

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

# **Wirkung von DMF auf inflammatorische Mikroglia**

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

vorgelegt von  
Leo Bahlmann  
aus Köln, Deutschland

promoviert am 24. April 2025

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln  
Druckjahr 2025

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

1. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Th. Langmann
2. Gutachterin: Universitätsprofessorin Dr. med. Dr. nat. med. M. A. Rüger

#### 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 keine Unterstützungsleistungen erhalten.

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.

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Frau Dr. Anne Wolf von mir selbst ausgeführt worden.

#### 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 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 9.2.2025

Unterschrift: .....

## Danksagung

Mein erster Dank gilt meinem Doktorvater Herr Univ.-Prof. Dr. Thomas Langmann, der es mir ermöglicht hat, berufsbegleitend zu promovieren.

An zweiter Stelle möchte ich mich bei Frau Dr. Anne Wolf bedanken, die mich über die Jahre stets unterstützt hat und mich nicht aufgegeben hat.

Des Weiteren möchte ich der gesamten Abteilung meinen Dank aussprechen, die mich damals herzlich aufgenommen hat. Jeder dort war immer nett und hilfsbereit.

Ein großes Dankeschön geht auch an Mandy Hector für das Korrekturlesen.

Eva Scheiffert hat immer geholfen, wenn es um technische Fragen ging. Auch ihr sei hier gedankt.

Bei organisatorischen Sachen hat das Büro immer schnell helfen können, vielen Dank Anja Volkmann.

Meine Frau und meine Tochter haben mir die Zeit gegeben, diesen Traum zu verwirklichen, sie verdienen meine tiefste Dankbarkeit.

Ich bedanke mich bei meinen Eltern, Dr. Ulrike und Dr. Ingo Bahlmann für die Möglichkeiten, die ich in diesem Leben habe, bei meinen Geschwistern, Jil und Dr. Louis Bahlmann und bei meinen Großeltern, meiner Familie und Freunden.

Dank gilt auch meinen beiden sehr guten Freunden, Stefan Luckmann und Simon Schoplocher, die die Arbeit immer mal wieder gelesen haben.

Ich bedanke mich außerdem bei allen, die mir und meiner Familie sehr nah stehen, wie meine Paten, und bei allen, die hier nicht Erwähnung finden, für die ich aber sehr dankbar bin.

Für Antonia, Julia & Stefan

# INHALTSVERZEICHNIS

|  |           |
|--|-----------|
| <b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>           | <b>7</b>  |
| <b>1. ZUSAMMENFASSUNG</b>              | <b>9</b>  |
| <b>2. EINLEITUNG</b>                   | <b>10</b> |
| 2.1. Das Auge                          | 10        |
| 2.2. Aufbau und Funktion der Retina    | 10        |
| 2.3. Sehen                             | 12        |
| 2.4. Mikroglia                         | 13        |
| 2.5. Altersbedingte Makuladegeneration | 17        |
| 2.6. Dimethylfumarat                   | 19        |
| 2.7. Zielsetzung der Arbeit            | 21        |
| <b>3. MATERIAL UND METHODEN</b>        | <b>21</b> |
| 3.1. Material                          | 21        |
| 3.1.1 BV-2-Mikrogliazellen             | 21        |
| 3.1.2 661W Fotorezeptorzellen          | 22        |
| 3.1.3 Chemikalien                      | 22        |
| 3.1.4 Antikörper                       | 24        |
| 3.1.5 Kitsysteme                       | 24        |
| 3.1.6 Medien                           | 25        |
| 3.1.7 Oligonukleotide / Primer         | 26        |
| 3.1.8 Verbrauchsmaterialien            | 28        |
| 3.1.9 Geräte                           | 29        |
| 3.1.10 Software                        | 30        |
| 3.2. METHODEN                          | 31        |
| 3.2.1 Kultivierung und Stimulation     | 31        |
| 3.2.2 Zellvitalität                    | 32        |
| 3.2.3 RNA-Isolation                    | 32        |
| 3.2.4 Reverse Transkriptase            | 32        |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 3.2.5     | Quantitative Echtzeit-PCR  | 33        |
| 3.2.6     | Zytokinmessung   | 33        |
| 3.2.7     | P65- und Phalloidinfärbung   | 33        |
| 3.2.8     | Migration  | 34        |
| 3.2.9     | Phagozytose  | 34        |
| 3.2.10    | Stickoxid-Messung  | 35        |
| 3.2.11    | Neurotoxizität   | 35        |
| 3.2.12    | Statistik  | 36        |
| <b>4.</b> | <b>ERGEBNISSE</b>  | <b>36</b> |
| 4.1.      | Dimethylfumarat reduziert die LPS-induzierte Mikroglia-Reaktivität                   | 36        |
| 4.1.1     | Wirkung unterschiedlicher DMF-Dosen auf die Vitalität von BV-2-Mikrogliazellen       | 36        |
| 4.1.2     | Einfluss von DMF auf die pro-inflammatorische Genexpression und Nitrit-Produktion    | 37        |
| 4.1.3     | Effekt von DMF auf die pro-inflammatorische Zytokinproduktion                        | 38        |
| 4.1.4     | Auswirkung von DMF auf den pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B | 39        |
| 4.1.5     | Wirkung von DMF auf anti-inflammatorische Gene                                       | 40        |
| 4.2.1     | Veränderung der Morphologie durch DMF  | 42        |
| 4.2.2     | Einfluss von DMF auf das Migrationsverhalten von BV-2-Mikrogliazellen                | 43        |
| 4.2.3     | Effekt von DMF auf die Phagozytose-Aktivität von BV-2-Mikrogliazellen                | 44        |
| <b>5.</b> | <b>DISKUSSION</b>  | <b>46</b> |
| 5.1.      | Effekt von DMF auf BV-2-Mikrogliazellen und ihre Reaktivität                         | 47        |
| 5.2.      | Effekt von DMF auf wichtige Schlüsselfunktionen von Mikroglia                        | 50        |
| 5.3.      | Bedeutung für die Fotorezeptoren   | 51        |
| <b>6.</b> | <b>LITERATURVERZEICHNIS</b>  | <b>52</b> |
| <b>7.</b> | <b>ANHANG</b>  | <b>59</b> |
| 7.1.      | Abbildungsverzeichnis  | 59        |
| 7.2.      | Tabellenverzeichnis  | 59        |

## Abkürzungsverzeichnis

|                |  |
|----------------|--|
| °C             | Grad Celsius   |
| AMD            | Altersbedingte Makuladegeneration                              |
| ARG1           | Arginase-1   |
| ATPase         | Adenosintri-phosphatase  |
| BM             | Bruch-Membran  |
| BPC            | Bipolarzelle   |
| C              | Choroidea  |
| CAT1           | Catalase-1   |
| CCL2           | CC-Chemokin-Ligand-2   |
| CD163          | Cluster of Differentiation 163                                 |
| CD4+ / CD8+    | Cluster of Differentiation 4+ / 8+                             |
| CNV            | Choroidale Neovaskularisierung                                 |
| CV             | Choroidale Vaskularisierung                                    |
| DAMPs          | Damage-associated molecular patterns                           |
| DMEM           | Dulbeccos modified eagle medium                                |
| DMF            | Dimethylfumarat  |
| DR             | Drusen   |
| FBS / FCS      | Fetal bovine serum / Fetal calf serum                          |
| FIZZ           | Found in inflammatory zone                                     |
| GADPH          | Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase                       |
| GC             | Ganglienzelle  |
| GCL            | Ganglion cell layer / Ganglienzellschicht                      |
| GSH            | Glutathion   |
| h              | Hour / Stunde  |
| HC             | Horizontalzelle  |
| HMOX1          | Hämoxygenase-1   |
| IL             | Interleukin  |
| IL-1 $\beta$   | Interleukin-1 $\beta$  |
| IL-6           | Interleukin-6  |
| INL            | Inner nuclear layer / Innere Körnerschicht                     |
| iNOS           | Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase                        |
| IPL            | Inner plexiforme layer / Innere plexiforme Schicht             |
| KEAP1          | Kelch-like ECH-associated protein 1                            |
| MMF            | Monomethylfumarat  |
| n              | Number / Anzahl  |
| NF- $\kappa$ B | Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells |
| NFL            | Nerve fiber layer / Nervenzellschicht                          |
| NRF2           | Nuclear-factor-erythroid-derived-2-related factor 2            |
| NQO1           | NAD(P)H-Dehydrogenase  |
| ONL            | Outer nuclear layer / Äußere Körnerschicht                     |
| OPL            | Outer plexiforme layer / Äußere plexiforme Schicht             |
| p              | p-Wert   |
| PAMPs          | Pathogen-associated molecular patterns                         |
| PCR            | Polymerase chain reaction / Polymerase-Kettenreaktion          |
| PL             | Photoreceptor layer / Fotorezeptorschicht                      |
| P/S            | Penicillin / Streptomycin                                      |
| RPE            | Retinales Pigmentepithel                                       |
| SOD2           | Superoxiddismutase-2   |
| TNF $\alpha$   | Tumornekrosefaktor Alpha                                       |
| TSPO           | Translocator Protein   |
| YM1            | Chitinase-3-like protein 3                                     |
| ZNS            | Zentrales Nervensystem   |

## 1. Zusammenfassung

In den vergangenen Jahren hat sich Dimethylfumarat als vielversprechendes Medikament zur Behandlung verschiedener Krankheiten herausgestellt. Insbesondere das Präparat Tecfidera hat als Vorreiterarznei für die Behandlung der schubförmig remittierenden Multiplen Sklerose an Bedeutung gewonnen und wird seit 2014 verordnet. Die anti-entzündlichen und antioxidativen Eigenschaften von DMF wurden in zahlreichen Studien nachgewiesen und die Frage nach einem erweiterten Anwendungsspektrum kam auf. Heutzutage wird DMF auch zur Behandlung von autoimmunen Hauterkrankungen eingesetzt. Ein therapeutisches Ziel in der Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen ist es, die Immunantwort zu verändern, welche im ZNS unter anderem von Mikrogliazellen moduliert wird. Diese sind als residente Immunzellen dafür verantwortlich, das zentrale Nervensystem zu schützen. Es sind jedoch oft langanhaltende Immunreaktionen, die den Übergang von einer entzündlichen zu einer chronischen degenerativen Neuropathologie ermöglichen. Dieser Prozess führt im weiteren Verlauf, wie bei der altersbedingten Makuladegeneration, zum Untergang von Sinneszellen. Die *in-vitro*-Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen: DMF interveniert hier, indem es die Reaktivität der Mikroglia moduliert. Dabei wird auf Transkriptions-, Sekretions- und auf oxidativer Ebene die Balance wiederhergestellt. Gleichmaßen beeinflusst DMF wichtige Schlüsselfunktionen von Mikroglia, was ebenfalls eine übertriebene Immunantwort verhindert. Abschließend konnte nachgewiesen werden, dass das Zurückführen in den Ruhestand der Mikrogliazellen schädliche Auswirkungen auf Fotorezeptorzellen so stark dezimiert, dass die Neurotoxizität signifikant abnahm. Die Wirkungsweise von DMF ist zum heutigen Tag nicht vollständig verstanden, aber diese präklinischen Ergebnisse deuten auf vielversprechende ophthalmologische Einsatzmöglichkeiten hin. Obgleich es weiterer Evidenz durch *in-vivo*-Studien bedarf, besteht Zuversicht in der Behandlung der weltweit verbreitetsten Augenerkrankung, der altersbedingten Makuladegeneration.

## 2. Einleitung

### 2.1. Das Auge

Das Auge ist ein komplexes Organ, das für das Sehen, das heißt für die visuelle Wahrnehmung unserer Umwelt, verantwortlich ist. Es besteht aus verschiedenen Teilen, die in Zusammenarbeit Lichtstrahlen auffangen und in elektrische Impulse umwandeln, welche vom Gehirn interpretiert werden. Im Hinblick auf die Wahrnehmung der Umwelt ist der Sehsinn mit einem Anteil von ca. 70 % der am stärksten genutzte Sinn des Menschen (Welsch & Liebmann, 2004). Eine Einschränkung oder gar der Verlust der visuellen Wahrnehmung führt zu sozialen Beeinträchtigungen und beeinflusst die gesamte Lebensführung einher (Senra et al., 2015).

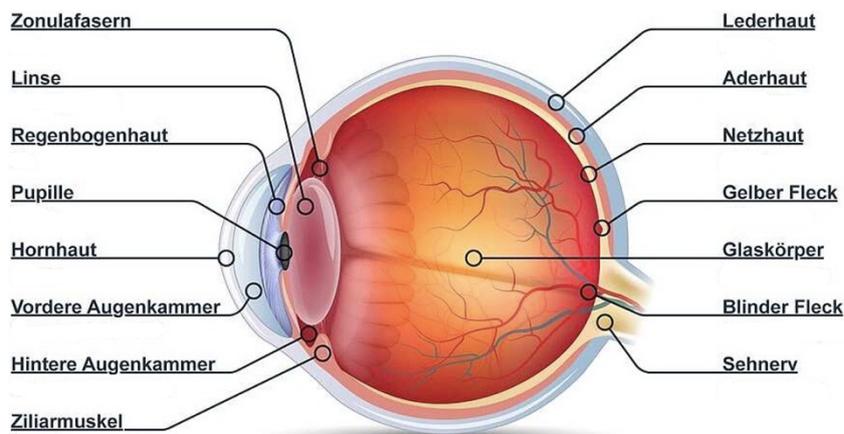
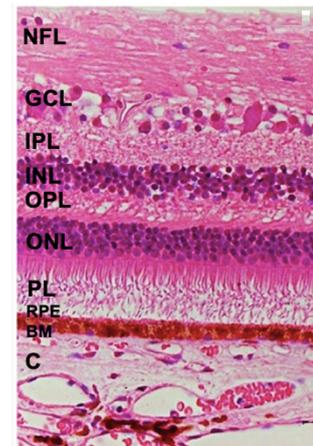
Der Aufbau des Auges (Abb. 1 A) lässt sich in mehrere Teile gliedern. Umgeben ist das Auge von der Lederhaut (Sklera), die im Bereich der Hornhaut (Kornea) durchsichtig ist. Die Kornea kann deswegen als das Fenster zum Auge betrachtet werden (Kaplan, 2007). Zusammen mit der Kornea kann die darunter liegende Linse auf Grundlage muskulärer Aktivität (Ziliarmuskeln) verformt werden, um das Licht zu fokussieren (Breiner, 2019). Nachdem die Lichtstrahlen durch die Linse, reguliert von der Pupille, in den klaren Glaskörperraum des Auges eingetreten sind, treffen sie auf die neurosensorische Netzhaut (Retina) (Grajewski, 2021; Kaplan, 2007). Die Retina ist eine Schicht von Nervenzellen zwischen der stark vaskularisierten Choroidea (Aderhaut) und dem Glaskörper, welche die Innenseite des Augapfels bedeckt. Sie enthält über 60 Millionen lichtempfindliche Zellen, die Fotorezeptoren, wobei die Dichte dieser Zellen mit dem Alter abnimmt (Jonas et al., 1992; Panda-Jonas et al., 1995). Am höchsten ist die neuronale Dichte im gelben Fleck, der Bereich des schärfsten Sehens. Dieser Bereich wird auch Makula genannt. Die Rezeptoren nehmen die Energie des Lichts auf und wandeln es in ein neuronales Signal um, welches am blinden Fleck die Retina verlässt und über den Sehnerv an den Nucleus geniculatus lateralis des zentralen Nervensystems (ZNS) weitergeleitet wird (Kaplan, 2007; Willoughby et al., 2010). Das Gehirn interpretiert diese Impulse als Bilder und lässt uns so die Welt um uns herum sehen.

### 2.2. Aufbau und Funktion der Retina

Der Aufbau der Retina (Abb. 1B) ist in eine mehrschichtige Struktur unterteilt, die aus einer Vielzahl verschiedener Zelltypen besteht. Neben den oben genannten Fotorezeptorzellen, welche sich in Zapfen und Stäbchen unterteilen, finden sich Ganglienzellen, Bipolarzellen, Gliazellen, amakrine Zellen und Horizontalzellen (zu sehen in Abb. 3A), die parallel und in

Kombination zusammenarbeiten, um ein komplexes Sehergebnis zu erzeugen (Hoon et al., 2014; Willoughby et al., 2010).

Die äußerste Schicht der Netzhaut ist das retinale Pigmentepithel (RPE). Es liegt zwischen den lichtsensitiven Fortsätzen der Fotorezeptorzellen und der Bruch-Membran (BM), die wiederum zur Choroidea (C) abgrenzt. Neben nutritiven und homöostatischen Funktionen und Phagozytose interagieren die RPE-Zellen mit Zapfen-Sinneszellen und sind an der Lichtwahrnehmung beteiligt (Strauß, 2009). Das RPE isomerisiert das all-trans-Retinal zum 11-cis -Retinal (Strauss, 2005), welches beim Sehen in Dämmerung von Bedeutung ist (Hejtmancik & Nickerson, 2015). Die Pigmentepithelzellen bilden außerdem mit ihren Tight-junctions die äußere Blut-Retina-Schranke (Cunha-Vaz et al., 2011). Dem RPE schließt sich die Fotorezeptorschicht (Photoreceptor Layer, PL) mit den lichtempfindlichen Fortsätzen der Fotorezeptoren an, die ihre Perikaryen jenseits der äußeren Grenzschrift in der äußeren Körnerschicht (Outer Nuclear Layer, ONL) haben. In der äußeren plexiformen Schicht (Outer Plexiforme Layer, OPL) verlaufen die Axone der Sinneszellen und derer Verbindungen zu den Bipolarzellen weiter bulbuswärts. Die Bipolarzellen bilden mit den Horizontal- und Amakrinzellen die retinalen Interneurone, deren Zellkörper innerhalb der inneren Körnerschicht (Inner Nuclear Layer, INL) lokalisiert sind. In der inneren plexiformen Schicht (Inner Plexiforme Layer, IPL) finden sich hauptsächlich interneuronale Axone (Hejtmancik & Nickerson, 2015). Die Horizontalzellen ermöglichen durch laterale Verschaltung der Fotorezeptoren und Bipolarzellen eine Anpassung der Empfindlichkeit der Sinneszellen gegen Licht (Bear et al., 2018). Die Amakrinzellen vermitteln ebenfalls synaptischen Informationsaustausch und modulieren Farbkontrast- und Helligkeitsinformation (Kellner et al., 2020). Aber auch Mirkoglia sind in den plexiformen Schichten angesiedelt, denen eine besondere Rolle in der Überwachung der Umgebung und der Regulierung der immunologischen Antwort zukommt (Silverman & Wong, 2018). In der sich anschließenden Ganglienzellschicht (Ganglion Cell Layer, GCL) befinden sich die Zellkerne der multipolaren Ganglienzellen, deren Axone in der Nervenzellschicht (Nerve Fiber Layer, NFL) weiterziehen und sich zum Nervus opticus bündeln. Die innere Grenzschrift (nicht abgebildet) wird maßgeblich durch die Basalmembran der Müller-Zellen gebildet, die sich von der inneren Grenzschrift bis zu den Sinneszellen pyramidenförmig erstrecken können (Junqueira & Carneiro, 2013). Mit dieser Morphologie bilden sie die Statik der Retina. Aber auch das extrazelluläre Ionen- und pH-Gleichgewicht, die Versorgung und der Schutz von Fotorezeptoren gehören zu ihren Aufgaben. Dabei helfen auch Astrozyten, die unter anderem für die Aufrechterhaltung der Blut-Retina-Schranke verantwortlich sind (Bringmann & Reichenbach, 2001).

**A****B**

**Abb. 1:** **A** Schematische Darstellung der Anatomie des Auges (<https://www.sehen.de/sehen/rund-ums-auge/das-auge-aufbau-und-funktion>). **B** histologischer Schnitt der Netzhaut (Retina; NFL: Nerve Fiber Layer, Nervenzellschicht; GCL: Ganglion Cell Layer, Ganglienzellschicht; IPL: Inner Plexiforme Layer, Innere Plexiforme Schicht; INL: Inner Nuclear Layer, Innere Körnerschicht; OPL: Outer Plexiforme Layer, Äußere Plexiforme Schicht; ONL: Outer Nuclear Layer, Äußere Körnerschicht; PL: Photoreceptor Layer, Fotorezeptorschicht; RPE: Retinal Pigment Epithelium, Retinales Pigmentepithel; BM: Bruchs Membrane, Bruch-Membran; C: Choroid, Choroidea; Originalquellen: A: (Grehn, 2019), und B: (Triviño et al., 2012), alle modifiziert von Leo Bahlmann).

