

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

Untersuchung des Effekts von Minocyclin auf Mikrogliazellen sowie auf lichtinduzierte Retinadegeneration

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

vorgelegt von
Markus Sobotka
aus Köln

promoviert am 23.März 2016

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

Untersuchung des Effekts von Minocyclin auf Mikrogliazellen sowie auf lichtinduzierte Retinadegeneration

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

vorgelegt von
Markus Sobotka
aus Köln

promoviert am 23.März 2016

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. Dr. h. c. Th. Krieg

1. Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Th. Langmann

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. rer. nat. M. Plomann

Erklärung

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

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Frau Dipl. oec. troph. Rebecca Scholz

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung 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 die Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertationsschrift stehen.

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

Köln, den 11.08.2015

Markus Sobotka

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Frau Dipl. oec. troph. Rebecca Scholz von mir selbstständig durchgeführt worden.

Danksagung:

Während dieser Doktorarbeit konnte ich viele wissenschaftliche als auch menschliche Erkenntnisse gewinnen. Dafür ist eine Vielzahl an Personen nötig gewesen, denen ich hier meinen Dank aussprechen will. Falls ich dabei jemanden vergessen haben sollte, sei Ihr/Ihm hiermit auch gedankt.

Ich danke in erster Linie Herrn Prof. Dr. Thomas Langmann, der mir durch die Bereitstellung dieses Themas eine Doktorarbeit in seinem Labor ermöglicht hat, bei der ich die Verbindung von Grundlagenforschung und klinischer Medizin eindrücklich erfahren konnte.

Weiterhin danke ich meiner Betreuerin Frau Dipl. oec. troph. Rebecca Scholz, die mich in den Laboralltag eingeführt hat und mir mit Rat und Tat zur Seite stand.

Auch Dr. Albert Caramoy, der u.a. ein Experte für OCT-Untersuchungen bei Mäusen ist, gilt mein Dank für Tipps und Tricks.

Den Laborkollegen danke ich für die gute Atmosphäre, die gegenseitige Hilfsbereitschaft und auch besonders für die abwechslungsreichen Zeiten nach getaner Arbeit. Mein Dank gilt: Anne Wolf, Katharina Dannhausen, Alexander Aslanidis, Dr. Marcus Karlstetter, Khalid Rashid, Anja Volkmann, Isha Akhtar, Jenny Fleischmann, Anika Lückoff, Rodica Maniu, Christopher Nebel, Viktoria Salz, Nadine Bremicker.

Schließlich danke ich von Herzen meinen Eltern, die mir das Medizinstudium sowie diese Arbeit ermöglicht haben. Ohne ihre Unterstützung, in allen Lebenslagen, stünde ich heute nicht hier! Auch meine Brüder seien hier dankend erwähnt, von denen mir jeder durch seine individuelle Art sehr wichtig ist.

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Inhaltsverzeichnis | I |
| Abkürzungsverzeichnis..... | III |
| 1. Einleitung..... | 1 |
| 1.1 Sehen..... | 1 |
| 1.2 Retina..... | 2 |
| 1.3 Mikroglia | 5 |
| 1.4 Lichtschaden..... | 9 |
| 1.5 Minocyclin | 10 |
| 1.6 Zielsetzung der Arbeit | 11 |
| 2. Materialien | 13 |
| 2.1 Zellen..... | 13 |
| 2.1.1 BV-2 Mikrogliazellen | 13 |
| 2.1.2 661W Photorezeptorzellen..... | 13 |
| 2.2 Tiere..... | 13 |
| 2.3 Chemikalien/etc. | 14 |
| 2.4 Kitsysteme | 14 |
| 2.5 Medien..... | 15 |
| 2.6 Oligonukleotide | 15 |
| 2.7 Verbrauchsmaterialien | 16 |
| 2.8 Geräte..... | 16 |
| 2.9 Software | 18 |
| 3. Methoden..... | 19 |
| 3.1 In vitro..... | 19 |
| 3.1.1 Zellzahl-Auszählung..... | 19 |
| 3.1.2 Stimulation..... | 19 |
| 3.1.3 Trypanblau-Färbung | 20 |
| 3.1.4 RNA-Isolation aus Zellen | 20 |
| 3.1.5 RNA-Konzentrations Bestimmung..... | 21 |
| 3.1.6 Eindampfen der RNA-Proben..... | 21 |
| 3.1.7 cDNA-Synthese | 21 |
| 3.1.8 Taqman Quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR) | 22 |
| 3.1.9 NO-Messung..... | 25 |
| 3.1.10 Caspase-Aktivitäts Messung..... | 26 |

