

Aus dem Zentrum für Augenheilkunde der Universität zu Köln  
Lehrstuhl für Experimentelle Immunologie des Auges  
Direktor: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Th. Langmann

**“Untersuchung der immunmodulatorischen  
Effekte von Pomalidomid auf retinale Zelllinien in  
vitro“**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
Charlotte Bresgen  
aus Köln

promoviert am 20. Oktober 2022

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Th. Langmann
2. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. O. Utermöhlen

## Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Thomas Langmann, Dr. rer. nat. Khalid Rashid.

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

## Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 24/2011) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichtete mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.



Unterschrift

Köln, den 10.05.2022

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Herrn Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Thomas Langmann sowie Herrn Dr. rer. nat. Khalid Rashid von mir selbst ausgeführt worden.

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich im Laufe meines Studiums sowie während meiner Promotion unterstützt und mir dieses ermöglicht haben.

Herrn Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Thomas Langmann danke ich für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe meine Promotionsarbeit anfertigen zu dürfen.

Ihm sowie Herrn Dr. rer. nat. Khalid Rashid danke ich außerdem für die stete Unterstützung und den guten Rat bei der Durchführung meiner Experimente.

Ein weiterer großer Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe für Experimentelle Immunologie des Auges für die angenehme und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre.

Ganz besonders danke ich natürlich meinen Eltern Karin und Martin, die mir das Studium erst ermöglichten und mich jederzeit unterstützten, sowie meinen Schwestern Stephanie und Juliane und meinem Freund Tobias, die meiner Arbeit viel Verständnis und Geduld entgegenbrachten.

# INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	8
1. ZUSAMMENFASSUNG.....	10
2. EINLEITUNG.....	12
2.1 Sehen.....	12
2.2 Struktur und Funktion der Retina.....	13
2.3 Rolle und Funktionen der retinalen Mikroglia .....	17
2.3.1 Rolle von Mikroglia in der Entstehung und im Fortschreiten degenerativer Erkrankungen der Retina .....	19
2.3.2 Modulation der Mikroglia als Therapieziel .....	19
2.4 Immunmodulatorische Imide (IMiDs).....	20
2.4.1 Thalidomid als Ursprungssubstanz .....	20
2.4.2 Thalidomid-Analoga .....	21
2.4.3 Immunmodulatorische Eigenschaften von Pomalidomid .....	22
2.4.4 Aktuelle Einsatzgebiete von Pomalidomid.....	23
2.5 Aufgabenstellung.....	23
3. MATERIAL UND METHODEN .....	24
3.1 Material.....	24
3.1.1 Zellen .....	24
3.1.2 Pomalidomid.....	24
3.1.3 Primer.....	26
3.1.4 Kulturmedien und Reagentien .....	28
3.1.5 Verbrauchsmaterialien .....	30
3.1.6 Geräte .....	31
3.1.7 Software .....	32
3.2 Methoden .....	33
3.2.1 Zellkultur.....	33
3.2.2 MTT-Test.....	34
3.2.3 Untersuchung der Genexpression.....	35
3.2.3.1 Stimulation mit LPS und Behandlung mit Pomalidomid.....	36
3.2.3.2 RNA Isolation und reverse Transkription .....	37

3.2.3.3	Quantitative RT-PCR.....	39
3.2.3.4	Computergestützte Analyse .....	39
3.2.4	Phalloidin-TRITC Färbung und Mikroskopie von BV-2 Mikrogliazellen .....	40
3.2.5	Untersuchung der Phagozytose .....	41
3.2.5.1	Apoptotisches Material .....	41
3.2.5.2	Polystyrene Mikropartikel .....	42
3.2.6	Untersuchung der Zellmigration .....	42
3.2.7	Untersuchung der Nitritexpression .....	43
3.2.8	Apoptose Untersuchung an ARPE-19 Zellen und 661W Zellen ....	44
3.2.9	Phalloidin-TRITC Färbung und Mikroskopie von ARPE-19 Zellen	45
3.3	Statistik.....	46
4.	ERGEBNISSE .....	47
4.1	Dosisfindung.....	47
4.2	Unter Einfluss von Pomalidomid zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der Genexpression von BV2-Mikrogliazellen .....	50
4.3	BV-2 Mikrogliazellen zeigten unter Einfluss von Pomalidomid eine vermehrt ramifizierte Morphologie .....	53
4.4	Untersuchung auf Veränderungen der Effektorfunktionen von LPS- stimulierten BV-2 Mikrogliazellen unter Einfluss von Pomalidomid..	55
4.4.1	Pomalidomid zeigt keine signifikante Reduktion der Phagozytose in durch LPS-stimulierte BV-2 Mikrogliazellen .....	55
4.4.2	Pomalidomid bewirkt eine signifikante Veränderung des Zellmigrationsverhaltens von LPS-stimulierten BV-2 Mikrogliazellen .....	58
4.4.3	Pomalidomid führt zu keiner signifikanten Reduktion der NO- Produktion in LPS-stimulierten BV-2 Mikrogliazellen .....	60
4.5	Zytotoxische bzw. protektive Einflüsse von Pomalidomid auf ARPE- 19 Zellen und 661W Zellen.....	62
4.5.1	Pomalidomid führt zu einer signifikanten Steigerung der Expression von Il-1b sowie Caspase1 in ARPE-19 Zellen.....	62

4.5.2	Unter Einfluss von Pomalidomid zeigen sich keine signifikanten Unterschiede im Apoptoseverhalten von 661W Zellen sowie ARPE-19 Zellen .....	66
4.5.3	Morphologie ARPE-19 Zellen .....	69
5.	DISKUSSION .....	71
5.1	Effekt von Pomalidomid auf BV-2 Mikrogliazellen .....	71
5.1.1	Toxizität von Pomalidomid auf BV-2 Mikrogliazellen .....	71
5.1.2	Effekt von Pomalidomid auf die Genexpression in BV-2 Mikrogliazellen .....	72
5.1.3	Effekt von Pomalidomid auf die Morphologie von BV-2 Mikrogliazellen .....	73
5.1.4	Effekt von Pomalidomid auf die Effektorfunktionen von BV-2 Mikrogliazellen .....	74
5.2	Mikrogliavermittelte zytotoxische oder protektive Einflüsse von Pomalidomid auf ARPE-19 Zellen sowie 661W Zellen .....	76
5.2.1	Mikrogliavermittelter Effekt von Pomalidomid auf die Genexpression sowie die Morphologie von ARPE-19 Zellen .....	76
5.2.2	Mikrogliavermittelter Effekt von Pomalidomid auf die Apoptoseinduktion in ARPE-19 Pigmentepithelzellen sowie 661W Photorezeptorzellen .....	78
5.3	Kritische Würdigung .....	79
6.	LITERATURVERZEICHNIS .....	81
7.	ANHANG .....	89
7.1	Abbildungsverzeichnis.....	89
7.2	Tabellenverzeichnis.....	91

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AMD	Altersbedingte Makuladegeneration
Amwap	Activated microglia/macrophage whey acidic protein
ANOVA	Varianzanalyse
ATPase	Adenosintriphosphatase
bFGF	basischer Fibroblastenwachstumsfaktor
Casp	Caspase
Ccl	CC-Chemokin-Ligand
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Co2	Kohlenstoffdioxid
COX	Cyclooxygenase
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DsRed	Discosoma-Rot
DTT	Dithiothreitol
FBS	Fetales Rinderserum
FCS	Fetal calf serum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDNF	Glial derived growth factor
H2O2	Wasserstoffperoxid
IL	Interleukin
IMiDs	Immunmodulatorische Imide
iNOS	NO-Synthase
KCl	Kaliumchlorid
LPS	Lipopolysaccharid
MDB	Alkalische Cyanid-Reagenz-Lösung
MgCl	Magnesiumchlorid
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
n	Anzahl an Experimenten
N.	Nervus
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat

NFκB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer'
NGF	Nerve growth factor
NH <sub>2</sub>	Aminogruppe
NO	Stickstoffmonoxid
p	Signifikanzniveau
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
Pom	Pomalidomid
qRT-PCR	Quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion
r	Anzahl an Replikaten in einem Experiment
rDNAse	Rekombinante Desoxyribonuklease
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROI	Regions of Interest
RPE	Retinales Pigmentepithel
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Reverse Transkriptase
TCR	T-Zellen Rezeptor
TLR	Toll like receptor
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TrisHCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
UT	Untreated
ZNS	Zentrales Nervensystem

# 1. ZUSAMMENFASSUNG

Die Retina mit ihrer physiologischen Abgrenzung durch die Blut-Retina-Schranke bildet ein sogenanntes immunprivilegiertes Organ, dessen einzige Immunzellen die Mikroglia darstellen. Diese Mikrogliazellen nehmen daher eine entscheidende Rolle bei der Schädigung und Degeneration der Netzhaut durch inflammatorische Prozesse sowohl bei hereditären als auch bei erworbenen Erkrankungen der Retina ein. Hierbei steht der Übergang der physiologisch ramifizierten Mikroglia in eine aktivierte, sogenannte reaktive Form und die dadurch folgende fehlregulierte Immunantwort mit Hyperinflammation und neuronaler Degeneration im Vordergrund. Da dies über einen gewissen Zeitraum hin zu einer Sehstörung im Rahmen der unterschiedlichen Erkrankungen führt, rückt die Mikroglia als möglicher Therapieansatz immer weiter in den Fokus der Betrachtung. Ziel der aktuellen Forschung ist es, eine möglichst potente Substanz für diese Zielsetzung zu finden.

In dieser Arbeit wurde Pomalidomid, welches bereits in der Therapie des multiplen Myeloms eine immunmodulatorische Wirkung in der Tumorumgebung zeigt, hinsichtlich seiner immunmodulatorischen Effekte auf die retinale Mikroglia untersucht.

Hierzu erfolgte die Betrachtung der Toxizität, der Genexpression und der Veränderungen der Morphologie in BV-2 Mikrogliazellen unter Einsatz von Pomalidomid sowie dessen Einfluss auf deren Effektorfunktionen wie Phagozytoseverhalten, Migrationsverhalten und Veränderungen der NO-Produktion. Zusätzlich wurde der Einfluss von Pomalidomid mittels konditionierten Mediums aus BV-2 Mikrogliazellen auf die Genexpression sowie die Morphologie von ARPE-19 Pigmentepithelzellen und dessen Einfluss auf das Apoptoseverhalten von ARPE-19 Pigmentepithelzellen sowie 661W Photorezeptorzellen untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass der immunmodulatorische Effekt von Pomalidomid, der für Makrophagen des peripheren Bluts eindeutig beschrieben wurde, in der retinalen Mikroglia kaum vorhanden ist. Ein signifikanter Effekt durch Pomalidomid konnte ausschließlich in der

Morphologie und dem Migrationsverhalten der BV-2 Mikrogliazellen sowie in der Genexpression durch ARPE-19 Zellen gezeigt werden. In der Untersuchung der Phagozytoserate zeigte sich eine Tendenz zur Reduktion dieser durch Pomalidomid. In allen weiteren Experimenten zeigte Pomalidomid keinen Einfluss.

Aufgrund der unzureichenden antiinflammatorisch-immunmodulatorischen Wirkung von Pomalidomid auf die retinale Mikroglia sowie der verhältnismäßig hohen Toxizität der Substanz ist diese für einen Einsatz in der Therapie retinaldegenerativer Erkrankungen nicht vielversprechend, sodass der Fokus zukünftiger Forschung auf der Untersuchung alternativer Substanzen liegen sollte.

## 2. EINLEITUNG

### 2.1 Sehen

Das Auge gilt als eines der wichtigsten Sinnesorgane des Menschen, da es eine bedeutende Rolle in der Wahrnehmung unserer Umwelt einnimmt.

Beim Sehen nimmt jedes Auge pro Sekunde Millionen von einzelnen Informationen auf und gibt diese an das Gehirn weiter. Funktion und Aufbau des Auges ähneln denen einer Fotokamera. Beim Sehvorgang tritt Licht, ausgehend von einem Objekt, zunächst durch die transparente Kornea (Hornhaut) in das Augeninnere ein. Dann passiert es auf dem Weg zur Netzhaut verschiedene optische Medien mit unterschiedlich starker Brechkraft, den sogenannten dioptrischen Apparat. Dieser besteht aus Cornea (Hornhaut), Humor aquosus (Kammerwasser), Lens oculi (Augenlinse) sowie dem Corpus vitreum (Glaskörper). Hierbei sorgt die Refraktion (Brechkraft) dafür, dass alle von einem bestimmten Punkt ausgehenden Lichtstrahlen eines betrachteten Objekts auf der Retina (Netzhaut) auch wieder zu einem Punkt zusammengeführt werden, sodass eine scharfe, verkleinerte und umgekehrte Abbildung davon auf der Retina entsteht. [10, 66]. Damit dies auch bei unterschiedlich weit vom Auge entfernten Objekten möglich ist, kann die elastische Linse durch ihre Aufhängung im Muskelapparat ihre Brechkraft ändern und somit trotz unterschiedlichem Abstand ein scharfes Bild generieren. Die Retina ermöglicht nun die Umwandlung der elektromagnetischen Strahlung (Licht) in ein elektrisches Nervensignal, welches über den Nervus opticus (Sehnerv), das Chiasma opticum (Sehnervenkreuzung) sowie den Tractus opticus (Sehstrang) in die Sehrinde im Okzipitallappen des Gehirns weitergeleitet wird. In der Sehrinde entsteht aus diesen Reizen folglich der Seheindruck. [21, 77].

Durch diese Mechanismen des Sehens erkennen wir Licht, Farbe sowie Bewegung und durch das Zusammenspiel beider Augen wird auch eine räumliche Wahrnehmung möglich.

All dies ist natürlicherweise ein bedeutender Bestandteil unseres täglichen Lebens. Einschränkungen der Sehfähigkeit führen deshalb bei Betroffenen zu

einer häufig gravierenden Einschränkung der Lebensqualität und einer deutlichen Minderung der Partizipation und Teilhabe [67].

## **2.2 Struktur und Funktion der Retina**

Die Retina ist die für den Sehvorgang elementare Struktur, hier werden die elektromagnetischen Wellen des Lichts in ein elektrisches Nervensignal umgewandelt und eine weitere Verarbeitung des Sinneseindrucks ermöglicht [15].

Die hintere Augenhälfte besteht von außen nach innen gesehen aus der Sklera (Lederhaut), der Choroidea (Aderhaut) sowie der Retina (Netzhaut).

Die Sklera bildet zusammen mit der Cornea die äußere Augenhaut und besteht aus einem dichten Kollagenfasernetz, welches dem Auge einen mechanischen Schutz bietet und den Augapfel in seiner Form hält.

Die Choroidea ist Teil der mittleren Augenhaut und ist maßgeblich an der Nährstoffversorgung der Retina beteiligt. Sie enthält zahlreiche Kapillaren mit fenestriertem Endothel und sorgt so für den Stoffaustausch. [66].

Die Retina selbst geht in der Embryonalentwicklung aus dem Augenbläschen, einer Ausstülpung des ZNS (Zwischenhirn), hervor. Es bilden sich zwei Blätter aus, von denen sich das eine zum Stratum pigmentum und das zweite zum Stratum nervosum entwickelt. In der Pars caeca der Retina bleibt die Differenzierung zu einem neuronalen Netzwerk aus, sodass dieser Bereich keine Photorezeptorzellen enthält und damit nicht am Sehvorgang beteiligt ist. An der Ora serrata geht die Pars caeca in die Pars optica über, in welcher sich im Rahmen der Entwicklung ein komplexes neuronales Netzwerk bildet [78].

Das Stratum pigmentosum enthält folgende Schicht:

1. Retinales Pigmentepithel (RPE)

Das Stratum nervosum enthält folgende Schichten:

2. Außensegmente der Photorezeptoren
3. Äußere Gliagrenzmembran
4. Äußere Körnerschicht
5. Äußere plexiforme Schicht
6. Innere Körnerschicht
7. Innere plexiforme Schicht
8. Ganglienzellschicht
9. Nervenfaserschicht
10. Innere Gliagrenzmembran

Insgesamt hat die Retina mit all Ihren Schichten eine durchschnittliche Dicke von 200  $\mu\text{m}$ .

Im Bereich der Papilla nervi optici (Austrittsstelle des N. opticus) sowie der Macula lutea mit der Fovea centralis (Punkt der höchsten Sehschärfe) weicht die Schichtung von der der restlichen Netzhaut ab.

In der Papilla nervi optici befinden sich keine Photorezeptoren, sondern nur Nervenfasern (3. Neuron der Sehbahn), sodass an diesem Punkt kein Sinneseindruck entstehen kann (sogenannter „blinder Fleck“). Dieser fehlende Seheindruck wird in der Sehrinde ausgeglichen, sodass wir im alltäglichen Leben keinen Gesichtsfeldausfall bemerken.

Im Zentrum der Retina liegt die Macula lutea, die Stelle mit der höchsten Sehschärfe. Hier liegen nur Zapfen und die Verschaltung von Photorezeptor auf Nervenzelle erfolgt 1:1, in der restlichen Retina liegt ein Verhältnis von 40:1 vor.

[32].

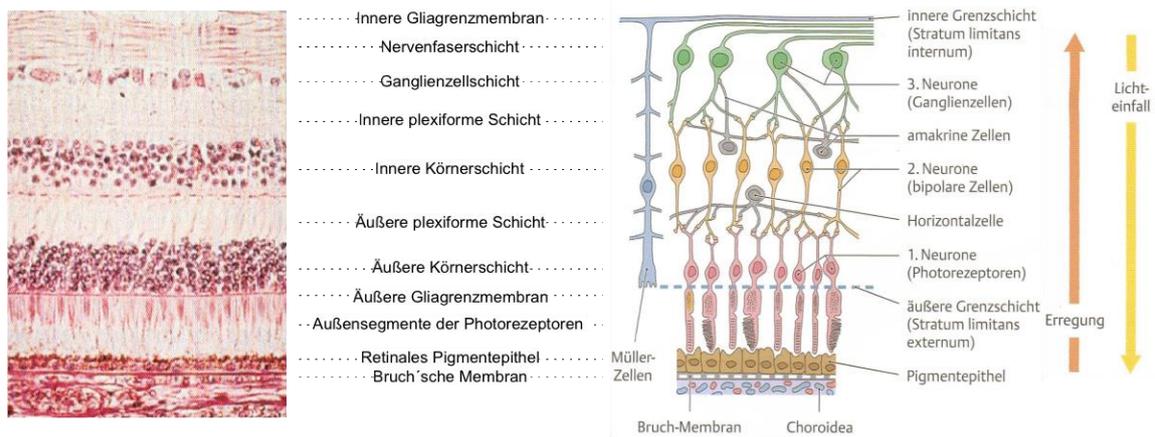


Abbildung 1: Aufbau der humanen Retina [40, 66]: links: Schichtung im histologischen Präparat, rechts: schematische Darstellung der Zellschichtung.

Das retinale Pigmentepithel hat eine Vielzahl von Aufgaben im Rahmen des Sehvorgangs. Das einschichtige Epithel enthält zum einen Pigmentkörnchen, sogenannte Melanosomen, diese verhindern durch die Absorption von Licht eine Lichtreflexion innerhalb des Auges. Das retinale Pigmentepithel umgibt dicht angelagert die Photorezeptoren, allerdings ist es nicht fest mit diesen verbunden. Es versorgt diese kontinuierlich mit Nährstoffen aus der gefäßreichen Choroidea und bildet gleichzeitig durch die interzellulären Zonulae occludens die Blut-Retina-Schranke. Diese ist vergleichbar mit der Blut-Hirn-Schranke und ist essentiell für das Immunprivileg der Retina [3].

Im Rahmen des Sehvorgangs fällt in den Außensegmenten der Photorezeptoren All-trans-Retinal an. Dieses wird von den Zellen des RPE verstoffwechselt und als 11-cis-Retinal wieder an die Photorezeptoren übertragen.

Die Retina enthält etwa 110 Millionen Stäbchen und 6 Millionen Zapfen, welche dann mit circa 1 Million Ganglienzellen verschaltet sind. Die Stäbchen, welche für die Hell-Dunkel-Wahrnehmung sowie für die Bewegungswahrnehmung zuständig sind, enthalten den Sehfärbstoff Rhodopsin. Die Zapfen enthalten als Sehfärbstoffe die Photopsine, man unterscheidet drei Typen mit unterschiedlicher Empfindlichkeit für rotes (565 nm, L-Zapfen), grünes (535 nm, M-Zapfen) und blaues (420 nm, S-Zapfen) Licht.

Im Rahmen des Phototransduktionsprozesses absorbiert das Rhodopsin der Stäbchen Lichtquanten (Absorptionsmaximum bei 500 nm) und geht somit von der 11-cis-Form in die All-trans Form über. Diese Umwandlung bedingt eine Änderung des Membranpotentials der Stäbchen, die Membran ist nun hyperpolarisiert. Durch Aktivierung von Transducinen wird dieser Effekt noch um das  $10^6$ -fache verstärkt. An den Synapsen wird weniger Glutamat freigesetzt und die Nervenzelle somit weniger stark erregt.

Die Vorgänge in den Zapfen sind denen in den Stäbchen sehr ähnlich, allerdings reagieren diese schneller, aber dafür schwächer.

Damit die Photoreaktion erneut ablaufen kann, muss das All-trans-Retinal wieder in 11-cis-Retinal überführt werden, dies erfolgt in den Zellen des retinalen Pigmentepithels. [21].

In der äußeren Körnerschicht befinden sich die Perykaryen (Zellkörper) der Photorezeptoren. Diese bilden das 1. Neuron der Sehbahn.

Die äußere plexiforme Schicht ist eine Synapsenzone zwischen den Photorezeptorzellen sowie den Bipolarzellen und Horizontalzellen.

In der inneren Körnerschicht liegen wiederum die Perikaryen der Bipolarzellen, diese bilden das 2. Neuron der Sehbahn), der amakrinen Zellen und Horizontalzellen, diese sind Interneurone, welche bereits in der Retina eine Querverschaltung ermöglichen. In dieser Schicht liegen auch die Perikaryen der Müller-Zellen. Diese gehören zu den Gliazellen und durchspannen mit ihren Fortsätzen die gesamte Retina von der inneren bis zur äußeren Grenzmembran. In der inneren plexiformen Schicht liegt eine weitere Synapsenzone zwischen den bipolaren Neuronen und den Ganglienzellen, welche das 3. Neuron der Sehbahn darstellen.

Es folgt die Ganglienzellschicht mit den Perikaryen der multipolaren Ganglienzellen und die Nervenfaserschicht, die die Axone dieser Neurone beinhaltet, welche gebündelt den Nervus opticus bilden.

Die innere und äußere Grenzmembran dient dem Erhalt der Stabilität dieser Schichtung. [40].

Ein weiterer wichtiger Zelltyp der Retina sind die Gliazellen. Diese lassen sich im Nervensystem in zwei Hauptgruppen unterteilen, die Makroglia und die Mikroglia. Zur Makroglia gehören die oben schon genannten Müller-Zellen sowie die Astrozyten. Die Müller-Zellen sorgen zum einen wie oben beschrieben für eine

räumliche Gliederung und Stabilität und besitzen andererseits die für die Retina sehr wichtige Ernährungs- und Homöostase-Funktion, sodass auch die innen liegenden Schichten ausreichend mit Nährstoffen versorgt werden. [78].

Die retinale Mikroglia ist für diese Arbeit von besonderer Bedeutung und wird daher im folgenden Abschnitt detailliert behandelt.

### **2.3 Rolle und Funktionen der retinalen Mikroglia**

Mikrogliazellen stammen von Vorläuferzellen aus dem Dottersack ab, diese leiten sich embryologisch von den Makrophagen ab und wandern sekundär in das ZNS ein [27].

Sie sind die einzigen residenten Immunzellen der Retina und tragen maßgeblich zum Erhalt der Gewebshomöostase und somit der Funktion und Morphologie bei. Ihre hauptsächliche Funktion ist der von Gewebsmakrophagen sehr ähnlich und besteht im Besonderen aus der Überwachung der Umgebung sowie dem Erkennen und Eliminieren von Pathogenen. Bereits in der Entwicklung der Retina kommen der Mikroglia elementare Aufgaben zu. Sie sind an der Entstehung von Synapsen beteiligt, können gezielt die Apoptose überflüssiger Zellen einleiten und haben einen Einfluss auf die Einsprossung von Blutgefäßen. [39, 55].

