M.J., Rosner, B., 2011. Risk models for progression to advanced age-related macular degeneration using demographic, environmental, genetic, and ocular factors. *Ophthalmology* 118, 2203–2211. doi:10.1016/j.ophtha.2011.04.029
- Seddon, J.M., Yu, Y., Miller, E.C., Reynolds, R., Tan, P.L., Gowrisankar, S., Goldstein, J.I., Triebwasser, M., Anderson, H.E., Zerbib, J., Kavanagh, D., Souied, E., Katsanis, N., Daly, M.J., Atkinson, J.P., Raychaudhuri, S., 2013. Rare variants in CFI, C3 and C9 are associated with high risk of advanced age-related macular degeneration. *Nat. Genet.* 45, 1366–1370. doi:10.1038/ng.2741
- Singh, J.A., Christensen, R., Wells, G.A., Suarez-Almazor, M.E., Buchbinder, R., Lopez-Olivo, M.A., Tanjong Ghogomu, E., Tugwell, P., 2009. Biologics for rheumatoid arthritis: an overview of Cochrane reviews. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD007848. doi:10.1002/14651858.CD007848.pub2
- Song, C., Zhang, Y., Dong, Y., 2013. Acute and subacute IL-1 $\beta$  administrations differentially modulate neuroimmune and neurotrophic systems: possible implications for neuroprotection and neurodegeneration. *J. Neuroinflammation* 10, 59. doi:10.1186/1742-2094-10-59
- Sparrow, J.R., Boulton, M., 2005. RPE lipofuscin and its role in retinal pathobiology. *Exp. Eye Res.* 80, 595–606. doi:10.1016/j.exer.2005.01.007
- Steelman, A.J., Li, J., 2011. Poly(I:C) promotes TNF $\alpha$ /TNFR1-dependent oligodendrocyte death in mixed glial cultures. *J. Neuroinflammation* 8, 89. doi:10.1186/1742-2094-8-89
- Steinberg, R.H., 1985. Interactions between the retinal pigment epithelium and the neural retina. *Doc. Ophthalmol. Adv. Ophthalmol.* 60, 327–346.
- Strauss, O., 2005. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol. Rev.* 85, 845–881. doi:10.1152/physrev.00021.2004
- Suh, H.-S., Brosnan, C.F., Lee, S.C., 2009. Toll-Like Receptors in CNS Viral Infections, in: Kielian, T. (Ed.), *Toll-like Receptors: Roles in Infection and Neuropathology*, Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer Berlin Heidelberg, pp. 63–81.
- Tabeta**, K., Georgel, P., Janssen, E., Du, X., Hoebe, K., Crozat, K., Mudd, S., Shamel, L., Sovath, S., Goode, J., Alexopoulou, L., Flavell, R.A., Beutler, B., 2004. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 3516–3521. doi:10.1073/pnas.0400525101
- Tang, D., Kang, R., Zeh, H.J., Lotze, M.T., 2011. High-mobility group box 1, oxidative stress, and disease. *Antioxid. Redox Signal.* 14, 1315–1335. doi:10.1089/ars.2010.3356
- Tanuma, N., Sakuma, H., Sasaki, A., Matsumoto, Y., 2006. Chemokine expression by astrocytes plays a role in microglia/macrophage activation and subsequent neurodegeneration in secondary progressive multiple sclerosis. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 112, 195–204. doi:10.1007/s00401-006-0083-7
- Tedgui, A., Mallat, Z., 2006. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol. Rev.* 86, 515–581. doi:10.1152/physrev.00024.2005