| | |
|--|----|
| 3.2 In vivo..... | 27 |
| 3.2.1 Tierhaltung..... | 27 |
| 3.2.2 Lichtschaden und Behandlungsprotokoll..... | 27 |
| 3.2.3 Optische Kohärenztomographie (OCT)..... | 28 |
| 3.2.4 Präparation der Retinae..... | 31 |
| 3.2.5 RNA-Isolation aus Retina..... | 32 |
| 3.2.6 cDNA-Synthese/qRT-PCR..... | 32 |
| 3.3 Statistik..... | 32 |
| 4. Ergebnisse..... | 35 |
| 4.1 In vitro..... | 35 |
| 4.1.1 Minocyclin reduziert die Expression von proinflammatorischen Genen in LPS-stimulierten BV-2 Mikrogliazellen..... | 35 |
| 4.1.2 Minocyclin reduziert die NO-Produktion von LPS-stimulierten BV-2 Mikrogliazellen..... | 37 |
| 4.1.3 Minocyclin reduziert die durch reaktive Mikroglia vermittelte Apoptose in 661W Photorezeptorzellen..... | 38 |
| 4.2 In vivo..... | 40 |
| 4.2.1 Minocyclin reduziert die Mikrogliaaktivierung sowie die Expression von proinflammatorischen Genen und einem proapoptotischen Gen bei lichtinduzierter Retinadegeneration in Balb/c Mäusen..... | 40 |
| 4.2.2 Minocyclin erhält die retinale Struktur und Dicke bei linchtinduzierter Retinadegeneration in Balb/c Mäusen..... | 42 |
| 5. Diskussion..... | 45 |
| 5.1 In vitro..... | 45 |
| 5.1.1 Effekt von Minocyclin auf BV-2 Mikrogliazellen..... | 45 |
| 5.1.2 Effekt von Minocyclin auf die NO-Produktion von BV-2 Mikrogliazellen..... | 47 |
| 5.1.3 Effekt von Minocyclin auf die BV-2 Mikrogliazellen vermittelte Apoptoseinduktion in 661W Photorezeptorzellen..... | 47 |
| 5.2 In vivo: Effekt von Minocyclin auf lichtinduzierte Retinadegeneration..... | 49 |
| 6. Zusammenfassung..... | 53 |
| 7. Literaturverzeichnis..... | 55 |
| 8. Anhang..... | 63 |
| 8.1 Abbildungsverzeichnis..... | 63 |
| 8.2 Tabellenverzeichnis..... | 64 |
| 9. Lebenslauf..... | 65 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------|--|
| °C | Grad Celsius |
| A | Absorption |
| Abb. | Abbildung |
| AMWAP | Activated microglia/macrophages whey acidic protein |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| ANOVA | analysis of variance/Varianzanalyse |
| aZ | amakrine Zellen |
| äGM | äußere Grenzmembran |
| äKS | äußere Körnerschicht |
| äpS | äußere plexiforme Schicht |
| bp | Basenpaare |
| BZ | Bipolarzellen |
| CCL2 | Chemokin (C-C Motiv) Ligand 2 |
| CCR5 | C-C-Motiv-Chemokinrezeptor 5 |
| cDNA | complementary DNA/komplementäre DNA |
| CD68 | Cluster of Differentiation 68 |
| Chr | Choroidea |
| cm | Zentimeter |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| C _t | Cycle threshold |
| CXCR3 | C-X-C Chemokinrezeptor 3 |
| ddH ₂ O | doppelt destilliertes Wasser |
| dH ₂ O | destilliertes Wasser |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Deoxyribonucleic Acid/Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphat |
| ERG | Elektroretinogramm |
| EtOH | Ethanol |
| FCS | Fetal Calf Serum/fetales Kälberserum |
| g | Gramm |
| GS | Ganglienzellschicht |
| h | hours(s)/Stunde(n) |
| HE | Hämatoxylin-Eosin |
| H ₂ O | Wasserstoffhydroxid (Wasser) |
| HZ | Horizontalzellen |
| Hz | Hertz |
| iKS | innere Körnerschicht |
| IL-6 | Interleukin 6 |
| iNOS | inducible nitric oxide synthase/induzierbare NO-Synthase |
| ipS | innere plexiforme Schicht |
| l | Liter |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| lx | Lux (Beleuchtungsstärke) |
| M | molar |
| m- | milli- |
| MAPK | Mitogen-aktivierte Protein Kinase |
| min | Minute(n) |
| mM | millimolar |