Mikrogliazellen können in einer ramifizierten oder aktivierten Form vorliegen.

Im ramifizierten Zustand liegen ihre Perikaryen hauptsächlich in den plexiformen Schichten der Retina. Mit Ihren langen, verzweigten Fortsätzen bilden sie ein territorial organisiertes Netzwerk. Die Fortsätze der ramifizierten Mikroglia sind nicht ortsständig, sondern wandern ständig umher, um die Oberfläche der umgebenden Neurone zu überprüfen, dabei überwacht jede Zelle ein ihr zugewiesenes Areal, welches nicht mit dem anderer Mikrogliazellen überlappt. Durch diesen Mechanismus sowie eine Vielzahl von Rezeptoren und Oberflächenproteinen auf den Mikrogliazellen, stehen diese über Zell-Zell-Interaktionen mit den anderen retinalen Zellen in Kontakt und erhalten unter anderem durch Phagozytose von Zelldetritus und sonstigem Material die Gewebshomöostase der Retina. Der Erhalt dieser Homöostase wird außerdem durch die Ausschüttung neuroprotektiver Substanzen durch direkte Interaktion

mit Müller-Zellen, wie etwa dem nerve growth factor (NGF), dem glial derived growth factor (GDNF) sowie vielen weiteren, verstärkt. [12, 31, 37].

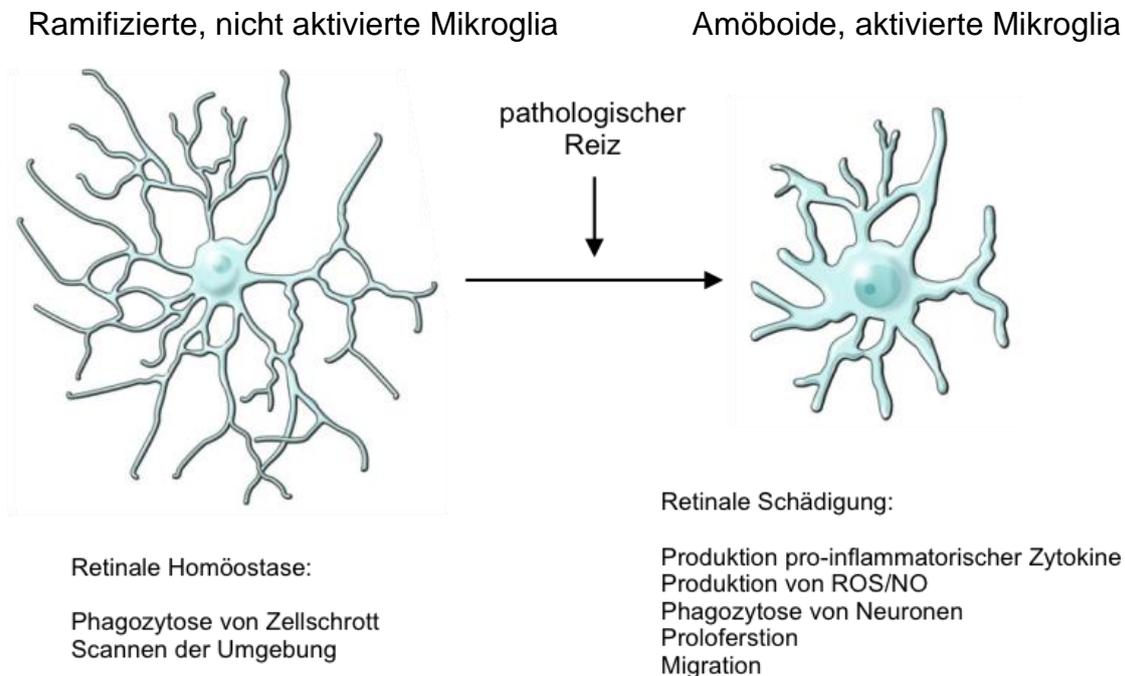


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Aktivierung von Mikrogliazellen [60].

Kommt es zu einer Aktivierung von Mikrogliazellen gehen diese in eine reaktive, amöboide Form mit größerem Zellkörper und kürzeren, weniger verzweigten Zellfortsätzen über. Eine Aktivierung erfolgt durch pathologische Reize wie beispielsweise Lipopolysaccharide (LPS) als Bestandteil von Bakterien [8].

Im aktivierten Zustand migrieren die Mikrogliazellen zum Ort der Schädigung. Sie schütten außerdem eine Vielzahl an Effektorsubstanzen aus, welche eine effektive Bekämpfung des Aktivierungsreizes und die Kommunikation mit anderen Immunzellen und benachbarter Mikroglia ermöglichen. Die Interaktion erfolgt hauptsächlich über Interleukine und Zytokine [17].

Aktiviert Mikrogliazellen haben die Fähigkeit zur Apoptoseinduktion, setzen verstärkt NO frei, dieses wirkt in großen Mengen zytotoxisch, und können außerdem Pathogene durch Phagozytose entfernen. [13, 37, 39].

### **2.3.1 Rolle von Mikroglia in der Entstehung und im Fortschreiten degenerativer Erkrankungen der Retina**

Kommt es zu einer überschießenden Aktivierung der Mikroglia und somit zu einer unkontrollierten Immunantwort, führt dies über einen inflammatorischen Zustand schlussendlich zu einer Degeneration der Retina [3, 56].

Dies kann sowohl in seltenen hereditären Erkrankungen wie Retinitis pigmentosa und X-gebundener juveniler Retinoschisis, aber auch bei multifaktoriellen Netzhauterkrankungen wie der altersbedingten Makuladegeneration (AMD) oder der diabetischen Retinopathie beobachtet werden und trägt maßgeblich zum Untergang von Photorezeptorzellen und Ganglienzellen bei [16, 29, 38].

Vor allem die gesteigerte Gefäßpermeabilität, die ausgeprägte Atrophie des retinalen Pigmentepithels, die Zerstörung der Bruch'schen Membran sowie die Einsprossung von Neovaskularisationen tragen zur Entstehung dieser Erkrankungen bei und scheinen in direktem Zusammenhang mit einer überschießenden Aktivierung von Mikrogliazellen zu stehen [2, 41].

### **2.3.2 Modulation der Mikroglia als Therapieziel**

Die hier beschriebenen Mechanismen der retinalen Degeneration unter Einfluss der retinalen Mikroglia führen zwangsläufig zum progredienten Visusverlust und schlussendlich zur Erblindung. Netzhautdegenerationen gehören zu den häufigsten Erblindungsursachen in Deutschland und führen oft zu erheblichen Einschränkungen der Alltagstauglichkeit. Deshalb ist eine Optimierung der Therapie entscheidend [23].

Aus den genannten Gründen verspricht die Beeinflussung der Mikroglia weg vom proinflammatorischen hin zum antiinflammatorischen Phänotyp ein entscheidender Therapieansatz zu sein [37].

Es gilt also Substanzen zu finden, die eine Beeinflussung der Mikroglia hierhingehend ermöglichen und somit in der Therapie retinaler degenerativer Erkrankungen zum Einsatz kommen können, um ein Auftreten dieser zu verhindern, deren Progress anzuhalten oder zumindest zu verzögern.

## 2.4 Immunmodulatorische Imide (IMiDs)

### 2.4.1 Thalidomid als Ursprungssubstanz

Thalidomid ( $\alpha$ -Phthalimidoglutarimid) ist ein Arzneimittel, welches von der Firma Chemie Grünenthal aus Stolberg 1954 entwickelt wurde und in den 1950er und 1960er-Jahren als Schlaf- und Beruhigungsmittel bereits weit verbreitet gewesen ist [53].

Damals wurde dieses unter anderem unter dem Handelsnamen Contergan® verkauft und war aufgrund seiner schlaffördernden sowie zusätzlich antiemetischen Wirkung besonders bei schwangeren Frauen beliebt. Für diese Beliebtheit sorgte ebenfalls, dass in Tierversuchen im Gegensatz zu vergleichbaren damals genutzten Medikamenten keine unerwünschten Arzneimittelwirkungen auftraten. [71, 73].

In den folgenden Jahren wurde eine Häufung von Fehlbildungen und Neuropathien bei Neugeborenen festgestellt, deren Ursache zunächst ungeklärt blieb. Im November und Dezember 1961 wurde zeitgleich sowohl durch den australischen Arzt McBride als auch durch den deutschen Arzt und Humangenetiker Widukind Lenz die Einnahme von Thalidomid während der Schwangerschaft als Ursache identifiziert. Contergan® wurde daraufhin aus dem Handel genommen [25, 43, 48, 72].

Der Bundesverband Contergangeschädigter gibt an, dass in dieser Zeit etwa 5000 contergangeschädigte Kinder geboren worden seien, die Zahl der hierdurch bedingten Fehlgeburten sei unklar.

Der Arzneistoff Thalidomid besteht aus einer chiralen Verbindung eines S(-) und R(+) Enantiomers, von denen das S(-) Enantiomer für die Ausbildung von Fehlbildungen, welche im Rahmen der Embryonalentwicklung entstehen, verantwortlich ist, wohingegen das R(+) Enantiomer vornehmlich für die sedative Komponente sorgt. Biochemische Experimente sowie Versuche an Kaninchen-Embryonen konnten zeigen, dass eine Isolation und Separierung der beiden Enantiomere innerhalb von Körperflüssigkeiten nicht möglich sind [42, 76].

Thalidomid verschwand anschließend vom Arzneimittelmarkt, bis es der Forschung gelang auch immunmodulatorische und antiinflammatorische Effekte nachzuweisen. [30, 46, 59].

Sampaio et al. konnten zeigen, dass Thalidomid die Produktion des Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ) in humanen Monozyten inhibiert [64]. Dieser Mechanismus scheint neben weiteren eine wichtige Rolle in der immunmodulatorischen Wirkung von Thalidomid einzunehmen.

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Thalidomid vermutlich auch TNF- $\alpha$  aus anderem zellulären Ursprung, welche durch inflammatorische Stimuli (z.B. durch Verwendung von Lipopolysaccharides (LPS)) aktiviert wurden, wie Mikrogliazellen und Langerhanszellen, inhibieren kann [18, 44].

Moller et al. zeigten ferner Thalidomids Vermögen zur Inhibierung der IL-12 Produktion [49].

Diese hier aufgeführten Erkenntnisse führten zu weiterer Forschung, welche letztlich ergab, dass Thalidomid ebenfalls die Angiogenese hemmt. D'Amato et al. bewiesen die Reduktion des basischen Fibroblastenwachstumsfaktors (bFGF) im Zuge einer Thalidomid-Behandlung. Diese Reduktion von bFGF vermindert seinerseits die Angiogenese [14].

Eine weitere wichtige Erkenntnis ist, dass Thalidomid als stimulierender Cofaktor in der Aktivierung von T-Zellen dienen kann, welche zuvor über den T-Zell-Rezeptor (TCR) teilaktiviert worden sind. Auch die Möglichkeit der Aktivierung von NK-Zellen durch Thalidomid konnte nachgewiesen werden [33].

Thalidomid wurde aufgrund dieser Erkenntnisse wieder auf dem Arzneimittelmarkt zugelassen und erhielt Einzug in die Therapie maligner Tumoren, vor allem der des Multiplen Myeloms.

### **2.4.2 Thalidomid-Analoga**

Als die Wirksamkeit von Thalidomid in der Behandlung dieser Patienten deutlich wurde und die Mortalität signifikant gesenkt werden konnte, rückten erneut die Toxizität sowie die Teratogenität der Substanz in den Fokus. Wie bereits erwähnt ist eine Separierung der beiden Enantiomere technisch nicht möglich und somit ist auch das Auftreten von unerwünschten toxischen und teratogenen Effekten im Zusammenhang mit der Einnahme von Thalidomid unvermeidbar.

In Folge dessen wurden, führend von der Firma Celgene Corporation, rasch Versuche unternommen Thalidomid-Analoga zu finden, welche die gleichen immunmodulatorischen Eigenschaften in der Krebstherapie aufweisen, allerdings ein günstigeres Nebenwirkungsprofil haben. Der Begriff der immunmodulatorischen Imide (IMiDs) wurde eingeführt und Thalidomid als Erstgenerations-IMiD klassifiziert.

Basierend auf dem chemischen Aufbau von Thalidomid wurden die Zweigenerations-IMiDs Lenalidomid (CC-5013; Revimid®) und Pomalidomid (CC-4047; Actimid®) konstruiert. Lenalidomid beinhaltet eine zusätzliche Amino (NH<sub>2</sub>-) Gruppe an der vierten Position des Phthaloylrings. Pomalidomid beinhaltet eine zusätzliche Amino (NH<sub>2</sub>-) Gruppe an der vierten Position des Phthaloylrings, außerdem wurde eine Carbonylgruppe entfernt. [6].

### **2.4.3 Immunmodulatorische Eigenschaften von Pomalidomid**

Diese Thalidomid-Analoga erwiesen sich als bis zu 50.000-mal potenter in der Inhibition von TNF  $\alpha$  als die Muttersubstanz Thalidomid selbst [47]. Auch die Co-stimulatorischen Effekte zur T-Zell-Aktivierung waren bei Lenalidomid und Pomalidomid deutlich höher.

Hieraus resultiert eine Abweichung der TNF  $\alpha$  Level in verschiedenen krankheitsabhängigen Zuständen, da die T-Zell Co-Stimulation durch die Thalidomid-Analoga zu einer vermehrten Freisetzung von TNF  $\alpha$  aus T-Zell-Ursprung führt, wo hingegen die Freisetzung von TNF  $\alpha$  aus Monozyten durch IMiDs wiederum herunter reguliert wird [33].

Dies beeinflusst somit sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem.

Für den Einsatz als anti-Tumor-Medikament lag der Schwerpunkt außerdem auf der direkten antiproliferativen und anti-Tumor-Wirkung sowie auf deren Fähigkeit, die Interaktion der Tumor-Mikroumgebung zu beeinflussen [58].

Die These von Pomalidomids immunmodulatorischer Wirkung konnte außerdem durch dessen Vermögen zur Inhibition der Produktion von Cyclooxygenase 2

(COX 2) und Prostaglandin in durch LPS stimulierten Monozyten bestärkt werden [22].

Weiter wurde bekannt, dass IMiDs die Synthese proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 und IL-12 in Monozyten im peripheren Blut hemmen [52]. Aufgrund der starken förderlichen Effekte, welche IMiDs in verschiedenen Makrophagenzelllinien zeigten, soll in diesem Projekt nun der Effekt auf retinale Mikrogliazellen, eine weitere Zellart, welche sich embryologisch von Makrophagen ableitet, untersucht werden.

#### **2.4.4 Aktuelle Einsatzgebiete von Pomalidomid**

Pomalidomid findet aktuell Einsatz in der Therapie des Multiplen Myeloms, einer Tumorerkrankung der Gruppe der Non-Hodgkin-Lymphome des blutbildenden Systems, welche von maligne mutierten Plasmazellen ausgeht [28]. Es ist hierbei seit 2013 zur second- und third-line-Therapie sowie in der Rezidivtherapie zugelassen und führte zu einer Verlängerung des Gesamtüberlebens sowie einer verbesserten Lebensqualität. [4, 5, 69].

### **2.5 Aufgabenstellung**

Die Zielsetzung dieser Arbeit ist die Untersuchung des immunmodulatorischen Effekts von Pomalidomid auf Mikrogliazellen. Im Fokus steht hierbei die Verwendung einer Zelllinie als zuverlässiges Modell mit hoher Reproduzierbarkeit sowie Verfügbarkeit. Hierbei soll besonders die Veränderung der Morphologie, des Phagozytoseverhaltens, des Migrationsverhaltens und der Genexpression der murinen BV-2 Zellen in vitro untersucht werden sowie außerdem mikrogliavermittelte zytotoxische oder protektive Einflüsse auf humane ARPE-19 Zellen sowie humane Photorezeptorzellen evaluiert werden.

## **3. MATERIAL UND METHODEN**

### **3.1 Material**

#### **3.1.1 Zellen**

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden folgende Zelllinien genutzt:

BV2 Mikrogliazellen murinen Ursprungs (Costar, Cambridge, MA, USA)

661W Photorezeptorzellen humanen Ursprungs (Prof. Muayyad Al-Ubaidi (Department of Cell Biology, University of Oklahoma Health Sciences Center, Oklahoma City, OK, USA))

ARPE-19 Pigmentepithelzellen humanen Ursprungs (ATCC - CRL-2302; Rockville, MD, USA)

In dieser Arbeit wurden für die Zellkulturen unter anderem murine BV-2 Mikrogliazellen verwendet, diese stellen das in der Mikrogliazellforschung für diesen Zweck meist verwendete, etablierte Zellmodell dar [34, 51].

Hieraus ergeben sich auf Grund der Speziesdifferenzen der verwendeten Zelllinien zwangsläufig begrenzte Analogieschlüsse sowie eine begrenzte Übertragbarkeit.

#### **3.1.2 Pomalidomid**

Pomalidomid ist ein Thalidomide-Analogon und gehört zur Substanzklasse der immunmodulatorischen Imide der 2. Generation.

Das Produkt, welches für die Experimente in dieser Arbeit verwendet wurde, stammt von der Firma Santa Cruz Biotechnology Inc., einem Hersteller

chemischer Produkte für den biomedizinischen Forschungsmarkt mit Sitz in Heidelberg.

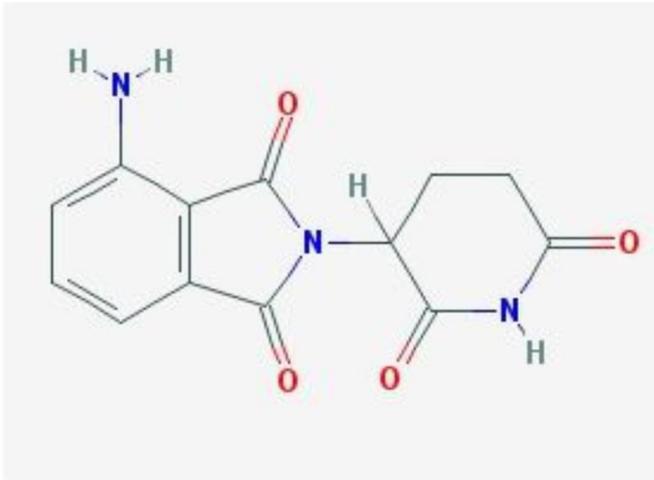


Abbildung 3: Strukturformel Pomalidomid [65].

Tabelle 1: Chemische Daten Pomalidomid. Hersteller: Santa Cruz Biotechnology Inc.

Substanzklasse	Immunmodulatorische Imide der 2. Generation (IMiDs)
Synonym	1,3-dioxo-2-(2,6-dioxopiperidin-3-yl)-4-aminoisoindoline
CAS Nummer	19171-19-8
Reinheit	≥99%
Molekulargewicht	273.24
Summenformel	C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>

Stammlösung Pomalidomid 100mM:

$$0,1 \text{ Mol} = \text{Masse (g)} \div 273,25 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

273,25 mg Pomalidomid gelöst in 10 ml DMSO entspricht einer 100mM Lösung

Anschließend Herstellung der 10mM sowie 25mM Stammlösung durch Verdünnung.

Stammlösung Pomalidomid 10mM:

$$0,01 \text{ Mol} = \text{Masse (g)} \div 273,25 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

2,7325 mg Pomalidomid gelöst in 1 ml DMSO entspricht einer 10mM Lösung

Stammlösung Pomalidomid 25mM:

$$0,025 \text{ Mol} = \text{Masse (g)} \div 273,25 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

6,8313 mg Pomalidomid gelöst in 1 ml DMSO entspricht einer 25mM Lösung

### 3.1.3 Primer

Tabelle 2: Primer für qRT-PCR, murine entzündungsreaktionsabhängig regulierte Gene, BV-2 Zellen. Hersteller: Primer: IDT, custom design; Sonden: Roche, Universal Probe Library.

Gene	Sequenz	Sonde
iNOS	5' CTT TGC CAC GGA CGA GAC 3'	Roche # 13
	3' TCA TTG TAC TCT GAG GGC TGA 5'	
IL6	5' GAT GGA TGC TAC CAA ACT GGA T 3'	Roche # 6
	3' CCA GGT AGC TAT GGT ACT CCA GA 5'	
Ccl2	5' CAT CCA CGT GTT GGC TCA 3'	Roche # 62
	3' GAT CAT CTT GCT GGT GAA TGA GT 5'	
IL1β	5' TGT AAT GAA AGA CGG CAC ACC 3'	Roche # 78
	3' TCT TCT TTG GGT ATT GCT TGG 5'	

Amwap	5' TTT GAT CAC TGT GGG GAT GA 3'	Roche # 1
	3' ACA CTT TCT GGT GAA GGC TTG 5'	
TNF $\alpha$	5' CTG TAG CCC ACG TCG TAG C 3'	Roche # 78
	3' TTG AGA TCC ATG CCG TTG 5'	
Tlr2	5' GGG GCT TCA CTT CTC TGC TT 3'	Roche # 50
	3' AGC ATC CTC TGA GAT TTG ACG 5'	

Tabelle 3: Primer für qRT-PCR, murines nicht-reguliertes, konstitutiv exprimiertes Referenz-Gen, BV-2 Zellen. Hersteller: Primer: IDT, custom design; Sonden: Roche, Universal Probe Library.

Gene	Sequenz	Sonde
ATPase	5' GGC ACA ATG CAG GAA AGG 3'	Roche # 77
	3' TCA GCA GGC ACA TAG ATA GCC 5'	

Tabelle 4: Primer für qRT-PCR, humane entzündungsreaktionsabhängig regulierte Gene, ARPE-19 Zellen. Hersteller: Primer: IDT, custom design; Sonden: Roche, Universal Probe Library.

Gene	Sequenz	Sonde
IL8	5' AGA CAG CAG AGC ACA CAA GC 3'	Roche # 72
	3' CAC AGT GAG ATG GTT CCT TCC 5'	
IL18	5' AAC AAA CTA TTT GTC GCA GGA AT 3'	Roche # 46
	3' TGC CAC AAA GTT GAT GCA AT 5'	
CASP1	5' CCA GGA CAT TAA AAT AAG GAA ACT GTA 3'	Roche # 4
	3' CCA AAA ACC TTT ACA GAA GGA TCT C 5'	
IL1 $\beta$	5' TAC CTG TCC TGC GTG TTG AA 3'	Roche # 78
	3' TCT TTG GGT AAT TTT TGG GAT CT 5'	
CCL2	5' AGT CTC TGC CGC CCT TCT 3'	Roche # 40
	3' GTG ACT GGG GCA TTG ATT G 5'	

Tabelle 5: Primer für qRT-PCR, humanes nicht-reguliertes, konstitutiv exprimiertes Referenz-Gen, ARPE-19 Zellen. Hersteller: Primer: IDT, custom design; Sonden: Roche, Universal Probe Library.