- Teismann, P., Tieu, K., Choi, D.-K., Wu, D.-C., Naini, A., Hunot, S., Vila, M., Jackson-Lewis, V., Przedborski, S., 2003. Cyclooxygenase-2 is instrumental in Parkinson's disease neurodegeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 5473–5478. doi:10.1073/pnas.0837397100
- Temin, H.M., Mizutani, S., 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 226, 1211–1213.
- Terubayashi, H., Murabe, Y., Fujisawa, H., Itoi, M., Iyata, Y., 1984. Enzymohistochemical identification of microglial cells in the rat retina: light and electron microscopic studies. *Exp. Eye Res.* 39, 595–603.
- Thornton, J., Edwards, R., Mitchell, P., Harrison, R.A., Buchan, I., Kelly, S.P., 2005. Smoking and age-related macular degeneration: a review of association. *Eye Lond. Engl.* 19, 935–944. doi:10.1038/sj.eye.6701978
- Towbin, J.A., 1995. Polymerase chain reaction and its uses as a diagnostic tool for cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc. Med.* 5, 175–185. doi:10.1016/1050-1738(95)00059-I
- van Leeuwen, R., Klaver, C.C.W., Vingerling, J.R., Hofman, A., de Jong, P.T.V.M., 2003. The risk and natural course of age-related maculopathy: follow-up at 6 1/2 years in the Rotterdam study. *Arch. Ophthalmol.* 121, 519–526. doi:10.1001/archophth.121.4.519
- Wang, J.J., Rochtchina, E., Lee, A.J., Chia, E.-M., Smith, W., Cumming, R.G., Mitchell, P., 2007. Ten-year incidence and progression of age-related maculopathy: the blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology* 114, 92–98. doi:10.1016/j.ophtha.2006.07.017
- Werner, S., Grose, R., 2003. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol. Rev.* 83, 835–870. doi:10.1152/physrev.00031.2002
- Whitcup, S.M., Sodhi, A., Atkinson, J.P., Holers, V.M., Sinha, D., Rohrer, B., Dick, A.D., 2013. The role of the immune response in age-related macular degeneration. *Int. J. Inflamm.* 2013, 348092. doi:10.1155/2013/348092
- Wiencke, A.K., Kiilgaard, J.F., Nicolini, J., Bundgaard, M., Röpke, C., La Cour, M., 2003. Growth of cultured porcine retinal pigment epithelial cells. *Acta Ophthalmol. Scand.* 81, 170–176.
- Wong, M.L., Medrano, J.F., 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques* 39, 75–85.
- Wong, T.Y., Klein, R., Nieto, F.J., Moraes, S.A.D., Mosley, T.H., Couper, D.J., Klein, B.E.K., Boland, L.L., Hubbard, L.D., Sharrett, A.R., 2002. Is early age-related maculopathy related to cognitive function? The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Am. J. Ophthalmol.* 134, 828–835.
- Wörnle, M., Merkle, M., Wolf, A., Ribeiro, A., Himmelein, S., Kernt, M., Kampik, A., Eibl-Lindner, K.H., 2011. Inhibition of TLR3-mediated proinflammatory effects by Alkylphosphocholines in human retinal pigment epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 6536–6544. doi:10.1167/iovs.10-6993
- Wu, Z., Zhang, J., Nakanishi, H., 2005. Leptomeningeal cells activate microglia and astrocytes to induce IL-10 production by releasing pro-inflammatory cytokines during systemic inflammation. *J. Neuroimmunol.* 167, 90–98. doi:10.1016/j.jneuroim.2005.06.025
- Xia, Q., Hu, Q., Wang, H., Yang, H., Gao, F., Ren, H., Chen, D., Fu, C., Zheng, L., Zhen, X., Ying, Z., Wang, G., 2015. Induction of COX-2-PGE2 synthesis by activation of the MAPK/ERK pathway contributes to neuronal death triggered by TDP-43-depleted microglia. *Cell Death Dis.* 6, e1702. doi:10.1038/cddis.2015.69
- Xu, H., Chen, M., Forrester, J.V., 2009. Para-inflammation in the aging retina. *Prog. Retin. Eye Res.* 28, 348–368. doi:10.1016/j.preteyeres.2009.06.001
- Xu, H., Chen, M., Manivannan, A., Lois, N., Forrester, J.V., 2008. Age-dependent accumulation of lipofuscin in perivascular and subretinal microglia in experimental mice. *Aging Cell* 7, 58–68. doi:10.1111/j.1474-9726.2007.00351.x
- Xu, H., Chen, M., Mayer, E.J., Forrester, J.V., Dick, A.D., 2007. Turnover of resident retinal microglia in the normal adult mouse. *Glia* 55, 1189–1198. doi:10.1002/glia.20535
- Yang, Z., Stratton, C., Francis, P.J., Kleinman, M.E., Tan, P.L., Gibbs, D., Tong, Z., Chen, H., Constantine, R., Yang, X., Chen, Y., Zeng, J., Davey, L., Ma, X., Hau, V.S., Wang, C., Harmon, J., Buehler, J., Pearson, E., Patel, S., Kaminoh, Y., Watkins, S., Luo, L., Zabriskie, N.A., Bernstein,