## 2.3. Sehen

Hat das Licht das anteriore Segment des Auges und den Glaskörper passiert, trifft es auf die sensorische Retina und auf das RPE, was auch als non-neurale Komponente der Retina bezeichnet wird. Ein Teil der Lichtwellen wird von dem RPE absorbiert und die Wärme wird über die Choriocapillaris abtransportiert (Strauß, 2009). Für das Sehen ist der sensorische Teil der Retina wichtig, dessen Fotorezeptoren – die Stäbchen und Zapfen - durch Lichtwellen hyperpolarisiert werden und eine Umwandlung von Licht in elektrische Reize ermöglichen. Zu diesem Zweck enthalten die Sehzellen, sowie auch die nachgeschalteten Ganglienzellen, rezeptorspezifische Sehpigmente, sogenannte Opsine, die über eine Signalkaskade einen Ioneneinstrom und die damit verbundene Hyperpolarisation induzieren (Mannu, 2014). Diese Pigmente sind membranständig und haben unterschiedliche Absorptionsbereiche. So sind Zapfen-Opsine (Photopsine) beispielsweise im Wellenlängenbereich von Rot (563 nm), Grün (543 nm) und Blau (420 nm) aktiv und damit für das Farbsehen zuständig (Bowmaker & Dartnall, 1980; Breiner, 2019). Die anzahlmäßig deutlich stärker vertretenen Stäbchen und ihre Pigmente (Skotopsine) werden aktiviert bei Dämmerlicht und absorbieren nahezu nur blaue Wellenlängen (Willoughby et al., 2010). Dieses Stäbchen-Opsin (auch Rhodopsin) ist ein G-

Protein gekoppelter Rezeptor und beinhaltet die bereits erwähnte lichtaktive Komponente Retinal, welches nach Anregung durch ein Photon seine Konfiguration verändert (Photoisomerisation) und verschiedene Intermediate und G-Proteine aktiviert, was über sekundäre Botenstoffe ein Schließen von zahlreichen Kationen-Kanälen bewirkt (Takeuchi et al., 2008). Das führt zu einem geringeren Membranpotenzial, das sich über das Axon zur Synapse ausbreitet. Dort schließen spannungsabhängige Kalziumkanäle und weniger Glutamat wird sezerniert, was die postsynaptische Bipolarzelle oder Horizontalzelle reizt (Nakatani et al., 2002) (Slaughter & Awatramani, 2002). Die Horizontalzelle sorgt für ein laterales Feedback und hilft dem Auge damit, sich wechselnden Lichtverhältnissen anzupassen und Kontraste zu verbessern (Chapot et al., 2017). Bei der Bipolarzelle unterscheidet man zwischen der ON- und OFF-Zelle, die entweder über metabotrope Rezeptoren das Signal weiterleitet oder aber in dem Fall der OFF-Zelle eine Weiterleitung über ionotrope Rezeptoren blockiert (Slaughter & Awatramani, 2002). Die Signaltransduktion auf Ganglienzellen ist ebenfalls chemisch über Glutamat vermittelt (Hoon et al., 2014), deren Intensität durch Amakrinzellen moduliert wird. Dabei sind Ganglienzellen nicht mit nur einer Bipolarzelle verknüpft, vielmehr ist es so, dass eine Ganglienzelle, die durchaus schichtenübergreifend lokalisiert sein kann, unterschiedliche Informationen von verschiedenen Typen von Bipolarzellen aufzunehmen in der Lage ist (Masland, 2012). Auch bei den Ganglienzellen unterscheidet man zwischen stimulierenden und hemmenden Zelltypen (On und Off). Die Aktionspotenziale wandern entlang der Axone der Ganglienzelle zum hinteren Augenpol (auch blinder Fleck oder Papilla nervi optici) und bilden hier den zweiten Hirnnerv – Nervus opticus (Purves, 2004).

Diese komplexe biologische Architektur ist sehr empfindlich, eine Schädigung, zum Beispiel Aufgrund von Durchblutungsstörungen oder entzündlicher Prozesse, kann folglich zu einer Einschränkung des Sehvermögens führen. Für die Gesunderhaltung des Nervensystems und damit auch der sensorischen Zellen der Retina sowie für die Reaktion auf Infektionen und Verletzungen sind unter anderem die bereits oben genannten Mikroglia verantwortlich (Bachiller et al., 2018).

## 2.4. Mikroglia

Mikroglia sind vielseitige Immunzellen des zentralen Nervensystems (L. Zhang et al., 2022). Als einzige residente Immunzellen des ZNS sind sie im adulten Gehirn für die stetige Überwachung ihrer Umgebung, die Entfernung von Zelldebris, Viren, Bakterien und anderen Fremdkörpern, sowie die Förderung der Neurogenese nach Verletzung des ZNS und den

Schutz des Nervengewebes wichtig. Dadurch sind sie essentiell für die Aufrechterhaltung der Homöostase des ZNS (Dermitzakis et al., 2023).

In den vergangenen Jahrzehnten konnte ein beträchtlicher Fortschritt im Bereich der Mikrogliaforschung beobachtet werden (Paolicelli et al., 2022). So konnte z.B. der Einfluss der Mikroglia auf die Entwicklung und die Homöostase des ZNS, die Entwicklung der Mikroglia im Alterungsprozess und die Immunantwort durch Mikroglia auf unterschiedliche Krankheiten wie z.B. Alzheimer und Multiple Sklerose untersucht werden (Bohlen et al., 2019; Harry, 2013). Neben der Erforschung der Funktionen der Mikroglia bei Entwicklung, Plastizität, Alterung und Krankheiten wurden weitergehend große Fortschritte in der Beschreibung unterschiedlicher Mikroglia-Zustände gemacht und Abstand von einer dualistischen Klassifizierung genommen (Paolicelli et al., 2022).

Durch die Entwicklung spezifischer Silberfärbetechniken erfolgte die erste Beschreibung der Mikroglia als klar bestimmter glialer Zelltyp im Jahr 1919 durch Pío del Río Hortega (Pérez-Cerdá et al., 2015). In den folgenden Jahren und Jahrzehnten konnten, vor allem durch Fortschritte in der Einfärbung und Bildgebung, Genetik und durch den Einzug von Einzelzelltechnologie neue Einblicke in die komplexe Biologie der Mikroglia realisiert werden (Prinz et al., 2019). Der Ursprung der Mikroglia war lange Zeit ungeklärt, bis eine Arbeitsgruppe (Ginhoux et al., 2010) durch Abstammungsanalysen in *in-vivo*-Studien zeigen konnten, dass Mikroglia in der frühen embryonalen Entwicklung entstehen und sich von primitiven Makrophagen im Dottersack ableiten. Die Entwicklung der Mikroglia lässt sich in vier Stadien unterteilen: Dottersack, frühe Mikroglia, Prä-Mikroglia und erwachsene Mikroglia. Im Laufe der embryonalen Entwicklung wandern die Mikroglia in das ZNS ein und werden durch die Formung der Blut-Hirn-Schranke von den peripheren Zellen isoliert (L. Zhang et al., 2022).

Früh in der Entwicklung sind die Mikroglia für das Zellwachstum und das Überleben verantwortlich. Später, nachdem sich die Blut-Hirn-Schranke bildet, sind sie für den Zellzyklus, die Zelldifferenzierung, die Neurogenese, die Synapsenstutzung und die Regulation des Neuronennetzes sowie für die Immunüberwachung verantwortlich (L. Zhang et al., 2022).

Während die Mikrogliaforschung sich in den vergangenen Jahrzehnten stets weiterentwickelt hat, hat sich eine dichotome Einteilung der Mikroglia etabliert. Diese Einteilung in „gute oder schlechte“ Mikroglia, „M1 oder M2“, „ruhende oder aktivierte“ Mikroglia hat die Forschung in diesem Bereich in den vergangenen Jahren dominiert, wird der Vielfalt an unterschiedlichen Mikroglia-Status und -Funktionen jedoch nicht gerecht (Paolicelli et al., 2022). Auf dieser Grundlage wurde die dichotome Sichtweise zuletzt in Frage gestellt und eine Betrachtung nach Status als anzustrebend erklärt (Devanney et al., 2020).

Basierend auf dieser Entwicklung werden in Anlehnung an die Übersichtsarbeit von Paolicelli et al. (2022) Mikroglia in der vorliegenden Arbeit in multidimensionalen Status betrachtet, welche abhängig vom Kontext und der lokalen Umgebung definiert werden.

So, wie das Gehirn und das Rückenmark, gehören auch die Retina und der Nervus opticus zum ZNS. Während der frühen Entwicklung migrieren Mikroglia in die Retina, wo sie sich zu einem stark verzweigten Phänotyp entwickeln (Guo et al., 2022).

Retinale Mikroglia überwachen stetig Änderungen in ihrer Umgebung und stellen durch Kommunikation mit anderen retinalen Zellen ein funktionelles Gleichgewicht sicher (Fan et al., 2022). Sie reagieren dabei u.a. auf spezifische pathogenassoziierte molekulare Muster (PAMPs) wie z.B. Lipopolysaccharid (LPS) und endogene Stimuli, die als "damage associated molecular patterns" (schadensassoziierte molekulare Muster, DAMPs) bezeichnet werden (Kigerl et al., 2014). Mikroglia exprimieren unter anderem eine Vielzahl an Immunrezeptoren und Rezeptoren für Neurotransmitter - darunter auch Glutamatrezeptoren (Colonna & Butovsky, 2017; Murugan et al., 2013). Kommt es zu homöostatischen Änderungen in der Umgebung der retinalen Mikroglia, werden diese reaktiviert (Guo et al., 2022). Diese Reaktivierung wird mit einer erhöhten Ausschüttung von Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren in Verbindung gebracht (Guo et al., 2022). Eine weitere Reaktion auf Änderungen der Umgebung ist eine Anpassung des Phänotyps hin zu einer amöboiden Form (Abb. 2), welche schnell zu geschädigtem Gewebe migrieren kann (Fan et al., 2022).

Die Funktion von Mikroglia in der Netzhaut wurde mit einer Reihe von Augenkrankheiten in Verbindung gebracht, darunter Retinitis pigmentosa, diabetische Retinopathie und altersbedingte Makuladegeneration (AMD). Ursächlich für die Entstehung dieser Erkrankungen ist eine anhaltende und überschießende Reaktion der Mikroglia im Sinne einer chronischen Entzündung (Hu et al., 2022; Karlstetter et al., 2015; Makabe et al., 2020).

Mit dem zunehmenden fachübergreifenden Forschungsinteresse an Mikroglia hat sich auch ein vermehrtes Interesse an der Entwicklung Mikroglia-basierter Therapien gezeigt. Neben verschiedenen neurologischen Erkrankungen wie z.B. Alzheimer und Parkinson (Z. Wang & Weaver, 2022; Y. Zhang et al., 2018) stellt sich die Mikroglia-basierte Therapie auch zur Behandlung retinaler Erkrankungen wie diabetischer Retinopathie, Retinitis oder der AMD als vielversprechend dar (S. K. Wang & Cepko, 2022).

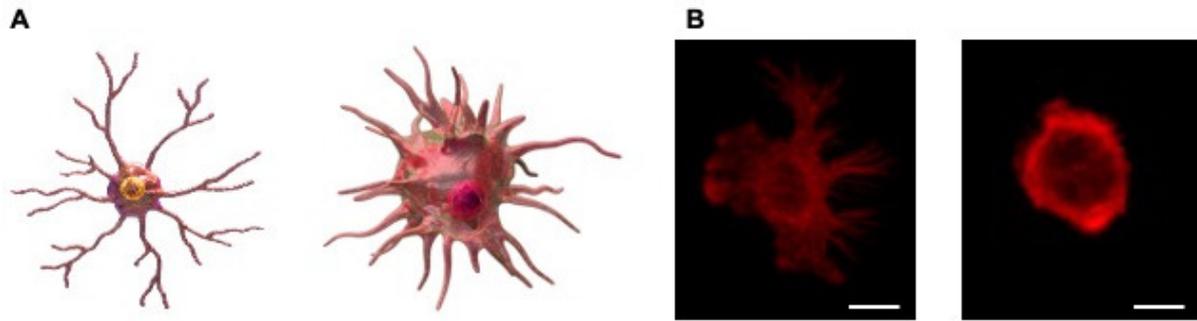
Die Potenziale der Mikroglia-basierten Therapie umfassen dabei die immunmodulatorischen Fähigkeiten der Mikroglia, die Regulierung von Phagozytose, welche mit fortschreitendem Alter abnimmt, und die Freisetzung neuroprotektiver Faktoren (Guo et al., 2022). So könnten Mikroglia dabei helfen, entzündliche Prozesse in der Retina zu kontrollieren, schädliche

Ablagerungen zu entfernen und den Schutz und die Regeneration von Netzhautzellen zu fördern.

Neben den weitreichenden Potenzialen zeigen sich jedoch auch Herausforderungen bei der Entwicklung Mikroglia-basierter Therapien. So setzt die Entwicklung Mikroglia-basierter Therapien aufgrund der starken Heterogenität der Mikroglia ein tiefgehendes Verständnis der verschiedenen Status der Mikroglia voraus. Weitergehend sollte auch der Einfluss von Faktoren wie Alter und Geschlecht auf die Funktion der Mikroglia weiter untersucht werden, um die Effektivität und die Sicherheit solcher Therapien zu sichern (Ngwa et al., 2021).

Während die Bulk-Sequenzierung von Mikroglia den Grundstein für die Einordnung ihrer Kerneigenschaften legte, wurde durch den gemittelten Überblick die Heterogenität der Mikroglia lange übersehen (Dumas et al., 2021). Fortschritte auf dem Gebiet der Einzelzellanalyse haben in den letzten Jahren die notwendige Untersuchungspräzision zur Erweiterung des untersuchten Spektrums der Mikrogliaaktivität und zur Überwindung der bisher verwendeten Schemata und des unzureichenden M1/M2-Paradigmas zur Aufdeckung der kontextabhängigen Heterogenität der Mikroglia ermöglicht (Dumas et al., 2021; Masuda et al., 2020). So erlaubt die RNA-Sequenzierung von Einzelzellen im Vergleich zur Gen-Expressions-Analyse von Zellpopulationen die Darstellung von Subpopulationen mit distinkten molekularen und funktionellen Charakteristiken (Pettas et al., 2022).

Abseits der Analyse durch Genexpression bildet das Feld der bildgebenden Verfahren eine weitere Möglichkeit der Untersuchung von Mikroglia. Zusätzlich zu den distinkten molekularen und funktionellen Charakteristiken der Mikroglia lassen sich auf diesem Weg auch eine Vielzahl unterschiedlicher und kontextabhängiger Phänotypen darstellen. Ausgehend von den durch Pio del Rio Hortega genutzten Silberfärbetechniken wurden die bildgebenden Verfahren in den folgenden Jahren und Jahrzehnten stetig weiterentwickelt, wodurch eine genauere und differenziertere Beschreibung der Mikroglia ermöglicht wurde. Zu den derzeit genutzten bildgebenden Verfahren zählen *in-vitro*-Verfahren durch Immunohistochemie und die Immunfluoreszenz (González Ibanez et al., 2019; Muñoz-Castro et al., 2022) sowie mikroskopische Verfahren (Banati et al., 2004; Sagar et al., 2020). *In-vivo*-Bildgebung durch z.B. Magnetresonanztomographie oder Positronen-Emissions-Tomographie gibt es darüber hinaus (Beaino et al., 2021; Garcia-Hernandez et al., 2022), wird aber selten angewandt. Vor allem die mikroskopischen Verfahren in der Zellkultur erlauben eine Beobachtung von Mikroglia in Echtzeit und damit die Untersuchung ihrer Morphologie und Dynamik sowie die Wechselwirkungen mit anderen Zelltypen. Diese Einblicke erlauben eine genauere Auseinandersetzung mit der Reaktion der Mikroglia auf Änderungen in der Homöostase. Eine der Erkrankungen, bei der die überschießende Reaktivierung der Mikroglia zur Krankheitsentwicklung beiträgt, ist die altersbedingte Makuladegeneration (AMD).



**Abb. 2:** **A** Schematische Darstellung einer Mikrogliazelle, links in Homöostase und rechts in reaktiviertem Zustand (Quelle: <https://www.biolegend.com/ja-jp/microglia>). **B** Mikrofotografien einer verzweigten (links) und einer amöboiden BV-2-Mikrogliazelle (rechts); hier wurde das Zytoskelett mit dem roten Fluoreszenz-Konjugat Phalloidin-TRITC gefärbt; Maßstab: 5 µm (von Leo Bahlmann).

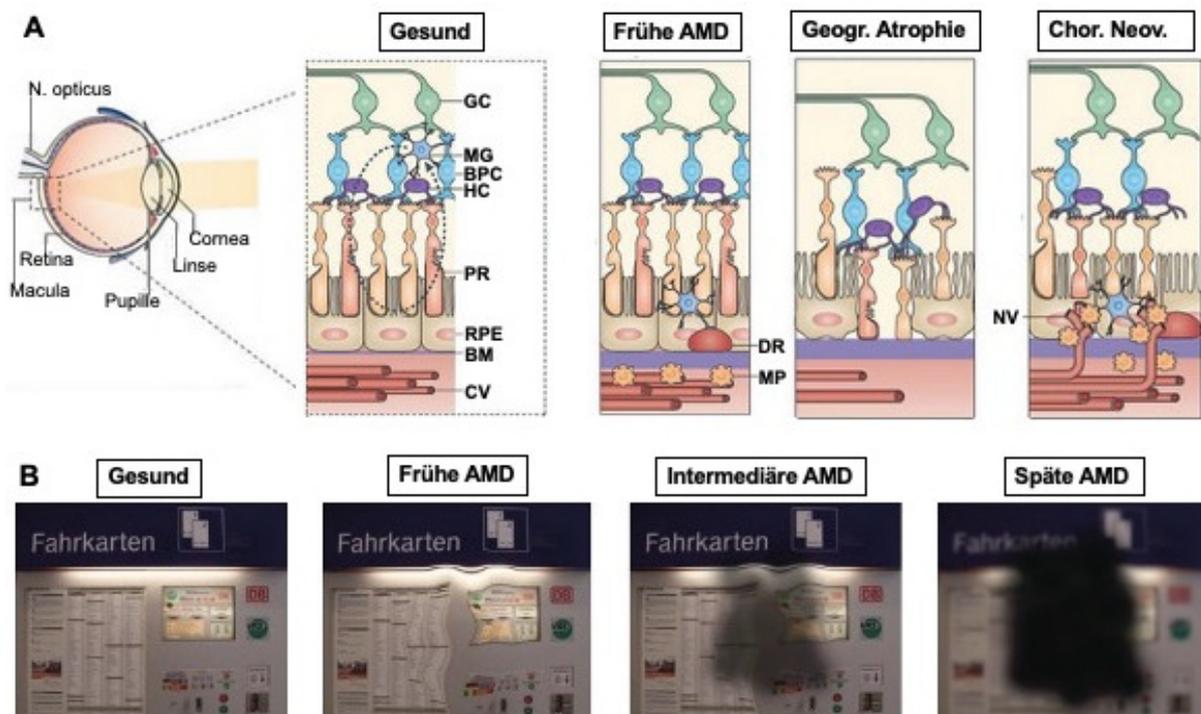
## 2.5. Altersbedingte Makuladegeneration

Die altersbedingte Makuladegeneration (AMD) ist eine häufige und schwere Augenerkrankung, die vorrangig ältere Erwachsene betrifft. Sie ist die Hauptursache für den Verlust des Sehvermögens bei Menschen über 50 Jahren in den Industrieländern (Harvey, 2003; Jager, 2008). AMD ist gekennzeichnet durch die Degeneration der zentralen Stelle des Netzhautgewebes. Diese Degeneration kann zu einem Verlust des scharfen, zentralen Sehens führen, das für Tätigkeiten wie Lesen, Autofahren und das Erkennen von Gesichtern erforderlich ist (Jager, 2008).

Die AMD wird in zwei Haupttypen unterteilt: trockene (atrophe) und feuchte (exsudative) AMD. Die trockene AMD ist die häufigste Form. Sie ist gekennzeichnet durch die Ansammlung von Drusen, kleinen Ablagerungen von Abfallstoffen unter der Netzhaut, und die Degeneration des retinalen Pigmentepithels (RPE). Diesen Vorgang bezeichnet man auch als geographische Atrophie und ist eine Folge der frühen AMD. Die feuchte AMD ist mit ca. 10-15% der Fälle weniger häufig, zeigt jedoch schwerere Verläufe und ist für mehr als 80 % der Fälle von schwerem Sehverlust oder Erblindung im Zusammenhang mit AMD verantwortlich (Jager, 2008). Sie ist gekennzeichnet durch das Wachstum abnormaler Blutgefäße (Choroidale Neovaskularisationen) aus der Aderhaut, einer Schicht von Blutgefäßen unter der Netzhaut. Aus diesen Blutgefäßen können Flüssigkeit und Blut austreten, was zu Narbenbildung und Sehkraftverlust führt (Jager, 2008) (Abb. 3).

Die genaue Ursache der AMD ist noch nicht vollständig geklärt, es wird jedoch angenommen, dass sie mit einer Kombination aus genetischen und umweltbedingten Faktoren zusammenhängt. Zu den Risikofaktoren für AMD gehören einerseits nicht-modifizierbare Risikofaktoren wie Alter, wobei klinisch auffällige AMD typischerweise ab einem Alter von 55 Jahren auftritt, genetische und umweltbedingte Faktoren (Fleckenstein et al., 2021). Modifizierbare Risiken sind Rauchen und Alkohol aber auch ungesunde Lebensmittel, denn einige Studien deuten darauf hin, dass eine schlechte Ernährung und Bewegungsmangel Risikofaktoren für die AMD sein können (Armstrong & Mousavi, 2015).