Gene	Sequenz	Sonde
GAPDH	5´ AGC CAC ATC GCT CAG ACA C 3´	Roche # 60
	3´ GCC CAA TAC GAC CAA ATC C 5´	

### 3.1.4 Kulturmedien und Reagentien

Tabelle 6: Zusammensetzung Kulturmedium für BV-2 Zellen

Substanz	Menge	Hersteller
RPMI 1640	500ml - 35 ml	Thermo Fisher Scientific
2mM L-Glutamin	5 ml	Life Technologies GmbH
1% Pen/Strep	5 ml	Gibco
5% FCS	25 ml	Sigma-Aldrich
50 µM β-Mercaptoethanol	1,95 µl	Merck

Tabelle 7: Zusammensetzung Kulturmedium für ARPE-19 Zellen;

Substanz	Menge	Hersteller
DMEM/ F-12	500ml - 55 ml	ThermoFisher Scientific
10% FCS	50 ml	Sigma-Aldrich
1% Pen/Strep	5 ml	Gibco

Tabelle 8: Zusammensetzung Kulturmedium für 661W Zellen;

Substanz	Menge	Hersteller
DMEM High Glucose mit L-Glutamin	500ml - 35 ml	Sigma-Aldrich
5% FCS	25 ml	Sigma-Aldrich
1% Pen/Strep	5 ml	Gibco
1% Antibiotic/Antimycotic	5 ml	Sigma-Aldrich

Tabelle 9: Reagentien

Substanz	Hersteller
DMSO	Serva
PBS	Gibco
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	VWR International
LPS 50 ng/ml (Escherichia coli 0111:B4)	Sigma-Aldrich
Färbelösung MTT-Test	Sigma-Aldrich
Solubilisations-/Stop-Lösung MTT-Test	Sigma-Aldrich
4% Formaldehydlösung	Sigma-Aldrich
0,1% Triton X-100 Lösung	Sigma-Aldrich
0.1 µg/ml Phalloidin-TRITC	Sigma-Aldrich
0.1 µg/ml DAPI	Roche Diagnostics
Dako Fluoreszen-Eindeckmedium	Dako Agilent Pathology solutions
NucleoSpin® RNA Kit	Macherey-Nagel
RA1 Pufferlösung	Macherey-Nagel
70%iges Ethanol	Macherey-Nagel
MDB	Macherey-Nagel
rDNase	Macherey-Nagel
RAW2 Lösung	Macherey-Nagel
RA3 Lösung	Macherey-Nagel
RNase freiem Wasser	Macherey-Nagel

RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas
random Hexamer Primer	Fermentas
5X Reaktion Buffer (bestehend aus 250mM TrisHCl (ph 8,3), 250 mM KCl, 20mM MgCl <sub>2</sub> sowie 50 mM DTT)	Fermentas
RiboLock RNase Inhibitor 20 U/μl	Fermentas
10mM dNTP Mix	Fermentas
RevertAid RT 200U/μl	Fermentas
TaqMan Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems
Latex Partikel Lösung: Polystyrene microparticles	Sigma-Aldrich
Griess Reagenz	Promega
Caspase-Glo® 3/7 Reagenz	Promega

### 3.1.5 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 10: Liste Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
1,5 ml Reagiergefäße	Eppendorf
2 ml Reagiergefäße	Sarstedt
2,5 μl, 10 μl, 200 μl, 1000 μl Pipettenspitzen	Sarstedt
10 μl, 200 μl, 1000 μl Filterspitzen	Sarstedt
15 ml, 50 ml Röhrchen	Sarstedt
2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml serologische Pipetten	Sarstedt
5 ml, 10 ml, 25 ml Glaspipetten	Brandt
6-well Platten	Sarstedt
12-well Platten	Sarstedt
96-well Micro Test Platten	Sarstedt

TC Flasche belüftet	Sarstedt
Frame Star 384-well Platten	4titude
Matrix Pipettenspitzen 30 µl	Thermo Scientific
PCR-Strips	Kisker
QPCR Adhesive Clear Seals	4titude
Zellschaber	TPP

### 3.1.6 Geräte

Tabelle 11: Geräteliste

Gerät	Hersteller
Sterilbank MSC-Advantage	Thermo Scientific
Heracell 240i CO <sub>2</sub> Inkubator	Thermo Scientific
Stereo Zoom Binokular Mikroskop	VWR
BVC professional Absaugpumpe	vacubrand
Heraeus Labofuge 450R	Thermo Scientific
S1 Pipette Filler	Thermo Scientific
Wasserbad TW20	Thermo Scientific
Neubauer Hämozytometer	Marienfeld
Stickstofftank ARPEGE 75	Air Liquide
Vortex Genie II G-560E	Scientific Industries
Zentrifuge Rotina 420R	Hettich
Zentrifuge 5415R	Eppendorf
NanoDrop 2000	Thermo Scientific
Matrix Pipette	Thermo Scientific
Peqstar 2X Gradient Thermocycler	Peqlab
Microplate Reader Infinite F200 Pro	Tecan
Mini Star Mikrozentrifuge	VWR
TaqMan ABI7900HT Fast Realtime PCR System	Applied Biosystems
ECLIPSE TE2000 Inversionsmikroskop	Nikon

Axiomager M2 plus ApoTome 2 Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss
---	------------

### 3.1.7 Software

Tabelle 12: Softwareliste

Software	Hersteller
Microsoft Office	Microsoft
GraphPad Prism 7	GraphPad
Adobe Photoshop	Adobe
Adobe Illustrator	Adobe
RQ Manager 1.2	Applied Biosystems
SDS 2.3	Applied Biosystems
i-control 1.9	TECAN
ImageJ	National Institute of Health
Corel Draw	Corel Corporation

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Zellkultur**

Die murine Mikroglia Zelllinie BV-2 wurde in Zellkulturflaschen kultiviert. Hierzu wurde das RPMI 1640 Medium verwendet, welches mit 5% fetalem Rinderserum (FBS), 2 mM L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin sowie 50 µM (1,95µl) β-Mercaptoethanol supplementiert wurde. Die Bebrütung der Zellkulturen erfolgte bei 37°C sowie einer befeuchteten Atmosphäre von 5% CO<sub>2</sub> im Inkubator.

Die humane retinale Pigmentepithel Zelllinie ARPE-19 wurde ebenfalls in Zellkulturflaschen kultiviert. Hierzu wurde das DMEM/ F-12 Medium verwendet, welches mit 10% fetalem Rinderserum (FBS) sowie 1% Penicillin/Streptomycin supplementiert wurde. Die Bebrütung der Zellkulturen erfolgte bei 37°C sowie einer befeuchteten Atmosphäre von 5% CO<sub>2</sub> im Inkubator.

Die humane Photorezeptor Zelllinie 661W wurde ebenfalls in Zellkulturflaschen kultiviert. Hierzu wurde das DMEM high glucose Medium mit L-Glutamin verwendet, welches mit 5% fetalem Rinderserum (FBS), 1% Penicillin/Streptomycin sowie 1% Antibiotikum/Antimykotikum supplementiert wurde. Die Bebrütung der Zellkulturen erfolgte bei 37°C sowie einer befeuchteten Atmosphäre von 5% CO<sub>2</sub> im Inkubator.

Die langfristige Aufbewahrung der Zellen erfolgte in einem mit 30% fetalem Rinderserum sowie 10% DMSO supplementiertem Medium in hoher Zellkonzentration durch Kryokonservierung.

Zur Anzucht und Verwendung der Zellen wurden diese zunächst schonend aufgetaut, bis das Medium sich verflüssigte. Nun wurden die Zellen in eine Zellkulturflasche, welche etwa 5-10 ml bereits erwärmtes Zellkulturmedium enthielt, überführt. Durch vorsichtiges Pipettieren und Schwenken konnte eine gute Durchmischung erreicht werden. Die Kultur wurde schnellstmöglich wieder im Inkubator gelagert. Nach einem Auftauprozess erfolgte einmalig ein Austausch des Zellkulturmediums, sobald die Zellen sich auf dem Boden der

Kulturflasche angeheftet hatten, dies entsprach etwa einem Zeitraum von 8 Stunden.

Danach erfolgte üblicherweise der Wechsel des Kulturmediums alle 2-3 Tage. Für einen Wechsel des Kulturmediums wurde zunächst das alte Kulturmedium abgenommen und daraufhin etwa 10 ml PBS in die Kulturflasche hinzugefügt und diese mehrmals geschwenkt, um etwaige abgestorbene oder nicht anhaftende Zellen zu entfernen. Im Anschluss wurde das PBS gegen vorgewärmtes Kulturmedium ausgetauscht. Es erfolgte nun die Mobilisation der Zellen vom Boden des Kulturgefäßes mittels eines Zellschabers. Die in Medium gelösten Zellen wurden nun in ein Röhrchen pipettiert und in einer Heraeus Labofuge 450R Zentrifuge bei 10.000 Umdrehungen pro Minute für 5 Minuten zentrifugiert, sodass die Zellen sich als Bodensatz absetzten. Das zellfreie Medium wurde nun verworfen und das Zellpellet in frischem Kulturmedium durch vorsichtiges Auf- und Ab-pipettieren wieder aufgelöst.

Im Anschluss daran wurden die Zellen unter Zuhilfenahme einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt und hierdurch die Zellkonzentration im Medium bestimmt.

Die Lösung wurde nun weiter mit Medium verdünnt, bis die gewünschte Konzentration für die Aussaat für Experimente oder die Vervielfältigung in den Kulturflaschen erreicht war. Die Zellen wurden dann für die weitere Anzucht oder Vermehrung erneut in Kulturflaschen oder für Experimente in entsprechende Kulturplatten überführt. Diese wurden anschließend im Inkubator gelagert.

### **3.2.2 MTT-Test**

Zur Bestimmung der Zellviabilität wurde der MTT-Test eingesetzt.

Dieser erlaubt durch die Bestimmung der Absorptionsrate von Strahlung eine Aussage über die metabolische Aktivität der Zellen und hierdurch über das Zellüberleben und die Zellproliferation, sodass die Toxizität einer verwendeten Substanz eingeschätzt werden kann.

Es erfolgt die Umwandlung des gelben 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in ein blau-violettes Formazan in Folge einer

Reduktionsreaktion vermittelt durch NADH und NADPH. Anhand der Menge des umgesetzten Farbstoffes kann so direkt auf die Glykolyserate der Zellen geschlossen werden [50].

Zur Durchführung des MTT-Tests wurden in einer transparenten Mikrotiterplatte mit 96 Wells 10.000 BV-2 Zellen in je 200 µl RPMI Medium pro Well ausgesät. Es erfolgte anschließend die Bebrütung der Zellkulturen bei 37°C in einer befeuchteten Atmosphäre von 5% CO<sub>2</sub> im Inkubator über Nacht.

Je drei Wells mit BV-2 Zellen wurden für 6 Stunden mit alternativ Pomalidomid 5µM, Pomalidomid 25µM, Pomalidomid 50µM, Pomalidomid 500µM, DMSO 1µl/ml (Vehikel-Kontrolle) oder 500µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (tot-Kontrolle) versetzt oder so belassen (unbehandelte Kontrolle). Zwei Wells enthielten als Referenz lediglich Medium ohne Zellen. Nach der 6-stündigen Inkubation wurden je 100 µl Überstand abpipettiert und 15 µl Färbelösung zu jedem Well hinzugefügt, es erfolgte die erneute Inkubation für 3 Stunden. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden je Well 100 µl der Solubilisations-/Stop-Lösung hinzugefügt. Die Mikrotiterplatte wurde für 1 Stunde bei Raumtemperatur belassen. Im Anschluss erfolgte die Absorptionsmessung mittels Photometer (Infinite F200 pro plate reader (Tecan)) bei 570 nm.

Die Methode wurde wie oben beschrieben in drei unabhängigen Experimenten wiederholt, sodass insgesamt eine Wiederholung von n=6 in allen Versuchsgruppen vorlag.

### **3.2.3 Untersuchung der Genexpression**

Eine wichtige Methode zur Bestimmung des Aktivierungszustandes von Zellen des immunologischen Systems ist die Gen-Expressions-Analyse. In den hier durchgeführten Experimenten wurden für murine BV-2 Zellen die Expression der proinflammatorisch wirkenden Zytokine iNOS, IL6, IL1β, TNFα sowie Tlr2, das antiinflammatorisch wirkende Zytokin Ccl2 sowie Activated microglia whey acid protein (Amwap) und das konstitutiv exprimierte Gen ATP5b untersucht.

Humane ARPE-19 Zellen wurden auf die Expression der proinflammatorisch wirkenden Zytokine IL1β, IL8, CASP1 sowie IL18, das antiinflammatorisch

wirkende Zytokin CCL2 und das konstitutiv exprimierte Gen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) hin untersucht.

### **3.2.3.1 Stimulation mit LPS und Behandlung mit Pomalidomid**

Für die Gen-Expressionsanalyse wurden in 6-well Kulturplatten 300.000 BV-2 Zellen in je 2 ml RPMI Medium pro Well ausgesät. Es erfolgte anschließend die Bebrütung der Zellkulturen bei 37°C in einer befeuchteten Atmosphäre von 5% CO<sub>2</sub> im Inkubator über Nacht.

Anschließend wurden je drei Wells mit BV-2 Zellen für 6 Stunden mit alternativ Pomalidomid 25 µM, LPS 50 ng/ml + 2 µl DMSO oder Pomalidomid 25 µM + LPS 50 ng/ml versetzt oder unbehandelt belassen und inkubiert.

Für die Gen-Expressionsanalyse der ARPE-19 Zellen erfolgte zunächst die Herstellung von konditioniertem Medium. Hierzu wurden zunächst 300.000 BV-2 Zellen in 2 ml Medium pro Well in 6-well Kulturplatten ausgesät, um konditioniertes Medium zu erhalten. Nach Inkubation der Zellen bei 37°C in einer befeuchteten Atmosphäre von 5% CO<sub>2</sub> über Nacht wurden je drei Wells mit BV-2 Zellen für 6 Stunden mit alternativ Pomalidomid 25 µM, LPS 50 ng/ml + 2 µl DMSO oder Pomalidomid 25 µM + LPS 50 ng/ml versetzt oder unbehandelt belassen. Im Anschluss an die Inkubationszeit wurde der Überstand jedes Wells abpipettiert und für 10 Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert.

Parallel hierzu wurden ARPE-19 Zellen in 6-well Kulturplatten zu je 300.000 Zellen in je 2 ml Medium pro Well ausgesät und über Nacht bei 37°C in einer befeuchteten Atmosphäre von 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

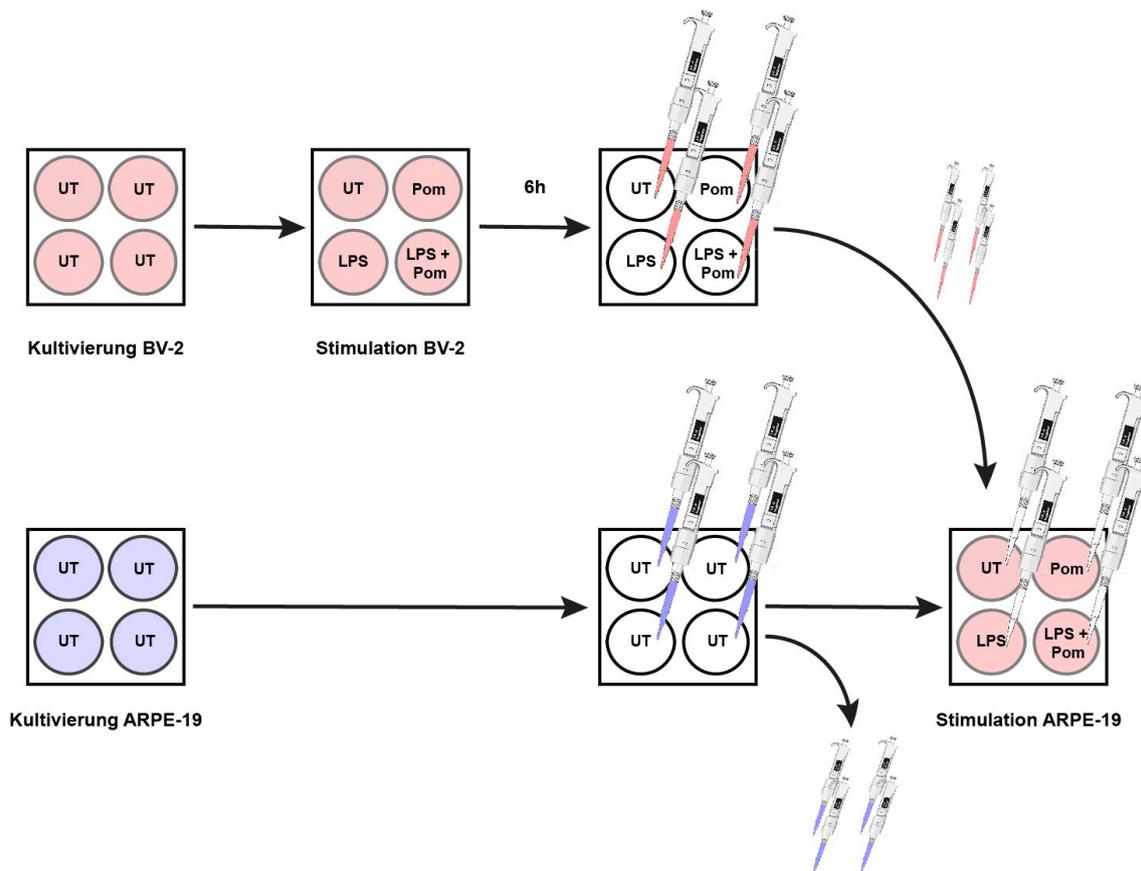


Abbildung 4: Herstellung von konditioniertem Medium.

Das - wie oben beschrieben - gewonnene konditionierte Medium wurde nun für 24 Stunden auf die ARPE-19 Zellen aufgebracht.

### 3.2.3.2 RNA Isolation und reverse Transkription

Die RNA-Isolierung aus BV-2 Zellen und ARPE-19 Zellen erfolgte entsprechend den Herstellerinformationen mittels des NucleoSpin® RNA Kit (Macherey-Nagel, Dueren, Germany).

Hierzu wurde das Zellmaterial zunächst lysiert, indem pro abpipetiertem Well je 350 µl RA1 Pufferlösung sowie 3,5 µl β-Mercaptoethanol hinzugefügt und dann mittels einer Vortex-Maschine homogenisiert wurde. Anschließend wurde das Lysat durch den NucleoSpin Filter in einer Zentrifuge für 1 Minute bei 11.000 x g filtriert. Das Filtrat wurde volumenäquivalent mit 70%igem Ethanol vermischt, um die Bindung der RNA an die Säule zu ermöglichen. Im nächsten Arbeitsschritt wurde die Mischung auf eine NucleoSpin RNA Säule aufgebracht und für 30

Sekunden bei 11.000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und zum Entsalzen der Säule je 350 µl MDB hinzugefügt und für 1 Minute bei 11.000 x g zentrifugiert und die Säule somit getrocknet. Es erfolgte die Zugabe von 95 µl rDNase Reaktionszusatz, dieser wurde für 15 Minuten bei Raumtemperatur zum Verdau der genomischen DNA auf der RNA Säule inkubiert. Nun erfolgten mehrere Waschschriffe der RNA auf der Säule mittels Hinzugabe von 200 µl RAW2 Lösung, 600 µl RA3 Lösung und 250 µl RA3 Lösung sowie das zwischenzeitliche Abzentrifugieren der Flüssigkeit durch die Säule bei 11.000 x g für 30 Sekunden beziehungsweise 2 Minuten.

Im letzten Schritt wurde die isolierte RNA unter Zugabe von RNase freiem Wasser und erneutem Zentrifugieren mit 11.000 x g für 1 Minute aus der RNA Säule eluiert.

Die isolierte RNA wurde anschließend mit dem NanoDrop 2000 photospektrometrisch quantifiziert und danach bei -80°C bis zur Weiterverwendung gelagert.

Die Synthese der cDNA erfolgte mittels RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Schwerte, Germany). Zur Herstellung der cDNA wurden zunächst 2 µg der jeweiligen RNA mit 1 µl random Hexamer Primer versetzt und mit nukleasefreiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 12 µl aufgefüllt. Diese Lösung wurde vorsichtig durch Pipettieren vermischt, kurz zentrifugiert, für 5 Minuten bei 65°C inkubiert und anschließend auf Eis gelagert. Im Anschluss wurden zu jeder Probe 4 µl 5X Reaktion Buffer (bestehend aus 250 mM TrisHCl (ph 8,3), 250 mM KCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub> sowie 50 mM DTT), 1 µl RiboLock RNase Inhibitor 20 U/µl, 2 µl 10 mM dNTP Mix und 1 µl RevertAid RT 200U/µl hinzugefügt, sodass ein totales Volumen von 20 µl je Probe entstand. Der Reaktionsansatz wurde erneut gemischt und anschließend kurz zentrifugiert. Es folgte die Inkubation der Reaktionslösung bei 25°C für 5 Minuten gefolgt von einer Inkubation bei 42°C für 60 Minuten. Zum Abschluss der Reaktion wurden die Proben unter Zugabe des Cyclers für 5 Minuten auf 70°C erhitzt.

### 3.2.3.3 Quantitative RT-PCR

Nach der cDNA Synthese folgte die Amplifizierung von 50 ng cDNA je Probe in einem Real-time PCR Gerät sowie die anschließende Gen-Expressions-Analyse mittels einer TaqMan ABI7900HT Maschine (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA).

Es wurde zunächst ein MasterMix für jedes zu amplifizierende Gen erstellt. Dieser beinhaltete pro Messpunkt 5 µl TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1 µl 10µM Primer (F und R), 0,125 µl doppelt markierter Sonden (Roche ProbeLibrary, Roche Applied Science, Basel, Switzerland) sowie 0,375 µl nukleasefreies Wasser. Anschließend wurden je 2,5 µl jeder Probe mit 7,5 µl eines MasterMix vermischt, in transparente 384-well Platten pipettiert sowie mit Versiegelungsfolie verschlossen. Es erfolgte jeweils die Messung von technischen Duplikaten.

Die Reaktionsparameter verhielten sich wie folgt: 30 Minuten bei konstant 60°C und 5 Minuten bei konstant 90°C, gefolgt von 40 Zyklen mit je 20 Sekunden bei 94°C zur Denaturierung sowie 1 Minute bei 60°C zur Primerhybridisierung sowie Elongation.

Die Primer Sequenzen sowie die Roche Library Sonden Nummer für Experimente mit BV2 Zellen sind unter 2.1.3 zu entnehmen.

### 3.2.3.4 Computergestützte Analyse

Die computergestützte Analyse der Ergebnisse der quantitativen RT-PCR erfolgt mit Hilfe des Programms SDS 2.3. Hier wurden durch  $\Delta\Delta$  Ct Analyse die normalisierten Expressionslevel der Zielgene bestimmt.

$$\Delta Ct1 = Ct(\text{Zielgen stimuliert}) - Ct(\text{Referenzgen stimuliert})$$

$$\Delta Ct2 = Ct(\text{Zielgen Kontrolle}) - Ct(\text{Referenzgen Kontrolle})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct1 (\text{stimuliert}) - \Delta Ct2 (\text{Kontrolle})$$

normalisierte Expressionslevel der Zielgene =  $2^{\Delta\Delta Ct}$

### **3.2.4 Phalloidin-TRITC Färbung und Mikroskopie von BV-2 Mikrogliazellen**

Um die Zellmorphologie beurteilen zu können, erfolgte die Anfärbung von BV-2 Zellen mittels Phalloidin-TRITC sowie DAPI und die anschließende Fluoreszenzmikroskopie.

Hierzu wurden BV-2 Zellen zunächst in 6-well Kulturplatten kultiviert. Pro Well wurden 150.000 BV-2 Zellen in 2 ml Medium auf Deckgläsern ausgesät. Es erfolgte anschließend die Bebrütung der Zellkulturen bei 37°C in einer befeuchteten Atmosphäre von 5% CO<sub>2</sub> im Inkubator über Nacht.

Je drei Wells mit BV-2 Zellen wurden für 24 Stunden alternativ mit Pomalidomid 25 µM, LPS 50 ng/ml + 2 µl DMSO oder Pomalidomid 25 µM + LPS 50 ng/ml versetzt oder unbehandelt belassen.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Deckgläser mit den darauf anhaftenden Zellen entnommen und die Zellen mit 4% Formaldehydlösung fixiert sowie anschließend mit 0,1% Triton X-100 in PBS permeabilisiert.

Die F-Actin Filamente des Zellskeletts wurden angefärbt, indem eine Lösung mit 0,1 µg/ml Phalloidin-TRITC appliziert wurde; die Zellkerne wurden mit einer 0,1 µg/ml DAPI Lösung angefärbt.

Nachdem die Deckgläser mit Dako Fluoreszenz-Eindeckmedium auf Objektträgern eingedeckt wurden, wurden diese in Dunkelheit bei 4°C gelagert. Es erfolgte die Fluoreszenzmikroskopie mittels AxioImager M2 plus ApoTome2 microscope (Carl Zeiss).

### **3.2.5 Untersuchung der Phagozytose**

Als wichtiger Parameter für die Zellaktivität und zur Beurteilung einer etwaigen Zellaktivierung der BV-2 Zellen erfolgte die Untersuchung des Phagozytoseverhaltens der Zellen unter verschiedenen Konditionen.

Hierzu wurden BV-2 Zellen in 6-well Kulturplatten kultiviert. Pro Well wurden 150.000 BV-2 Zellen in 2 ml Medium auf Deckgläsern ausgesät. Es erfolgte anschließend die Bebrütung der Zellkulturen bei 37°C in einer befeuchteten Atmosphäre von 5% CO<sub>2</sub> im Inkubator über Nacht.