- P.S., Cho, W., Schwager, A., Hinton, D.R., Klein, M.L., Hamon, S.C., Simmons, E., Yu, B., Campochiaro, B., Sunness, J.S., Campochiaro, P., Jorde, L., Parmigiani, G., Zack, D.J., Katsanis, N., Ambati, J., Zhang, K., 2008. Toll-like Receptor 3 and Geographic Atrophy in Age-Related Macular Degeneration. *N. Engl. J. Med.* 359, 1456–1463. doi:10.1056/NEJMoa0802437
- Yates, J.R.W., Sepp, T., Matharu, B.K., Khan, J.C., Thurlby, D.A., Shahid, H., Clayton, D.G., Hayward, C., Morgan, J., Wright, A.F., Armbrecht, A.M., Dhillon, B., Deary, I.J., Redmond, E., Bird, A.C., Moore, A.T., Genetic Factors in AMD Study Group, 2007. Complement C3 variant and the risk of age-related macular degeneration. *N. Engl. J. Med.* 357, 553–561. doi:10.1056/NEJMoa072618
- Yuan, T.-F., Liang, Y.-X., Peng, B., Lin, B., So, K.-F., 2015. Local proliferation is the main source of rod microglia after optic nerve transection. *Sci. Rep.* 5, 10788. doi:10.1038/srep10788
- Zamiri, P., Sugita, S., Streilein, J.W., 2007. Immunosuppressive properties of the pigmented epithelial cells and the subretinal space. *Chem. Immunol. Allergy* 92, 86–93. doi:10.1159/000099259
- Zarepari, S., Branham, K.E.H., Li, M., Shah, S., Klein, R.J., Ott, J., Hoh, J., Abecasis, G.R., Swaroop, A., 2005. Strong association of the Y402H variant in complement factor H at 1q32 with susceptibility to age-related macular degeneration. *Am. J. Hum. Genet.* 77, 149–153. doi:10.1086/431426
- Zealley, B., de Grey, A.D.N.J., 2013. Strategies for engineered negligible senescence. *Gerontology* 59, 183–189. doi:10.1159/000342197
- Zeiss, C.J., Johnson, E.A., 2004. Proliferation of microglia, but not photoreceptors, in the outer nuclear layer of the rd-1 mouse. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45, 971–976.
- Zweifel, S.A., Imamura, Y., Spaide, T.C., Fujiwara, T., Spaide, R.F., 2010. Prevalence and significance of subretinal drusenoid deposits (reticular pseudodrusen) in age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 117, 1775–1781. doi:10.1016/j.ophtha.2010.01.027