Mit der Entstehung und dem Fortschreiten der AMD wurden auch inflammatorische Prozesse in Verbindung gebracht. Mehrere Studien haben gezeigt, dass Menschen, die an AMD erkrankt sind, sowohl im Blut als auch in der Netzhaut höhere Werte von Entzündungsmarkern wie IL-6 aufweisen als Menschen, die nicht an dieser Krankheit leiden und dass die Wahrscheinlichkeit, an AMD zu erkranken, bei Personen mit höheren Werten der Entzündungsmarker erhöht ist (Emina Colak et al., 2012; Stanton & Wright, 2014). Dies deutet darauf hin, dass die gezielte Bekämpfung von Entzündungen ein potenzieller Therapieansatz für AMD sein könnte (Tan et al., 2020).



**Abb. 3:** A Schematische Übersicht des Auges (links) und schematische Darstellung der Prozesse in der erkrankten im Vergleich zur gesunden Retina (rechts; GC: Ganglienzelle, MG: Mikrogliazelle, BPC: Bipolarzelle, HC: Horizontalzelle, PR: Fotorezeptor, RPE: Retinales Pigmentepithel, BM: Bruch-Membran, CV: Choroidale Blutgefäße, DR: Drusen, MP: Makrophagen, NV: Neovaskularisationen;

Quelle: <https://www.childrenshospital.org/research/labs/smith-lab-research/age-related-macular-degeneration>, modifiziert von Leo Bahlmann). **B** Visusverlust der frühen, intermediären und späten AMD im Vergleich zum Gesunden (Quelle: <https://www.pro-retina.de/simulation/makuladegeneration>).

## 2.6. Dimethylfumarat

Die gezielte Bekämpfung von Entzündungen durch Einflussnahme auf das Immunsystem ist auch in der Therapie multipler Sklerose (MS) ein wichtiger Ansatzpunkt. Ein gängiges Medikament zur Behandlung von MS und auch der Schuppenflechte (Psoriasis) ist Dimethylfumarat (DMF) (Rosito et al., 2020a). DMF und der dazugehörige dynamische Metabolit Monomethylfumarat (MMF) sind Verbindungen, welche durch eine Herabregulierung von Immunreaktionen eine therapeutische Wirkung bei pathologischen Zuständen haben (Hosseini et al., 2019). DMF wird in einem alkalischen Milieu im Dünndarm durch Esterasen zu MMF hydrolysiert (Litjens et al., 2004) und komplett absorbiert, bevor es ins Blut übergeht. Dort kann MMF mit Immunzellen wie B- und T-Lymphozyten und anderen mononukleären Zellen interagieren. Das meiste der Substanz wird im Citratzyklus zu Wasser und Kohlendioxid metabolisiert und später abgeatmet (Moharreggh-Khiabani et al., 2009). Ursprünglich wurde angenommen, dass DMF als reines Prodrug von MMF fungiert, welches die Blut-Hirn-Schranke passieren kann (Mills et al., 2018), bis nachfolgende Studien ergaben, dass beide Substanzen durchaus eigene pharmakologische Eigenschaften haben. *In-vivo* ist jedoch kein DMF im Plasma nachweisbar, obwohl nicht alles zu MMF hydrolysiert wird. Dies kann daran liegen, dass DMF nach Absorption die Blutzellen penetriert und dort eine kovalente Bindung mit Glutathion eingeht (GS-DMS). MMF bildet diese Verbindung auch, allerdings in einem deutlich geringeren Ausmaß (GS-MMS). Diese Addukte werden schneller metabolisiert und weil DMF allein nicht für die pharmakologischen Wirkungen verantwortlich sein kann, muss man alle DMF-abstammenden Verbindungen als ursächlich ansehen (Brück et al., 2018).

Die genauen Wirkungswege von DMF als Immunmodulator sind bisher jedoch noch nicht vollständig geklärt, wohingegen die positiven Effekte auf das Immunsystem tiefgehend erforscht sind (Hosseini et al., 2019). Frühere Studien haben gezeigt, dass DMF auch die Mikroglia-bezogene Immunantwort im ZNS moduliert und dadurch Entzündungen und Schäden am Gehirngewebe verhindert (Rosito et al., 2020a).

Wie schon zuvor angedeutet ist die Wirkungsweise von DMF unvollständig geklärt, aber definitiv multifaktoriell. Ein Ziel der Therapie mit DMF ist die Aktivierung des Nuclear-factor-erythroid-derived-2-related factor 2 (NRF2)-Signalweg, der unter anderem die Immunantwort moduliert und oxidativen Stress abbauen kann (Saha et al., 2020). DMF modifiziert den

Cysteinrest des Kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1), wodurch dieses seine Verbindung zu NRF2 löst, das nun folglich in den Zellkern einwandern kann und dort die Genexpression moduliert (Tang et al., 2019). Das betrifft vor allem die Transkription von antioxidativen Genen wie Häm-Oxygenase-1 (HMOX1) oder NAD(P)H-Dehydrogenase (NQO1), was wiederum zu gesteigertem intrazellulärem Glutathion-Level (GSH) führt und die Zelle resistenter gegen oxidativen Stress macht. Darüber hinaus induziert DMF eine gesteigerte Expression der Glutathion-Reduktase und fördert damit den Recycling-Prozess von oxidiertem Glutathion, was ebenfalls das GSH-Level erhöht (Hoffmann et al., 2017).

Einen weiteren therapeutischen Ansatzpunkt stellt der *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- $\kappa$ B)-Signalweg dar, der bei Entzündung die Immunantwort auf Transkriptionsebene reguliert. NF- $\kappa$ B ist ein Molekül, das verschiedene funktionelle Untereinheiten, meist aber das Heterodimer p50/p65, besitzt. Bei Aktivierung spaltet sich der Inhibitor I $\kappa$ B vom Rest des Moleküls durch Phosphorylierung ab, was eine Translokation von den NF- $\kappa$ B-Untereinheiten in den Nukleus zur Folge hat (Saha et al., 2020). *In-vitro* Studien haben gezeigt, dass MMF agonistisch an den HCAR2-Rezeptor bindet und dadurch diesen Signalweg und nachfolgende proinflammatorische Zytokinexpression hemmt. Dabei handelt es sich um einen G-Protein gekoppelten Membranrezeptor, dessen Expression in aktivierten Immunzellen erhöht ist (Rosito et al., 2020a). NF- $\kappa$ B-induzierte Zytokine können in Chemokine, Interferone, Interleukine (IL), Koloniestimulierende Faktoren, Tumornekrosefaktoren (TNF) und Wachstumsfaktoren unterteilt werden (Loppnow, 2001). Studien ergaben, dass die Genexpressionslevel von *IL-1 $\beta$* , *IL-6* und *TNF $\alpha$*  (Rosito et al., 2020a) sowie *iNOS* (induzierbare NO-Synthase) (Pagani et al., 2020) und *CCL2* (CC-Chemokin-Ligand-2) (Kastrati et al., 2016) unter DMF-Verabreichung erniedrigt waren. Auch andere Entzündungsmediatoren wie Prostaglandine werden von DMF inhibiert (Diskin et al., 2021). Gleichzeitig konnte man eine gesteigerte Expression von anti-inflammatorischen Zytokinen ARG1 (Arginase-1), CD163 (Cluster of Differentiation 163), FIZZ (Found in inflammatory zone) und YM1 (Chitinase-like protein 3, CHIL3) messen (Pagani et al., 2020).

Des Weiteren modifiziert DMF ein wichtiges Enzym für die Energiegewinnung von aktivierten Immunzellen, die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Dabei wird der Cysteinrest des Moleküls um eine Succinyl-Gruppe ergänzt. Das Enzym wird dadurch irreversibel inaktiviert und die aerobe Glykolyse, die in stimulierten Immunzellen und Krebszellen (Warburg-Effekt) erhöht ist, reduziert (Kornberg et al., 2018). Ein anderer Teil des DMF wird im Citratzyklus verstoffwechselt und es konnte gezeigt werden, dass nach DMF-Gabe einige Zwischenprodukte des Citratzyklus vermehrt vorkommen. Das sind vor allem Succinat-, Fumarat- und Malatverbindungen, die über die Aconitase1 Gene steuern, die wichtig für die Eisenhomöostase sind (Rosito et al., 2020a). Succinat selber gilt als anti-

inflammatorisches Protein (Gafson et al., 2019). So hat man herausgefunden, dass eine erhöhte Succinat-Aggregation die Expression von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  in CD4+ und CD8+ T-Zellen unterdrückt (Gudgeon et al., 2022). Andere Autoren beschreiben eine direktere Wirkung von MMF auf T-Zellen durch eine gesteigerte Expression von IL4 und IL5 und damit eine Verschiebung zu einem anti-inflammatorischem Mikroglia- Phänotyp (Moharreggh-Khiabani et al., 2009).

Der Einsatz von DMF wirkte sich auch positiv auf andere Mikroglia-Eigenschaften wie Phagozytose, Migration und Morphologie aus (Pagani et al., 2020).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass DMF möglicherweise Apoptose reduzieren könnte und somit - wie weitere *in-vitro* Modelle bereits zeigten - dass DMF neuroprotektiv wirksam ist (Lee et al., 2021a). Damit eröffnen sich Therapieoptionen für Krankheiten, denen eine Neurodegeneration zugrunde liegt, wie Parkinson, Alzheimer oder auch retinale Erkrankungen, wie zum Beispiel die AMD (Manai et al., 2022).

## 2.7. Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Forschungsarbeit ist es, die modulierenden Effekte von DMF auf BV-2-Mikrogliazellen *in-vitro* einschließlich ihrer funktionellen und dynamischen Eigenschaften zu untersuchen. Dabei soll die Hypothese, dass eine DMF-Behandlung eine positive Wirkung auf reaktivierte BV-2-Mikrogliazellen und indirekt auch auf 661W-Fotorezeptorzellen hat.

## 3. Material und Methoden

### 3.1. Material

#### 3.1.1 BV-2-Mikrogliazellen

BV-2 Zellen sind eine durch Infektion primärer Mikrogliazellkulturen mit einem v-raf/v-myc-Onkogen-tragenden Retrovirus (J2) generierte immortalisierte murine Zelllinie (Blasi et al., 1990), welche sich in der Untersuchung von Mikroglia als geeigneter Ersatz für primäre Mikrogliazellkulturen erwiesen hat (Henn et al., 2009). Die Zellen wurde in einem Medium mit RPMI 1640, 5 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % L-Glutamin und 50  $\mu$ M  $\beta$ -

Mercaptoethanol im Inkubator bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert und bei 70-80 % Konfluenz durch Abschaben gesplittet (Verhältnis 1:3).

### 3.1.2 661W Fotorezeptorzellen

661W Zellen sind murine Fotorezeptorzellen, die durch Expression des SV40-T-Antigens immortalisiert wurden (al-Ubaidi et al., 1992). Die in der Versuchsreihe genutzten 661W Zellen wurden in einem DMEM High Glucose Medium mit 10 % hitzeaktiviertem FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert. Zur Dissoziation der Zellen wurde eine Trypsinlösung (0,05 %) genutzt.

### 3.1.3 Chemikalien

**Tabelle 1: Genutzte Chemikalien, Lösungen und Reagenzien mit Verwendung und Hersteller**

| Chemikalie                                 | Verwendung             | Hersteller, Katalognr.                |
|--|------------------------|---------------------------------------|
| Dimethyl Sulfoxide (DMSO)                  | Lösungsmittel          | SERVA Electrophoresis GmbH, #20385.01 |
| Dimethylfumarat (DMF)                      | Zellstimulation        | Sigma Cat #242926-25G                 |
| Dulbecco's Phosphat buffered Saline (DPBS) | Waschen, Verschiedenes | Gibco; 14190-094                      |
| ELISA-Antikörper                           | ELISA                  | R&D Systems                           |
| Ethanol 70 %                               | RNA-Isolation          | Eigene Herstellung                    |
| Ethanol 96-100 %                           | Verschiedenes          | PanReac #603-002-00-5                 |
| Fetales Kälberserum (FCS/FBS)              | Zellkulturmedien       | Gibco Cat #10270-106                  |
| Fluoromount G mit DAPI / Mounting Medium   | Färbung                | Thermo Fischer Cat #CO-4959-52        |

|                                     |   |  |
|-------------------------------------|---|--|
| L-Glutamin (200 mM)                 | Zellkulturmedium  | Gibco, #25030081                         |
| LPS from E. coli 0001:B4            | Zellstimulation   | InvivoGen                                |
| Mikropartikel aus Polystyren<br>2µm | Phagozytose-Assay   | Sigma-Aldrich Cat<br>#BCCF9987           |
| NED-Lösung                          | NO-Messung  | Promega Cat #G295A                       |
| Normal Donkey Serum                 | ELISA   |  |
| Penicillin-Streptomycin             | Antibiotischer Zusatz für<br>Zellkulturmedien   | Gibco, #14190                            |
| Phalloidin-TRITC                    | Konjugat aus Phalloidin und<br>dem fluoreszierenden<br>Farbstoff TRITC, Aktin-<br>Färbung | Sigma Aldrich Cat #P1951                 |
| RNase AWAY®                         | Lösung, um RNase-<br>Kontaminationen zu<br>beseitigen                                     | Life Technologies GmbH                   |
| Roti Histofix 4 %                   | Fixierung von Zellen  | Carl Roth GmbH & Co.KG,<br>Cat.# P087.4  |
| RPMI 1640                           | BV-2-Zellmedium   | Carl Roth GmbH & Co. KG,<br>Cat.# P087.4 |
| Streptavidin-HRP-Solution           | ELISA   | R&D Systems Cat #DY998                   |
| Triton X-100                        | Färbung   | Sigma-Aldrich, #T8787                    |
| Trypsin/EDTA                        | BV-2-Zell-Ernte   | Sigma-Aldrich, #T3924                    |
| β-Mercaptoethanol                   | Antioxidans / Radikalfänger   | Sigma-Aldrich Cat #M-7154                |

---

### 3.1.4 Antikörper

**Tabelle 2: Genutzte Antikörper**

| Antikörper                         | Verwendung  | Hersteller, Katalognr.                  |
|------------------------------------|---|---|
| Alexa Fluor 488 (Goat, Anti-mouse) | Sekundärer Antikörper (Goat, Anti-mouse) konjugiert mit dem fluoreszierenden Farbstoff Alexa Fluor 488, Färbung (hier: p65) | Thermo Fischer Cat #A11001              |
| Mouse CCL2/JE/MCP-1 DuoSet ELISA   | ELISA - Zytokinmessung  | R&D Systems Cat #DY479-05               |
| Mouse IL-6 DuoSet ELISA            | ELISA - Zytokinmessung  | R&D Systems Cat #DY406-05               |
| Mouse TNF-alpha DuoSet ELISA       | ELISA - Zytokinmessung  | R&D Systems Cat #DY410-05               |
| NFkB P65 (F-6) (Mouse)             | Monoklonaler Maus-Antikörper, Bindung an P65-F  | Santa Cruz Biotechnologies Cat #sc-8008 |

### 3.1.5 Kitsysteme

**Tabelle 3: Genutzte Kitsysteme mit Verwendung und Hersteller**

| Kit  | Verwendung             | Hersteller      |
|--|------------------------|-----------------|
| Caspase-Glo® 3/7 Assay   | Caspase 3/7-Messung    | Promega, #G8090 |
| CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (MTS) | Zellviabilitätsmessung | Promega, #G3581 |
| Griess Reagent System  | NO-Messung             | Promega, #G2930 |

|   |                           |                                 |
|---|---------------------------|---------------------------------|
| Mouse IL-6 DuoSet ELISA                     | ELISA                     | RD, #DY406                      |
| NucleoSpin® RNA isolation kit               | RNA-Isolation             | Macherey-Nagel, #740955         |
| RevertAid RT Kit                            | cDNA-Synthese             | ThermoFisher Scientific, #K1691 |
| Takyon™ No Rox Probe 2x MasterMix Blue dTTP | Polymerase-Kettenreaktion | Eurogentec, #UF-NPMT-B0710      |
| Takyon™ No Rox SYBR® 2x MasterMix dTTP      | Polymerase-Kettenreaktion | Eurogentec, #UF-NSMT-B0710      |

### 3.1.6 Medien

Tabelle 4: Genutzte Zellkulturmedien mit Rezept und Hersteller

| Medium  | Rezept/Verwendung  | Hersteller            |
|---|--|-----------------------|
| Dulbecco's Modified Eagle Medium – High Glucose (DMEM-HG) | DMEM High Glucose + 10 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin   | Sigma-Aldrich, #D6429 |
| Einfriermedium  | 60 % des Kulturmediums + 30 % FCS + 10 % DMSO  | eigene Herstellung    |
| Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium        | RPMI 1640 + 5 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin + 1 % L-Glutamin + 50 µM β-mercaptoethanol / Zellkulturmedium (BV-2) | Gibco, #21875034      |

### 3.1.7 Oligonukleotide / Primer

Tabelle 5: Genutzte qRT-PCR Primer – pro-inflammatorische Gene

| Amplikon     | Primer | Sequenz (5' - 3')         |
|--------------|--------|---------------------------|
| ATPase       | F      | ggcacaatgcaggaaagg        |
| ATPase       | R      | tcagcaggcacatagatagcc     |
| Ccl2         | F      | catccacgtgttgctca         |
| Ccl2         | R      | gatcatcttgctggatgagt      |
| Il-1b        | F      | agttgacggaccccaaaag       |
| Il-1b        | R      | agctggatgctctcatcagg      |
| Il-6         | F      | gctaccaaactggatataatcagga |
| Il-6         | R      | ccaggtagctatggactccagaa   |
| iNOS         | F      | cttgccacggacgagac         |
| iNOS         | R      | tcattgtactctgagggtga      |
| Tnf $\alpha$ | F      | ctgtagcccacgtcgtagc       |
| Tnf $\alpha$ | R      | ttgagatccatgccgttg        |
| Tspo         | F      | actgtattcagccatgggta      |
| Tspo         | R      | accatagcgtcctctgtgaaa     |

**Tabelle 6: Genutzte qRT-PCR Primer – anti-inflammatorische Gene inkl. Sonden**

| <b>Amplikon</b> | <b>Primer</b> | <b>Sequenz (5' - 3')</b> | <b>Sonde</b> |
|-----------------|---------------|--------------------------|--------------|
| ATPase          | F             | ggcacaatgcaggaaagg       | 77           |
| ATPase          | R             | tcagcaggcacatagatagcc    | 77           |
| ARG1            | F             | gaatctgcatgggcaacc       | 2            |
| ARG1            | R             | gaatcctggtacatctggaac    | 2            |
| CAT1            | F             | cctcaagttggttaatgcaga    | 34           |
| CAT1            | R             | caagttttgatgccctggt      | 34           |
| HMOX1           | F             | agggtcagggtccagagaa      | 9            |
| HMOX1           | R             | ctccagggccgtgtagata      | 9            |
| NQO1            | F             | agcgttcggtattacgatcc     | 50           |
| NQO1            | R             | agtacaatcagggctcttctcg   | 50           |
| NRF2            | F             | catgatggacttgagttgc      | 3            |
| NRF2            | R             | cctcaaaggatgtcaatcaa     | 3            |
| SOD2            | F             | tgcttaatcaggaccattg      | 3            |
| SOD2            | R             | gtagtaagcgtgctcccacac    | 3            |

### 3.1.8 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 7: Genutzte Verbrauchsmaterialien mit Verwendung und Hersteller

| Artikel  | Verwendung | Hersteller                               |
|--|------------|--|
| Deckgläser 10x10 mm                                |            | Th.Geyer, #7695023                       |
| ELISA Platte, 96 Well                              |            | R&D Systems, #DY990                      |
| Mikroreaktionsgefäß 1,5 ml                         |            | Sarstedt, #72.690                        |
| Mikroreaktionsgefäß 1,5 ml<br>schwarz              |            | Roth, #AA80.1                            |
| Mikroreaktionsgefäß 2 ml                           |            | Sarstedt, #72.689                        |
| FrameStar® 384-well Platte                         |            | 4titude, #4ti-0382                       |
| Matrix Pipettenspitzen 30 µl                       |            | Thermo Scientific, #7431                 |
| Mikrotiterplatte weiß, 96<br>Well                  |            | Costar, #3912                            |
| Pipettenspitzen, 2,5 µl, 10<br>µl, 200 µl, 1000 µl |            | Sarstedt                                 |
| PCR-Röhrchen, 0,2 ml                               |            | Kisker Biotech, #G003-SF                 |
| Schraubröhre 15 ml                                 |            | Sarstedt, #62.554.502                    |
| Schraubröhre 50 ml                                 |            | Sarstedt, #62.547.254                    |
| SPLScar™ Kratzer                                   |            | SPL Life Sciences, #201906               |
| Superfrost Plus™<br>Objektträger                   |            | ThermoFischer- Scientific,<br>#J1800AMNZ |

|                           |                        |
|---------------------------|------------------------|
| T-75 Zellkulturflasche    | Sarstedt, #83.3911.002 |
| Zellkulturplatte, 6 Well  | Sarstedt, #83.3920     |
| Zellkulturplatte, 12 Well | Sarstedt, #83.3921     |
| Zellkulturplatte, 96 Well | Sarstedt, #83.3924     |
| Zellschaber               | Sarstedt, #83.1830     |