#### **3.2.5.1 Apoptotisches Material**

Die Zellen wurden zunächst wie in 2.2.5 beschrieben ausgesät. Anschließend wurden je drei Wells mit BV-2 Zellen alternativ mit Pomalidomid 25 µM, LPS 50 ng/ml + 2 µl DMSO oder Pomalidomid 25 µM + LPS 50 ng/ml versetzt oder unbehandelt belassen. Zusätzlich wurden 400 µl von einem fluoreszenzfarbstoffmarkierten apoptotischen Zellmaterial aus 661 W Zellen pro Well hinzugegeben und für 6 Stunden inkubiert. Nach Ablauf der 6-stündigen Kontaktdauer wurden die Zellen mit 4% Formaldehyd fixiert und mit 0.1% Triton X-100 Lösung permeabilisiert. Die Zellkerne wurden anschließend mit 0.1 µg/ml DAPI angefärbt. Es folgte die Eindeckelung der Präparate mit Dako Fluoreszenzeinbettmedium. Diese wurden in Dunkelheit bei 4°C gelagert.

Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte unter Verwendung eines AxioImager M2 plus ApoTome2 microscope (Carl Zeiss). Es wurden 5 unabhängige Ausschnitte je Präparat in einer 40-fachen Vergrößerung fotografiert. Es erfolgte die Auswertung auf Grundlage der gemessenen Fluoreszenzwerte (DsRED/DAPI).

### **3.2.5.2 Polystyrene Mikropartikel**

Für diese Methode wurden die Zellen ebenfalls wie unter 2.2.5 erläutert ausgesät. Daraufhin wurden je drei Wells mit BV-2 Zellen alternativ mit Pomalidomid 25 µM, LPS 50 ng/ml + 2 µl DMSO oder Pomalidomid 25 µM + LPS 50 ng/ml versetzt oder unbehandelt belassen. Zusätzlich wurden 2 µl Latex Partikel Lösung (Polystyrene microparticles, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) pro Well hinzugegeben und ebenfalls für 6 Stunden inkubiert.

Nach Ablauf der 6-stündigen Kontaktdauer wurden die Zellen mit 4% Formaldehyd fixiert und mit Dako-Einbettmedium eingedeckt.

Die Durchlichtmikroskopie erfolgte unter Verwendung eines AxioImager M2 plus ApoTome2 microscope (Carl Zeiss). Es wurden 5 unabhängige Ausschnitte je Präparat in einer 40-fachen Vergrößerung fotografiert. Die hierbei entstandenen Bilder wurden von Hand ausgezählt. Es wurden folgende Parameter erfasst: Zellzahl, Beads insgesamt, Zellen mit > 4 Beads und Zellen mit > 9 Beads. Vorexperimente haben gezeigt, dass bei einer Anzahl von 5-9 Beads innerhalb der Zellmembran von einer mittleren, bei einer Anzahl von > 9 Beads innerhalb einer Zelle von einer hohen Phagozytoseleistung der Zellen auszugehen ist.

### **3.2.6 Untersuchung der Zellmigration**

Zur Beurteilung der Migrationseigenschaften der BV-2 Zellen unter verschiedenen Konditionen erfolgte die Zellmigrationsuntersuchung wie folgt:

In 6-well Kulturplatten wurden pro Well 500.000 BV-2 Zellen in je 2 ml RPMI Medium ausgesät. Es erfolgte anschließend die Bebrütung der Zellkulturen bei 37°C in einer befeuchteten Atmosphäre von 5% CO<sub>2</sub> im Inkubator, bis sich eine geschlossene Zelldecke entwickelt hatte.

Anschließend wurden je drei Wells mit BV-2 Zellen alternativ mit Pomalidomid 25 µM, LPS 50 ng/ml + 2 µl DMSO oder Pomalidomid 25 µM + LPS 50 ng/ml versetzt oder unbehandelt belassen. Unmittelbar nach Hinzugabe der Detergentien

erfolgte die kontrollierte Verletzung des flächendeckenden Zellverbandes in Form eines Kreuzes mit einer sterilen 100 µl Pipettenspitze (Defektsetzung).

Die Zellen wurden danach erneut inkubiert. Die Zellmigration in das zellfreie Areal wurde zu bestimmten Zeitpunkten nach Aufbringen der Detergentien/Verletzung (0, 3, 6, 8, 24, 72 Stunden) mittels Fotografien der Durchlichtmikroskopie unter Verwendung des Zeiss Zellkultur Mikroskops dokumentiert. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung des Programm ImageJ anhand der zellfreien Fläche.

### **3.2.7 Untersuchung der Nitritexpression**

Um einen Eindruck über die Toxizität der von BV-2 Zellen exprimierten Mediatoren auf ARPE-19 Zellen und 661W Zellen zu erlangen, erfolgte die Bestimmung der Nitrit Expression.

Hierzu erfolgte die Kultivierung von BV-2 Zellen in 6-well Kulturplatten mit 1 Million Zellen pro Well in je 1 ml RPMI Medium. Es erfolgte anschließend die Bebrütung der Zellkulturen bei 37°C in einer befeuchteten Atmosphäre von 5% CO<sub>2</sub> im Inkubator über Nacht.

Anschließend wurden je drei Wells mit BV-2 Zellen für 24 Stunden mit alternativ Pomalidomid 25 µM, LPS 50 ng/ml + 2 µl DMSO oder Pomalidomid 25 µM + LPS 50 ng/ml versetzt oder unbehandelt belassen. Nach Beendigung des Kontaktzeitraums wurde der Überstand abgenommen und bei 4000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert.

Die Nitritkonzentration in diesem Überstand wurde als Indikator für die NO-Produktion der Zellen festgelegt, indem das Griess Reaktionssystem (Promega) verwendet wurde.

50 µl Überstand wurden mit einem entsprechenden Volumen des Griess Reagenz pro Well in einer transparenten Mikrotiterplatte mit 96 Wells inkubiert. Nach 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 549 nm in einem Infinite F200 pro plate reader (Tecan) gemessen. Die Nitritkonzentrationen der einzelnen Proben wurden anhand einer gleichzeitig gemessenen Nitrit-Standardkurve bestimmt.

### 3.2.8 Apoptose Untersuchung an ARPE-19 Zellen und 661W Zellen

Die Untersuchung der Neuro- bzw. Zytotoxizität der von BV-2 Mikrogliazellen exprimierten Mediatoren auf ARPE-19 Zellen und 661W Zellen kann mittels der Bestimmung der Caspase 3/7 Aktivität erreicht werden. In den hier aufgeführten Experimenten erfolgte dies unter Verwendung des Caspase-Glo® 3/7 Assay (Promega GmbH, Mannheim, Germany). Bei dieser Methode wird den Proben ein lumineszierendes Caspase 3/7 Substrat zugeführt, welches die Tetrapeptidsequenz DEVD enthält. Es folgt die Spaltung des Substrats durch die Caspase, sodass ein Lumineszenzsignal der Luciferase aktiviert wird. Diese Lumineszenz ist direkt proportional zur vorliegenden Caspase Aktivität. [57].

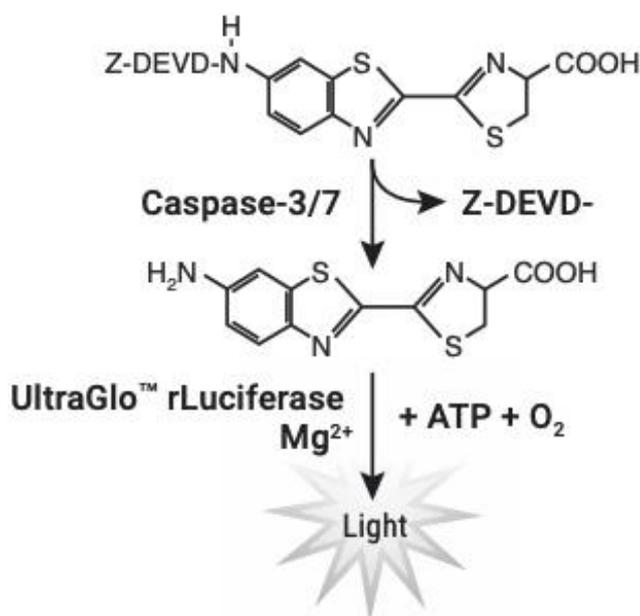


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Reaktion des Caspase-Glo® 3/7 Assay [57].

Für dieses Experiment wurden zunächst 150.000 BV-2 Zellen in 2 ml Medium pro Well in 6-well Kulturplatten ausgesät, um konditioniertes Medium zu erhalten. Nach Inkubation der Zellen bei 37°C in einer befeuchteten Atmosphäre von 5% CO<sub>2</sub> über Nacht wurden je drei Wells mit BV-2 Zellen für 6 Stunden mit alternativ Pomalidomid 25 µM, LPS 50 ng/ml + 2 µl DMSO oder Pomalidomid 25 µM + LPS

50 ng/ml versetzt oder unbehandelt belassen. Im Anschluss an die Inkubationszeit wurde der Überstand jedes Wells abpipettiert und für 10 Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert.

Parallel hierzu wurden ARPE-19 Zellen und 661W Zellen in schwarzen 96-Well Mikrotiterplatten mit transparentem Boden zu je 10.000 Zellen in je 100 µl Medium pro Well ausgesät und über Nacht bei 37°C in einer befeuchteten Atmosphäre von 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Das - wie oben beschrieben - gewonnene konditionierte Medium wurde nun für 48 Stunden auf die ARPE-19 Zellen / 661W Zellen aufgebracht. Das Caspase-Glo® 3/7 Reagenz wurde zunächst schonend auf Raumtemperatur erwärmt und anschließend wurden je 100 µl zu jeder Probe pipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde in den Infinite F200 pro plate reader (Tecan, Crailsheim, Germany) eingelegt und dort zunächst für 30 Sekunden gerüttelt. Nach 1 Stunde wurde durch den Plate Reader die Lumineszenz ermittelt.

### **3.2.9 Phalloidin-TRITC Färbung und Mikroskopie von ARPE-19 Zellen**

Um die Zellmorphologie beurteilen zu können, erfolgte die Anfärbung von ARPE-19 Zellen mittels Phalloidin-TRITC sowie DAPI und die anschließende Fluoreszenzmikroskopie.

Hierzu wurden ARPE-19 Zellen zunächst in 6-well Kulturplatten kultiviert. Pro Well wurden 150.000 Zellen in 2 ml Medium auf Deckgläsern ausgesät. Es erfolgte anschließend die Bebrütung der Zellkulturen bei 37°C in einer befeuchteten Atmosphäre von 5% CO<sub>2</sub> im Inkubator über Nacht.

Um konditioniertes Medium zu erhalten, wurden BV-2 Zellen zu je 150.000 Zellen pro well in 2 ml Medium ausgesät. Je drei Wells mit BV-2 Zellen wurden für 6 Stunden mit alternativ Pomalidomid 25 µM, LPS 50 ng/ml + 2 µl DMSO oder Pomalidomid 25 µM + LPS 50 ng/ml versetzt oder unbehandelt belassen. Im Anschluss an die Inkubationszeit wurde der Überstand jedes Wells abpipettiert und für 10 Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert.

Das so gewonnene konditionierte Medium wurde nun auf die ARPE-19 Zellen gegeben und dort für 24 Stunden belassen.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Deckgläser mit den darauf anhaftenden Zellen entnommen und die Zellen mit 4% Formaldehydlösung fixiert sowie anschließend mit 0,1% Triton X-100 Lösung permeabilisiert.

Die F-Actin Filamente des Zellskeletts wurden angefärbt, indem eine Lösung mit 0,1 µg/ml Phalloidin-TRITC appliziert wurde; die Zellkerne wurden mit einer 0,1 µg/ml DAPI Lösung angefärbt.

Nachdem die Deckgläser mit Dako Fluoreszenz-Eindeckmedium auf Objektträgern eingedeckt wurden, wurden diese in Dunkelheit bei 4°C gelagert. Es erfolgte die Fluoreszenzmikroskopie mittels AxioImager M2 plus ApoTome2 microscope (Carl Zeiss).

### **3.3 Statistik**

Die statistische Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism. Hier wurde für die Experimente eine einfaktorielle ANOVA durchgeführt, als Post Test wurde ein Bonferroni's Multiple Comparison Test gewählt.

Ergebnisse für  $p < 0,05$  wurden als signifikant gewertet. In den Graphen wurden die Signifikanzstufen mit  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) sowie  $p < 0,001$  (\*\*\*) dargestellt. Für alle Ergebnisse erfolgte die Darstellung als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler.

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1 Dosisfindung

Zur Festsetzung der für die folgenden Experimente verwendeten Konditionen wurden zunächst Vorexperimente durchgeführt.

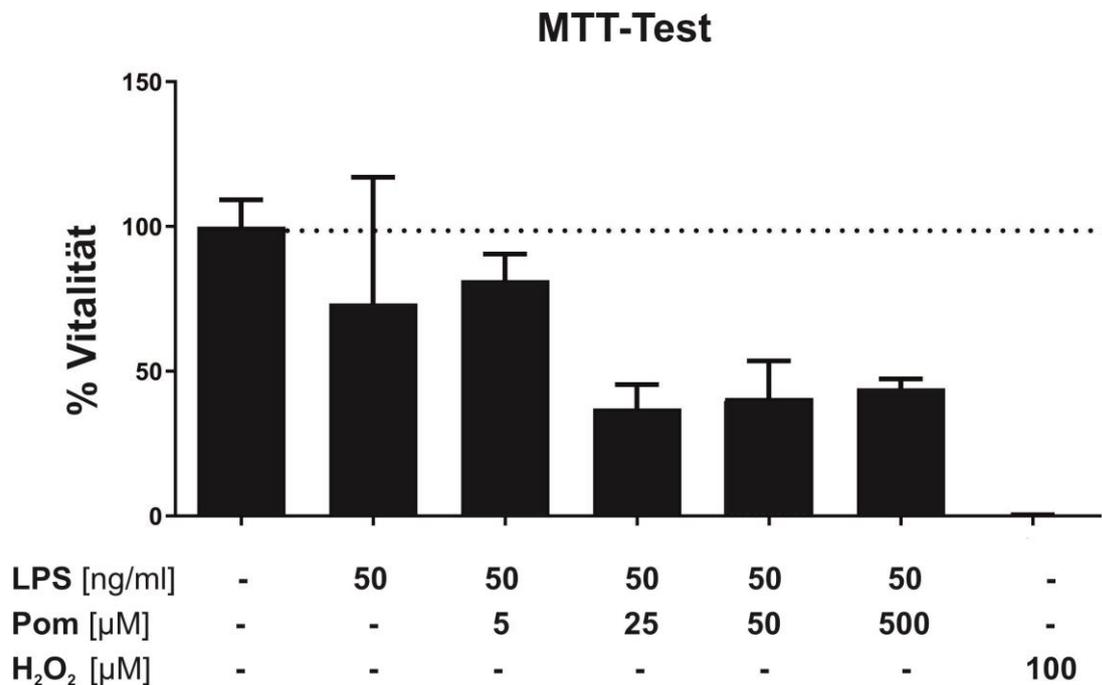
Hierbei lag das Ziel in der Bestimmung einer Dosierung des zu testenden Reagens Pomalidomid sowie in der Festlegung der Kontaktdauer.

Es wurde hierfür zum einen eine Untersuchung der Veränderung der Genexpression von BV2-Zellen vorgenommen, um die Wirkung von Pomalidomid auf die Zellen abzuschätzen, und zum zweiten ein MTT-Test zur Bestimmung der Toxizität der verwendeten Dosierung auf die BV-2 Zellen durchgeführt.

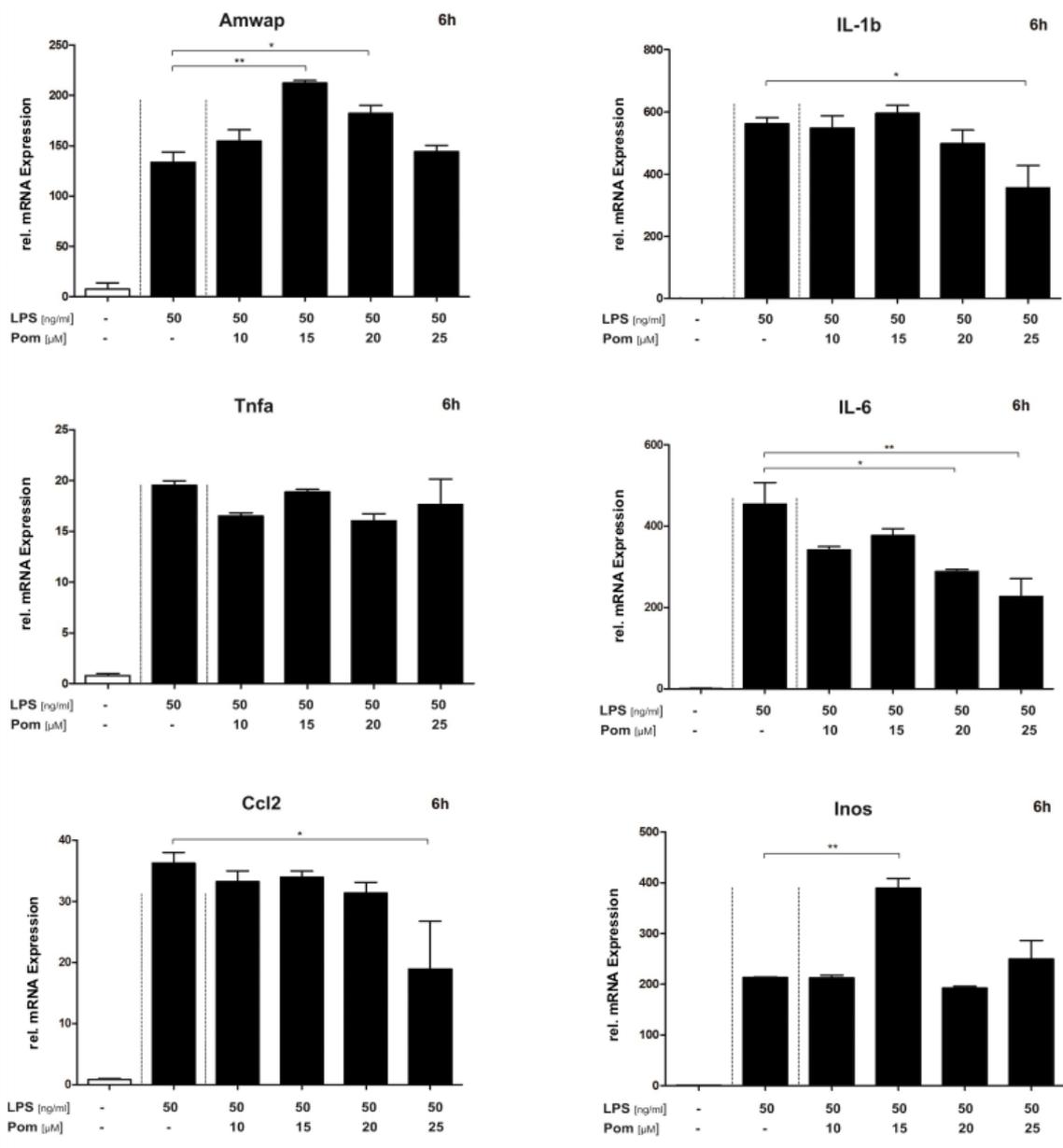
Hierzu wurden, wie oben beschrieben, BV-2 Zellen mit einer Dichte von 300.000 Zellen pro Well in Six-Well Platten kultiviert und behandelt. Die verwendeten Dosierungen von Pomalidomid lagen dabei zwischen 5  $\mu\text{M}$  und 500  $\mu\text{M}$ .

Als Kontaktdauer wurden zunächst 6 Stunden wie auch 24 Stunden untersucht. Im MTT-Test zeigte sich allerdings bereits bei einer Kontaktzeit von 6 Stunden deutliche Auswirkungen auf die Vitalität der BV-2 Zellen. So ergibt sich bei einer Vitalität der Kontrollgruppe von 100% bei einer Konzentration von Pomalidomid 5  $\mu\text{M}$  eine Vitalität von 81% und eine Vitalität von 37% bei einer Konzentration von Pomalidomid 25  $\mu\text{M}$  (Vgl.: Abbildung 6). Niedrige Dosierungen von Pomalidomid zeigten also eine geringe Einschränkung der Zellvitalität, wohingegen höhere Dosierungen  $\geq 25 \mu\text{M}$  bereits eine deutliche Toxizität zeigten.

In der Untersuchung der Genexpression wurde resultierend aus der Toxizitätsuntersuchung eine Kontaktzeit von 6 h vorausgesetzt und verschiedene Dosierungen von Pomalidomid zwischen 10  $\mu\text{M}$  und 25  $\mu\text{M}$  untersucht. Hier zeigten sich bei  $n=3$  mit je  $r=2$  für die pro- und antiinflammatorischen Gene Amwap, IL1b, IL6 und Ccl2 erst im höheren Dosisbereich signifikante Veränderungen der Genexpression (Vgl. Abbildung 7).



**Abbildung 6: MTT-Test: Analyse der Toxizität von Pomalidomid auf BV2-Mikrogliazellen.** BV-2 Zellen wurden für 6 Stunden mit alternativ LPS 50 ng/ml, LPS 50 ng/ml sowie Pomalidomid 5 $\mu$ M, LPS 50 ng/ml sowie Pomalidomid 25 $\mu$ M, LPS 50 ng/ml sowie Pomalidomid 50 $\mu$ M, LPS 50 ng/ml sowie Pomalidomid 500 $\mu$ M oder 500 $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (tot-Kontrolle) versetzt oder so belassen (unbehandelte Kontrolle). Die Vitalität in % wurde mittels Durchführung eines MTT-Tests wie in 3.2.2 beschrieben bestimmt. Es wird das arithmetische Mittel  $\pm$  Standardabweichung angegeben (n = 3, r=2, p < 0,05).



**Abbildung 7: Analyse der Genexpression in BV-2 Zellen unter Einfluss von Pomalidomid.** BV-2 Zellen wurden für 6 Stunden mit alternativ LPS 50 ng/ml, LPS 50 ng/ml sowie Pomalidomid 10μM, LPS 50 ng/ml sowie Pomalidomid 15μM, LPS 50 ng/ml sowie Pomalidomid 20μM, LPS 50 ng/ml sowie Pomalidomid 25μM versetzt oder so belassen (unbehandelte Kontrolle). Die normalisierten Expressionslevel der relativen mRNA Expression in  $\Delta\Delta Ct$  für Amwap, IL-1b, Tnfa, IL-6, Ccl2 sowie Inos wurden mittels Durchführung von quantitativer real-time

PCR wie in 3.2.3 beschrieben bestimmt. Es wird das arithmetische Mittel  $\pm$  Standardabweichung angegeben ( $n = 3$ ,  $r = 2$ ,  $p < 0,05$ ).

Die Abwägung der Zunahme der Toxizität bei höheren Dosierungen und längerer Kontaktzeit auf der einen Seite und der stärkeren Wirkung bei höheren Dosierungen auf der anderen Seite führten schlussendlich zur Festlegung folgender Parameter. Für die meisten der folgenden Experimente wurden die Kontaktzeit auf 6 Stunden festgelegt und für alle weiteren Experimente die Dosierung von Pomalidomid auf 25  $\mu$ M festgesetzt.