## 7. Anhang

Faktor	K0	100 ng	1 µg	10 µg	100 µg
<b>IL-6, 6h:</b>					
Poly I:C	1,0	3,78 ± 3,73	2,35 ± 0,84	4,13 ± 2,41	12,26 ± 8,44
RPE+Poly I:C	23,29 ± 7,33	18,20 ± 10,46	31,60 ± 16,77	53,90 ± 44,65	108,21 ± 103,20
Vergleich:	p<0,001; ***	p<0,05; *	p<0,01; **	p<0,05; *	p>0,05
<b>IL-6, 24h:</b>					
Poly I:C	1,0	1,01 ± 0,35	2,43 ± 1,31	8,41 ± 2,27	19,07 ± 3,31
RPE+Poly I:C	13,14 ± 7,64	8,75 ± 5,09	13,00 ± 7,05	25,51 ± 12,03	69,85 ± 35,06
Vergleich	p<0,01; **	p<0,05; *	p<0,05; *	p<0,05; *	p<0,05; *
<b>IL-1β, 6h:</b>					
Poly I:C	1,0	2,08 ± 1,6	5,64 ± 1,03	36,80 ± 16,14	135,47 ± 54,88
RPE+Poly I:C	455,48 ± 177,59	291,71 ± 129,08	505,08 ± 155,48	545,71 ± 285,71	592,33 ± 287,32
Vergleich	p<0,001; ***	p<0,01; **	p<0,01; **	p<0,05; *	p<0,05; *
<b>IL-1β, 24h:</b>					
Poly I:C	1,0	0,50 ± 0,25	6,02 ± 9,68	6,87 ± 2,11	30,47 ± 10,69
RPE+Poly I:C	38,71 ± 22,67	85,94 ± 122,5	87,83 ± 121,72	177,45 ± 179,10	267,31 ± 131,65
Vergleich	p<0,01; **	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p<0,01; **
<b>TNF-α, 6h:</b>					
Poly I:C	1,0	4,97 ± 3,80	8,18 ± 3,71	15,55 ± 3,08	23,89 ± 8,32
RPE+Poly I:C	9,69 ± 8,80	4,91 ± 3,89	11,01 ± 9,28	16,83 ± 10,61	32,28 ± 27,84
Vergleich	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<b>TNF-α, 24h:</b>					
Poly I:C	1,0	1,04 ± 0,21	2,44 ± 2,45	3,92 ± 2,52	3,88 ± 1,46
RPE+Poly I:C	2,01 ± 2,32	1,37 ± 1,41	2,34 ± 2,36	4,86 ± 4,80	6,60 ± 5,49
Vergleich	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05

<b>IL-10, 6h:</b>					
Poly I:C	1,0	1,17 ± 0,95	1,87 ± 1,16	1,71 ± 1,25	1,83 ± 1,35
RPE+Poly I:C	2,48 ± 1,08	2,60 ± 0,95	2,22 ± 0,89	1,65 ± 0,84	1,92 ± 1,15
Vergleich	p<0,05; *	p<0,05; *	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<b>IL-10, 24h:</b>					
Poly I:C	1,0	2,13 ± 0,39	3,34 ± 0,85	3,58 ± 3,10	2,84 ± 1,40
RPE+Poly I:C	3,18 ± 1,75	2,35 ± 0,16	2,2 ± 0,36	2,05 ± 0,63	2,32 ± 0,8
Vergleich	p<0,05; *	p>0,05	p<0,05; *	p>0,05	p>0,05
<b>COX-2, 6h:</b>					
Poly I:C	1,0	2,02 ± 1,15	2,62 ± 0,54	3,60 ± 0,64	4,15 ± 1,75
RPE+Poly I:C	6,14 ± 1,98	5,22 ± 1,23	6,28 ± 1,92	6,80 ± 1,15	13,04 ± 3,87
Vergleich	p<0,05; *				
<b>COX-2, 24h:</b>					
Poly I:C	1,0	0,69 ± 0,26	0,95 ± 0,77	2,7 ± 1,14	1,95 ± 0,85
RPE+Poly I:C	1,72 ± 0,69	1,79 ± 0,81	1,87 ± 0,67	4,32 ± 1,62	4,74 ± 1,25
Vergleich	p<0,05; *	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p<0,05; *
<b>iNOS, 6h:</b>					
Poly I:C	1,0	1,89 ± 0,63	4,34 ± 1,92	6,39 ± 3,80	16,6 ± 12,5
RPE+Poly I:C	4,22 ± 2,11	3,23 ± 0,84	2,87 ± 0,66	2,38 ± 0,75	4,09 ± 2,17
Vergleich	p<0,01; **	p<0,05; *	p>0,05	p<0,05; *	p<0,05; *
<b>iNOS, 24h:</b>					
Poly I:C	1,0	1,42 ± 0,07	3,73 ± 1,84	3,68 ± 0,72	3,55 ± 2,42
RPE+Poly I:C	1,04 ± 0,22	1,35 ± 0,75	1,27 ± 0,74	1,19 ± 0,71	1,67 ± 0,68
Vergleich	p>0,05	p>0,05	p<0,05; *	p<0,01; **	p>0,05