---

### 3.1.9 Geräte

**Tabelle 8: Genutzte Geräte mit Verwendung und Hersteller**

| Gerät                            | Verwendung                          | Hersteller        |
|----------------------------------|-------------------------------------|-------------------|
| ApoTome 2 Mikroskop              | Mikroskopieren                      | Zeiss             |
| AxioCam MRC vert. A1 Kamera      | Mikrophotographie                   | Zeiss             |
| AxioCam MRm Kamera               | Mikrophotographie                   | Zeiss             |
| Centrifuge 5415 R                | Zentrifugieren                      | Eppendorf         |
| Centrifuge Mini Star             | Zentrifugieren                      | VWR International |
| Imager M2 Mikroskop              | Mikroskopieren                      | Zeiss             |
| Infinite® F200 Pro Platten-Leser | Messung von Absorption, Lumineszenz | Tecan             |

|                                 |  |                         |
|---------------------------------|--|-------------------------|
| LightCycler® 480 Instrument II  | Quantifizierung von Genen mittels qPCR | Roche Applied Science   |
| Matrix™ Multichannel Pipette    | Mehrkanalpipettieren                   | ThermoFisher Scientific |
| MSC-Advantage Sterilbank        | Sterilbank                             | Thermo Scientific       |
| NanoDrop 2000 Spectrophotometer | Spektralphotometrie                    | Thermo Scientific       |
| Neubauer Zählkammer             | Zellzählung                            | Marienfeld              |
| TW20 Wasserbad                  | Auftauen, Erwärmen                     | Julabo                  |

---

### 3.1.10 Software

**Tabelle 9: Genutzte Software mit Verwendung und Hersteller**

| Software                                   | Verwendung                              | Hersteller                    |
|--|---|-------------------------------|
| Adobe Acrobat Reader                       | PDF-Dokumente                           | Adobe Systems                 |
| GraphPad Prism Version 7                   | Statistik                               | GraphPad Software, Inc.       |
| ImageJ 1.50i                               | Zählen, Abmessen von Zellen und Arealen | National Institutes of Health |
| FIJI                                       | Qualifizierung der Morphologie          | National Institutes of Health |
| LightCycler® 480 Software 1.5.1            | Quantifizierung von Genen mittels qPCR  | Roche Applied Science         |
| Microsoft Office (Word, Excel, Powerpoint) | Schreiben, Tabellen, Präsentationen     | Microsoft                     |

|                     |  |                          |
|---------------------|--|--------------------------|
| Nanodrop2000/2000c  | Spektralphotometrie                    | Thermo Fisher Scientific |
| Tecan i-control 1.9 | Messung von Absorption,<br>Lumineszenz | PerkinElmer              |
| Zen 2012            | Mikrophotographie                      | Zeiss                    |

---

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Kultivierung und Stimulation

Die BV-2-Zellen wurden nach dem Auftauen in einem speziellen Nährmedium in Zellkulturflaschen gezüchtet. Dafür wurde das Gibco RPMI Medium benutzt, welchem noch Fetales Kalbserum (FCS), L-Glutamin und Penicillin/Streptomycin zugesetzt wird (RPMI 1640 + 5 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin + 1 % L-Glutamin + 50  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoethanol). Wenn die Zellen annähernd konfluent sind, werden sie mithilfe eines Zellschabers in frischem Medium abgelöst und auf zwei oder drei neue Zellflaschen verteilt. Um die Anzahl der Zellen manuell zu bestimmen, wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Ein Tag vor der Stimulation werden die Zellen in 6- oder 12-Well Platten mit einer Dichte von 300.000 Zellen auf 2ml bzw. 150.000 Zellen auf 1 ml in den 12-Well Platten ausgesät. Ausnahmen hiervon werden in den jeweiligen Versuchsabschnitten erläutert. Aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit von DMF wurde eine Stammlösung von 175 mM in DMSO angesetzt, die für die spätere Anwendung in Medium verdünnt wurde. Um potenzielle Effekte des DMSO auf die Zellen abschätzen zu können wurden 0.057% DMSO als Kontrolle verwendet. Um die Arbeitslösung LPS herzustellen, wurde ein 1 mg/ml Stock LPS 1:100 mit PBS verdünnt. Diese Lösung wurde dann im Well 1:200 mit Medium verdünnt, um eine finale Arbeitskonzentration von 50 ng/ml zu erhalten. So ergeben sich vier Behandlungsgruppen, eine unbehandelte Kontrollgruppe, die nur Medium und 0,057 % DMSO enthält, eine DMF-Gruppe (100  $\mu$ M), eine LPS-Gruppe in 50 ng/ml Lösung und eine DMF/LPS-Kombinations-Gruppe.

### 3.2.2 Zellvitalität

Um eine effiziente und non-toxische Dosis für die DMF-Behandlung zu finden, wurde das Zellproliferationstest CellTiter 96® AQueous One Solution von Promega benutzt, der die metabolische Aktivität von Zellen quantifiziert. Dabei wurde das Reagenz – ein Methyl-Tetrazolium-Salz (MTS) – von den verwendeten BV-2-Mikrogliazellen durch Dehydrogenasen zu einem farbigen Formazan Produkt reduziert.  $10^4$  Zellen wurden pro Well über Nacht in einer 96-Well-Platte kultiviert. Daraufhin wurden die Zellen 24 h mit DMF in nachfolgend beschriebenen Konzentrationen stimuliert: 0  $\mu\text{M}$  (0,057 % DMSO), 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 150  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ . Zusätzlich gab es Proben ohne Zellen, die als Leerwert (Blank) fungierten und Proben mit Zellen, denen nur Medium gegeben wurde. Daraufhin erfolgte die Anwendung des Reagenzes wie vom Hersteller beschrieben für 2 h. Anschließend wurde die Absorption des entstandenen Formazan-Produktes bei einer Wellenlänge von 490 nm mit dem Tecan Infinite® F200 pro Mikroplattenleser gemessen. Der durchschnittliche Blank-Wert wurde von allen gemessenen Werten subtrahiert, um die Hintergrund-Absorption durch Medium zu eliminieren.

### 3.2.3 RNA-Isolation

BV-2-Mikrogliazellen wurden in 12-Well-Platten zu je 150.000 pro Well ausgesät und für 24 h kultiviert (n=3, DMSO 0,057 %; DMF 100  $\mu\text{M}$ ; LPS 50 ng/ml; DMF/LPS). Die Behandlungsdauer belief sich auf 6 h. Die Zellen wurden nach Ablauf dieser Zeit mit einem Zellschaber und in einem RA1-Lysis-Puffer (NucleoSpin RNA Kit von M&N) gelöst. Danach wurde die RNA mit dem NucleoSpin RNA Kit von M&N nach Herstellerprotokoll isoliert und die RNA in 40  $\mu\text{l}$  RNase-freiem Wasser eluiert. Für die RNA-Proben wurde die Konzentration spektrophotometrisch mit dem NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) gemessen. Die RNA-Proben wurden bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

### 3.2.4 Reverse Transkriptase

Der nächste Schritt bestand in der Umschreibung der RNA in 20  $\mu\text{l}$  komplementäre DNA mit dem RevertAid First Strand cDNA Synthese Kit von Thermo Scientific. Die Zielkonzentration betrug 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Benutzt wurde ein Thermocycler von Peqstar.

### 3.2.5 Quantitative Echtzeit-PCR

Für die Quantifizierung der DNA-Moleküle der pro- und anti-inflammatorischen Gene kam die quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR) mit dem Takyon™ No Rox SYBR® MasterMix Blue dTTP Kit bzw. das Takyon™ No ROX Probe 2X MasterMix Blue dTTP Kit von Eurogentec gemäß Protokoll zum Einsatz. Die für die Gene spezifischen Primer sind im Kapitel Material aufgelistet (Tab. 5). Die Plattenbelegung erfolgte in Duplikaten. Die Expression der pro-inflammatorischen Gene wurde sowohl mit 50 ng/ml als auch mit 100 ng/ml LPS untersucht. Die qPCR der anti-inflammatorischen Gene wurde mit 50 ng/ml LPS durchgeführt. Die anderen Konditionen blieben unverändert (s. Abschnitt 3.1.1).

### 3.2.6 Zytokinmessung

150.000 BV-2-Mikrogliazellen wurden pro Well in 12-Well-Platten für 18 h kultiviert und anschließend für 12 h zu den bekannten Konditionen behandelt (DMSO 0,057 %; DMF 100 µM; LPS 50 ng/ml; DMF/LPS), bevor die Überstände zentrifugiert und gesammelt wurden. In der vorliegenden Arbeit wurde wie folgt mit dem Reagenz-Verdünner (1 % Bovines Serumalbumin in 1x PBS) verdünnt: Ccl2: 1:50, Il-6 und Tnfa: keine Verdünnung. Für das Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA DuoSet Kit von R&D) wurde wie im Herstellerprotokoll beschrieben vorgegangen. Die durch den letzten Versuchsschritt entstehende Farbreaktion wurde mit dem Tecan Infinite® F200 pro Mikroplattenleser untersucht. Anhand der gemessenen Werte und der Standardkurve konnten die Konzentrationen berechnet werden.

### 3.2.7 P65- und Phalloidininfärbung

100.000 BV-2-Mikrogliazellen wurden in 12 Well-Platten auf Deckgläser mit 15 mm Durchmesser ausgesät und für 18 h kultiviert. Die Behandlung der Zellen zu bekannten Konditionen (DMSO 0,057 %; DMF 100 µM; LPS 50 ng/ml; DMF/LPS) dauerte 45 min. Der Ablauf der Immunocytochemie (ICC) ist dem Protokoll zu entnehmen. Der primäre Antikörper (NFκB p65, Spezies: Maus) wurde für 1 h inkubiert. Dieser wurde vorher 1:100 in Antikörper-Lösung verdünnt. Die lichtsensitiven sekundären Antikörper – Alexa Fluor 488 1:1000 verdünnt in Antikörper-Lösung bei Raumtemperatur und Phalloidin-TRITC 1:500 verdünnt in PBS – wurden für 30 bzw. 75 min bei Raumtemperatur, vor Licht geschützt inkubiert. Fluoromount G mit DAPI wurde verwendet, um auch die Zellkerne anzufärben. Mikrofotografien wurden

angefertigt in 20-facher Vergrößerung mit dem ApoTome 2 Mikroskop von Zeiss. Mit ImageJ wurden die Bilder analysiert, dabei wurde die Fläche von p65 im Nukleus in Relation zur Fläche des Nukleus gesetzt. Um die Morphologie zu analysieren, wurde mit ImageJ die Fläche, der Umriss und der Verzweigungsindex des Zytoskeletts gemessen.

### 3.2.8 Migration

Bei dem Scratch-Wound-Healing-Versuch wurden BV-2-Mikrogliazellen in 6-Well-Platten zu je 300.000 Zellen für 24 h kultiviert. Am darauffolgenden Tag wurde mittig in die Wells eine lineare Kratzspur gerastert (Scratcher 6Well, SPL Lifesciences) und die Zellen je nach Kondition behandelt, mit DMSO 0,057 %, DMF 100  $\mu$ M, LPS 50 ng/ml oder DMF/LPS-Kombinationstherapie. Unmittelbar darauf wurden die ersten Mikrofotografien in 10facher Vergrößerung gemacht (AxioVert.A1 Mikroskop, Nikon / AxioCam MRC vert. A1 Kamera, Zeiss). Die Position jedes Fotos wurde dokumentiert. 4 h später wurden erneut Fotos in den gleichen Positionen aufgenommen. Die Bilder wurden mit ImageJ analysiert, dabei wurden die Fläche von migrierten Zellen und die Anzahl bestimmt und verglichen.

### 3.2.9 Phagozytose

Für die Messung der Phagozytose-Aktivität wurden 100.000 BV-2-Mikrogliazellen pro Well in 12-Well-Platten für 24 h kultiviert. Dann wurden die Zellen behandelt (DMSO 0,057 %; DMF 100  $\mu$ M; LPS 50 ng/ml; DMF/LPS), wobei in diesem Experiment eine weitere Kondition nur mit Zellen und Medium eingeführt wurde. Dies diente der Ermittlung eines Phagozytose-Verhaltens unter nicht stimulierten Bedingungen. Nach 2 h Inkubationszeit wurde 1  $\mu$ l der Mikropartikel (2  $\mu$ m, Sigma-Aldrich) in Flüssigkeit hinzugegeben und die Platten zur gleichmäßigeren Verteilung geschwenkt. Es folgte eine erneute Inkubationszeit von 4 h. Dann wurde gewaschen und mit frischem Medium aufgefüllt. Pro Well wurde ein Bild in 5-facher Vergrößerung als Übersichtsbild und 3 Bilder in 40-facher Vergrößerung aufgenommen. Dann wurden die Mikropartikel gezählt mit Hilfe von ImageJ. Zellen mit mehr als 10 phagozytierten Mikropartikeln wurden als Phagozytose-aktive Zellen gezählt und in Relation zur totalen Zellanzahl in dem Bild gesetzt.

### 3.2.10 Stickoxid-Messung

Für die Bestimmung der Nitritoxidfreisetzung (NO) kam das Griess Reagent System von Promega zum Einsatz. Dieses misst den NO-Gehalt in den Zellkultur-Überständen der jeweiligen Kondition. Dafür wurden 500.000 Zellen in 500 µl pro Well (12-Well-Platte) für 18 h kultiviert und mit der jeweiligen Behandlung (DMSO 0,057 %; DMF 100 µM; LPS 50 ng/ml; DMF/LPS) für weitere 12 h inkubiert. Nach Zentrifugieren werden die Überstände auf einer 96-Well-Platte verteilt: 4 Konditionen à 3 Proben à 2 biologische Duplikate. Um die späteren Messwerte einordnen zu können, wird auch eine Nitrit-Standard-Lösung unterschiedlicher Konzentration in Triplikaten auf die Wells verteilt, um eine Referenzkurve zu erhalten (100 µM, 50 µM, 25 µM, 12,5 µM, 6,25 µM, 3,125 µM, 1,56 µM, 0 µM). Der weitere Verlauf war gemäß dem Herstellerprotokoll. Die Absorption wurde mit dem Tecan Infinite F200 Pro Platten-Leser gemessen. Dafür wurde ein Filter für Wellenlängen zwischen 520 und 550 nm verwendet.

### 3.2.11 Neurotoxizität

Der Caspase 3/7 Test von Promega ist eine Labormethode, um Caspasen in einer Zellprobe zu messen, die ein Maß für die Apoptose-Aktivität sind. Dafür wurden 661W-Fotorezeptorzellen (Maus-Fotorezeptoren, kultiviert in DMEM (high glucose) Medium + 1% P/S + 10% FCS) mit den Zellkulturüberständen der konditionierten BV-2-Zellen behandelt. Für die Gewinnung der Zellkulturüberstände wurden 150.000 BV-2-Mikrogliazellen in 12-Well-Platten für 18 h kultiviert und für 6 h unter bekannten Konditionen (DMSO 0,057 %; DMF 100 µM; LPS 50 ng/ml; DMF/LPS) inkubiert. Überstände wurden gesammelt, zentrifugiert und wahlweise direkt für die Behandlung der Fotorezeptoren benutzt oder bei -80° C gelagert. Die Fotorezeptoren wurden auf 96-Well-Platten (10.000 Zellen pro Well) kultiviert und mit dem konditionierten BV-2-Medium behandelt (5 Konditionen à 5 Proben: Medium; DMSO 0,057 %; DMF 100 µM; LPS 50 ng/ml; DMF/LPS). Als Blank wurden Wells mit Medium ohne Zellen genutzt. Das Subtrahieren der Blank-Werte ist wichtig, um durch das Medium verursachte Hintergrundsignale auszugleichen. Nach 48 h Inkubationszeit wurde jedem Well 50 µl von dem Caspase Glo 3/7 Reagenz hinzugegeben. Dann wurden die Platten abgedeckt, geschwenkt und für 1 h inkubiert, woraufhin mit dem Tecan Infinite F200 Pro Platten-Leser die Lumineszenz gemessen wurde. Die Messwerte wurden in Relation zu dem Durchschnittswert der unbehandelten (nur Medium) Gruppe gesetzt, um die relative Caspase-Aktivität darzustellen.

### 3.2.12 Statistik

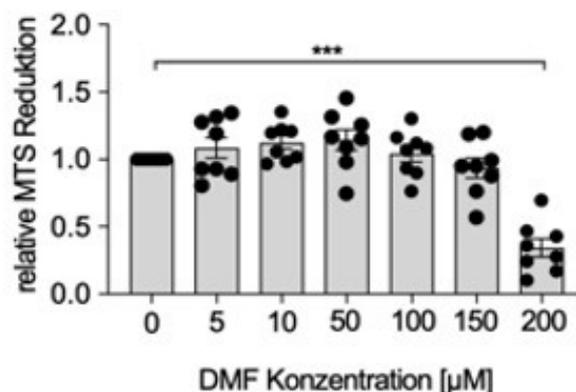
Es wurden einfaktorielle ANOVA-Analysen durchgeführt, um festzustellen, ob signifikante Unterschiede zwischen den Konditionen bestehen. Bei Nachweis von Signifikanz wurden anschließend Šidák's Multiple Comparisons Tests durchgeführt, um spezifische Gruppenvergleiche vorzunehmen und die Quellen der beobachteten Unterschiede genauer zu untersuchen. Die Signifikanz wurde wie folgt abgestuft:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) und  $p < 0,001$  (\*\*\*). Alle Ergebnisse entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  Standardfehler.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Dimethylfumarat reduziert die LPS-induzierte Mikroglia-Reaktivität

#### 4.1.1 Wirkung unterschiedlicher DMF-Dosen auf die Vitalität von BV-2-Mikrogliazellen

Um den Effekt von DMF auf die Vitalität von Mikroglia zu untersuchen, wurden BV-2-Zellen mit verschiedenen Inkubationszeiten und steigenden DMF-Konzentrationen inkubiert, um die optimale Dosierung für Versuche mit den Zellen zu ermitteln.

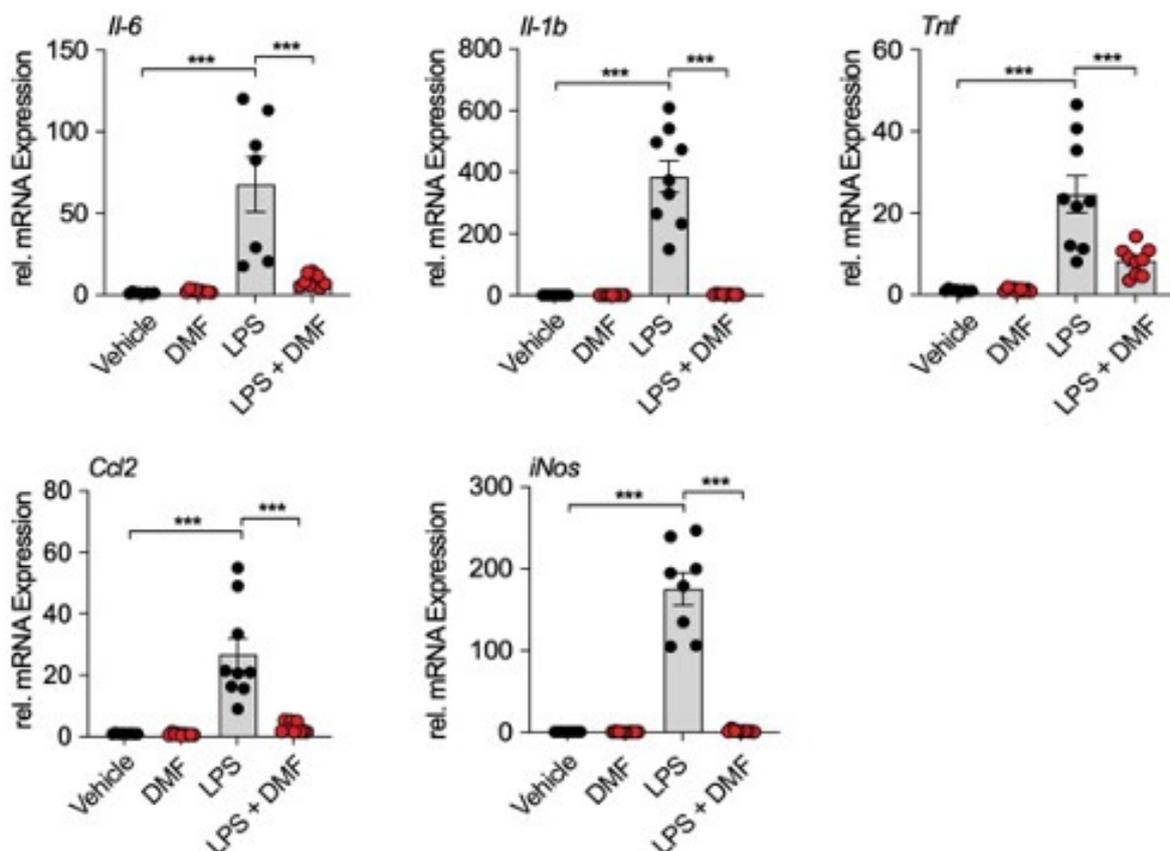


**Abb. 4: Vitalitätsmessung durch das MTS Cell Proliferation Assay von Promega nach 24 h Stimulation.** In den Gruppen 0-150  $\mu\text{M}$  DMF gab es keine signifikanten Unterschiede. Die Zellen mit der Dosis 200  $\mu\text{M}$  zeigten eine signifikant erniedrigte Vitalität von etwa 34 %. (n = 8 aus 3 unabhängigen Experimenten, Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, One-way ANOVA mit Šidák's multiple comparison test, \* =  $p < .05$ , \*\* =  $p < .01$ , \*\*\* =  $p < .001$ )

Die Messungen der DMF-Konzentrationen 5 bis 150  $\mu\text{M}$  ergaben keine signifikante Abweichung zur Referenz ohne DMF. Lediglich eine Dosis von 200  $\mu\text{M}$  konnte eine signifikante Reduktion ( $p < .001$ ) der Viabilität im Vergleich zur 0  $\mu\text{M}$ -Gruppe bewirken (Abb. 4).