#### **4.2 Unter Einfluss von Pomalidomid zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der Genexpression von BV2-Mikrogliazellen**

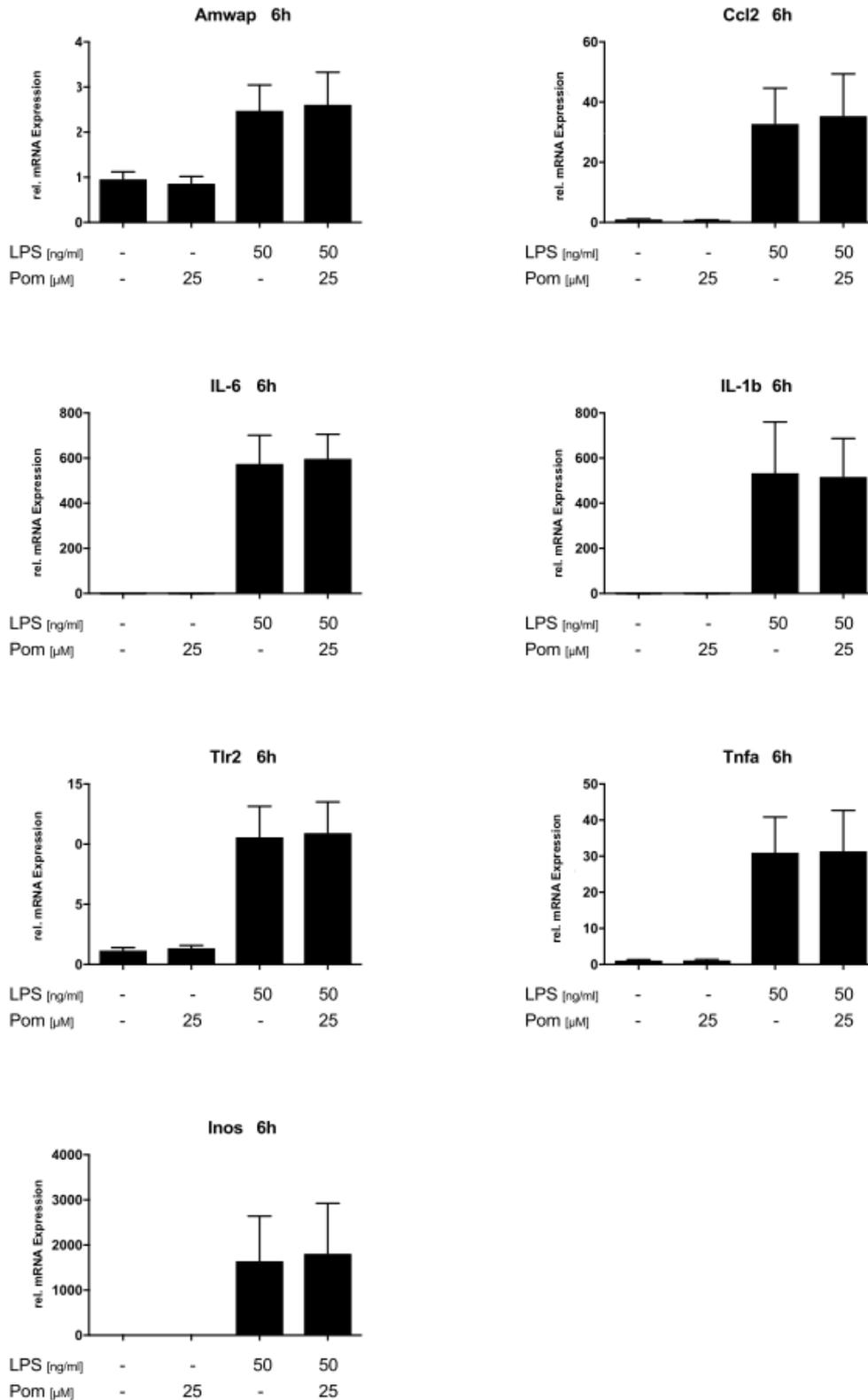
Die Genexpression einiger pro- und antiinflammatorischer Gene in BV-2 Mikrogliazellen unter Einfluss von Pomalidomid wurde mittels einer PCR-Analyse wie bereits oben erläutert bestimmt. Hierzu wurden je 300.000 BV-2 Mikrogliazellen pro well in 6-well Kulturplatten kultiviert und für 6 Stunden mit alternativ Pomalidomid 25  $\mu$ M, LPS 50 ng/ml + 2  $\mu$ l DMSO oder Pomalidomid 25  $\mu$ M + LPS 50 ng/ml versetzt oder so belassen.

Die in den Vorexperimenten gezeigten Tendenzen zur Beeinflussung der Genexpression in BV-2 Mikrogliazellen ließen sich bei einer deutlich höheren Anzahl von Proben und Experimenten mit insgesamt  $n=18$  nicht bestätigen. Es konnten unter gleichen Konditionen bei höherer Probenzahl in der Zusammenschau bei einem verhältnismäßig hohen Standardfehler keine signifikanten Unterschiede gezeigt werden. Dies gilt sowohl für die untersuchten proinflammatorischen Gene wie auch für die antiinflammatorischen Gene (Vgl.: Abbildung 8).

Für die antiinflammatorisch wirkenden Gene zeigten sich folgende normalisierte Expressionslevel in  $\Delta\Delta$  Ct: Die Genexpression von Amwap lag bei  $2,47 \pm 0,13$  (LPS 50 ng/ml) beziehungsweise  $2,60 \pm 0,17$  (Pom 25  $\mu$ M + LPS 50 ng/ml), die von Ccl2 bei  $32,74 \pm 2,8$  (LPS 50 ng/ml) beziehungsweise  $35,33 \pm 3,30$  (Pom 25

$\mu\text{M}$  + LPS 50 ng/ml). In der unstimulierten Vergleichsgruppe lagen die normalisierten Expressionslevel in  $\Delta\Delta\text{Ct}$  für Amwap bei  $0,96 \pm 0,04$  (UT) und für Ccl2 bei  $0,97 \pm 0,05$  (UT). Bei beiden untersuchten Genen zeigten sich keine signifikanten Abweichungen der Werte im Zuge einer Beeinflussung der Induktion durch LPS unter Zugabe von Pomalidomid.

Für die proinflammatorisch wirkenden Gene zeigten sich folgende normalisierte Expressionslevel in  $\Delta\Delta\text{Ct}$ : Die Genexpression von IL-6 lag bei  $574,4 \pm 29,81$  (LPS 50 ng/ml) beziehungsweise  $596,7 \pm 25,74$  (Pom 25  $\mu\text{M}$  + LPS 50 ng/ml), die von IL-1b bei  $532,9 \pm 53,63$  (LPS 50 ng/ml) beziehungsweise  $516,5 \pm 40,21$  (Pom 25  $\mu\text{M}$  + LPS 50 ng/ml), die von Tlr2 bei  $10,57 \pm 0,61$  (LPS 50 ng/ml) beziehungsweise  $10,92 \pm 0,61$  (Pom 25  $\mu\text{M}$  + LPS 50 ng/ml), die von TNF $\alpha$  bei  $30,98 \pm 2,33$  (LPS 50 ng/ml) beziehungsweise  $31,35 \pm 2,67$  (Pom 25  $\mu\text{M}$  + LPS 50 ng/ml) sowie die von Inos bei  $1643,0 \pm 235,5$  (LPS 50 ng/ml) beziehungsweise  $1806,0 \pm 263,9$  (Pom 25  $\mu\text{M}$  + LPS 50 ng/ml). In der unstimulierten Vergleichsgruppe lagen die normalisierten Expressionslevel in  $\Delta\Delta\text{Ct}$  für IL-6 bei  $1,01 \pm 0,05$  (UT), für IL-1b bei  $0,88 \pm 0,07$  (UT), für Tlr2 bei  $1,15 \pm 0,06$  (UT), für TNF $\alpha$  bei  $1,11 \pm 0,05$  (UT) und für Inos bei  $0,69 \pm 0,08$  (UT). Auch hier zeigten sich für die fünf untersuchten Gene keine signifikanten Abweichungen der Werte im Zuge einer Beeinflussung der Induktion durch LPS unter Zugabe von Pomalidomid.



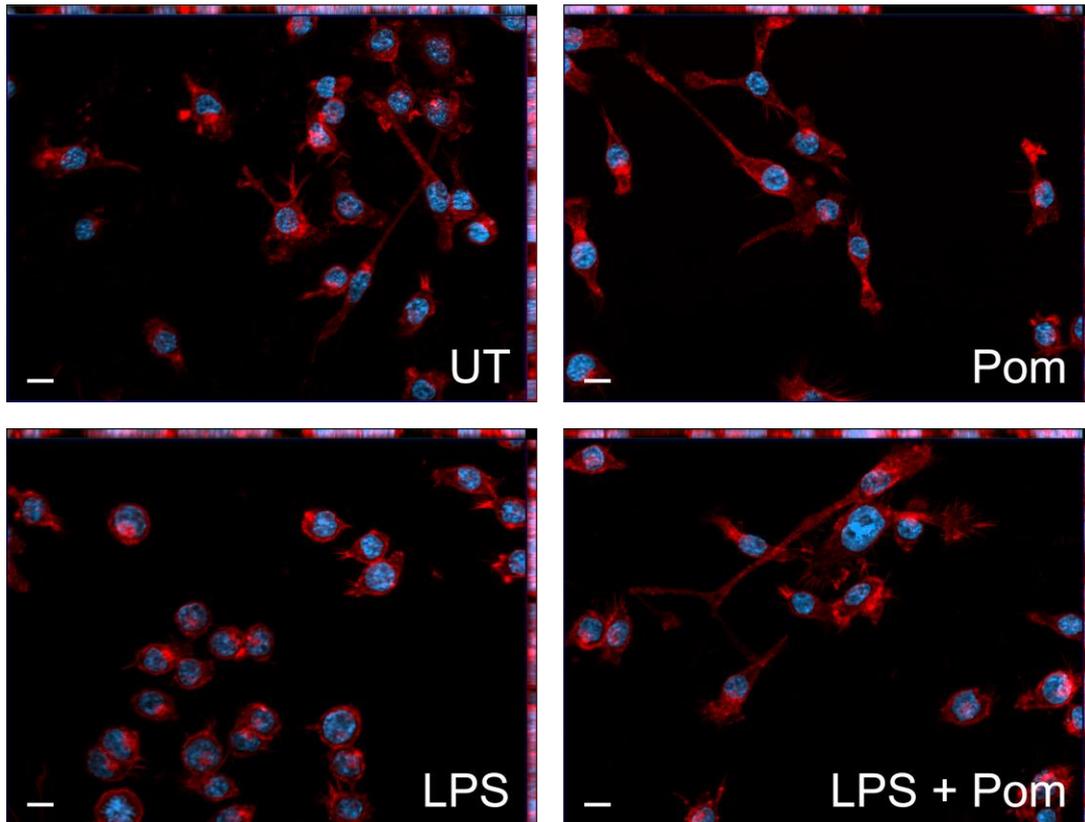
**Abbildung 8: Veränderungen der Genexpression in BV2-Mikrogliazellen unter Einfluss von Pomalidomid.** BV-2 Zellen wurden für 6 Stunden mit alternativ Pomalidomid 25 μM, LPS 50 ng/ml + 2 μl DMSO oder Pomalidomid 25 μM + LPS 50 ng/ml versetzt oder unbehandelt

belassen (unbehandelte Kontrolle). Die normalisierten Expressionslevel der relativen mRNA Expression in  $\Delta\Delta Ct$  für Amwap, Ccl2, IL-6, IL-1b, Tlr2, Tnfa sowie Inos wurden mittels Durchführung von quantitativer real-time PCR wie in 3.2.3 beschrieben bestimmt. Es wird das arithmetische Mittel  $\pm$  Standardabweichung angegeben (n = 6, r = 3, p < 0,05).

### **4.3 BV-2 Mikrogliazellen zeigten unter Einfluss von Pomalidomid eine vermehrt ramifizierte Morphologie**

Zur Untersuchung der Morphologie der BV-2 Mikrogliazellen erfolgte die Anfärbung des Zytoskeletts mittels einer Phalloidin-TRITC-Färbung sowie des Zellkerns mittels einer DAPI-Färbung. Hierzu wurden BV-2 Mikrogliazellen wie unter 2.2.4 beschrieben für 24 Stunden behandelt und anschließend gefärbt.

In der Kontrollgruppe zeigten sich die Perikarya der Mikrogliazellen deutlich ramifiziert und das Kern-Zytoplasma-Verhältnis auf Seiten des Zytoplasmas. Dies zeigte sich außerdem in den Zellpräparaten, die ausschließlich mit Pomalidomid 25 $\mu$ M behandelt wurden. In der Gruppe, die lediglich einer Induktion durch LPS 50 ng/ml unterworfen wurde, zeigte sich hingegen eine deutlich weniger ramifizierte Form der Perikarya der Mikrogliazellen mit deutlich weniger und dafür verdickten Zellausläufern. Auch das Kern-Zytoplasma-Verhältnis ist hier stark zugunsten der Zellkerne verschoben. Jene Mikrogliazellen, welche zusätzlich zu einer Induktion durch LPS 50 ng/ml ebenfalls mit Pomalidomid 25  $\mu$ M versetzt wurden, zeigen hingegen wie die vorher genannten Gruppen wieder einen deutlich stärker ramifizierten Zellaufbau mit einem ausgeglichenen bis stärker zytoplasmatischen Kern-Zytoplasma-Verhältnis. Für diese Beobachtungen werden in Abbildung 9 beispielhaft repräsentative Mikrofotografien der einzelnen Versuchsbedingungen gezeigt.



**Abbildung 9: Veränderungen der Morphologie von BV2-Mikrogliazellen unter Einfluss von Pomalidomid.** Die repräsentativ ausgewählten Fluoreszenzmikrofotografien zeigen die Morphologie der mittels Phalloidin-TRITC sowie DAPI wie unter 3.2.4. beschrieben angefärbten BV-2 Zellen. Diese wurden zuvor für 24 Stunden alternativ mit Pomalidomid 25  $\mu$ M, LPS 50 ng/ml + 2  $\mu$ l DMSO oder Pomalidomid 25  $\mu$ M + LPS 50 ng/ml versetzt oder unbehandelt belassen. (n = 2, r = 3, je 5 Fluoreszenzmikrofotografien je Probe).

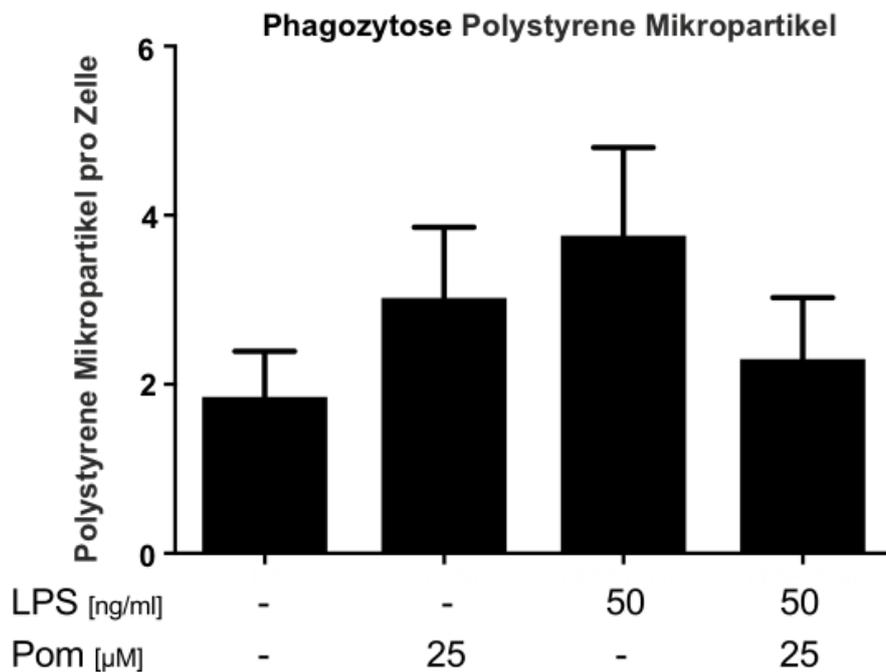
## **4.4 Untersuchung auf Veränderungen der Effektorfunktionen von LPS-stimulierten BV-2 Mikrogliazellen unter Einfluss von Pomalidomid**

Ein wichtiger Faktor zur Beurteilung der Einflüsse von Pomalidomid auf BV-2 Mikrogliazellen sind neben der Genexpression und der Morphologie auch die Beeinflussung der Effektorfunktionen. Hierzu wurden die Phagozytoseeigenschaften, das Zellmigrationsverhalten sowie die NO-Produktion der Zellen untersucht. Die Ergebnisse dieser Experimente werden im Folgenden dargestellt.

### **4.4.1 Pomalidomid zeigt keine signifikante Reduktion der Phagozytose in durch LPS-stimulierte BV-2 Mikrogliazellen**

Eine entscheidende Rolle bei inflammatorischen Aktivitäten in der Retina sowie für die Homöostase der Retina spielt die Phagozytoseeigenschaft der BV2-Mikrogliazellen, durch die Zelldetritus oder Pathogene entfernt werden. Die Phagozytose kann im Rahmen einer Immunreaktion oder einer retinalen degenerativen Erkrankung dysreguliert sein und diese somit verstärken [29, 83]. Die Phagozytose wurde wie unter 2.2.5 beschrieben zum einen anhand von Polystyrene Mikropartikeln und zum anderen mittels natürlichem apoptotischem Material aus 661W Zellen untersucht.

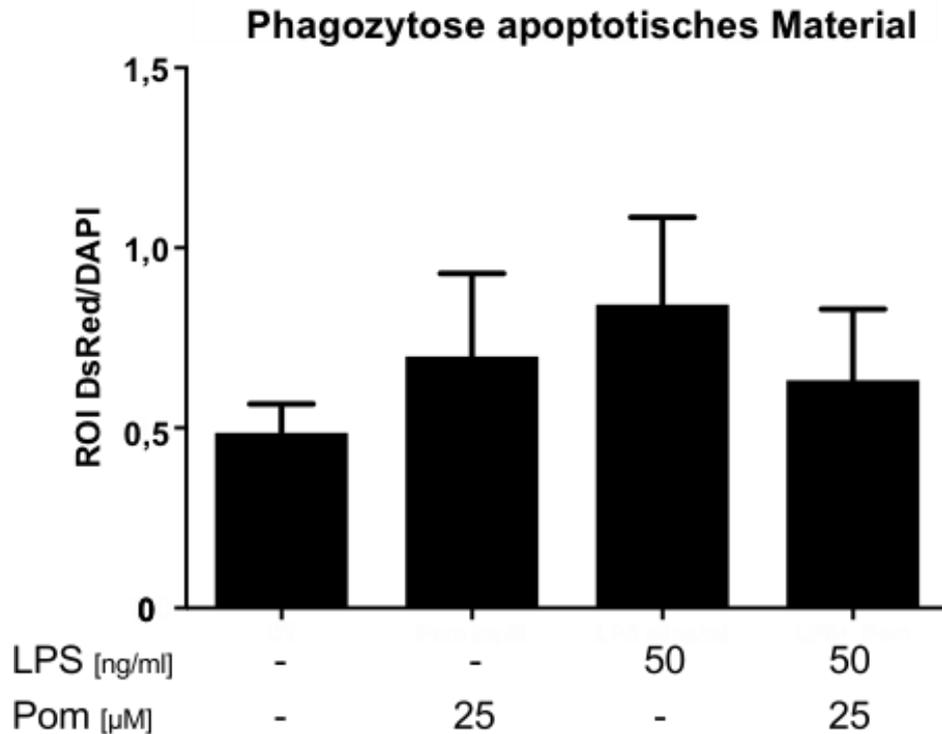
Im Experiment mit Verwendung der Polystyrene Mikropartikel lag die Phagozytoserate in Mikropartikeln pro Zelle unter reiner LPS-Stimulation bei  $3,76 \pm 0,60$  (LPS 50 ng/ml) beziehungsweise  $2,3 \pm 0,42$  (Pom 25  $\mu$ M + LPS 50 ng/ml) unter zusätzlicher Behandlung mit Pomalidomid, dieser Unterschied ist nicht signifikant. In der unstimulierten Vergleichsgruppe lag die Phagozytoserate in Mikropartikeln pro Zelle bei  $1,85 \pm 0,31$  (UT). (Vgl.: Abbildung 10).



**Abbildung 10: Veränderungen der Phagozytose von Polystyrene Mikropartikeln unter Einfluss von Pomalidomid in BV2-Mikrogliazellen.** BV-2 Zellen wurden für 6 Stunden mit Latex Partikel Lösung (Polystyrene microparticles, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) sowie alternativ Pomalidomid 25  $\mu$ M, LPS 50 ng/ml + 2  $\mu$ l DMSO oder Pomalidomid 25  $\mu$ M + LPS 50 ng/ml versetzt oder unbehandelt belassen (unbehandelte Kontrolle). Die Phagozytoserate in Polystyrene Mikropartikeln pro Zelle wurden wie in 3.2.5 beschrieben bestimmt. Es wird das arithmetische Mittel  $\pm$  Standardabweichung angegeben (n = 3, r = 3, p < 0,05).

Im Experiment mit Verwendung des apoptotischen Materials lag die Phagozytoserate in gemessener Fluoreszenzintensität (relative Photonenzahl/nm) unter reiner LPS-Stimulation bei  $0,84 \pm 0,09$  (LPS 50 ng/ml) beziehungsweise  $0,63 \pm 0,08$  (Pom 25  $\mu$ M + LPS 50 ng/ml) unter zusätzlicher Behandlung mit Pomalidomid, dieser Unterschied ist nicht signifikant. In der unstimulierten Vergleichsgruppe lag die Phagozytoserate in gemessener

Floureszenzintensität (relative Photonenzahl/nm) bei  $0,49 \pm 0,03$  (UT). (Vgl.: Abbildung 11).



**Abbildung 11: Veränderungen der Phagozytose von apoptotischem Material unter Einfluss von Pomalidomid in BV2-Mikrogliazellen.**

BV-2 Zellen wurden für 6 Stunden mit floureszenzfarbstoffmarkiertem apoptotischem Zellmaterial aus 661 W Zellen sowie alternativ Pomalidomid 25 µM, LPS 50 ng/ml + 2 µl DMSO oder Pomalidomid 25 µM + LPS 50 ng/ml versetzt oder unbehandelt belassen (unbehandelte Kontrolle). Die Phagozytoserate in gemessener Floureszenzintensität (relative Photonenzahl/nm) wurden wie in 3.2.5 beschrieben bestimmt. Es wird das arithmetische Mittel  $\pm$  Standardabweichung angegeben ( $n = 3$ ,  $r = 3$ ,  $p < 0,05$ ).

In beiden Untersuchungen lässt sich eine Tendenz zur Reduktion der Phagozytoserate in LPS-stimulierten BV-2 Mikrogliazellen durch zusätzliche Behandlung mit Pomalidomid erkennen. Es ergibt sich allerdings keine statistische Signifikanz.

#### **4.4.2 Pomalidomid bewirkt eine signifikante Veränderung des Zellmigrationsverhaltens von LPS-stimulierten BV-2 Mikrogliazellen**

Auch die Zellmigration der BV2-Mikrogliazellen spielt in der Aufrechterhaltung der Homöostase der Retina und im inflammatorischen Prozess im Rahmen einer Immunreaktion eine wichtige Rolle, da die Mikrogliazellen so zum Ort der Schädigung hin migrieren können und dort gezielt mit den Pathogenen interagieren können. [82].

Die Durchführung des Experiments erfolgte wie unter 2.2.6 beschrieben.