**Abb.7.1. Übersicht Ergebnisse *real-time* RT-PCR:** vertikale Spalte: getesteter Faktor, 6h oder 24h Stimulation; Mikroglia + Poly I:C; Mikroglia + RPE Überstand; Vergleich zwischen Mikroglia + Poly I:C und Mikroglia + RPE Überstand – die Signifikanz wurde mit dem *student's t-test* bestimmt – \* = 0,01>p<0,05; \*\* = 0,001>p<0,01; \*\*\* = p<0,001; horizontale Spalte: Konzentration Poly I:C/ml Stimulationsmedium

## 8. Abbildungsverzeichnis

<b>Abb.2.1.</b>	Stimulation retinaler Mikroglia.....	S.24
<b>Abb.2.2.</b>	<i>real-time</i> RT-PCR.....	S.29
<b>Abb.3.1.,3.2.</b>	retinale Mikroglia und <i>feederlayer</i> in Lichtmikroskop.....	S.31
<b>Abb.3.3.</b>	Ergebnisse Immunzytochemie retinaler Mikroglia.....	S.32
<b>Abb.3.4.</b>	Aufbau und Auswertung der Versuche.....	S.33
<b>Abb.3.5.</b>	<i>real-time</i> RT-PCR IL-6, 6 h.....	S.33
<b>Abb.3.6.</b>	<i>real-time</i> RT-PCR IL-6, 24 h.....	S.35
<b>Abb.3.7.</b>	<i>real-time</i> RT-PCR IL-1 $\beta$ , 6 h.....	S.36
<b>Abb.3.8.</b>	<i>real-time</i> RT-PCR IL1- $\beta$ , 24 h.....	S.37
<b>Abb.3.9.</b>	<i>real-time</i> RT-PCR TNF- $\alpha$ , 6 h.....	S.38
<b>Abb.3.10.</b>	<i>real-time</i> RT-PCR TNF- $\alpha$ , 24 h.....	S.39
<b>Abb.3.11.</b>	<i>real-time</i> RT-PCR IL-10, 6 h.....	S.40
<b>Abb.3.12.</b>	<i>real-time</i> RT-PCR IL-10, 24 h.....	S.41
<b>Abb.3.13.</b>	<i>real-time</i> RT-PCR COX-2, 6 h.....	S.42
<b>Abb.3.14.</b>	<i>real-time</i> RT-PCR COX-2, 24 h.....	S.43
<b>Abb.3.15.</b>	<i>real-time</i> RT-PCR iNOS, 6 h.....	S.44
<b>Abb.3.16.</b>	<i>real-time</i> RT-PCR iNOS, 24 h.....	S.45
<b>Abb.3.17.</b>	Signifikante Unterschiede im Expressionsmuster in der <i>real-time</i> RT-PCR.....	S.46
<b>Abb. 4.1.</b>	Modell zur Pathogenese der AMD.....	S.47
<b>Abb. 7.1.</b>	Übersicht Ergebnisse <i>real-time</i> RT-PCR.....	S.70