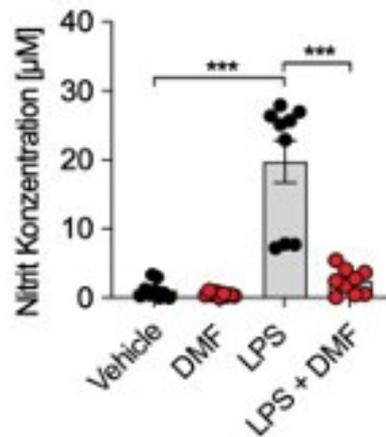
#### 4.1.2 Einfluss von DMF auf die pro-inflammatorische Genexpression und Nitrit-Produktion

Auf Grund der Ergebnisse aus den Zellvitalitätsmessungen wurde eine DMF-Dosis von 100  $\mu\text{M}$  gewählt. Für die Expressionsmessung pro-inflammatorischer Gene durch qPCR wurden BV-2-Mikrogliazellen über Nacht kultiviert und für 6 h in folgenden Konditionen stimuliert: DMSO 0,057 % (Kontrolle); DMF 100  $\mu\text{M}$ ; LPS 50 ng/ml; DMF/LPS. Dabei wurde gezeigt, dass im Vergleich zur LPS-Kondition die Zugabe von DMF die Expression von *Il-6*, *Il-1 $\beta$* , *Tnf*, *Ccl2* und *iNos* signifikant reduziert hat (Abb. 5), alle  $p < .001$ .



**Abb. 5:** Relative mRNA-Expression von *Il-6*, *Il-1 $\beta$* , *Tnf*, *Ccl2* und *iNos*, gemessen durch qPCR. Stimulationszeit: 6 h. (n = 7-9 aus 3 unabhängigen Experimenten, Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, One-way ANOVA mit Šidák's multiple comparison test, \* =  $p < .05$ , \*\* =  $p < .01$ , \*\*\* =  $p < .001$ )

iNOS ist ein nicht konstitutiv exprimiertes Enzym, welches die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) exponentiell steigern kann und Bestandteil der natürlichen Mikroglia vermittelten Immunabwehr nach Stimulation ist. NO wirkt in hohen Konzentrationen zytotoxisch und es wurde erwartet, dass DMF nicht nur die Genexpression des Enzyms reduziert, sondern daraus schlussfolgernd auch die Produktion von NO. Dafür wurden die Zellüberstände aus den jeweiligen Konditionen gesammelt, um den Anteil an NO zu bestimmen.

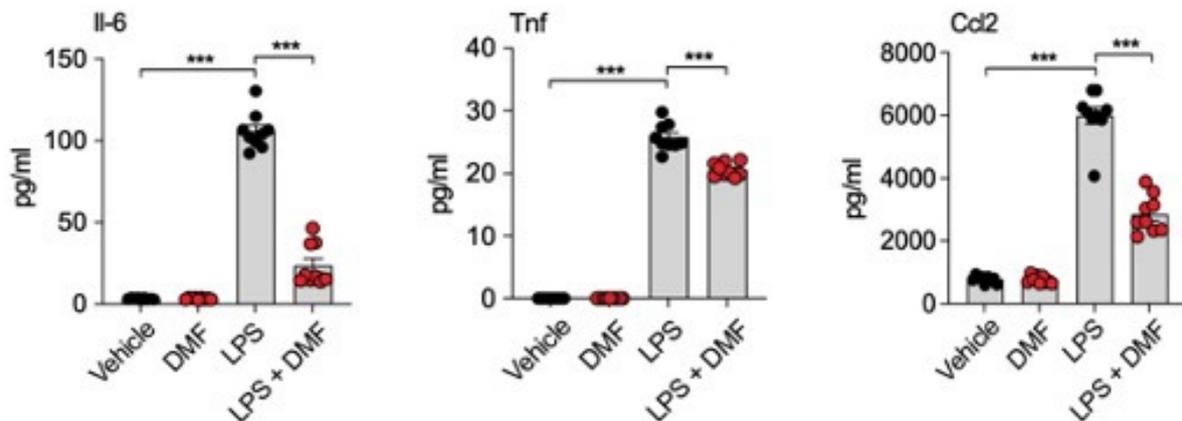


**Abb. 6:** Gemessene Nitrit-Konzentrationen nach 12h Inkubationszeit. (n = 9 aus 3 unabhängigen Experimenten, Mittelwert ± Standardfehler, One-way ANOVA mit Šidák's multiple comparison test, \* =  $p < .05$ , \*\* =  $p < .01$ , \*\*\* =  $p < .001$ )

Während die Nitrit-Konzentration nach LPS-Stimulierung der Mikroglia signifikant erhöht war, führte die zusätzliche DMF-Behandlung zu einer signifikant reduzierten Nitrit-Ausschüttung (Abb. 6).

#### 4.1.3 Effekt von DMF auf die pro-inflammatorische Zytokinproduktion

Nachdem dargelegt wurde, dass die Expression pro-inflammatorischer Gene durch DMF reduziert werden konnte, stellte sich die Frage, ob die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen im Umfeld von mit DMF behandelten Mikrogliazellen auch tatsächlich verringert ist. Zur Klärung dieser Frage kam ein ELISA-Immunoassay zum Einsatz. Für die Proben wurden die Überstände der Konditionen gesammelt und zentrifugiert. Getestet wurden Il-6, Tnf und Ccl2 und die entstandene Farbreaktion wurde in einem Mikroplattenleser gemessen.

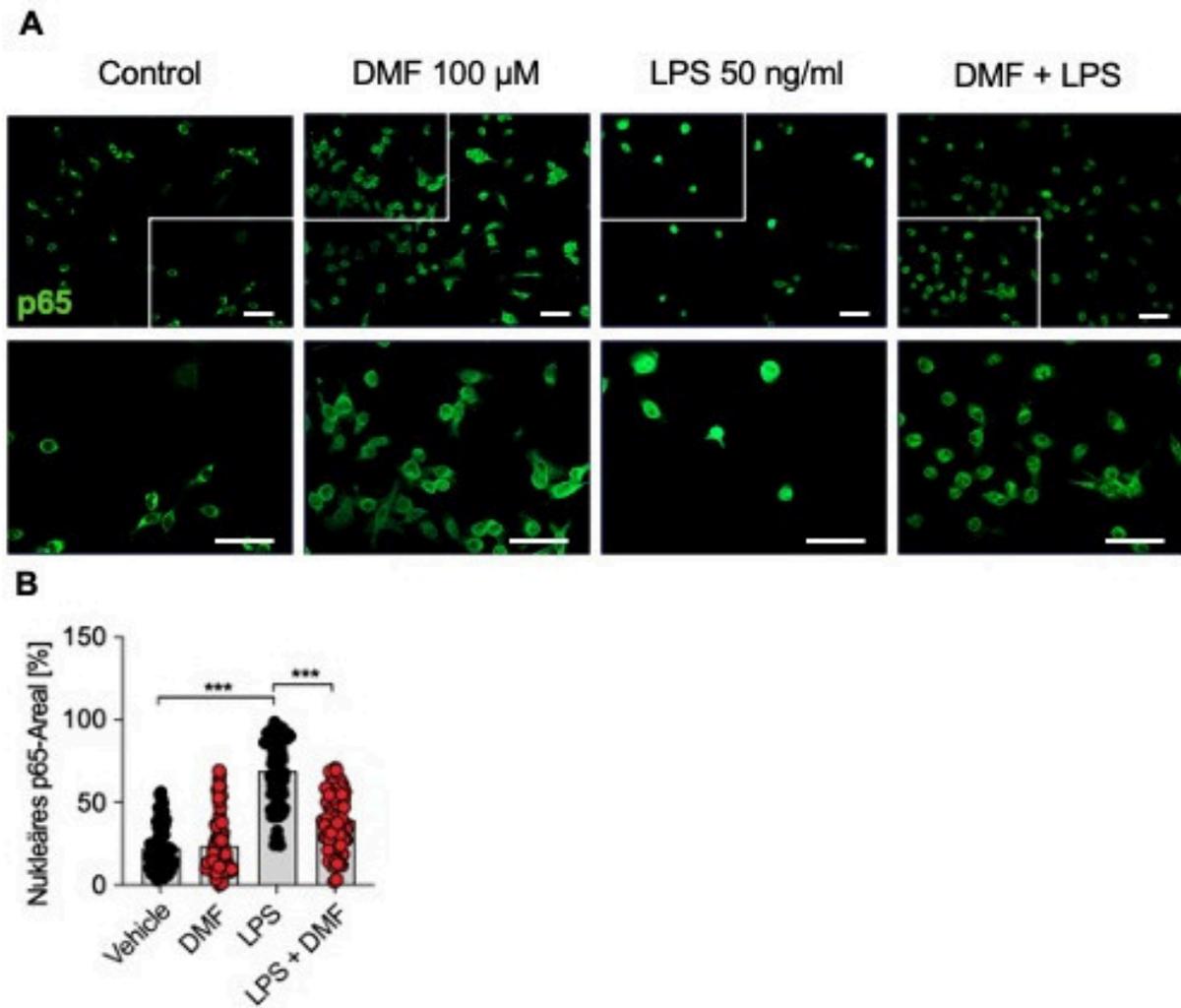


**Abb. 7:** Gemessene Konzentrationen von IL-6, TNF und CCL2 nach 12 h Stimulation. (n = 9 aus 3 unabhängigen Experimenten, Mittelwert ± Standardfehler, One-way ANOVA mit Šidák's multiple comparison test, \* =  $p < .05$ , \*\* =  $p < .01$ , \*\*\* =  $p < .001$ )

Wie die Abbildung zeigt, wurde die durch LPS hervorgerufene Erhöhung der Produktion der drei gemessenen Zytokine IL-6, Tnf und Ccl2 durch DMF signifikant herunterreguliert. DMF allein hat dabei keine signifikante Erhöhung der Zytokinlevel im Vergleich zur Kontrolle verursacht (Abb. 7).

#### 4.1.4 Auswirkung von DMF auf den pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B

In der homöostatischen Mikrogliazelle ist der pro-inflammatorische Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B außerhalb des Zellkerns im Zytosol lokalisiert. Bei Immunaktivierung transloziert NF- $\kappa$ B in seiner mobilen Form in den Zellkern, wo er die Expression von pro-inflammatorischen Genen induziert. Um NF- $\kappa$ B zu detektieren, wurde seine p65-Untereinheit immunzytochemisch angefärbt. Die Färbung ist wie in 3.7 beschrieben durchgeführt worden.



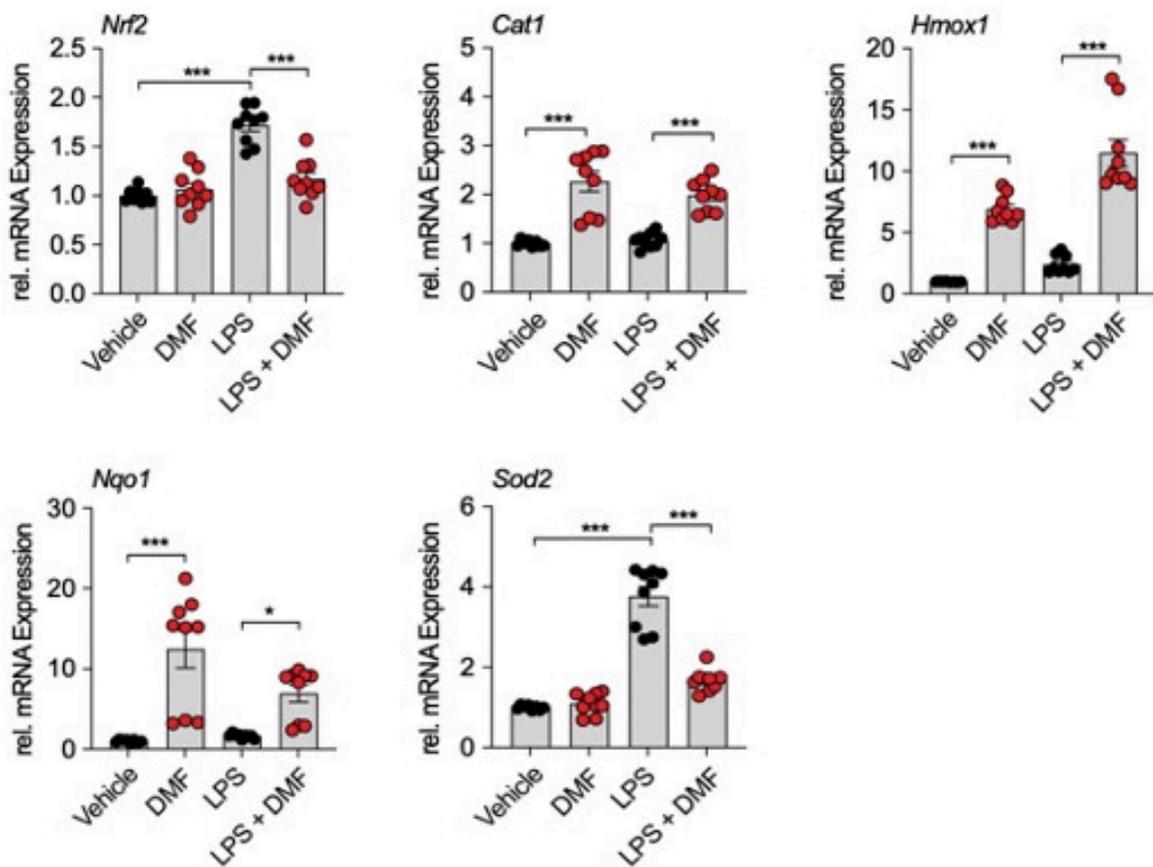
**Abb. 8:** **A** Mit Alexa Fluor 488 angefärbtes p65. Die weißen Kästen zeigen Areale, die darunter vergrößert dargestellt sind. **B** Quantifizierung des nukleären p65, Maßstab: 50  $\mu$ m. (n = 90 Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten, Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, One-way ANOVA mit Šidák's multiple comparison test, \* =  $p < .05$ , \*\* =  $p < .01$ , \*\*\* =  $p < .001$ )

In der Kontrolle war der p65-Anteil am geringsten und in der LPS stimulierten Gruppe am höchsten. In den Konditionen, in denen DMF zugesetzt wurde, konnte man einen geringeren p65-Anteil pro Zellkern beobachten. Statistisch signifikante Unterschiede zeigten sich hierbei sowohl zwischen Vehicle und LPS als auch zwischen LPS und LPS + DMF (Abb. 8).

#### 4.1.5 Wirkung von DMF auf anti-inflammatorische Gene

Die Expression anti-inflammatorischer Gene wurde überprüft, indem nach 6 h Stimulation eine qPCR durchgeführt wurde. Untersucht wurden die antioxidativen und zytoschutzenden Gene:

*Nrf2*, Catalase-1 (*Cat1*), Häm-Oxygenase-1 (*Hmox1*), *Nqo1* und Superoxiddismutase-2 (*Sod2*).



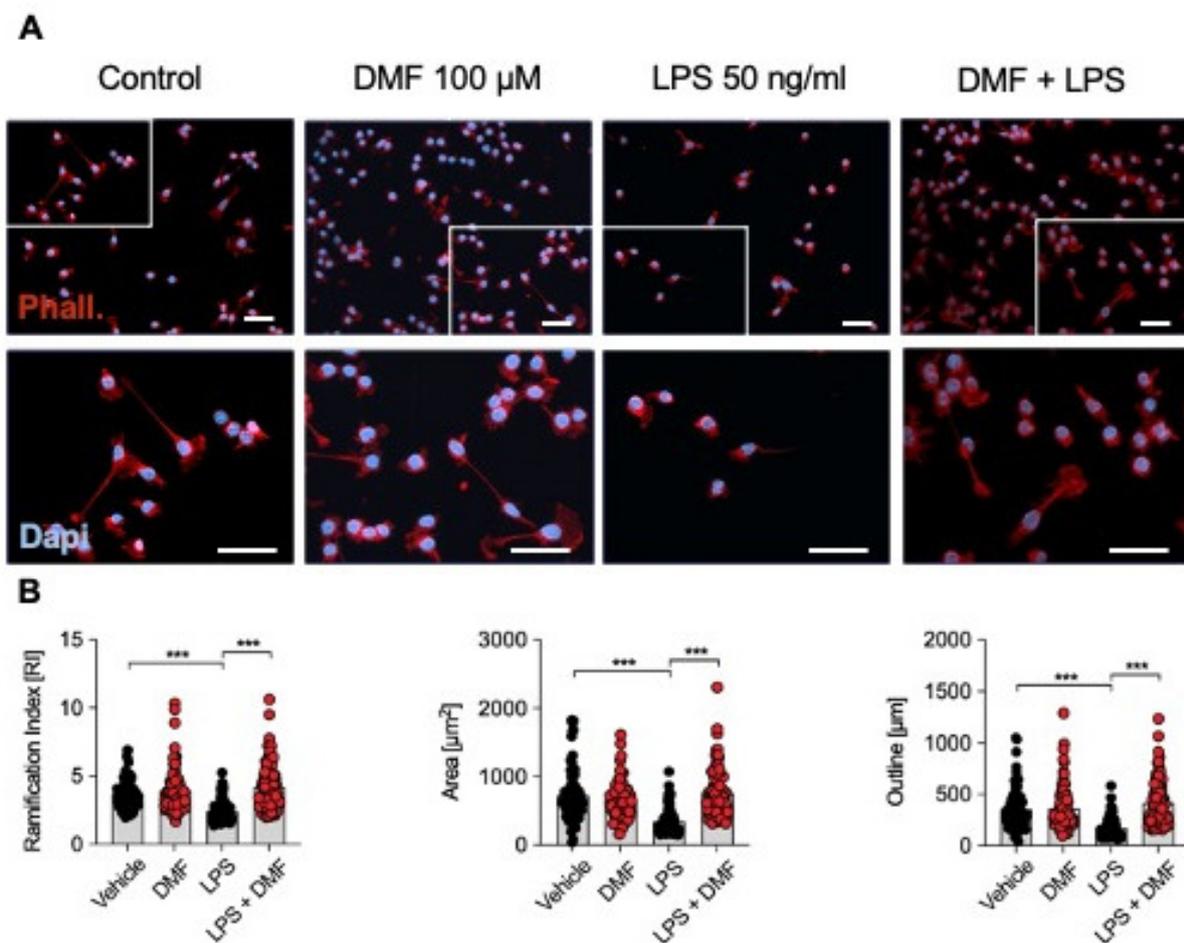
**Abb. 9:** Relative Genexpression anti-inflammatorischer Faktoren nach 6 h Stimulation. (n = 8-9 aus 3 unabhängigen Experimenten, Mittelwert ± Standardfehler, One-way ANOVA mit Šidák's multiple comparison test, \* =  $p < .05$ , \*\* =  $p < .01$ , \*\*\* =  $p < .001$ )

Die Abbildung zeigt, dass DMF im Vergleich zur Kontrolle und zu LPS die Expression von *Cat1*, *Hmox1* und *Nqo1* signifikant heraufregulierte, wohingegen die Gene *Nrf2* und Superoxiddismutase 2 (*Sod2*) signifikant durch DMF reduziert wurden (Abb. 9).

## 4.2. Dimethylfumarat beeinflusst Schlüsselfunktionen reaktiver Mikroglia

### 4.2.1 Veränderung der Morphologie durch DMF

Wird eine Mikrogliazelle durch einen Stimulus reaktiviert, findet eine Formveränderung statt, die sich der neuen Aufgabe, der Immunabwehr, anpasst. Die Mikroglia ändert ihre Morphologie von einer ramifizierten zu einer amöboiden Form, die so auch die Migration innerhalb der Retina ermöglicht. Um diese Formveränderungen zu untersuchen, wurde eine Phalloidin-Färbung eingesetzt, die das Zytoskelett markiert.