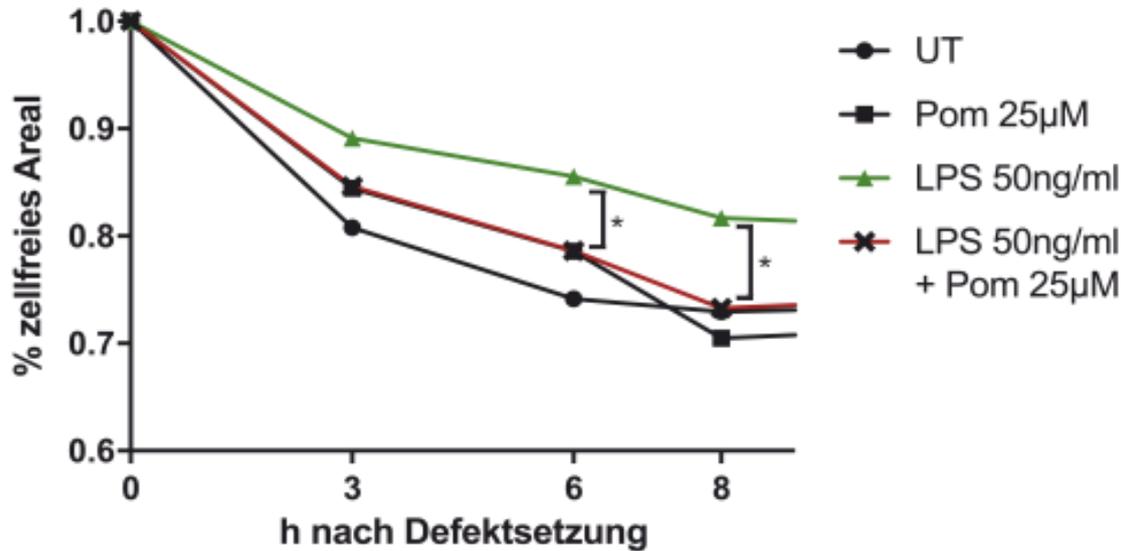
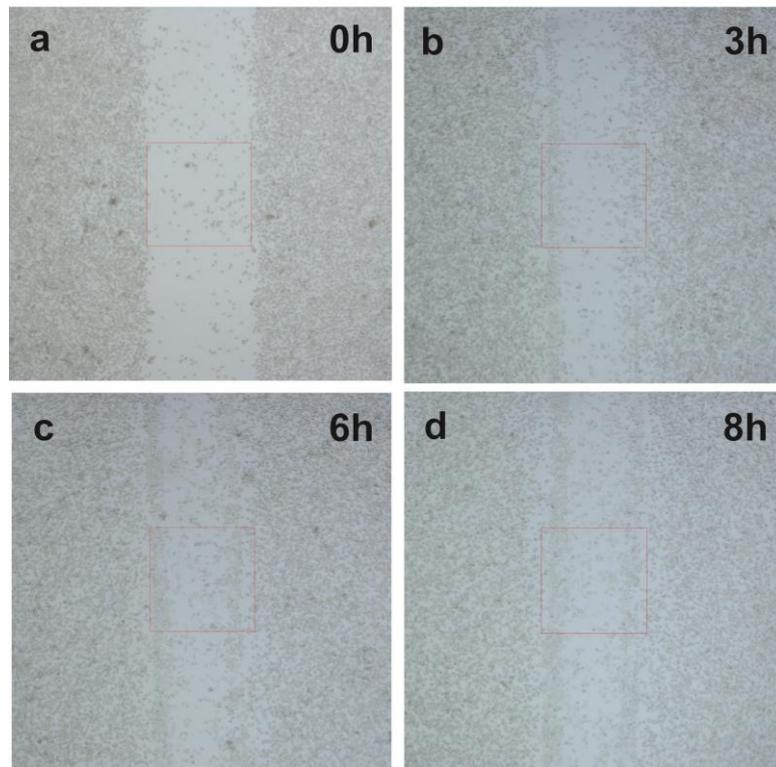
Im untersuchten Zeitraum zeigt sich unter reiner LPS-Stimulation (LPS 50 ng/ml) ein zellfreies Areal in % von  $0,89 \pm 0,01$  (3h),  $0,86 \pm 0,01$  (6h) sowie  $0,82 \pm 0,01$  (8h).

Unter zusätzlicher Behandlung mit Pomalidomid (Pom 25  $\mu$ M + LPS 50 ng/ml) zeigte sich ein zellfreies Areal in % von  $0,85 \pm 0,01$  (3h),  $0,79 \pm 0,01$  (6h) sowie  $0,73 \pm 0,01$  (8h).

In der unstimulierten Vergleichsgruppe (UT) zeigte sich ein zellfreies Areal in % von  $0,81 \pm 0,02$  (3h),  $0,74 \pm 0,01$  (6h) sowie  $0,73 \pm 0,01$  (8h). (Vgl.: Abbildung 12)

Pomalidomid beeinflusst somit das Migrationsverhalten von LPS-stimulierten BV-2 Mikrogliazellen nach Defektsetzung hin zu einer Annäherung des Zellverhaltens an das der unstimulierten Kontrollgruppe (UT). Für die Zeitpunkte  $t = 6h$  und  $t = 8h$  ist dieser Unterschied (LPS 50 ng/ml vs. Pom 25 $\mu$ M + LPS 50 ng/ml) signifikant ( $n = 3$ ,  $p < 0,05$ ).

## Zellmigration 0-8h



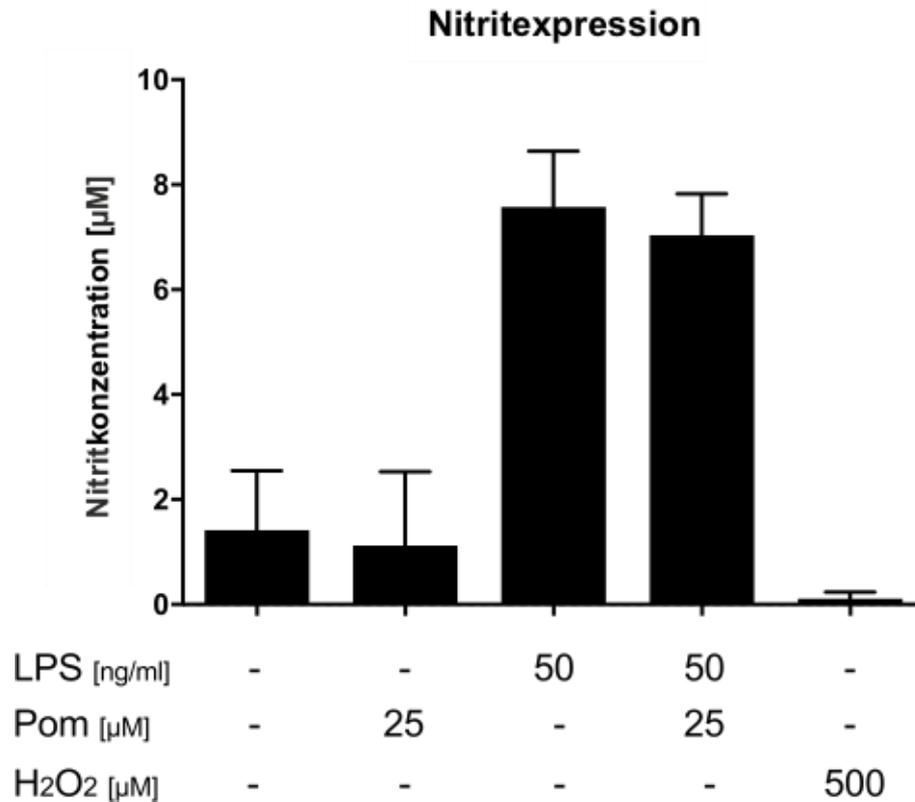
**Abbildung 12: Zellmigration von BV2-Mikrogliazellen unter Einfluss von Pomalidomid innerhalb von 8 h nach Defektsetzung.** BV-2 Zellen wurden zum Zeitpunkt t=0 mit alternativ Pomalidomid 25 µM (a), LPS 50 ng/ml + 2 µl DMSO (b) oder Pomalidomid 25 µM + LPS 50 ng/ml (c) versetzt oder unbehandelt belassen (unbehandelte Kontrolle) (d).

Die Defektsetzung erfolgte wie in 3.2.6 beschrieben ebenfalls zum Zeitpunkt  $t=0$ . Das zellfreie Areal in % zu den Zeitpunkten  $t=0$ ,  $t=3$ ,  $t=6$  sowie  $t=8$  wurde wie in 3.2.5 beschrieben bestimmt. Es wird das arithmetische Mittel angegeben ( $n = 2$ ,  $r = 3$ ,  $p < 0,05$ ).

#### **4.4.3 Pomalidomid führt zu keiner signifikanten Reduktion der NO-Produktion in LPS-stimulierten BV-2 Mikrogliazellen**

Die NO-Ausschüttung spielt in der Immunantwort im Rahmen eines inflammatorischen Prozesses eine wichtige Rolle und gehört zu einer der Schlüsselfunktionen der Makrophagenzelllinien. Die NO-Produktion in Mikrogliazellen wird durch eine vermehrte Expression der induzierbaren NO-Synthase (Inos) gesteigert, die anschließende Freisetzung wirkt zytotoxisch auf eine Reihe vermeintlich vorhandener Pathogene. In diesem Experiment wurde wie in 2.2.7 beschrieben die Nitritexpression als äquivalentes Abbauprodukt von NO bestimmt. [24, 35, 70].

Wie unter 3.2 bereits erläutert konnte Pomalidomid keine Veränderung der Expression von Inos in LPS-stimulierten BV-2 Mikrogliazellen im Vergleich zu einer reinen LPS-Stimulation erwirken. Auch in der direkten Messung der Nitritexpression lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden genannten Versuchsgruppen, sondern lediglich eine leichte Tendenz zur Reduktion der Nitritexpression unter Einfluss von Pomalidomid ausmachen.



**Abbildung 13: Veränderungen der Nitritexpression durch BV2-Mikrogliazellen unter Einfluss von Pomalidomid.** BV-2 Zellen wurden für 6 Stunden mit alternativ Pomalidomid 25 µM, LPS 50 ng/ml + 2 µl DMSO, Pomalidomid 25 µM + LPS 50 ng/ml oder 500µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (tot-Kontrolle) versetzt oder unbehandelt belassen (unbehandelte Kontrolle). Die Nitritkonzentrationen in µM wurden wie in 3.2.7 beschrieben bestimmt. Es wird das arithmetische Mittel ± Standardabweichung angegeben (n = 4, r = 2, p < 0,05).

Die Nitritexpression in µM lag unter reiner LPS-Stimulation bei  $7,58 \pm 0,43$  (LPS 50 ng/ml) beziehungsweise  $7,03 \pm 0,32$  (Pom 25 µM + LPS 50 ng/ml) unter zusätzlicher Behandlung mit Pomalidomid, dieser Unterschied ist wie bereits erwähnt nicht signifikant. In der unstimulierten Vergleichsgruppe lag die Nitritexpression in µM bei  $1,42 \pm 0,46$  (UT). (Vgl.: Abbildung 13).

## **4.5 Zytotoxische bzw. protektive Einflüsse von Pomalidomid auf ARPE-19 Zellen und 661W Zellen**

Neben den direkten Einflüssen von Pomalidomid auf BV-2 Mikrogliazellen ist ebenfalls die über diese Zellen sekundär vermittelte Wirkung auf die für die Homöostase der Retina und für den Sehvorgang essentiellen ARPE-19 Zellen sowie die 661W Zellen von starker Wichtigkeit. Hierzu erfolgte die Untersuchung der Caspase-Aktivität in ARPE-19 Zellen sowie 661W Zellen sowie eine Untersuchung der Genexpression und der morphologischen Veränderungen der ARPE-19 Zellen.

### **4.5.1 Pomalidomid führt zu einer signifikanten Steigerung der Expression von IL-1b sowie Caspase1 in ARPE-19 Zellen**

Die retinale Homöostase wird durch ein direktes Zusammenspiel aus verschiedenen Zellgruppen und deren Zell-Zell-Interaktion aufrechterhalten [54]. Neben der Betrachtung der direkten Einflüsse von Pomalidomid auf BV-2 Mikrogliazellen ist daher außerdem die Betrachtung der Auswirkungen des Einsatzes eines solchen Medikaments auf die in direkter Verbindung stehenden ARPE-19 Zellen wichtig.

Zur Bestimmung der Genexpression in ARPE-19 Zellen erfolgte die Behandlung dieser Zellen mittels konditionierten Mediums aus vorheriger Behandlung von BV-2 Mikrogliazellen wie unter 2.2.3 beschrieben.

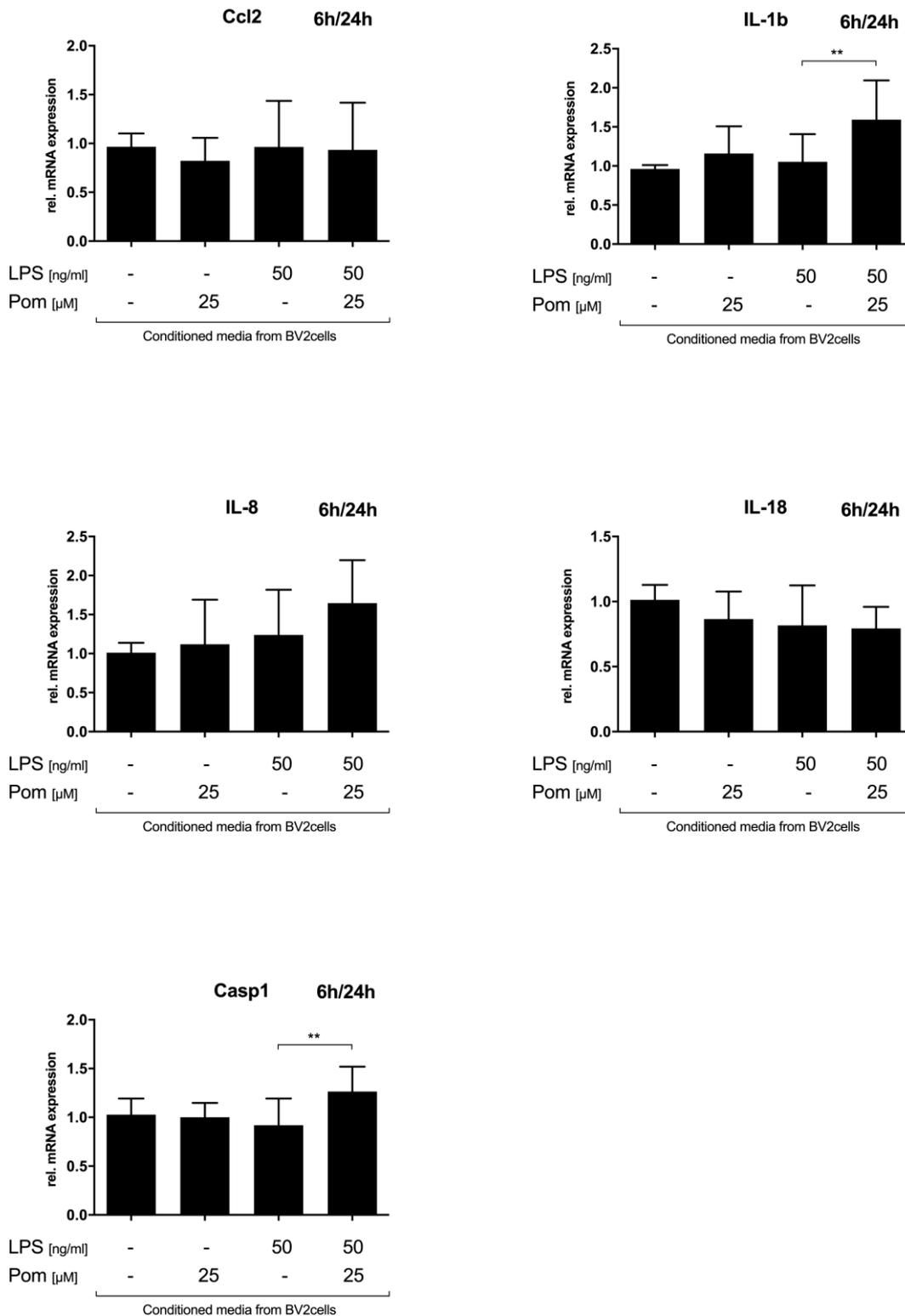
Die ARPE-19 Zellen wurden zur Untersuchung in 6-well Kulturplatten zu je 300.000 Zellen kultiviert und für 24 Stunden mit dem zuvor kultivierten Medium versetzt, es erfolgte die anschließende Auswertung mittels einer PCR-Analyse.

Für die Gene IL-1b sowie Caspase-1 zeigte sich jeweils eine signifikante Steigerung der Expression dieser Gene in ARPE-19 Zellen nach Behandlung mittels kultivierten Mediums nach Einfluss von LPS und Pomalidomid auf BV-2 Mikrogliazellen (Pom 25  $\mu$ M + LPS 50 ng/ml) im Gegensatz zu jenen, welche unter dem isolierten Einfluss von LPS auf BV-2 Mikrogliazellen standen (LPS 50

ng/ml). Das normalisierte Expressionslevel in  $\Delta\Delta$  Ct lag für IL-1b bei  $1,05 \pm 0,10$  (LPS 50 ng/ml) beziehungsweise  $1,59 \pm 0,14$  (Pom 25  $\mu$ M + LPS 50 ng/ml). Für Caspase-1 lag das normalisierte Expressionslevel in  $\Delta\Delta$  Ct bei  $0,92 \pm 0,08$  (LPS 50 ng/ml) beziehungsweise  $1,26 \pm 0,07$  (Pom 25  $\mu$ M + LPS 50 ng/ml). In der unstimulierten Vergleichsgruppe lagen die normalisierten Expressionslevel in  $\Delta\Delta$  Ct für IL-1b bei  $0,96 \pm 0,01$  (UT) und für Caspase-1 bei  $1,03 \pm 0,05$  (UT). (Vgl.: Abbildung 14).

Die Gene Ccl2, IL-8 sowie IL-18 zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Genexpression der ARPE-19 Zellen zwischen der Behandlung mit konditioniertem Medium nach reiner LPS-Stimulation beziehungsweise der zusätzlichen Behandlung mit Pomalidomid.

Das normalisierte Expressionslevel in  $\Delta\Delta$  Ct lag für Ccl2 lag bei  $0,96 \pm 0,14$  (LPS 50 ng/ml) beziehungsweise  $0,93 \pm 0,14$  (Pom 25  $\mu$ M + LPS 50 ng/ml), für IL-8 bei  $1,24 \pm 0,17$  (LPS 50 ng/ml) beziehungsweise  $1,65 \pm 0,17$  (Pom 25  $\mu$ M + LPS 50 ng/ml) sowie für IL-18 bei  $0,82 \pm 0,09$  (LPS 50 ng/ml) beziehungsweise  $0,79 \pm 0,05$  (Pom 25  $\mu$ M + LPS 50 ng/ml). In der unstimulierten Vergleichsgruppe lag das normalisierte Expressionslevel in  $\Delta\Delta$  Ct für Ccl2 bei  $0,97 \pm 0,04$  (UT), für IL-8 bei  $1,01 \pm 0,04$  (UT) und für IL-18 bei  $1,01 \pm 0,03$  (UT). (Vgl.: Abbildung 14).



**Abbildung 14: Analyse der Effekte von Pomalidomid auf die BV2-Mikrogliazellen vermittelte Veränderung der Genexpression in ARPE19-Zellen.** BV-2 Zellen wurden für 6 Stunden mit alternativ Pomalidomid 25  $\mu$ M, LPS 50 ng/ml + 2  $\mu$ l DMSO oder Pomalidomid 25  $\mu$ M + LPS 50 ng/ml versetzt oder unbehandelt belassen

(unbehandelte Kontrolle). Das hierdurch gewonnene kultivierte Medium wirkte anschließend für 24h auf ARPE-19 Zellen ein. Die normalisierten Expressionslevel der relativen mRNA Expression in  $\Delta\Delta Ct$  für Ccl2, IL-1b, IL-8, IL-18 sowie Caspase1 wurden mittels Durchführung von quantitativer real-time PCR wie in 3.2.3 beschrieben bestimmt. Es wird das arithmetische Mittel  $\pm$  Standardabweichung angegeben (n = 3, r = 3, p < 0,05)

#### **4.5.2 Unter Einfluss von Pomalidomid zeigen sich keine signifikanten Unterschiede im Apoptoseverhalten von 661W Zellen sowie ARPE-19 Zellen**

Ein sehr wichtiger Aspekt der retinalen Degeneration ist die Apoptose von Zellen. Dieser Prozess wird maßgeblich von Mikrogliazellen beeinflusst, welche im reaktiven Zustand proinflammatorische, proapoptotische und zytotoxische Zytokine und Effektorsubstanzen ausscheiden. [61].

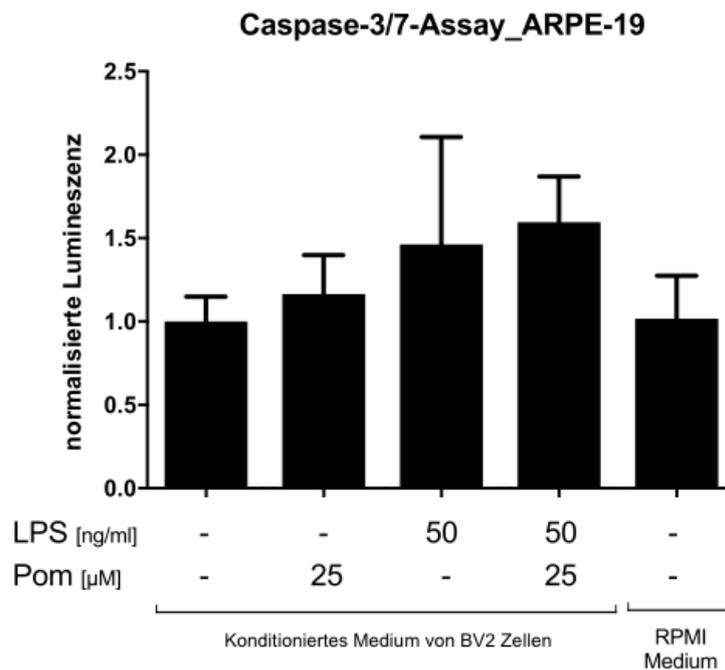
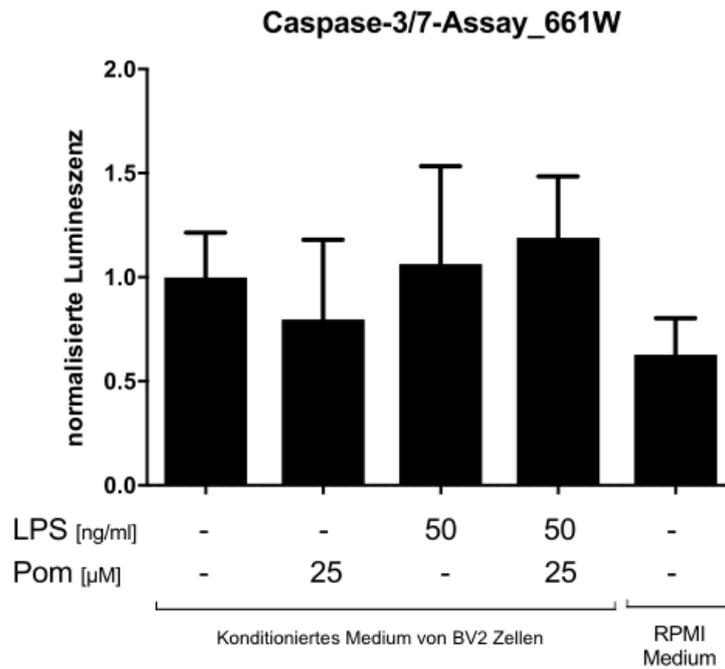
Zur Einschätzung der Apoptoserate wird in diesem Experiment die Caspase-Aktivität unter verschiedenen Konditionen bestimmt.

Es erfolgte wie unter 2.2.8 beschrieben die Gewinnung von konditionierten Überständen nach Behandlung von BV-2 Mikrogliazellen.

Parallel hierzu wurden ARPE-19 Zellen und 661W Zellen in schwarzen 96-Well Mikrotiterplatten mit transparentem Boden zu je 10.000 Zellen pro Well ausgesät und anschließend für 48 Stunden mit den konditionierten Überständen versetzt.

In der Untersuchung der 661W Zellen lag die normalisierte Lumineszenz in relativen Lichteinheiten unter reiner LPS-Stimulation bei  $1,06 \pm 0,16$  (LPS 50 ng/ml) beziehungsweise  $1,19 \pm 0,09$  (Pom 25  $\mu$ M + LPS 50 ng/ml) unter zusätzlicher Behandlung mit Pomalidomid, dieser Unterschied ist nicht signifikant. In der unstimulierten Vergleichsgruppe lag die normalisierte Lumineszenz in relativen Lichteinheiten bei  $0,99 \pm 0,07$  (UT).

In der Untersuchung der ARPE-19 Zellen lag die normalisierte Lumineszenz in relativen Lichteinheiten unter reiner LPS-Stimulation bei  $1,46 \pm 0,21$  (LPS 50 ng/ml) beziehungsweise  $1,59 \pm 0,09$  (Pom 25  $\mu$ M + LPS 50 ng/ml) unter zusätzlicher Behandlung mit Pomalidomid, dieser Unterschied ist ebenfalls nicht signifikant. In der unstimulierten Vergleichsgruppe lag die normalisierte Lumineszenz in relativen Lichteinheiten bei  $1,00 \pm 0,05$  (UT). (Vgl.: Abbildung 15).