## 9. Danksagung:

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof.Dr. Alexa Klettner für das beflügelnde Thema und die stets kompetente, freundliche Betreuung. Herrn Prof.Dr. Johann Roider danke ich ausdrücklich für die professionelle Unterstützung meiner Arbeit und die Nutzung der Labore seiner Klinik für Ophthalmologie des UKSH Campus Kiel. Für die hervorragende Zusammenarbeit und das Überlassen des Arbeitsplatzes bedanke ich mich bei Prof.Dr. Ralph Lucius, Direktor des anatomischen Instituts der Christian Albrechts Universität zu Kiel, ohne dessen Expertise auf dem Gebiet der Mikroglia dieses Projekt nicht möglich gewesen wäre.

Für die exzellente labortechnische Unterstützung bedanke ich mich herzlich bei Frau Rosemarie Sprang und Frau Claudia Küppers, sowie Frau Serap Luick und Frau Monika Grell. Für das Vertrauen und den bedingungslosen Rückhalt bedanke ich mich bei meiner Familie, insbesondere meiner lieben Mutter Marita Hamann, der diese Arbeit gewidmet ist.

Meinen Freunden danke ich für die kontinuierliche Unterstützung und Motivation – der Beste sei genannt, Aron – vielen Dank nochmal.

## 10. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Timothy Hamann
Geburtstag/ort	02.03.1988, Kiel
Adresse	Reventlouallee 18-24, 24105 Kiel
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

### Schulbildung

08/1994–06/1998	Grundschule Reventlouschule Kiel
08/1998–06/2007	Gymnasium Humboldt-Schule-Kiel
06/2007	Abitur

### Zivildienst

08/2007–08/2008	Augenklinik Bellevue
-----------------	----------------------

### Hochschulbildung

02/2009–06/2015	Studium der Humanmedizin an der Christian Albrechts Universität zu Kiel
03/2011	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

08/2011	Beginn der vorliegenden Dissertation
04/2012–09/2012	Zusatzqualifikation “English for medical sciences“
09/2012	Famulatur Ophthalmologie Bombay Hospital, Mumbai, Indien
08/2013	Famulatur Plastische Chirurgie Rambam Hospital, Technion, Haifa, Israel
04/2014	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
05/2014–04/2015	<b>Praktisches Jahr</b>
	1. Terial Chirurgie – Städtisches Krankenhaus Kiel
	2. Terial Innere Medizin – UKSH, Campus Kiel
	3. Terial Ophthalmologie – Universitätsspital Inselspital Bern, Schweiz – Moorfields Eye Hospital, London, England
06/2015	3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
06/2015	<b>Approbation als Arzt</b>

### **Facharztausbildung**

seit 08/2015 Assistenzarzt in der Klinik für Ophthalmologie des UKSH Campus Kiel

### **11. Veröffentlichungen, Vortragspreis**

63. Tagung der Vereinigung Norddeutscher Augenärzte, 31. Mai - 1. Juni 2013, Westerland, Sylt

**Hamann T**, Lucius R, Roeder J, Klettner A (2013)

Einfluss von TLR-3 aktiviertem retinalen Pigmentepithel auf retinale Mikroglia.

Vortragspreis für den besten Vortrag in der wissenschaftlichen Sitzung

ARVO Annual Meeting, Life-Changing Research, 5. Mai - 9. Mai 2013 Seattle, Washington, USA

Klettner A, **Hamann T**, Wilker S, Berg C, Schlüter K, Lucius R, Mentlein R, Roeder J., (2013):

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

Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.; 54(15): 4519.

Klettner, A., **Hamann, T.**, Schlüter, K., Lucius, R., Roeder, J., (2014): *Retinal pigment epithelium cells alter the pro-inflammatory response of retinal microglia to TLR-3 stimulation.*

Acta Ophthalmol. (Copenh.); 92(8) e621-e629