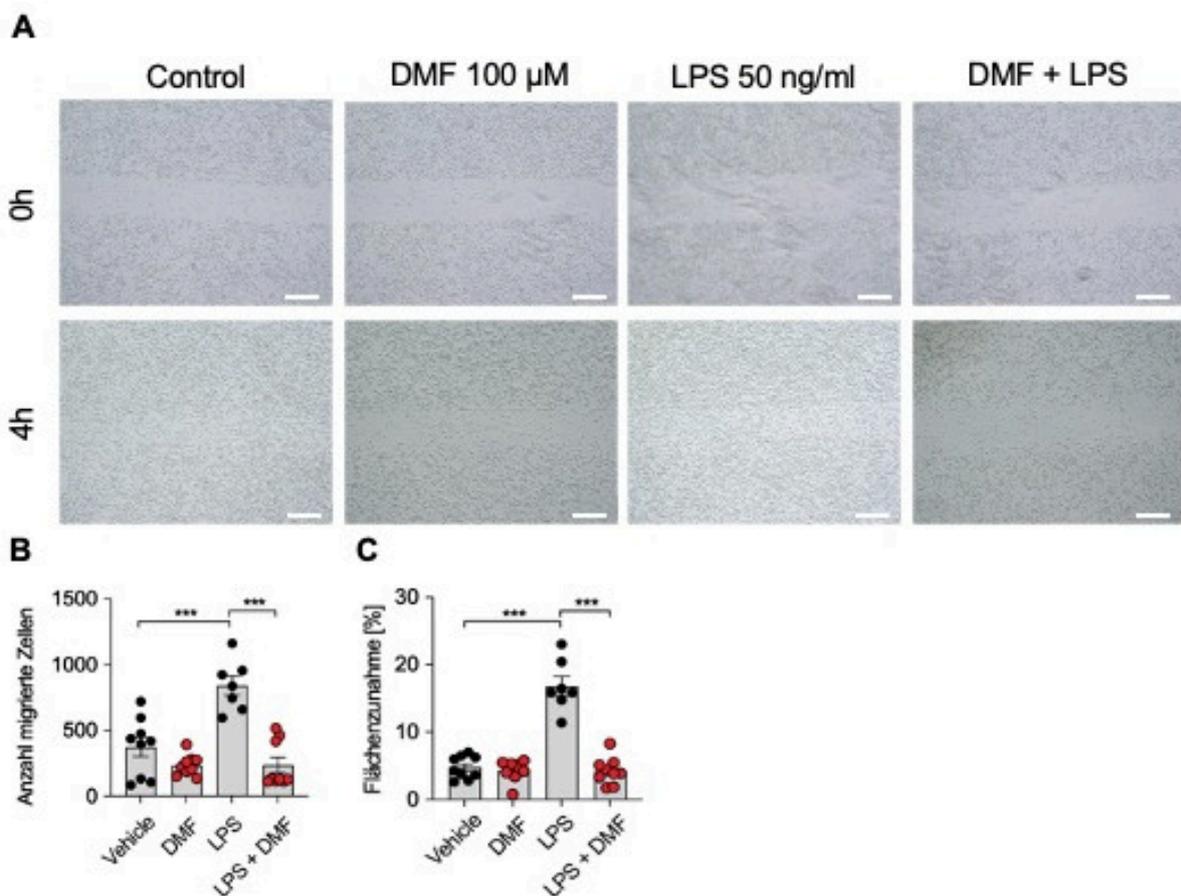
**Abb. 10:** **A** Mit DAPI angefärbte Zellkerne und durch Phalloidin-TRITC angefärbtes Zytoskelett. Maßstab: 50  $\mu$ m. **B** Gemessener Ramification Index, Area und Outline, (n = 90 Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten, Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, One-way ANOVA mit Šidák's multiple comparison test, \* =  $p < .05$ , \*\* =  $p < .01$ , \*\*\* =  $p < .001$ )

Um die Änderung der Morphologie messbar zu machen, wurden drei Parameter untersucht: der Verzweigungsindex (Ramification Index), die Fläche (Area) und der Umriss (Outline).

Sowohl Grad der Verzweigung und Fläche als auch Umriss wurde verglichen zur LPS-Bedingung durch die Zugabe von DMF signifikant erhöht, während LPS allein eine signifikante Reduktion gegenüber der Kontrolle in allen Parametern bewirkte (Abb. 10)

#### 4.2.2 Einfluss von DMF auf das Migrationsverhalten von BV-2-Mikrogliazellen

Ein weiteres Schlüsselmerkmal reaktiver Mikroglia ist ein erhöhtes Migrationsverhalten, welches, so unsere Hypothese, durch DMF reduziert werden könnte. Um dies zu beweisen, wurde dem mit Mikroglia besiedelten Boden von 6 Well-Platten eine Kratzspur zugefügt und die Wells je nach Kondition behandelt. Unmittelbar danach und nach 4 h wurden Fotos in 10-facher Vergrößerung mit einem Mikroskop angefertigt (Abb. 11A). Mit der Software ImageJ wurden Anzahl migrierter Zellen und die dadurch besiedelte Fläche gemessen und miteinander verglichen (Abschn. 3.1.8).



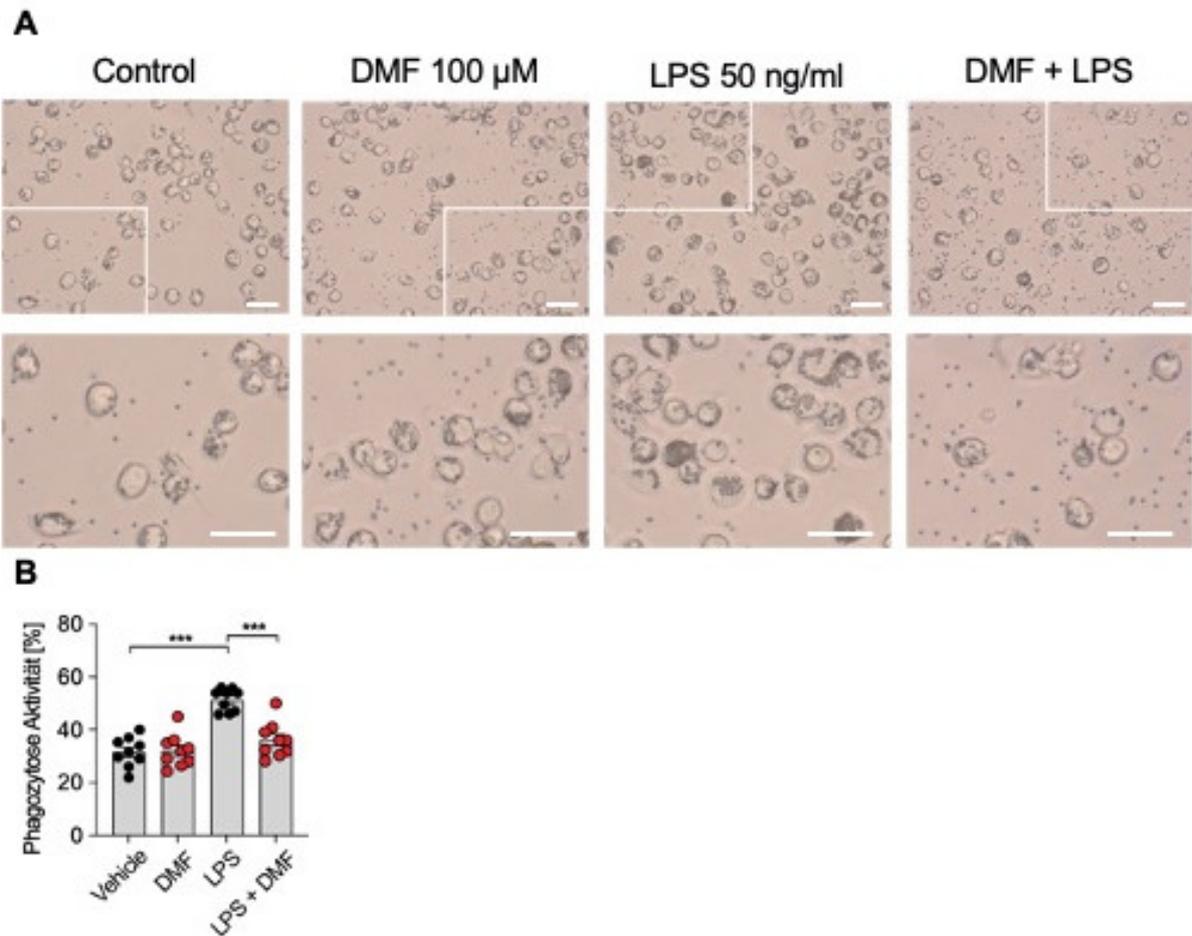
**Abb. 11:** **A** Mikrofotografien von den Zellen und dem Scratch zum Zeitpunkt des Scratches und Beginn der Stimulation und zum Zeitpunkt nach Ablauf von 4 h. Maßstab: 50 µm. **B** Anzahl der innerhalb 4 h

migrierten Zellen. **C** Zunahme der besiedelten Fläche. (n = 7-9 aus 3 unabhängigen Experimenten, Mittelwert ± Standardfehler, One-way ANOVA mit Šidák's multiple comparison test, \* =  $p < .05$ , \*\* =  $p < .01$ , \*\*\* =  $p < .001$ )

Es konnte gezeigt werden, dass DMF die Neubesiedelung des zellfreien Spaltes verlangsamt, denn nach 4 h ist die Anzahl der migrierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle unter LPS stark angestiegen, konnte aber durch DMF signifikant reduziert werden. Kohärent dazu konnte auch eine stark verminderte Flächenzunahme durch BV-2-Zellen im Spalt gemessen werden (Abb. 11).

#### 4.2.3 Effekt von DMF auf die Phagozytose-Aktivität von BV-2-Mikrogliazellen

Am Ort der Verletzung angekommen betreiben reaktivierte Mikrogliazellen übermäßig Phagozytose, der auch gesunde retinale Strukturen zum Opfer fallen können. Um den Einfluss von DMF auf die Phagozytose-Aktivität reaktiver Mikroglia zu untersuchen, wurden 2 µm große Mikropartikel den BV-2-Zellen präsentiert und die Anzahl der aufgenommenen Partikel miteinander verglichen. Es gab eine zusätzliche Kondition mit nur mit Medium behandelten Zellen. Die Ergebnisse aus dieser Gruppe wurden gemittelt und es konnten Werte für eine normale und eine gesteigerte Phagozytose Aktivität definiert werden. In diesem Versuch wurde festgelegt, dass eine Zelle mit mehr als 10 aufgenommenen Mikropartikeln als phagozytisch aktivierte Zelle gilt. Die Anzahl der Zellen mit mehr als 10 Mikropartikeln in Relation zur gesamten Zellzahl wurde als relative Phagozytose bestimmt und diente als Vergleichsparameter.



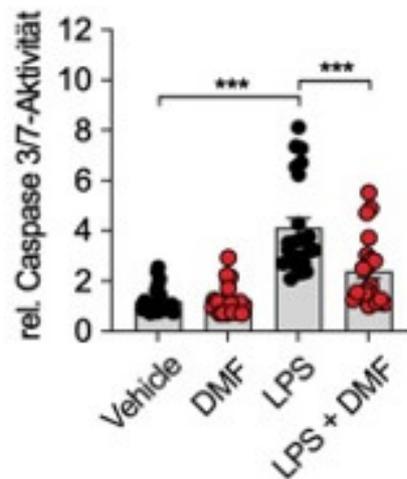
**Abb. 12:** **A** Mikrofotografien der Zellen in der jeweiligen Kondition (in 40-facher Vergrößerung). Maßstab: 50  $\mu$ m. **B** Prozentuale Phagozytose-Aktivität, (n = 9 aus 3 unabhängigen Experimenten, Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, One-way ANOVA mit Šidák's multiple comparison test, \* =  $p < .05$ , \*\* =  $p < .01$ , \*\*\* =  $p < .001$ )

Unter Stimulation mit LPS stieg die Anzahl Phagozytose-aktiver Zellen signifikant an,  $p < .001$ , aber unter DMF-Zugabe wurde sie signifikant reduziert,  $p < .001$ . Damit konnte die Annahme bestätigt werden, dass DMF neben der Morphologie und der Migration auch die Phagozytose modulieren kann (Abb. 12).

#### 4.3. Dimethylfumarat wirkt neuroprotektiv auf Fotorezeptoren

Um die Kernhypothese dieser Arbeit abschließend zu beantworten, wurde untersucht, welchen Einfluss alle bisher untersuchten Eigenschaften von DMF auf das Überleben von Fotorezeptoren haben. Dafür wurde die Caspase-Aktivität von 661-Photorezeptoren gemessen, nachdem diese mit den Zellüberständen der konditionierten BV-2-Mikrogliazellen

behandelt wurden. Diese Werte wurden dann mit den Werten aus der Gruppe verglichen, die nur mit Medium behandelt wurde.



**Abb. 13:** Relative Caspase-Aktivität, (n = 21-23 aus 3 unabhängigen Experimenten, Mittelwert ± Standardfehler, One-way ANOVA mit Šidák's multiple comparison test, \* =  $p < .05$ , \*\* =  $p < .01$ , \*\*\* =  $p < .001$ )

Es konnte gezeigt werden, dass DMF allein die Caspase-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant beeinflusst, wohingegen LPS zu einer signifikanten Steigerung führt. Dieser Effekt kann durch DMF allerdings wieder signifikant reduziert werden (Abb. 13).

## 5. Diskussion

Entzündungen und degenerative Erkrankungen im zentralen Nervensystem wie die AMD sind mitunter gekennzeichnet durch chronische Mikroglia-Reaktivität (Kwon & Koh, 2020). Die AMD ist eine progressive Erkrankung und ein weltweit führender Grund für Erblindung, doch die aktuellen Therapieoptionen gegen alle Formen der AMD sind stark limitiert (Pennington & DeAngelis, 2016). DMF hat als zugelassenes MS-Medikament in zahlreichen Studien einen positiven Effekt auf Mikrogliazellen im Gehirn gezeigt, in dem es anti-inflammatorisch, antioxidativ und neuroprotektiv wirkt (Rosito et al., 2020b). Ziel der vorliegenden Studie war es, zu eruieren, ob DMF auch in der Retina eine immunmodulatorische Wirkung auf Mikroglia zeigen könne. Dabei wurden BV-2-Mikrogliazellen *in vitro* auf ihre Reaktivität, Schlüsselfunktionen und ihren Einfluss auf 661W Fotorezeptoren untersucht.

## 5.1. Effekt von DMF auf BV-2-Mikrogliazellen und ihre Reaktivität

Zu Beginn der Untersuchungen wurden *in vitro* Viabilitätstests mit Dosierungen von 5 – 200  $\mu\text{M}$  DMF an BV-2-Mikrogliazellen durchgeführt, um festzustellen, welche nicht toxische Dosierung zur Behandlung mit DMF geeignet ist. Die Ergebnisse zeigten nach 24 h Behandlungszeit bis 150  $\mu\text{M}$  keine signifikante Reduzierung der Überlebensrate. Eine Behandlung mit 200  $\mu\text{M}$  führte zu einer signifikanten Verringerung der Viabilität. In der Literatur findet man die Verwendung von 100  $\mu\text{M}$  DMF (Paraiso et al., 2018; Pagani et al., 2020), aber auch Dosierungen im ein- bis zweistelligen Bereich (Lee et al., 2021b). Versuche unsererseits mit 10  $\mu\text{M}$  DMF-Behandlung führten nach 6, 12 und 24 h zu keinen konstanten Ergebnissen, die auf einen anti-inflammatorischen Einfluss von DMF hindeuten (s. Anhang). Wir entschieden uns auf dieser Grundlage für eine Dosierung von 100  $\mu\text{M}$  DMF.

LPS kommt in vielen Studien als Entzündungsstimulator zum Einsatz. In der Literatur sind regelmäßig Dosierungen im Bereich von 10 bis 100 ng/ml zu finden (Gomes et al., 2013; Zheng et al., 2018). Die durchgeführten Untersuchungen zur Genexpression zeigten, dass 50 ng/ml LPS über den NF- $\kappa\text{B}$ -Transkriptionsfaktor die Expression diverser Entzündungsmediatoren initiiert. Folglich wurden die Mikrogliazellen in den vorliegenden Untersuchungen mit 50 ng/ml LPS stimuliert. Die Analyse der Genexpression zeigte, dass DMF die Expression von *Il-6*, *Il-1 $\beta$* , *Tnf*, *Ccl2* und *iNos* nach 6 h signifikant gesenkt hat. Das passt zu der vorherrschenden Studienlage, denn viele andere Arbeiten spiegeln seit geraumer Zeit ähnliche Ergebnisse wider (Rosito et al., 2020b; Wilms et al., 2010). In der Studie von Wilms (Wilms et al., 2010) senkte DMF ebenfalls die Expression pro-inflammatorischer Gene nach 6 h.

Weiter wurde die Konzentration von Nitrit als messbarer Metabolit von NO in den Überständen der konditionierten Mikrogliazellen gemessen. NO spielt eine Rolle während der Entzündung, da es als zytotoxisch gilt und außerdem die Expression pro-inflammatorischer Gene weiter anfeuert (Wilms et al., 2010). Ziel war es zu untersuchen, ob LPS einen Einfluss auf die NO-Produktion hat und ob DMF diese wieder senken kann. Diese Annahme konnten wir mit den Ergebnissen des Griess-Testes nach 12 h Inkubationszeit bestätigen. *iNos* gilt hierbei als ursächlich, weshalb es sich anbot, dieses Enzym auf Transkriptionsebene quantitativ zu untersuchen. Kohärent zu den vorherigen Erkenntnissen, war auch das Expressionslevel von *iNOS* durch LPS-Stimulation signifikant erhöht und durch den die Zugabe von DMF signifikant reduziert. Wie auch in anderen Arbeiten beschrieben, liegt es nahe, dass diese Ereignisse mit der Fähigkeit von DMF, den NF- $\kappa\text{B}$ -Signalweg zu hemmen und den NRF2-Signalweg positiv zu beeinflussen, zusammenhängen (Giustina et al., 2018; Rosito et al., 2020b; Wilms et al., 2010).

Eine ELISA-Analyse zeigte, dass DMF die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen unter Einfluss von LPS-Stimulation unterdrückt und damit eine entzündungshemmende Wirkung auf Sekretionsebene entfaltet. Untersucht wurden hier Ccl2, Il-6 und Tnf, die eine zentrale Rolle bei der Regulierung von Entzündungsreaktionen spielen. Das Chemokin Ccl2 fungiert als Signalmolekül und navigiert weitere Immunzellen an die Entzündungsstelle im Gewebe. IL-6 ist maßgeblich an der Aktivierung von Abwehrzellen beteiligt und ist als wichtiger Mediator für die Entwicklung und Aufrechterhaltung der Funktion des ZNS angesehen. Dabei kann Il-6 schadhafte oder protektive Auswirkungen haben, was davon abhängt, ob es zu einer überschießenden Immunreaktion nach Reiz oder Verletzung von Gewebe kommt oder ob homöostatische Bedingungen vorherrschen (Kummer et al., 2021). Tnf ist ein Zytokin, das unter anderem die Immunantwort moduliert, Fieber induziert, Apoptose initiiert und mit der Entstehung und Progression von neurodegenerativen Erkrankungen wie Parkinson in Verbindung steht (McCoy et al., 2011). DMF konnte die Produktion von Ccl2, Il-6 und Tnf signifikant senken, was wiederum auf seinen positiven Einfluss auf den NF- $\kappa$ B-Signalweg und folglich auf die Genexpression zurückzuführen ist. Die gemessene Zytokinkonzentration im Zellüberstand wurde allerdings nicht auf das Referenzniveau unbehandelter Zellen aus der Kontrollgruppe gesenkt. McGuire hingegen konnte in seiner Arbeit zeigen, dass die Zytokinproduktion von TNF und IL-6 nach 12 h wieder auf das Ausgangsniveau gesunken ist. Hier wurde DMF bereits 4 h vor der LPS-Stimulation eingesetzt (McGuire et al., 2016). In der vorliegenden Arbeit wurde keine Vorbehandlung durchgeführt, was eine mögliche Erklärung für die abweichenden Ergebnisse sein könnte.

In weiteren Schritten wurde die Lokalisation des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B beobachtet, indem seine Untereinheit p65 angefärbt wurde. Der Aktivierungsmechanismus von NF- $\kappa$ B kann durch unterschiedliche Stimuli, in der vorliegenden Arbeit durch LPS, ausgelöst werden. Während im Ruhestadium NF- $\kappa$ B vorwiegend im Zytosol vorkommt und dort an Inhibitoren gebunden ist, kommt es bei Aktivierung durch Proteinkinasen zu dessen Liberation, was eine Translokation in den Zellkern ermöglicht. Dort kodiert NF- $\kappa$ B für pro-inflammatorische Gene. Wir postulierten, dass DMF diese Translokation von NF- $\kappa$ B verhindert und das gemessene nukleäre p65 unter DMF-Behandlung reduziert ist. Es stellte sich heraus, dass DMF allein den nukleären Anteil von p65 nicht signifikant erhöhte, wohingegen LPS zu einer signifikanten Steigerung des gemessenen p65 im Zellkern führte. Durch Zugabe von DMF konnte die LPS-induzierte Steigerung jedoch wieder signifikant reduziert werden. Eine Studie, die sich mit dem NF- $\kappa$ B-Signalweg bei Brustkrebs auseinandergesetzt hat, hat den Wirkmechanismus von DMF mit einer kovalenten Bindung an p65 erklärt, was die Translokation blockiert (Kastrati et al., 2016). Mittlerweile weiß man auch, dass auf Transkriptionsebene DMF zu einer Reduktion der NF- $\kappa$ B p65 Genexpression führt (Li et al., 2020).