**Abbildung 15: Analyse der Effekte von Pomalidomid auf die BV2-Mikrogliazellen vermittelte Apoptoseinduktion in 661W Zellen beziehungsweise ARPE-19 Zellen.** BV-2 Zellen wurden für 6 Stunden mit alternativ Pomalidomid 25  $\mu$ M, LPS 50 ng/ml + 2  $\mu$ l DMSO oder Pomalidomid 25  $\mu$ M + LPS 50 ng/ml versetzt oder unbehandelt belassen (unbehandelte Kontrolle). Das hierdurch gewonnene

kultivierte Medium wirkte anschließend für 48h auf 661 W Zellen beziehungsweise ARPE-19 Zellen ein. Die normalisierte Lumineszenz in relativen Lichteinheiten wurden wie in 3.2.8 beschrieben bestimmt. Es wird das arithmetische Mittel  $\pm$  Standardabweichung angegeben (n = 6, r = 3, p < 0,05).

### 4.5.3 Morphologie ARPE-19 Zellen

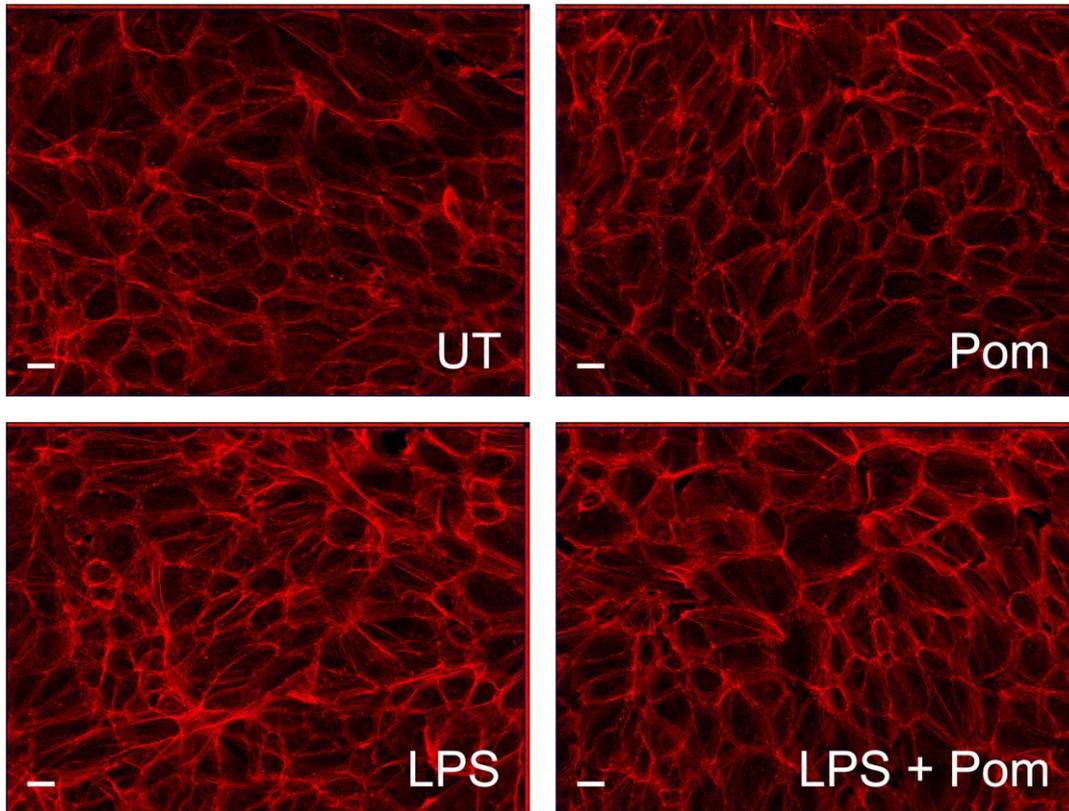
Die Untersuchung der Morphologie der ARPE-19 Zellen erfolgte wie in 2.2.9 beschrieben durch die Anfärbung des Zytoskeletts mittels einer Phalloidin-TRITC-Färbung. Hierzu wurden ARPE-19 Zellen in 6-well Kulturplatten zu je 150.000 Zellen kultiviert und anschließend für 24 Stunden mit den konditionierten Überständen, aus Behandlung von BV-2 Mikrogliazellen, versetzt.

Es zeigte sich in den Präparaten aller Versuchsgruppen ein flächendeckender Zellverband der ARPE-19 Zellen. Des Weiteren ließen sich keine strukturellen Unterschiede im Aktin-Zytoskelett der Zellen unter Einfluss von Pomalidomid im Gegensatz zum fehlenden Einfluss von Pomalidomid erkennen.

Auch ergab sich kein Hinweis auf einen etwaigen Verlust der Fluoreszenzintensität in den unterschiedlichen Behandlungsgruppen. [26].

Für diese Beobachtungen werden in Abbildung 16 beispielhaft repräsentative Mikrofotografien der einzelnen Versuchsgruppen gezeigt.

Es ergaben sich insgesamt keine Hinweise auf einen Einfluss des konditionierten Mediums aus Behandlung von BV-2 Mikrogliazellen auf die Morphologie der ARPE-19 Zellen.



**Abbildung 16: Analyse der Effekte von Pomalidomid auf eine mögliche BV2-Mikrogliazellen vermittelte Veränderung der Morphologie von ARPE19-Zellen.** Die repräsentativ ausgewählten Fluoreszenzmikrografien zeigen die Morphologie der mittels Phalloidin-TRITC wie unter 3.2.9. beschrieben angefärbten ARPE-19 Zellen. Hierfür wurden zunächst BV-2 Zellen für 6 Stunden mit alternativ Pomalidomid 25  $\mu$ M, LPS 50 ng/ml + 2  $\mu$ l DMSO oder Pomalidomid 25  $\mu$ M + LPS 50 ng/ml versetzt oder unbehandelt belassen (unbehandelte Kontrolle). Das hierdurch gewonnene kultivierte Medium wirkte anschließend für 24h auf ARPE-19 Zellen ein. (n = 2, r = 3, je 5 Fluoreszenzmikrografien je Probe).

## **5. DISKUSSION**

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Untersuchung des immunmodulatorischen Effekts von Pomalidomid auf retinale Mikrogliazellen in vitro. Es erfolgte sowohl die Untersuchung des direkten Einflusses von Pomalidomid auf BV-2 Mikrogliazellen sowie ebenso die Untersuchung der mikrogliavermittelten zytotoxischen oder protektiven Einflüsse auf ARPE-19 Zellen sowie auf 661W Zellen.

### **5.1 Effekt von Pomalidomid auf BV-2 Mikrogliazellen**

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte zunächst die Betrachtung des direkten Einflusses von Pomalidomid auf BV-2 Mikrogliazellen durch die Untersuchung von Toxizität, Genexpression, Morphologie, Phagozytoseverhalten, Migrationsverhalten sowie der NO-Produktion.

#### **5.1.1 Toxizität von Pomalidomid auf BV-2 Mikrogliazellen**

Zur Beurteilung der Ausprägung des zytotoxischen Effekts auf BV-2 Mikrogliazellen wurde zu Beginn dieser Arbeit zunächst ein MTT-Test durchgeführt. Hier zeigte sich eine nicht zu vernachlässigende Toxizität mit zunehmender Kontaktdauer sowie steigender Konzentration von Pomalidomid. Aus diesem Grund erfolgte die Festlegung der Kontaktzeit für den Großteil der Experimente auf 6 Stunden. Im Bereich von 24 Stunden lag bereits eine deutlich erhöhte Toxizität von Pomalidomid vor.

Für die Festlegung einer Behandlungsdosis galt, dass eine höhere Dosierung von Pomalidomid zwar, so lassen Vorexperimente schließen, zu einer Steigerung der antiinflammatorischen Wirkung auf die Zellen führen würde, diese wäre allerdings aufgrund der deutlich erhöhten Toxizität auf die untersuchten Zelllinien und den damit einhergehenden Schwierigkeit der Bewertung vitaler Zellen in den Experimenten kaum zu beurteilen gewesen.

Die hohe Zytotoxizität von Pomalidomid ist in der Literatur bereits bekannt und wurde unter anderem von Bartlett beschrieben [6, 11, 62].

Die verwendete Behandlungssdosis von Pomalidomid wurde somit für alle Experimente auf 25  $\mu$ M festgelegt.

Für alle hier durchgeführten Experimente erfolgte also die Abwägung zwischen bestmöglicher antiinflammatorischer Wirkung bei einer dennoch akzeptablen Toxizität.

Es gilt zu beachten, dass die hohe Toxizität der Substanz einen eventuellen Einfluss auf die Ergebnisse einiger durchgeführten Experimente gehabt haben könnte, besonders diejenigen mit längerer Kontaktzeit.

### **5.1.2 Effekt von Pomalidomid auf die Genexpression in BV-2 Mikrogliazellen**

Unter Einfluss von Pomalidomid zeigte sich in Makrophagen des peripheren Bluts eine signifikant veränderte Genexpression im Rahmen eines Entzündungsgeschehens [33, 47, 52]. Dieser Effekt wurde in den hier durchgeführten Experimenten auch in BV-2 Mikrogliazellen untersucht. Die Zellen wurden zunächst durch LPS stimuliert, dies führt über Bindung am Toll-like-Rezeptor-4 (TLR-4) zu einer Aktivierung des spezifischen Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B und hierdurch zu einer Modulation der Expression verschiedener inflammatorischer Mediatoren [45, 68]. Die zusätzliche Behandlung mittels Pomalidomid zeigte in allen untersuchten pro-/ und antiinflammatorisch wirkenden Genen (Amwap, Ccl2, IL-6, IL-1b, TLR2, TNF $\alpha$  sowie Inos) keine signifikante Abweichung der Expressionslevel, sodass eine antiinflammatorische Wirkung in reaktiven BV-2 Mikrogliazellen von Pomalidomid auf Ebene der Genexpression nicht nachgewiesen werden konnte.

Aufgrund der interexperimentellen und intraexperimentellen Unterschiede unter anderem durch eine Schwankung der Zelldichte, des Zellwachstums und der Zellvitalität im Laufe des Experiments bei zuvor gleichen Aussaat-/ und Behandlungsbedingungen kommt es bei Zusammenfassung der

Einzelexperimente, zur Erlangung einer ausreichenden Probenzahl, zu einem hohen Standardfehler, sodass die abschließende Beurteilung erschwert wird.

Der genaue Wirkmechanismus von Pomalidomid ist bislang nicht gänzlich geklärt, es wird allerdings aufgrund von Studien zur Verwendung von Pomalidomid in der Therapie des multiplen Myeloms von einer multifaktoriellen Wirkweise mit unterschiedlichen Ansatzpunkten ausgegangen, sodass im Folgenden in dieser Arbeit neben der Genexpression auch weitere Faktoren Berücksichtigung gefunden haben [84].

### **5.1.3 Effekt von Pomalidomid auf die Morphologie von BV-2 Mikrogliazellen**

In der Untersuchung der Morphologie zeigten sich deutliche Unterschiede in den einzelnen Versuchsgruppen.

In der unstimulierten Kontrollgruppe sowie unter alleiniger Behandlung mit Pomalidomid 25  $\mu$ M wiesen die BV-2 Mikrogliazellen eine deutlich ramifizierte Struktur mit einem günstigen Kern-Zytoplasma-Verhältnis auf, sodass sich die Mikroglia hier im nicht aktivierten Zustand befand. Nach alleiniger Stimulation mittels LPS stellten sich die BV-2 Mikrogliazellen als deutlich weniger ramifiziert, stattdessen abgerundet und mit einem stark verschobenen Kern-Zytoplasma-Verhältnis in der Mikroskopie dar. Aufgrund dessen kann davon ausgegangen werden, dass die BV-2 Mikrogliazellen in eine aktivierte, sogenannte reaktive Form übergegangen waren. Die gleichzeitige Stimulation mit LPS und zusätzlich Behandlung mit Pomalidomid 25  $\mu$ M führte hingegen wieder zu einer Veränderung der Morphologie hin zur der unstimulierten Kontrollgruppe, es zeigte sich hier trotz Zugabe von LPS eine vermehrt ramifizierte Struktur der BV-2 Mikrogliazellen.

Ähnliche Beobachtungen der Veränderung der Morphologie zeigten sich auch in verschiedenen Untersuchungen unter Verwendung anderer Mikroglia-modulierender Substanzen [20, 79, 81].

Diese oben genannten Beobachtungen führen somit zu der Hypothese, dass eine Behandlung der BV-2 Mikrogliazellen mit Pomalidomid eine Aktivierung dieser durch LPS, auf morphologischer Ebene, stark abschwächt, oder sogar antagonisiert.

#### **5.1.4 Effekt von Pomalidomid auf die Effektorfunktionen von BV-2 Mikrogliazellen**

Die hier untersuchten Effektorfunktionen waren das Phagozytoseverhalten, das Migrationsverhalten sowie die NO-Produktion.

Pomalidomid bewirkte eine Reduktion der Phagozytoserate in LPS-stimulierten BV-2 Mikrogliazellen sowohl von Polystyrene Mikropartikeln wie auch von apoptotischem Material, welches aus 661W Photorezeptorzellen gewonnen wurde. In beiden Experimenten wurde dieser Trend deutlich, allerdings zeigte sich in beiden Fällen keine statistische Signifikanz der ermittelten Werte. Es kann also davon ausgegangen werden, dass Pomalidomid die Phagozytoserate nach LPS-Stimulation von BV-2 Mikrogliazellen wieder leicht reduziert.

Die leichte Reduktion der Phagozytoserate durch IMiDs und im speziellen Pomalidomid in aktivierten Mikrogliazellen ist bislang nicht beschrieben. Im Rahmen der Forschung zum multiplen Myelom, zu dessen Therapie auch Pomalidomid eingesetzt wird, gibt es bereits andere Substanzen, wie die CD38-Antikörper, für die ein Effekt auf die Phagozytoserate bereits nachgewiesen werden konnte [75]. Ein ähnlich modulierender Effekt von Pomalidomid und anderen IMiDs wurde zwar vermutet, aber bisher nicht bewiesen. In retinalen Mikrogliazellen, welche wie bereits oben erläutert ebenfalls zu den Makrophagen-Zelllinien gehören, scheint nun zumindest ein leichter Effekt auf die Phagozytoserate in aktivierten Zellen diese Hypothese zu unterstützen.

Auch in der Untersuchung des Migrationsverhaltens zeigte sich eine Annäherung des Zellverhaltens unter Zugabe von Pomalidomid zu LPS-stimulierten BV-2

Mikrogliazellen an das der unstimulierten Vergleichsgruppe im Gegensatz zu einer reinen LPS-Stimulation. Dieser Unterschied war für die Zeitpunkte t=6 und t=8 statistisch signifikant.

Diese Beobachtung wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. Die Ergebnisse bestätigen die vor Beginn der Arbeit aufgestellte Hypothese einer Immunmodulation hin zu einer Annäherung an das Verhalten der unstimulierten Kontrollgruppe in LPS-stimulierten reaktiven BV-2 Mikrogliazellen durch zusätzliche Behandlung mittels Pomalidomid.

Bereits in der Untersuchung der Genexpression war keine Veränderung der Expression von Inos durch Pomalidomid-Behandlung erkennbar gewesen. Somit war auch eine abweichende NO-Produktion nicht anzunehmen. Diese Vermutung bestätigte sich auch in der Untersuchung der Nitritexpression. Wie zu erwarten, führte Pomalidomid zu keiner signifikanten Reduktion der NO-Produktion in LPS-stimulierten BV-2 Mikrogliazellen. Es ließ sich lediglich eine mögliche geringe Tendenz zur Reduktion zeigen, welche allerdings unterhalb des Standardfehlers lag. Diese geringe Änderung der Nitritexpression unter Einfluss von Pomalidomid kann in diesem Fall nicht durch eine Beeinflussung des Schlüsselenzyms Inos, sondern lediglich durch einen eventuell vorhandenen direkten Einfluss auf das Enzym selber bedingt sein. Zu diesem möglichen Effekt existieren bislang keine Veröffentlichungen, die Bedeutung ist allerdings aufgrund der sehr geringen Effektstärke eher als niedrig zu bewerten.

In den hier untersuchten Effektorfunktionen von BV-2 Mikrogliazellen zeigten sich unter Einfluss von Pomalidomid besonders im Migrationsverhalten signifikante Veränderungen, für das Phagozytoseverhalten sowie die NO-Produktion ließen sich bei zwar leichter Tendenz zur Reduktion keine Signifikanzen nachweisen. Die Veränderung von Effektorfunktionen in BV-2 Mikrogliazellen hat in Arbeiten mit alternativen Substanzen bereits Hinweise auf eine Modulation der Zellen gebracht [20, 79, 81]. Zwar deutet die Veränderung des Migrationsverhaltens durch Zugabe von Pomalidomid, ähnlich wie in den genannten Versuchsreihen, auf eine Abschwächung des aktivierenden Effekts von LPS auf die BV-2 Mikrogliazellen hin und auch die Tendenzen in den anderen hier genannten Experimenten könnten diese These stützen, eine endgültige Bewertung ist

aufgrund des Fehlens von vergleichbaren Untersuchungen allerdings kaum möglich.

## **5.2 Mikrogliavermittelte zytotoxische oder protektive Einflüsse von Pomalidomid auf ARPE-19 Zellen sowie 661W Zellen**

Als zweiter wichtiger Aspekt wurden mikrogliavermittelte zytotoxische oder protektive Einflüsse auf ARPE-19 Zellen sowie 661W Zellen evaluiert. Hierzu erfolgte die Untersuchung der Genexpression, der Morphologie von ARPE-19 Zellen sowie des Apoptoseverhaltens von ARPE-19 Zellen und 661W Zellen.

### **5.2.1 Mikrogliavermittelter Effekt von Pomalidomid auf die Genexpression sowie die Morphologie von ARPE-19 Zellen**

In der Genexpression der ARPE-19 Zellen nach Kultivierung mit Überständen aus der Behandlung von BV-2 Mikrogliazellen zeigt sich wie oben beschrieben eine signifikante Steigerung der Expression von Caspase1 sowie IL-1b.

In der Literatur ist beschrieben, dass Pathogene beziehungsweise Bakterienbestandteile, wie zum Beispiel LPS, als TLR-Agonisten die Synthese von IL-1b stimulieren. Die Aktivierung der Caspase 1 erfolgt unter anderem durch eine Aktivierung des Inflammasoms, die ihrerseits durch LPS induziert werden kann. Caspase 1 führt schlussendlich zu einer Aktivierung der IL-1b Vorläufer zu einer funktionalen Form. Das so aktivierte IL1b führt zu einer Inflammation und im speziellen zu einer Ausschüttung von IL6 [19, 80]. Diese inflammatorisch wirkende Kaskade wurde auch im Zusammenhang mit einer retinalen Degeneration beschrieben[1]. Die in den konditionierten Überständen verbliebene Restdosis von LPS scheint in diesem Experiment allerdings keinen stimulierenden Effekt auf die Genexpression dieser Gene gehabt zu haben. Ein Anstieg der Expression von Caspase 1 sowie IL-1b ist erst unter zusätzlicher Behandlung mit Pomalidomid zu sehen. Die Behandlung mit Pomalidomid allein

zeigte ebenfalls keine Veränderung gegenüber der unstimulierten Vergleichsgruppe.

Die verstärkte Expression dieser beiden proinflammatorischen Mediatoren steht zunächst im Kontrast zu der anfänglichen Hypothese einer antiinflammatorischen Modulation durch Pomalidomid. Wichtig ist allerdings erneut die Berücksichtigung der direkten Toxizität von Pomalidomid, welche gegebenenfalls durch die zusätzliche LPS Einwirkung auf die ARPE-19 Zellen verstärkt werden könnte und ihrerseits einen solchen Effekt hervorrufen könnte. Eine abschließende Beurteilung ist daher in diesem Fall mit der aktuell zur Verfügung stehenden Datenlage nicht möglich.

Die Morphologie der ARPE-19 Zellen nach Zugabe des konditionierten Mediums weist am ehesten keine relevanten Veränderungen des Zellnetzwerkes im Gegensatz zu der unbehandelten Kontrollgruppe auf. Es kann in der Zusammenschau der Mikrofotografien allenfalls die Ausbildung eines feinblasigeren Zellnetzwerkes unter Zugabe von LPS beobachtet werden, in den übrigen Gruppen zeigte sich dies nicht. Eine solche Veränderung des Zellnetzwerk könnte das Resultat eines durch den inflammatorischen Reiz ausgelösten Umbau im Zytoskelett der ARPE-19 Zellen sein. Eine Übertragbarkeit dieses Effekts auf das retinale Pigmentepithel in vivo ist aber aufgrund des unterschiedlichen morphologischen Verhaltens der Zellen in vitro und in vivo kaum möglich [9]. Weiterhin gilt es zu bedenken, dass es sich bei der Beobachtung vermutlich eher um eine der Methodik des Experimentes geschuldete Veränderung handelt. So zeigen sich nach Anfertigung der Präparate aufgrund der hohen Anzahl an Spülvorgängen dieser im Rahmen der Anfärbung der Präparate mit den Fluoreszenzfarbstoffen regelhaft Areale mit geringerer Zelldichte sowie auch Areale mit überlappenden Zellschichten. Um sicherzustellen, ob es sich um eine tatsächlich auftretende Veränderung in der Struktur des Zellnetzwerkes in der LPS-stimulierten Gruppe handelt, wäre sicherlich eine detailliertere Untersuchung der Morphologie mit zusätzlicher Anfärbung weitere Zytoskelettbestandteile sowie eine größere Zahl an Experimenten notwendig.

Insgesamt deuten die Beobachtungen am ehesten darauf hin, dass Pomalidomid zumindest auf morphologischer Ebene keinen schädigenden Einfluss auf die

Zellen des retinalen Pigmentepithels ausübt. Hierzu bestehen keine vorherigen Veröffentlichungen, sodass eine Einordnung in den Zusammenhang daher entfällt.

### **5.2.2 Mikrogliavermittelter Effekt von Pomalidomid auf die Apoptoseinduktion in ARPE-19 Pigmentepithelzellen sowie 661W Photorezeptorzellen**

Wie bereits erläutert haben in der Vergangenheit bereits viele Untersuchungen gezeigt, dass Mikrogliazellen die Homöostase der Retina sensibel beeinflussen und vor allem eine Aktivierung von Mikroglia zu einem entzündlich-degenerativen Outcome besonders für die direkt betroffenen Photorezeptorzellen sowie Pigmentepithelzellen führt [3, 36, 39]. Hierbei kommt es im Rahmen der Inflammation zu einer Ausschüttung von apoptoseinduzierenden Zytokinen, reaktiven Sauerstoffspezies oder Stickoxide, die einzeln und in Ihrem Zusammenspiel schließlich die Apoptose bewirken [13, 29, 56]. Aus diesem Grund war die Untersuchung der Caspaseaktivität, welche einen direkten Rückschluss auf die Apoptoserate in den Zellen zulässt, in dieser Arbeit von großer Wichtigkeit [57]. In den durchgeführten Experimenten ergab sich für beide Zelllinien kein signifikanter Unterschied zwischen der Apoptoserate bei Kultivierung mit konditionierten Überständen aus BV-2 Mikrogliazellen für entweder ausschließliche Verwendung von LPS oder Verwendung von LPS und Pomalidomid. Die Apoptoserate stieg zwar unter LPS-Stimulation im Vergleich zu der unstimulierten Kontrollgruppe an, dieser Effekt konnte aber durch das zusätzliche Vorhandensein von Pomalidomid nicht aufgehoben werden. LPS führt einerseits durch die Überführung von BV-2 Mikrogliazellen in eine reaktive Form sowie über Stimulation des von Photorezeptorzellen expremierten TLR4 zu einer Steigerung der Apoptoserate in Photorezeptorzellen und Pigmentepithelzellen [63, 74]. Zum anderen wird in der Literatur auch ein direkter protektiver Einfluss von LPS auf die Apoptose in Photorezeptorzellen durch Steigerung der IL-6 Expression beschrieben [7]. Aufgrund der oben

beschriebenen Steigerung der Apoptoserate durch LPS scheint der apoptoseinduzierende Effekt auf Photorezeptorzellen hier zu überwiegen.