Nachdem der hemmende Effekt von DMF auf die pro-inflammatorische Genexpression deutlich wurde, konnte beobachtet werden, dass auch anti-inflammatorische und anti-oxidative Gene signifikant stärker exprimiert werden, wenn die Zellen mit DMF oder LPS und DMF behandelt wurden. Das war bei den Genen *CAT1*, *HMOX1* und *NQO1* zu beobachten. LPS allein beeinflusste die Expression dieser Gene nicht wesentlich. Das verdeutlicht die entzündungshemmende Wirkung von DMF, die über eine rein anti-inflammatorische Wirkung hinausgeht. Denn diese Gene kodieren für Enzyme, die eine wichtige Rolle für das oxidative Gleichgewicht spielen. Cat1 ist wichtig für die Neutralisierung von Wasserstoffperoxid, welches zu den reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) gehört. HMOX1 ist von zentraler Bedeutung bei der Degradation von Häm, einem potenten ROS-Aktivator. Seine Abbauprodukte Bilirubin und Biliverdin, sowie Kohlenmonoxid wirken ebenfalls antioxidativ (Jansen & Daiber, 2012; Tadros & Sabanegh, 2019). NQO1 hilft bei der Zellentgiftung und schützt ebenfalls vor oxidativem Stress, indem es freie Radikale unschädlich macht und anti-inflammatorische Signalwege beeinflusst. Dazu gehört unter anderem der NRF2-KEAP1-ARE-NQO1-Signalweg, wodurch auch andere antioxidative und anti-inflammatorische Gene wie *HMOX1* und die Glutathion-S-Transferase (*GST*) aktiviert werden (Yuhan et al., 2024). Interessanterweise konnten wir nach 6 h Inkubation keinen positiven Effekt auf die Gene *NRF2* und *SOD2* feststellen. NRF2 ist ein Transkriptionsfaktor, der eine entscheidende Funktion in der Regulierung der Entzündungsreaktion und der Redox-Homöostase hat (Cuadrado et al., 2019). Weiter sind die NRF2-Zielgene involviert in der Glutathionsynthese, Zellentgiftung, Autophagie, Eisentransport und -speicherung, sowie im Lipid- und Kohlenhydratstoffwechsel (W.-T. Chen & Dodson, 2023). Dadurch wird die Tragweite dieses Transkriptionsfaktors für die Balance von Entzündung und Immunabwehr im Organismus deutlich und umso erstaunlicher ist die fehlende positive Wirkung von DMF in diesem Versuchsabschnitt. Als möglichen Grund lässt sich hier die geringe Inkubationszeit von 6 h anführen. Es wäre denkbar, dass erst nach 12 oder 24 h ein signifikanter Unterschied messbar würde, da den Änderungen in der Genexpression komplexe Mechanismen zu Grunde liegen. LPS allein löste sowohl bei NRF2 als auch bei SOD2 einen Anstieg der Expression aus. Manai et al. haben 2022 in einer Studie herausgefunden, dass nach 6 h Inkubationszeit zwar die Proteinlevel von NRF2 im Western Blot signifikant erhöht waren, die Expression aber unverändert blieb. Die Autoren gehen davon aus, dass DMF einer Degradierung von NRF2 entgegenwirkt und dass dieser Effekt sich schneller bemerkbar macht, als eine Veränderung auf Transkriptionsebene (Manai et al., 2022). Zu erwähnen ist an dieser Stelle, dass Manai et al., 2022 humane retinale Epithelzellen (RPE-Zellen) und keine Mikrogliazellen untersucht hat. Allerdings sind beide Zelltypen als Teile des ZNS an der Immunantwort und Aufrechterhaltung der Homöostase beteiligt.

## 5.2. Effekt von DMF auf wichtige Schlüsselfunktionen von Mikroglia

Um die Untersuchungen zu den potenziellen therapeutischen Möglichkeiten von DMF auszuweiten, haben wir uns mit zentralen Funktionen der Mikrogliazellen auseinandergesetzt, der Migration und der Phagozytose. Diese Aufgaben sind Teil einer adäquaten Immunantwort, wobei eine ungedämpfte Reaktion auch Gewebe schädigen kann. Der Untergang von Gewebe und Nervenzellen ist kennzeichnend für neurodegenerative Erkrankungen, so auch für die AMD. Migration setzt eine variable Gestalt der Zellen voraus, was die Wanderung durch das Gewebe bzw. durch die Schichten der Retina ermöglicht. Kommt es zu einem ausreichenden Stimulus durch LPS, so zieht die Zelle ihre Filopodien ein und geht in einen Modus der amöboiden Fortbewegung. Deshalb wurde die Morphologie zu Beginn dieses Versuchsabschnittes evaluiert. Dabei hat sich gezeigt, dass LPS den Ramification-Index (Verzweigungsindex) signifikant reduziert, wohingegen DMF keine signifikante Veränderung zur Kontrollgruppe bewirkte. Behandelte man die Zellen mit LPS und DMF, so konnte man eine signifikante Steigerung des Ramification-Index im Vergleich zur LPS-Gruppe messen. Gleiches fand man in den Messungen zur Fläche und zum Umriss der Mikrogliazellen. Die Ergebnisse legen nahe, dass DMF dabei helfen kann, die Ursprungsform der Zellen im Ruhezustand wiederherzustellen. Eine Studie aus 2018 bestätigt, dass 100  $\mu$ M DMF einer LPS induzierten Formveränderung entgegenwirkt (Paraiso et al., 2018). Unsere Untersuchungen zum Migrationsverhalten von Mikrogliazellen zeigten einen signifikanten LPS-bedingten Anstieg. Außerdem senkte DMF die Migrationsaktivität signifikant auf das Ausgangsniveau herab. Chen et al. beschrieben 2014, dass DMF die Transmigration von Makrophagen in das Rückenmark reduzierte, was typischerweise Bestandteil eines MS-Krankheitsverlaufs ist (H. Chen et al., 2014). Vor wenigen Jahren konnte eine weitere Studie belegen, dass DMF die Migration von diversen Abwehrzellen einschränkt (Najjar et al., 2020). Weitere Untersuchungen brachten die Erkenntnis, dass DMF ebenfalls das Phagozytose-Verhalten von Mikrogliazellen signifikant dämpft. Das hat einen entscheidenden Einfluss auf die Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen und unterstreicht die entzündungshemmende Eigenschaft von DMF. In der Literatur findet man sowohl Ergebnisse, die DMF mit einer Verringerung der Phagozytose-Aktivität in Verbindung bringen (Pagani et al., 2020), als auch welche, die DMF als Phagozytose fördernd beschreiben (Lee et al., 2021b). Eine weitere Studie beschreibt keinen signifikanten Einfluss von DMF auf primäre Mikroglia (Kronenberg et al., 2019). Ob das als positiv oder negativ zu bewerten ist, hängt davon ab, welches Verhalten von Mikrogliazellen und anderen Abwehrzellen erwünscht ist. In einem akuten oder subakuten Prozess beispielsweise durch ein Trauma ist es von großer Wichtigkeit, dass Immunzellen schnell auf das Geschehen reagieren. Dass sie zügig zum Ort der Läsion wandern, dort pathogene Mikroorganismen und Zell- und Gewebetrümmer beseitigen. In einem chronischen neurodegenerativen Prozess wie der AMD oder der MS sind es die

langanhaltenden überschießenden Reaktionen der Mikroglia, die neurotoxische und entzündungsfördernde Stoffe freisetzen und den Krankheitsverlauf erschweren können (Liu & Pope, 2004). Darum ist es von herausragender Bedeutung diese Immunantwort zu modulieren.

### 5.3. Bedeutung für die Fotorezeptoren

Die vorliegenden Ergebnisse haben uns auf den Schwerpunkt dieser Arbeit gelenkt: die potenzielle Neuroprotektion durch Immunmodulation. Trotz vielversprechender Hinweise aus den vorangegangenen Versuchen war es notwendig, Fotorezeptoren genauer zu untersuchen, um die Forschungsfrage abschließend beantworten zu können. Apoptose von Fotorezeptoren wird unter anderem durch Caspasen vermittelt, einer Familie von Endoproteasen. Sie lassen sich grob in zwei Gruppen einteilen: in entzündungsregulierende Caspasen und in Caspasen, die für die Apoptose eine wichtige Rolle spielen (McIlwain et al., 2013). Zur letzteren gehört die Caspase-3, die in diesem letzten Versuchsabschnitt analysiert wurde. Dabei wurden 661W-Photorezeptoren mit konditionierten BV-2-Überständen behandelt. Die Ergebnisse sagen aus, dass DMF die gesteigerte LPS-induzierte Caspase-Aktivität wieder signifikant herabsenkt, wobei eine Behandlung nur mit DMF keine signifikante Veränderung hervorruft. Das bestätigt die Hypothese, dass DMF Fotorezeptoren schützt. Hier muss man aber von einem indirekten Einfluss sprechen, weil der Effekt auf die Fotorezeptoren durch eine Modulierung der Mikroglia bzw. deren Sekretionsverhalten zustande kommt. Es gilt zu erwähnen, dass das in den Überständen enthaltene LPS und DMF auch einen direkten Einfluss auf die Fotorezeptoren haben könnte. Eine andere Arbeit, die sich ebenfalls mit der Neuroprotektion von DMF beschäftigt hat, zeigte, dass 100  $\mu$ M DMF einen positiven Einfluss auf das Apoptose-Verhalten von hippocampalen Neuronen hat (Paraiso et al., 2018). Eine weitere Studie beschreibt, dass DMF auch die Sterblichkeit von Tumorzellen reguliert. Dabei wird durch DMF aber gezielt Apoptose induziert, um einem Wachstum des Tumors entgegenzuwirken (Nicolay et al., 2016). Das unterstreicht den Stellenwert der Immunmodulation und die vielfältigen Einsatzmöglichkeiten von DMF.

## 6. Literaturverzeichnis

1. al-Ubaidi, M. R., Font, R. L., Quiambao, A. B., Keener, M. J., Liou, G. I., Overbeek, P. A., & Baehr, W. (1992). Bilateral retinal and brain tumors in transgenic mice expressing simian virus 40 large T antigen under control of the human interphotoreceptor retinoid-binding protein promoter. *Journal of Cell Biology*, 119(6), 1681–1687. <https://doi.org/10.1083/jcb.119.6.1681>
2. Armstrong, R. A., & Mousavi, M. (2015). Overview of Risk Factors for Age-Related Macular Degeneration (AMD). *Journal of Stem Cells*, 10(3), 171–191.
3. Bachiller, S., Jiménez-Ferrer, I., Paulus, A., Yang, Y., Swanberg, M., Deierborg, T., & Boza-Serrano, A. (2018). Microglia in Neurological Diseases: A Road Map to Brain-Disease Dependent-Inflammatory Response. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2018.00488>
4. Banati, R. B., Egensperger, R., Maassen, A., Hager, G., Kreutzberg, G. W., & Graeber, M. B. (2004). Mitochondria in activated microglia in vitro. *Journal of Neurocytology*, 33(5), 535–541. <https://doi.org/10.1007/s11068-004-0515-7>
5. Beaino, W., Janssen, B., Vugts, D. J., de Vries, H. E., & Windhorst, A. D. (2021). Towards PET imaging of the dynamic phenotypes of microglia. *Clinical and Experimental Immunology*, 206(3), 282–300. <https://doi.org/10.1111/cei.13649>
6. Bear, M. F., Connors, B. W., & Paradiso, M. A. (2018). *Neurowissenschaften: Ein grundlegendes Lehrbuch für Biologie, Medizin und Psychologie*. Springer-Verlag.
7. Blasi, E., Barluzzi, R., Bocchini, V., Mazzolla, R., & Bistoni, F. (1990). Immortalization of murine microglial cells by a v-raf / v-myc carrying retrovirus. *Journal of Neuroimmunology*, 27(2–3), 229–237. [https://doi.org/10.1016/0165-5728\(90\)90073-V](https://doi.org/10.1016/0165-5728(90)90073-V)
8. Bohlen, C. J., Friedman, B. A., Dejanovic, B., & Sheng, M. (2019). Microglia in Brain Development, Homeostasis, and Neurodegeneration. *Annual Review of Genetics*, 53, 263–288. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-112618-043515>
9. Bowmaker, J. K., & Dartnall, H. J. (1980). Visual pigments of rods and cones in a human retina. *The Journal of Physiology*, 298, 501–511. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1980.sp013097>
10. Breiner, T. C. (2019). Physiologie des Auges. In T. C. Breiner (Hrsg.), *Farb- und Formpsychologie* (S. 9–30). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-57870-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-662-57870-4_2)
11. Bringmann, A., & Reichenbach, A. (2001). Role of Muller cells in retinal degenerations. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 6, E72-92. <https://doi.org/10.2741/bringman>
12. Brück, J., Dringen, R., Amasuno, A., Pau-Charles, I., & Ghoreschi, K. (2018). A review of the mechanisms of action of dimethylfumarate in the treatment of psoriasis. *Experimental Dermatology*, 27(6), 611–624. <https://doi.org/10.1111/exd.13548>
13. Chapot, C. A., Euler, T., & Schubert, T. (2017). How do horizontal cells ‘talk’ to cone photoreceptors? Different levels of complexity at the cone-horizontal cell synapse: How do horizontal cells ‘talk’ to cone photoreceptors? *The Journal of Physiology*, 595(16), 5495–5506. <https://doi.org/10.1113/JP274177>
14. Chen, H., Assmann, J. C., Krenz, A., Rahman, M., Grimm, M., Karsten, C. M., Köhl, J., Offermanns, S., Wettschureck, N., & Schwaninger, M. (2014). Hydroxycarboxylic acid receptor 2 mediates dimethyl fumarate’s protective effect in EAE. *The Journal of Clinical Investigation*, 124(5), 2188–2192. <https://doi.org/10.1172/JCI72151>
15. Chen, W.-T., & Dodson, M. (2023). The untapped potential of targeting NRF2 in neurodegenerative disease. *Frontiers in Aging*, 4. <https://doi.org/10.3389/fragi.2023.1270838>
16. Colonna, M., & Butovsky, O. (2017). Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annual review of immunology*, 35, 441–468. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052358>
17. Cuadrado, A., Rojo, A. I., Wells, G., Hayes, J. D., Cousin, S. P., Rumsey, W. L., Attucks, O. C., Franklin, S., Levonen, A.-L., Kensler, T. W., & Dinkova-Kostova, A. T. (2019).

- Therapeutic targeting of the NRF2 and KEAP1 partnership in chronic diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 18(4), 295–317. <https://doi.org/10.1038/s41573-018-0008-x>
18. Cunha-Vaz, J., Bernardes, R., & Lobo, C. (2011). Blood-retinal barrier. *European Journal of Ophthalmology*, 21 Suppl 6, S3-9. <https://doi.org/10.5301/EJO.2010.6049>
  19. Dermitzakis, I., Manthou, M. E., Meditskou, S., Tremblay, M.-È., Petratos, S., Zoupi, L., Boziki, M., Kesidou, E., Simeonidou, C., & Theotokis, P. (2023). Origin and Emergence of Microglia in the CNS—An Interesting (Hi)story of an Eccentric Cell. *Current Issues in Molecular Biology*, 45(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/cimb45030171>
  20. Devanney, N. A., Stewart, A. N., & Gensel, J. C. (2020). Microglia and macrophage metabolism in CNS injury and disease: The role of immunometabolism in neurodegeneration and neurotrauma. *Experimental Neurology*, 329, 113310. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113310>
  21. Diskin, C., Zotta, A., Corcoran, S. E., Tyrrell, V. J., Zaslona, Z., O'Donnell, V. B., & O'Neill, L. A. J. (2021). 4-Octyl-Itaconate and Dimethyl Fumarate Inhibit COX2 Expression and Prostaglandin Production in Macrophages. *The Journal of Immunology*, ji2100488. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2100488>
  22. Dumas, A. A., Borst, K., & Prinz, M. (2021). Current tools to interrogate microglial biology. *Neuron*, 109(18), 2805–2819. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.07.004>
  23. Emina Colak, Nada Majkic-Singh, Lepša Žoric, Aleksandra Radosavljevic, & Natalija Kosanovic-Jakovic. (2012). The impact of inflammation to the antioxidant defense parameters in AMD patients. *Aging Clinical and Experimental Research*, 24(6). <https://doi.org/10.3275/8593>
  24. Fan, W., Huang, W., Chen, J., Li, N., Mao, L., & Hou, S. (2022). Retinal microglia: Functions and diseases. *Immunology*, 166(3), 268–286. <https://doi.org/10.1111/imm.13479>
  25. Fleckenstein, M., Keenan, T. D. L., Guymer, R. H., Chakravarthy, U., Schmitz-Valckenberg, S., Klaver, C. C., Wong, W. T., & Chew, E. Y. (2021). Age-related macular degeneration. *Nature Reviews. Disease Primers*, 7(1), 31. <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00265-2>
  26. Gafson, A. R., Savva, C., Thorne, T., David, M., Gomez-Romero, M., Lewis, M. R., Nicholas, R., Heslegrave, A., Zetterberg, H., & Matthews, P. M. (2019). Breaking the cycle: Reversal of flux in the tricarboxylic acid cycle by dimethyl fumarate. *Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation*, 6(3), e562. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000562>
  27. Garcia-Hernandez, R., Cerdán Cerdá, A., Trouve Carpena, A., Drakesmith, M., Koller, K., Jones, D. K., Canals, S., & De Santis, S. (2022). Mapping microglia and astrocyte activation in vivo using diffusion MRI. *Science Advances*, 8(21), eabq2923. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abq2923>
  28. 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. (2010). Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages. *Science*, 330(6005), 841–845. <https://doi.org/10.1126/science.1194637>
  29. Giustina, A. D., Bonfante, S., Zarbato, G. F., Danielski, L. G., Mathias, K., De Oliveira, A. N., Garbossa, L., Cardoso, T., Fileti, M. E., De Carli, R. J., Goldim, M. P., Barichello, T., & Petronilho, F. (2018). Dimethyl Fumarate Modulates Oxidative Stress and Inflammation in Organs After Sepsis in Rats. *Inflammation*, 41(1), 315–327. <https://doi.org/10.1007/s10753-017-0689-z>
  30. Gomes, C., Ferreira, R., George, J., Sanches, R., Rodrigues, D. I., Gonçalves, N., & Cunha, R. A. (2013). Activation of microglial cells triggers a release of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) inducing their proliferation in an adenosine A2A receptor-dependent manner: A2A receptor blockade prevents BDNF release and proliferation of microglia. *Journal of Neuroinflammation*, 10(1), 780. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-10-16>
  31. González Ibanez, F., Picard, K., Bordeleau, M., Sharma, K., Bisht, K., & Tremblay, M.-È. (2019). Immunofluorescence Staining Using IBA1 and TMEM119 for Microglial Density, Morphology and Peripheral Myeloid Cell Infiltration Analysis in Mouse Brain.

- Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 152. <https://doi.org/10.3791/60510>
32. Grajewski, R. (2021). *FAQ Augenheilkunde*. Elsevier Health Sciences.
  33. Grehn, F. (2019). *Augenheilkunde*. Springer-Verlag.
  34. Gudgeon, N., Munford, H., Bishop, E. L., Hill, J., Fulton-Ward, T., Bending, D., Roberts, J., Tennant, D. A., & Dimeloe, S. (2022). Succinate uptake by T cells suppresses their effector function via inhibition of mitochondrial glucose oxidation. *Cell Reports*, 40(7), 111193. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111193>
  35. Guo, L., Choi, S., Bikkannavar, P., & Cordeiro, M. F. (2022). Microglia: Key Players in Retinal Ageing and Neurodegeneration. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 16, 804782. <https://doi.org/10.3389/fncel.2022.804782>
  36. Harry, G. J. (2013). Microglia during development and aging. *Pharmacology & Therapeutics*, 139(3), 313–326. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.04.013>
  37. Harvey, P. T. (2003). Common Eye Diseases of Elderly People: Identifying and Treating Causes of Vision Loss. *Gerontology*, 49(1), 1–11. <https://doi.org/10.1159/000066507>
  38. Hejtmančík, J. F., & Nickerson, J. M. (2015). Overview of the Visual System. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Bd. 134, S. 1–4). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2015.05.006>
  39. Henn, A., Lund, S., Hedtjárn, M., Schratzenholz, A., Pörzgen, P., & Leist, M. (2009). The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation. *ALTEX*, 26(2), 83–94. <https://doi.org/10.14573/altex.2009.2.83>
  40. Hoffmann, C., Dietrich, M., Herrmann, A.-K., Schacht, T., Albrecht, P., & Methner, A. (2017, Januar 1). *Dimethyl Fumarate Induces Glutathione Recycling by Upregulation of Glutathione Reductase* [Research Article]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*; Hindawi. <https://doi.org/10.1155/2017/6093903>
  41. Hoon, M., Okawa, H., Della Santina, L., & Wong, R. O. L. (2014). Functional architecture of the retina: Development and disease. *Progress in Retinal and Eye Research*, 42, 44–84. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2014.06.003>
  42. Hosseini, A., Masjedi, A., Baradaran, B., Hojjat-Farsangi, M., Ghalamfarsa, G., Anvari, E., & Jadidi-Niaragh, F. (2019). Dimethyl fumarate: Regulatory effects on the immune system in the treatment of multiple sclerosis. *Journal of Cellular Physiology*, 234(7), 9943–9955. <https://doi.org/10.1002/jcp.27930>
  43. Hu, Z., Mao, X., Chen, M., Wu, X., Zhu, T., Liu, Y., Zhang, Z., Fan, W., Xie, P., Yuan, S., & Liu, Q. (2022). Single-Cell Transcriptomics Reveals Novel Role of Microglia in Fibrovascular Membrane of Proliferative Diabetic Retinopathy. *Diabetes*, 71(4), 762–773. <https://doi.org/10.2337/db21-0551>
  44. Jager, R. D. (2008). Age-Related Macular Degeneration. *N Engl J Med*, 12.
  45. Jansen, T., & Daiber, A. (2012). Direct Antioxidant Properties of Bilirubin and Biliverdin. Is there a Role for Biliverdin Reductase? *Frontiers in Pharmacology*, 3, 30. <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00030>
  46. Jonas, J. B., Schneider, U., & Naumann, G. O. H. (1992). Count and density of human retinal photoreceptors. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 230(6), 505–510. <https://doi.org/10.1007/BF00181769>
  47. Junqueira, L. C., & Carneiro, J. (2013). *Histologie: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. Unter Berücksichtigung der Histophysiologie*. Springer-Verlag.
  48. Kaplan, H. J. (2007). Anatomy and function of the eye. *Chemical Immunology and Allergy*, 92, 4–10. <https://doi.org/10.1159/000099236>
  49. Karlstetter, M., Scholz, R., Rutar, M., Wong, W. T., Provis, J. M., & Langmann, T. (2015). Retinal microglia: Just bystander or target for therapy? *Progress in Retinal and Eye Research*, 45, 30–57. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2014.11.004>
  50. Kastrati, I., Siklos, M. I., Calderon-Gierszal, E. L., El-Shennawy, L., Georgieva, G., Thayer, E. N., Thatcher, G. R. J., & Frasor, J. (2016). Dimethyl Fumarate Inhibits the Nuclear Factor κB Pathway in Breast Cancer Cells by Covalent Modification of p65 Protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 291(7), 3639–3647.