Ein weiterer möglicher Störfaktor ist das direkte Vorhandensein von LPS und Pomalidomid in den konditionierten Überständen, da diese nach Behandlung der BV-2 Mikrogliazellen nicht aus dem Überstand entfernt werden können und somit zusätzlich zu den von den Mikrogliazellen sezernierten Mediatoren vorliegen. Pomalidomid könnte also auch einen direkten toxischen Effekt auf die beiden hier untersuchten Zelllinien ähnlich dem auf Mikrogliazellen haben und somit einen eventuell vorliegenden protektiven Einfluss kaschieren. Dies lässt sich allerdings nicht beweisen, da kein signifikanter direkter Einfluss von Pomalidomid auf die Photorezeptorzellen oder Pigmentepithelzellen gezeigt werden konnte.

### **5.3 Kritische Würdigung**

Die Retina mit ihrer physiologischen Abgrenzung durch die Blut-Retina-Schranke bildet ein sogenanntes immunprivilegiertes Organ, dessen einzige Immunzellen die Mikroglia darstellt. Diese Mikrogliazellen nehmen daher eine entscheidende Rolle bei der Schädigung und Degeneration der Netzhaut durch inflammatorische Prozesse sowohl bei hereditären als auch bei erworbenen Erkrankungen der Retina ein. Hierbei steht der Übergang der physiologisch ruhenden Mikroglia in eine aktivierte, sogenannte reaktive Form und die dadurch folgende fehlregulierte Immunantwort mit Hyperinflammation und neuronaler Degeneration im Vordergrund. Mikroglia stellt daher ein ernstzunehmendes Therapieziel dar.

In dieser Arbeit wurde Pomalidomid, welches bereits in der Therapie des multiplen Myeloms eine immunmodulatorische Wirkung in der Tumorumgebung zeigt, mit diesem Ziel hinsichtlich seiner immunmodulatorischen Effekte auf die retinale Mikroglia untersucht. Hierzu erfolgten Experimente zur Untersuchung der Toxizität, der Genexpression, der Morphologie und der Effektorfunktionen von BV-2 Mikrogliazellen unter Zugabe von Pomalidomid. Zusätzlich wurde der Einfluss von Pomalidomid auf die Genexpression sowie die Morphologie von ARPE-19 Pigmentepithelzellen und dessen Einfluss auf das Apoptoseverhalten von ARPE-19 Pigmentepithelzellen sowie 661W Photorezeptorzellen untersucht.

Ein signifikanter Effekt durch Pomalidomid konnte ausschließlich in der Morphologie und dem Migrationsverhalten der BV-2 Mikrogliazellen sowie in der Genexpression durch

ARPE-19 Zellen gezeigt werden. In der Untersuchung der Phagozytoserate zeigte sich eine Tendenz zur Reduktion dieser durch Pomalidomid. In allen weiteren Experimenten zeigte Pomalidomid keinen Einfluss.

Es wurde somit gezeigt, dass der immunmodulatorische Effekt von Pomalidomid, der in Makrophagen des peripheren Bluts eindeutig beschrieben worden ist, in der retinalen Mikroglia kaum vorhanden zu sein scheint.

Eine abschließende Aussage diesbezüglich kann unter alleiniger Betrachtung dieser Arbeit sicher nicht gestellt werden. Limitationen der Aussagekraft ergeben sich unter anderem aus der methodisch nicht vermeidbaren Speziesdifferenz der verwendeten Zelllinien sowie der limitierten Anzahl an Wiederholungen der einzelnen Experimente.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass aufgrund der unzureichenden antiinflammatorisch-immunmodulatorischen Wirkung von Pomalidomid auf die retinale Mikroglia sowie der verhältnismäßig hohen Toxizität der Substanz, diese für einen Einsatz in der Therapie retinal-degenerativer Erkrankungen nicht vielversprechend erscheint.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Ambati, J., Atkinson, J. P., Gelfand, B. D. Immunology of age-related macular degeneration. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(6):438-451.
- [2] Ardeljan, D., Chan, C. C. Aging is not a disease: distinguishing age-related macular degeneration from aging. *Prog Retin Eye Res.* 2013;37:68-89.
- [3] Armbrust, K. R., Nussenblatt, R. B., Schachst, A. Ryan's Retina. Volume I. Sixth Edition. In *Blood-Retinal Barrier, Immune Privilege and Autoimmunity.* : Elsevir; 2013. 656-666 p.
- [4] Arnheim, K. Myelodysplastische Syndrome (MDS) und multiples Myelom (MM). *Wiener klinisches Magazin.* 2013;16(6):30-31.
- [5] Arnheim, K. Pomalidomid (Imnovid®) beim multiplen Myelom neu zugelassen. *PharmaForum in OnkOIOgie* 36 | 10 | 13. 2013().
- [6] Bartlett, J. B., Dredge, K., Dalglish, A. G. The evolution of thalidomide and its IMiD derivatives as anticancer agents. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(4):314-322.
- [7] Bissonnette, C. J., Klegeris, A., McGeer, P. L., McGeer, E. G. Interleukin 1alpha and interleukin 6 protect human neuronal SH-SY5Y cells from oxidative damage. *Neurosci Lett.* 2004;361(1-3):40-43.
- [8] Boche, D., Perry, V. H., Nicoll, J. A. Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2013;39(1):3-18.
- [9] Bonilha, V. L. Retinal pigment epithelium (RPE) cytoskeleton in vivo and in vitro. *Exp Eye Res.* 2014;126:38-45.
- [10] Bowling, B. *Kanskis Klinische Ophthalmologie. Ein systematischer Ansatz.* 8. Auflage.: Elsevier; 2019.
- [11] Bringhen, S., De Wit, E., Dimopoulos, M. A. New Agents in Multiple Myeloma: An Examination of Safety Profiles. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2017;17(7):391-407.e395.
- [12] Carwile, M. E., Culbert, R. B., Sturdivant, R. L., Kraft, T. W. Rod outer segment maintenance is enhanced in the presence of bFGF, CNTF and GDNF. *Exp Eye Res.* 1998;66(6):791-805.
- [13] Cobb, C. A., Cole, M. P. Oxidative and nitrate stress in neurodegeneration. *Neurobiol Dis.* 2015;84:4-21.

- [14] D'Amato, R. J., Loughnan, M. S., Flynn, E., Folkman, J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(9):4082-4085.
- [15] Dahlmann, C., Patzelt, J. *Augenheilkunde.* 4. Auflage. : Elsevier; 2016.
- [16] Dannhausen, K., Karlstetter, M., Caramoy, A., Volz, C., Jagle, H., Liebisch, G., Utermohlen, O., Langmann, T. Acid sphingomyelinase (aSMase) deficiency leads to abnormal microglia behavior and disturbed retinal function. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;464(2):434-440.
- [17] Das, A., Chai, J. C., Kim, S. H., Park, K. S., Lee, Y. S., Jung, K. H., Chai, Y. G. Dual RNA sequencing reveals the expression of unique transcriptomic signatures in lipopolysaccharide-induced BV-2 microglial cells. *PLoS One.* 2015;10(3):e0121117.
- [18] Deng, L., Ding, W., Granstein, R. D. Thalidomide inhibits tumor necrosis factor-alpha production and antigen presentation by Langerhans cells. *J Invest Dermatol.* 2003;121(5):1060-1065.
- [19] Dinarello, C. A. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev.* 2018;281(1):8-27.
- [20] Dirscherl, K., Karlstetter, M., Ebert, S., Kraus, D., Hlawatsch, J., Walczak, Y., Moehle, C., Fuchshofer, R., Langmann, T. Luteolin triggers global changes in the microglial transcriptome leading to a unique anti-inflammatory and neuroprotective phenotype. *J Neuroinflammation.* 2010;7:3.
- [21] Eysel, U., Klinke, R., Silbernagel, S. *Physiologie:* Thieme; 2005.
- [22] Ferguson, G. D., Jensen-Pergakes, K., Wilkey, C., Jhaveri, U., Richard, N., Verhelle, D., De Parseval, L. M., Corral, L. G., Xie, W., Morris, C. L., Brady, H., Chan, K. Immunomodulatory drug CC-4047 is a cell-type and stimulus-selective transcriptional inhibitor of cyclooxygenase 2. *J Clin Immunol.* 2007;27(2):210-220.
- [23] Finger, R. P., Bertram, B., Wolfram, C., Holz, F. G. Blindness and visual impairment in Germany: a slight fall in prevalence. *Dtsch Arztebl Int.* 2012;109(27-28):484-489.
- [24] Forstermann, U., Sessa, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J.* 2012;33(7):829-837, 837a-837d.

- [25] Fullerton, P. M., Kremer, M. Neuropathy after intake of thalidomide (distaval). *Br Med J.* 1961;2(5256):855-858.
- [26] Gao, M., Wu, S., Ji, J., Zhang, J., Liu, Q., Yue, Y., Liu, L., Liu, X., Liu, W. The influence of actin depolymerization induced by Cytochalasin D and mechanical stretch on interleukin-8 expression and JNK phosphorylation levels in human retinal pigment epithelial cells. *BMC Ophthalmol.* 2017;17(1):43.
- [27] Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M. F., Conway, S. J., Ng, L. G., Stanley, E. R., Samokhvalov, I. M., Merad, M. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science.* 2010;330(6005):841-845.
- [28] GmbH, C. Fachinformation Imnovid [https://www.gelbe-liste.de/produkte/IMNOVID-3mg-Hartkapseln\\_825090/fachinformation](https://www.gelbe-liste.de/produkte/IMNOVID-3mg-Hartkapseln_825090/fachinformation)  
[updated 29.02.2020.
- [29] Gupta, N., Brown, K. E., Milam, A. H. Activated microglia in human retinitis pigmentosa, late-onset retinal degeneration, and age-related macular degeneration. *Exp Eye Res.* 2003;76(4):463-471.
- [30] Hales, B. F. Thalidomide on the comeback trail. *Nat Med.* 1999;5(5):489-490.
- [31] Harada, C., Harada, T., Quah, H. M., Maekawa, F., Yoshida, K., Ohno, S., Wada, K., Parada, L. F., Tanaka, K. Potential role of glial cell line-derived neurotrophic factor receptors in Muller glial cells during light-induced retinal degeneration. *Neuroscience.* 2003;122(1):229-235.
- [32] Hartmann, M., Pabst, M. A., Dohr, G. *Zytologie, Histologie und Mikroskopische Anatomie. Licht- und elektronenmikroskopischer Bildatlas.* 5. Auflage. 2011.
- [33] Haslett, P. A., Corral, L. G., Albert, M., Kaplan, G. Thalidomide costimulates primary human T lymphocytes, preferentially inducing proliferation, cytokine production, and cytotoxic responses in the CD8+ subset. *J Exp Med.* 1998;187(11):1885-1892.
- [34] Henn, A., Lund, S., Hedtjörn, M., Schrattenholz, A., Pörzgen, P., Leist, M. The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation. *Altex.* 2009;26(2):83-94.

- [35] Hickman, S., Izzy, S., Sen, P., Morsett, L., El Khoury, J. Microglia in neurodegeneration. *Nat Neurosci.* 2018;21(10):1359-1369.
- [36] Karlstetter, M., Langmann, T. Microglia in the aging retina. *Adv Exp Med Biol.* 2014;801:207-212.
- [37] Karlstetter, M., Scholz, R., Rutar, M., Wong, W. T., Provis, J. M., Langmann, T. Retinal microglia: just bystander or target for therapy? *Prog Retin Eye Res.* 2015;45:30-57.
- [38] Karlstetter, M., Soroush, N., Caramoy, A., Dannhausen, K., Aslanidis, A., Fauser, S., Boesl, M. R., Nagel-Wolfrum, K., Tamm, E. R., Jagle, H., Stoehr, H., Wolfrum, U., Langmann, T. Disruption of the retinitis pigmentosa 28 gene *Fam161a* in mice affects photoreceptor ciliary structure and leads to progressive retinal degeneration. *Hum Mol Genet.* 2014;23(19):5197-5210.
- [39] Kettenmann, H., Hanisch, U. K., Noda, M., Verkhratsky, A. Physiology of microglia. *Physiol Rev.* 2011;91(2):461-553.
- [40] Lang, G., K. . *Augenheilkunde*: Thieme; 2019.
- [41] Langmann, T. Microglia activation in retinal degeneration. *J Leukoc Biol.* 2007;81(6):1345-1351.
- [42] Lee, C. J., Goncalves, L. L., Wells, P. G. Embryopathic effects of thalidomide and its hydrolysis products in rabbit embryo culture: evidence for a prostaglandin H synthase (PHS)-dependent, reactive oxygen species (ROS)-mediated mechanism. *FASEB J.* 2011;25(7):2468-2483.
- [43] Lenz, v., W. , Knapp, K. Die Thalidomid-Embryopathie. *Deutsche Medizinische Wochenschrift.* 1962;87(24): 1232–1242.
- [44] Lokensgard, J. R., Hu, S., van Fenema, E. M., Sheng, W. S., Peterson, P. K. Effect of thalidomide on chemokine production by human microglia. *J Infect Dis.* 2000;182(3):983-987.
- [45] Lu, Y. C., Yeh, W. C., Ohashi, P. S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine.* 2008;42(2):145-151.
- [46] Marriott, J. B., Muller, G., Dalgleish, A. G. Thalidomide as an emerging immunotherapeutic agent. *Immunology Today.* 1999;20(12):538-540.
- [47] Marriott, J. B., Muller, G., Stirling, D., Dalgleish, A. G. Immunotherapeutic and antitumour potential of thalidomide analogues. *Expert Opin Biol Ther.* 2001;1(4):675-682.

- [48] McBride, W. G. THALIDOMIDE AND CONGENITAL ABNORMALITIES. *The Lancet*. 1961;278(7216):1358.
- [49] Moller, D. R., Wysocka, M., Greenlee, B. M., Ma, X., Wahl, L., Flockhart, D. A., Trinchieri, G., Karp, C. L. Inhibition of IL-12 production by thalidomide. *The Journal of Immunology*. 1997;159(10):5157-5161.
- [50] Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63.
- [51] Moussaud, S., Draheim, H. J. A new method to isolate microglia from adult mice and culture them for an extended period of time. *J Neurosci Methods*. 2010;187(2):243-253.
- [52] Muller, G. W., Corral, L. G., Shire, M. G., Wang, H., Moreira, A., Kaplan, G., Stirling, D. I. Structural modifications of thalidomide produce analogs with enhanced tumor necrosis factor inhibitory activity. *J Med Chem*. 1996;39(17):3238-3240.
- [53] Müller Jahnke, W. D., Friedrich, C., Meyer, U. *Arzneimittelgeschichte*. 2. überarb. und erw. Auflage.: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; 2005.
- [54] Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., Helmchen, F. Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo. *Science*. 2005;308(5726):1314-1318.
- [55] Paolicelli, R. C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T. A., Guiducci, E., Dumas, L., Ragozzino, D., Gross, C. T. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science*. 2011;333(6048):1456-1458.
- [56] Perry, V. H., Teeling, J. Microglia and macrophages of the central nervous system: the contribution of microglia priming and systemic inflammation to chronic neurodegeneration. *Semin Immunopathol*. 2013;35(5):601-612.
- [57] Promega Corporation. <https://www.promega.de/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/101/caspase-glo-3-7-assay-protocol.pdf?la=en> 2019 [updated 03.03.2020].
- [58] Quach, H., Ritchie, D., Stewart, A. K., Neeson, P., Harrison, S., Smyth, M. J., Prince, H. M. Mechanism of action of immunomodulatory drugs (IMiDS) in multiple myeloma. *Leukemia*. 2010;24(1):22-32.

- [59] Raje, N., Anderson, K. Thalidomide--a revival story. *N Engl J Med.* 1999;341(21):1606-1609.
- [60] Ransohoff, R. M. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science.* 2016;353(6301):777-783.
- [61] Rashid, K., Akhtar-Schaefer, I., Langmann, T. Microglia in Retinal Degeneration. *Front Immunol.* 2019;10:1975.
- [62] Raza, S., Safyan, R. A., Lentzsch, S. Immunomodulatory Drugs (IMiDs) in Multiple Myeloma. *Curr Cancer Drug Targets.* 2017;17(9):846-857.
- [63] Roque, R. S., Rosales, A. A., Jingjing, L., Agarwal, N., Al-Ubaidi, M. R. Retina-derived microglial cells induce photoreceptor cell death in vitro. *Brain Res.* 1999;836(1-2):110-119.
- [64] Sampaio, E. P., Sarno, E. N., Galilly, R., Cohn, Z. A., Kaplan, G. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes. *J Exp Med.* 1991;173(3):699-703.
- [65] Santa Cruz Biotechnology, I. <https://www.scbt.com/de/p/pomalidomide-19171-19-8> [updated 03.03.2020].
- [66] Schünke, M., Schulte, E., Schumacher, U., Voll, M., Wesker, K. Prometheus, LernAtlas der Anatomie. Kopf, Hals und Neuroanatomie. 3.Auflage.: Thieme; 2012.
- [67] Senra, H., Barbosa, F., Ferreira, P., Vieira, C. R., Perrin, P. B., Rogers, H., Rivera, D., Leal, I. Psychologic adjustment to irreversible vision loss in adults: a systematic review. *Ophthalmology.* 2015;122(4):851-861.
- [68] Shabab, T., Khanabdali, R., Moghadamtousi, S. Z., Kadir, H. A., Mohan, G. Neuroinflammation pathways: a general review. *Int J Neurosci.* 2017;127(7):624-633.
- [69] Siegmund-Schultze, N. Multiples Myelom: Pomalidomid ist eine neue Option beim Rezidiv. *Dtsch Arztebl International.* 2013;110(50):A-2428-A-2428.
- [70] Silverman, S. M., Wong, W. T. Microglia in the Retina: Roles in Development, Maturity, and Disease. *Annu Rev Vis Sci.* 2018;4:45-77.
- [71] Silverman, W. A. The schizophrenic career of a "monster drug". *Pediatrics.* 2002;110(2 Pt 1):404-406.
- [72] Speirs, A. L. Thalidomide and congenital abnormalities. *Lancet.* 1962;1(7224):303-305.

- [73] Thomann, K.-D. Die Contergan-Katastrophe: Die trügerische Sicherheit der „harten“ Daten. *Dtsch Arztebl International*. 2007;104(41):A-2778.
- [74] Tu, Z., Portillo, J. A., Howell, S., Bu, H., Subauste, C. S., Al-Ubaidi, M. R., Pearlman, E., Lin, F. Photoreceptor cells constitutively express functional TLR4. *J Neuroimmunol*. 2011;230(1-2):183-187.
- [75] van de Donk, N. Immunomodulatory effects of CD38-targeting antibodies. *Immunol Lett*. 2018;199:16-22.
- [76] Vargesson, N. Thalidomide-induced teratogenesis: history and mechanisms. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2015;105(2):140-156.
- [77] Viegas, J. *The Eye. Learning how We see.:* The Rosen Publishing Group; 2002.
- [78] Welsch, U., Kummer, W., Deller, T. *Histologie. Das Lehrbuch. 5.Auflage:* Elsevier; 2018.
- [79] Wiedemann, J., Rashid, K., Langmann, T. Resveratrol induces dynamic changes to the microglia transcriptome, inhibiting inflammatory pathways and protecting against microglia-mediated photoreceptor apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;501(1):239-245.
- [80] Wooff, Y., Fernando, N., Wong, J. H. C., Dietrich, C., Aggio-Bruce, R., Chu-Tan, J. A., Robertson, A. A. B., Doyle, S. L., Man, S. M., Natoli, R. Caspase-1-dependent inflammasomes mediate photoreceptor cell death in photo-oxidative damage-induced retinal degeneration. *Sci Rep*. 2020;10(1):2263.
- [81] Yorgun, M. A., Rashid, K., Aslanidis, A., Bresgen, C., Dannhausen, K., Langmann, T. Crocin, a plant-derived carotenoid, modulates microglial reactivity. *Biochem Biophys Rep*. 2017;12:245-250.
- [82] Zeng, H. Y., Zhu, X. A., Zhang, C., Yang, L. P., Wu, L. M., Tso, M. O. Identification of sequential events and factors associated with microglial activation, migration, and cytotoxicity in retinal degeneration in rd mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46(8):2992-2999.
- [83] Zhao, L., Zabel, M. K., Wang, X., Ma, W., Shah, P., Fariss, R. N., Qian, H., Parkhurst, C. N., Gan, W. B., Wong, W. T. Microglial phagocytosis of living photoreceptors contributes to inherited retinal degeneration. *EMBO Mol Med*. 2015;7(9):1179-1197.

- [84] Zhu, Y. X., Kortuem, K. M., Stewart, A. K. Molecular mechanism of action of immune-modulatory drugs thalidomide, lenalidomide and pomalidomide in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*. 2013;54(4):683-687.

# 7. ANHANG

## 7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der humanen Retina [40, 66]: links: Schichtung im histologischen Präparat, rechts: schematische Darstellung der Zellschichtung. ....	15
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Aktivierung von Mikrogliazellen...	18
Abbildung 3: Strukturformel Pomalidomid. ....	25
Abbildung 4: Herstellung von konditioniertem Medium.....	37
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Reaktion des Caspase-Glo® 3/7 Assay .....	44
Abbildung 6: MTT-Test: Analyse der Toxizität von Pomalidomid auf BV2-Mikrogliazellen.. ....	48
Abbildung 7: Analyse der Genexpression in BV-2 Zellen unter Einfluss von Pomalidomid.. ....	49
Abbildung 8: Veränderungen der Genexpression in BV2-Mikrogliazellen unter Einfluss von Pomalidomid.. ....	52
Abbildung 9: Veränderungen der Morphologie von BV2-Mikrogliazellen unter Einfluss von Pomalidomid.. ....	54
Abbildung 10: Veränderungen der Phagozytose von Polystyrene Mikropartikeln unter Einfluss von Pomalidomid in BV2-Mikrogliazellen.....	56
Abbildung 11: Veränderungen der Phagozytose von apoptotischem Material unter Einfluss von Pomalidomid in BV2-Mikrogliazellen.....	57
Abbildung 12: Zellmigration von BV2-Mikrogliazellen unter Einfluss von Pomalidomid innerhalb von 8 h nach Defektsetzung. ....	59
Abbildung 14: Veränderungen der Nitritexpression durch BV2-Mikrogliazellen unter Einfluss von Pomalidomid. ....	61
Abbildung 15: Analyse der Effekte von Pomalidomid auf die BV2-Mikrogliazellen vermittelte Veränderung der Genexpression in ARPE19-Zellen. ....	64
Abbildung 16: Analyse der Effekte von Pomalidomid auf die BV2-Mikrogliazellen vermittelte Apoptoseinduktion in 661W Zellen beziehungsweise ARPE-19 Zellen. ....	67

Abbildung 17: Analyse der Effekte von Pomalidomid auf eine mögliche BV2-  
Mikrogliazellen vermittelte Veränderung der Morphologie von  
ARPE19-Zellen. .... 70

## 7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemische Daten Pomalidomid. Hersteller: Santa Cruz Biotechnology Inc.....	25
Tabelle 2: Primer für qRT-PCR, murine entzündungsreaktionsabhängig regulierte Gene, BV-2 Zellen. Hersteller: Primer: IDT, custom design; Sonden: Roche, Universal Probe Library.....	26
Tabelle 3: Primer für qRT-PCR, murines nicht-reguliertes, konstitutiv exprimiertes Referenz-Gen, BV-2 Zellen. Hersteller: Primer: IDT, custom design; Sonden: Roche, Universal Probe Library. ....	27
Tabelle 4: Primer für qRT-PCR, humane entzündungsreaktionsabhängig regulierte Gene, ARPE-19 Zellen. Hersteller: Primer: IDT, custom design; Sonden: Roche, Universal Probe Library. ....	27
Tabelle 5: Primer für qRT-PCR, humanes nicht-reguliertes, konstitutiv exprimiertes Referenz-Gen, ARPE-19 Zellen. Hersteller: Primer: IDT, custom design; Sonden: Roche, Universal Probe Library. ....	28
Tabelle 6: Zusammensetzung Kulturmedium für BV-2 Zellen .....	28
Tabelle 7: Zusammensetzung Kulturmedium für ARPE-19 Zellen; .....	28
Tabelle 8: Zusammensetzung Kulturmedium für 661W Zellen; .....	29
Tabelle 9: Reagentien .....	29
Tabelle 10: Liste Verbrauchsmaterialien .....	30
Tabelle 11: Geräteliste .....	31
Tabelle 12: Softwareliste .....	32