- <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.679704>
51. Kellner, U., Heimann, H., Wachtlin, J., & Lommatzsch, A. P. (2020). *Atlas des Augenhintergrundes*. Georg Thieme Verlag.
  52. Kigerl, K. A., de Rivero Vaccari, J. P., Dietrich, W. D., Popovich, P. G., & Keane, R. W. (2014). Pattern recognition receptors and central nervous system repair. *Experimental neurology*, 258, 5–16. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.01.001>
  53. Kornberg, M. D., Bhargava, P., Kim, P. M., Putluri, V., Snowman, A. M., Putluri, N., Calabresi, P. A., & Snyder, S. H. (2018). Dimethyl fumarate targets GAPDH and aerobic glycolysis to modulate immunity. *Science*, 360(6387), 449–453. <https://doi.org/10.1126/science.aan4665>
  54. Kronenberg, J., Pars, K., Brieskorn, M., Prajeeth, C. K., Heckers, S., Schwenkenbecher, P., Skripuletz, T., Pul, R., Pavlou, A., & Stangel, M. (2019). Fumaric Acids Directly Influence Gene Expression of Neuroprotective Factors in Rodent Microglia. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2), 325. <https://doi.org/10.3390/ijms20020325>
  55. Kummer, K. K., Zeidler, M., Kalpachidou, T., & Kress, M. (2021). Role of IL-6 in the regulation of neuronal development, survival and function. *Cytokine*, 144, 155582. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2021.155582>
  56. Kwon, H. S., & Koh, S.-H. (2020). Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: The roles of microglia and astrocytes. *Translational Neurodegeneration*, 9(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s40035-020-00221-2>
  57. Lee, Y.-S., Gupta, D. P., Park, S. H., Yang, H.-J., & Song, G. J. (2021a). Anti-Inflammatory Effects of Dimethyl Fumarate in Microglia via an Autophagy Dependent Pathway. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 612981. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.612981>
  58. Lee, Y.-S., Gupta, D. P., Park, S. H., Yang, H.-J., & Song, G. J. (2021b). Anti-Inflammatory Effects of Dimethyl Fumarate in Microglia via an Autophagy Dependent Pathway. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 612981. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.612981>
  59. Li, S., Takasu, C., Lau, H., Robles, L., Vo, K., Farzaneh, T., Vaziri, N. D., Stamos, M. J., & Ichii, H. (2020). Dimethyl Fumarate Alleviates Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis, through the Activation of Nrf2-Mediated Antioxidant and Anti-inflammatory Pathways. *Antioxidants*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/antiox9040354>
  60. Litjens, N. H. R., van Strijen, E., van Gulpen, C., Mattie, H., van Dissel, J. T., Thio, H. B., & Nibbering, P. H. (2004). In vitro pharmacokinetics of anti-psoriatic fumaric acid esters. *BMC Pharmacology*, 4, 22. <https://doi.org/10.1186/1471-2210-4-22>
  61. Liu, H., & Pope, R. M. (2004). Phagocytes: Mechanisms of inflammation and tissue destruction. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, 30(1), 19–39. [https://doi.org/10.1016/S0889-857X\(03\)00107-8](https://doi.org/10.1016/S0889-857X(03)00107-8)
  62. Loppnow, H. (2001). Zytokine: Klassifikation, Rezeptoren, Wirkungsmechanismen: *Der Internist*, 42(1), 13–27. <https://doi.org/10.1007/s001080050720>
  63. Lu, Y.-C., Yeh, W.-C., & Ohashi, P. S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, 42(2), 145–151. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.01.006>
  64. Makabe, K., Sugita, S., Mandai, M., Futatsugi, Y., & Takahashi, M. (2020). Microglia dynamics in retinitis pigmentosa model: Formation of fundus whitening and autofluorescence as an indicator of activity of retinal degeneration. *Scientific Reports*, 10(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71626-2>
  65. Manai, F., Govoni, S., & Amadio, M. (2022). The Challenge of Dimethyl Fumarate Repurposing in Eye Pathologies. *Cells*, 11(24), 4061. <https://doi.org/10.3390/cells11244061>
  66. Mannu, G. S. (2014). Retinal phototransduction. *Neurosciences*, 19(4), 275–280.
  67. Masland, R. H. (2012). The Neuronal Organization of the Retina. *Neuron*, 76(2), 266–280. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.10.002>
  68. Masuda, T., Sankowski, R., Staszewski, O., & Prinz, M. (2020). Microglia Heterogeneity in the Single-Cell Era. *Cell Reports*, 30(5), 1271–1281. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.01.010>

69. McCoy, M. K., Ruhn, K. A., Blesch, A., & Tansey, M. G. (2011). TNF: A Key Neuroinflammatory Mediator of Neurotoxicity and Neurodegeneration in Models of Parkinson's Disease. In D. Wallach, A. Kovalenko, & M. Feldmann (Hrsg.), *Advances in TNF Family Research* (Bd. 691, S. 539–540). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6612-4\\_56](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6612-4_56)
70. McGuire, V. A., Ruiz-Zorrilla Diez, T., Emmerich, C. H., Strickson, S., Ritorto, M. S., Sutavani, R. V., Weiß, A., Houslay, K. F., Knebel, A., Meakin, P. J., Phair, I. R., Ashford, M. L. J., Trost, M., & Arthur, J. S. C. (2016). Dimethyl fumarate blocks pro-inflammatory cytokine production via inhibition of TLR induced M1 and K63 ubiquitin chain formation. *Scientific Reports*, 6, 31159. <https://doi.org/10.1038/srep31159>
71. McIlwain, D. R., Berger, T., & Mak, T. W. (2013). Caspase Functions in Cell Death and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(4), a008656. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008656>
72. Mills, E. A., Ogradnik, M. A., Plave, A., & Mao-Draayer, Y. (2018). Emerging Understanding of the Mechanism of Action for Dimethyl Fumarate in the Treatment of Multiple Sclerosis. *Frontiers in Neurology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00005>
73. Moharregg-Khiabani, D., Linker, R., Gold, R., & Stangel, M. (2009). Fumaric Acid and its Esters: An Emerging Treatment for Multiple Sclerosis. *Current Neuropharmacology*, 7(1), 60–64. <https://doi.org/10.2174/157015909787602788>
74. Muñoz-Castro, C., Noori, A., Magdamo, C. G., Li, Z., Marks, J. D., Frosch, M. P., Das, S., Hyman, B. T., & Serrano-Pozo, A. (2022). Cyclic multiplex fluorescent immunohistochemistry and machine learning reveal distinct states of astrocytes and microglia in normal aging and Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation*, 19(1), 30. <https://doi.org/10.1186/s12974-022-02383-4>
75. Murugan, M., Ling, E.-A., & Kaur, C. (2013). Glutamate receptors in microglia. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*, 12(6), 773–784. <https://doi.org/10.2174/18715273113126660174>
76. Najjar, E., Staun-Ram, E., Volkowich, A., & Miller, A. (2020). Dimethyl fumarate promotes B cell-mediated anti-inflammatory cytokine profile in B and T cells, and inhibits immune cell migration in patients with MS. *Journal of Neuroimmunology*, 343, 577230. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2020.577230>
77. Nakatani, K., Chen, C., Yau, K.-W., & Koutalos, Y. (2002). Calcium and Phototransduction. In W. Baehr & K. Palczewski (Hrsg.), *Photoreceptors and Calcium* (Bd. 514, S. 1–20). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0121-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0121-3_1)
78. Ngwa, C., Qi, S., Mamun, A. A., Xu, Y., Sharmeen, R., & Liu, F. (2021). Age and sex differences in primary microglia culture: A comparative study. *Journal of Neuroscience Methods*, 364, 109359. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2021.109359>
79. Nicolay, J. P., Müller-Decker, K., Schroeder, A., Brechmann, M., Möbs, M., Géraud, C., Assaf, C., Goerdt, S., Krammer, P. H., & Gülow, K. (2016). Dimethyl fumarate restores apoptosis sensitivity and inhibits tumor growth and metastasis in CTCL by targeting NF-κB. *Blood*, 128(6), 805–815. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-694117>
80. Pagani, F., Testi, C., Grimaldi, A., Corsi, G., Cortese, B., Basilico, B., Baiocco, P., De Panfilis, S., Ragozzino, D., & Di Angelantonio, S. (2020). Dimethyl Fumarate Reduces Microglia Functional Response to Tissue Damage and Favors Brain Iron Homeostasis. *Neuroscience*, 439, 241–254. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.10.041>
81. Panda-Jonas, S., Jonas, J. B., & Jakobczyk-Zmija, M. (1995). Retinal Photoreceptor Density Decreases with Age. *Ophthalmology*, 102(12), 1853–1859. [https://doi.org/10.1016/S0161-6420\(95\)30784-1](https://doi.org/10.1016/S0161-6420(95)30784-1)
82. Paolicelli, R. C., Sierra, A., Stevens, B., Tremblay, M.-E., Aguzzi, A., Ajami, B., Amit, I., Audinat, E., Bechmann, I., Bennett, M., Bennett, F., Bessis, A., Biber, K., Bilbo, S., Blurton-Jones, M., Boddeke, E., Brites, D., Brône, B., Brown, G. C., ... Wyss-Coray, T. (2022). Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads. *Neuron*, 110(21), 3458–3483. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.10.020>
83. Paraiso, H. C., Kuo, P.-C., Curfman, E. T., Moon, H. J., Sweazey, R. D., Yen, J.-H., Chang, F.-L., & Yu, I.-C. (2018). Dimethyl fumarate attenuates reactive microglia and long-term memory deficits following systemic immune challenge. *Journal of*

- Neuroinflammation*, 15, 100. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1125-5>
84. Pennington, K. L., & DeAngelis, M. M. (2016). Epidemiology of age-related macular degeneration (AMD): Associations with cardiovascular disease phenotypes and lipid factors. *Eye and Vision*, 3. <https://doi.org/10.1186/s40662-016-0063-5>
  85. Pérez-Cerdá, F., Sánchez-Gómez, M. V., & Matute, C. (2015). Pío del Río Hortega and the discovery of the oligodendrocytes. *Frontiers in Neuroanatomy*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnana.2015.00092>
  86. Pettas, S., Karagianni, K., Kanata, E., Chatziefstathiou, A., Christoudia, N., Xanthopoulos, K., Sklaviadis, T., & Dafou, D. (2022). Profiling Microglia through Single-Cell RNA Sequencing over the Course of Development, Aging, and Disease. *Cells*, 11(15), Article 15. <https://doi.org/10.3390/cells11152383>
  87. Prinz, M., Jung, S., & Priller, J. (2019). Microglia Biology: One Century of Evolving Concepts. *Cell*, 179(2), 292–311. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.08.053>
  88. Purves, D. (Hrsg.). (2004). *Neuroscience* (3rd ed). Sinauer Associates, Publishers.
  89. Rosito, M., Testi, C., Parisi, G., Cortese, B., Baiocco, P., & Di Angelantonio, S. (2020a). Exploring the Use of Dimethyl Fumarate as Microglia Modulator for Neurodegenerative Diseases Treatment. *Antioxidants*, 9(8), 700. <https://doi.org/10.3390/antiox9080700>
  90. Rosito, M., Testi, C., Parisi, G., Cortese, B., Baiocco, P., & Di Angelantonio, S. (2020b). Exploring the Use of Dimethyl Fumarate as Microglia Modulator for Neurodegenerative Diseases Treatment. *Antioxidants*, 9(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/antiox9080700>
  91. Sagar, M. A. K., Ouellette, J. N., Cheng, K. P., Williams, J. C., Watters, J. J., & Eliceiri, K. W. (2020). Microglia activation visualization via fluorescence lifetime imaging microscopy of intrinsically fluorescent metabolic cofactors. *Neurophotonics*, 7(3), 035003. <https://doi.org/10.1117/1.NPh.7.3.035003>
  92. Saha, S., Buttari, B., Panieri, E., Profumo, E., & Saso, L. (2020). An Overview of Nrf2 Signaling Pathway and Its Role in Inflammation. *Molecules*, 25(22), 5474. <https://doi.org/10.3390/molecules25225474>
  93. Senra, H., Barbosa, F., Ferreira, P., Vieira, C. R., Perrin, P. B., Rogers, H., Rivera, D., & Leal, I. (2015). Psychologic adjustment to irreversible vision loss in adults: A systematic review. *Ophthalmology*, 122(4), 851–861. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2014.10.022>
  94. Silverman, S. M., & Wong, W. T. (2018). Microglia in the Retina: Roles in Development, Maturity, and Disease. *Annual Review of Vision Science*, 4, 45–77. <https://doi.org/10.1146/annurev-vision-091517-034425>
  95. Slaughter, M. M., & Awatramani, G. B. (2002). On Bipolar Cells: Following in the Footsteps of Phototransduction. In W. Baehr & K. Palczewski (Hrsg.), *Photoreceptors and Calcium* (Bd. 514, S. 477–492). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0121-3\\_29](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0121-3_29)
  96. Stanton, C. M., & Wright, A. F. (2014). Inflammatory Biomarkers for AMD. In J. D. Ash, C. Grimm, J. G. Hollyfield, R. E. Anderson, M. M. LaVail, & C. Bowes Rickman (Hrsg.), *Retinal Degenerative Diseases* (Bd. 801, S. 251–257). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3209-8\\_32](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3209-8_32)
  97. Strauss, O. (2005). The Retinal Pigment Epithelium in Visual Function. *Physiological Reviews*, 85(3), 845–881. <https://doi.org/10.1152/physrev.00021.2004>
  98. Strauß, O. (2009). Das Retinale Pigmentepithel. *Der Ophthalmologe*, 106(4), 297–298. <https://doi.org/10.1007/s00347-008-1868-y>
  99. Tadros, N. N., & Sabanegh, E. (2019). Varicocele. In *Oxidants, Antioxidants and Impact of the Oxidative Status in Male Reproduction* (S. 105–115). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812501-4.00012-2>
  100. Takeuchi, I., Bock, G. R., & Goode, J. A. (2008). *Rhodopsins and Phototransduction*. John Wiley & Sons.
  101. Tan, W., Zou, J., Yoshida, S., Jiang, B., & Zhou, Y. (2020). The Role of Inflammation in Age-Related Macular Degeneration. *International Journal of Biological Sciences*, 16(15), 2989–3001. <https://doi.org/10.7150/ijbs.49890>
  102. Tang, C., Tan, S., Zhang, Y., Dong, L., & Xu, Y. (2019). Activation of Keap1-

- Nrf2 signaling by 4-octyl itaconate protects human umbilical vein endothelial cells from high glucose. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 508(3), 921–927. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.12.032>
103. Triviño, A., Hoz, R. de, Rojas, B., Gallego, B. I., Ramírez, A. I., Salazar, J. J., Ramírez, J. M., Triviño, A., Hoz, R. de, Rojas, B., Gallego, B. I., Ramírez, A. I., Salazar, J. J., & Ramírez, J. M. (2012). Effects of Hypercholesterolaemia in the Retina. In *Ocular Diseases*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/48359>
  104. Wang, S. K., & Cepko, C. L. (2022). Targeting Microglia to Treat Degenerative Eye Diseases. *Frontiers in Immunology*, 13, 843558. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.843558>
  105. Wang, Z., & Weaver, D. F. (2022). Microglia and microglial-based receptors in the pathogenesis and treatment of Alzheimer's disease. *International Immunopharmacology*, 110, 109070. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.109070>
  106. Welsch, N., & Liebmann, C. C. (2004). *Farben: Natur, Technik, Kunst* (2. Aufl.). Spektrum Akademischer Verlag.
  107. Willoughby, C. E., Ponzin, D., Ferrari, S., Lobo, A., Landau, K., & Omid, Y. (2010). Anatomy and physiology of the human eye: Effects of mucopolysaccharidosis disease on structure and function – a review. *Clinical & Experimental Ophthalmology*, 38(s1), 2–11. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9071.2010.02363.x>
  108. Wilms, H., Sievers, J., Rickert, U., Rostami-Yazdi, M., Mrowietz, U., & Lucius, R. (2010). Dimethylfumarate inhibits microglial and astrocytic inflammation by suppressing the synthesis of nitric oxide, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6 in an in-vitro model of brain inflammation. *Journal of Neuroinflammation*, 7, 30. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-7-30>
  109. Yuhan, L., Khaleghi Ghadiri, M., & Gorji, A. (2024). Impact of NQO1 dysregulation in CNS disorders. *Journal of Translational Medicine*, 22, 4. <https://doi.org/10.1186/s12967-023-04802-3>
  110. Zhang, L., Cao, Y., Zhang, X., Gu, X., Mao, Y., & Peng, B. (2022). The origin and repopulation of microglia. *Developmental Neurobiology*, 82(1), 112–124. <https://doi.org/10.1002/dneu.22862>
  111. Zhang, Y., Feng, S., Nie, K., Li, Y., Gao, Y., Gan, R., Wang, L., Li, B., Sun, X., Wang, L., & Zhang, Y. (2018). TREM2 modulates microglia phenotypes in the neuroinflammation of Parkinson's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 499(4), 797–802. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.03.226>
  112. Zheng, X., Huang, H., Liu, J., Li, M., Liu, M., & Luo, T. (2018). Propofol Attenuates Inflammatory Response in LPS-Activated Microglia by Regulating the miR-155/SOCS1 Pathway. *Inflammation*, 41(1), 11–19. <https://doi.org/10.1007/s10753-017-0658-6>

## 7. Anhang

### 7.1. Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 1: Das Auge – Schematisch und histologisch.....                | 12 |
| Abbildung 2: Schematische und mikroskopische Mikrogliazelle.....         | 17 |
| Abbildung 3: AMD – Verlauf und Visusverlust.....                         | 18 |
| Abbildung 4: Zellvitalität .....   | 36 |
| Abbildung 5: Relative Expression pro-inflammatorischer Gene.....         | 37 |
| Abbildung 6: Nitrit-Produktion.....                                      | 38 |
| Abbildung 7: Zytokinkonzentrationen – ELISA .....                        | 39 |
| Abbildung 8: p65 - Mikroskopie und Verteilung.....                       | 40 |
| Abbildung 9: Relative Expression anti-inflammatorischer Gene.....        | 41 |
| Abbildung 10: Morphologie - Mikroskopie und Messung zur Verzweigung..... | 42 |
| Abbildung 11: Migrationsverhalten – mikroskopisch und gemessen.....      | 43 |
| Abbildung 12: Phagozytose – mikroskopisch und relative Verteilung.....   | 45 |
| Abbildung 13: Relative Caspase-Aktivität.....                            | 46 |

### 7.2. Tabellenverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Tabelle 1: Genutzte Chemikalien, Lösungen und Reagenzien mit Verwendung und Hersteller ..... | 22 |
| Tabelle 2: Genutzte Antikörper .....   | 24 |
| Tabelle 3: Genutzte Kitsysteme mit Verwendung und Hersteller.....                            | 24 |
| Tabelle 4: Genutzte Zellkulturmedien mit Rezept und Hersteller .....                         | 25 |
| Tabelle 5: Genutzte qRT-PCR Primer – pro-inflammatorische Gene .....                         | 26 |
| Tabelle 6: Genutzte qRT-PCR Primer – anti-inflammatorische Gene inkl. Sonden.....            | 27 |
| Tabelle 7: Genutzte Verbrauchsmaterialien mit Verwendung und Hersteller .....                | 28 |
| Tabelle 8: Genutzte Geräte mit Verwendung und Hersteller .....                               | 29 |
| Tabelle 9: Genutzte Software mit Verwendung und Hersteller .....                             | 30 |