| | |
|----------------|--|
| mm | Millimeter |
| mRNA | messenger RNA |
| MZ | Müllerzellen |
| n- | nano- |
| NED | N -1-Naphthyl Ethylendiamindihydrochlorid |
| NFκB | nuclear factor `kappa-light-chain-enhancer´ of activated B-cells |
| NFS | Nervenfaserschicht |
| NGF | nerve growth factor/Nerven-Wachstumsfaktor |
| ng | Nanogramm |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| O ₂ | Sauerstoff |
| OCT | Optical Coherence Tomography/Optische Kohärenz Tomographie |
| OD | optische Dichte |
| PAS | Photorezeptor Außensegmente |
| PBS | Phosphate Buffered Saline/phosphatgepufferte Salzlösung |
| PIS | Photorezeptor Innensegmente |
| PCR | Polymerase Chain Reaction/Polymerase-Kettenreaktion |
| pH | Pondus Hydrogenii/Potentia Hydrogenii |
| qRT-PCR | quantitative real-time PCR/quantitative Echtzeit-PCR |
| RLU | relative light units/relative Lichteinheiten |
| RNA | ribonucleic acid/Ribonukleinsäure |
| RPE | Retinales Pigmenepithel |
| rpm | revolutions per minute/ Umdrehungen pro Minute |
| sek | Sekunde(n) |
| SD-OCT | Spektral-Domänen-OCT |
| SkI | Sklera |
| TLR-4 | Toll-like receptor 4/Toll ähnlicher Rezeptor 4 |
| tRNA | Transfer-RNA |
| TSPO | Translokatorprotein |
| UV | Ultraviolett |
| μ | mikro- |
| μg | Mikrogramm |
| μl | Mikrogliter |
| μM | mikromolar |
| μm | Mikrometer |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |

1. Einleitung

1.1 Sehen

Der Sehsinn ist der vom Menschen am stärksten genutzte Sinn, er trägt mit ca. 70 % [113] am meisten zur Wahrnehmung der Umgebung bei. Das Auge als Sinnesorgan übernimmt hierbei die Funktion einer Kamera. Das Licht tritt über die Kornea (Hornhaut) ein und passiert verschiedene optische Medien (Hornhaut, Kammerwasser, Linse, Glaskörper). Die elastisch aufgehängte Linse kann durch Muskelkontraktion und –entspannung ihre Wölbung ändern und so das Licht auf die Retina (Netzhaut) fokussieren. Hier findet die Umwandlung der Information von elektromagnetischer Strahlung in elektrische Nervenimpulse statt. Dabei wird durch die Nervenzellen der Retina schon hier eine Vorverarbeitung hinsichtlich Kontrast-, Farb- und Bewegungswahrnehmung geleistet [36]. Über den Sehnerv, das Chiasma opticum (Sehkreuzung), wo die Fasern entsprechend ihrer Zugehörigkeit zur Gesichtsfeldseite geordnet werden und die Sehstrahlung gelangt die Information zur Sehrinde im Okzipitallappen (Hinterhauptslappen) des Gehirns, wo der Seheindruck entsteht. Eine Vielzahl von Verschaltungen verknüpft das Sehen mit den anderen Sinnen um die Umwelt als Produkt aller Sinne wahrnehmen zu können. Hierzu trägt auch die komplexe Steuerung der Augenbewegungen bei, damit beispielsweise in verschiedenen Entfernungen scharf gesehen werden kann oder beide Augen parallel bewegt werden können, damit keine Doppelbilder entstehen. Ebenso wird hierdurch eine dreidimensionale Raumwahrnehmung ermöglicht. Des Weiteren werden die Informationen weiter verarbeitet und selektiert, um Wichtiges von Unwichtigem zu trennen [66]. Dieser Prozess zeigt sich eindrücklich bei optischen Illusionen, bei denen es zu Fehlinterpretationen kommt und gerade Linien plötzlich gewellt erscheinen.

Ein Verlust oder eine Einschränkung des Sehsinnes führt zu einer deutlichen Minderung der Partizipation und Teilhabe. Betroffene sind meist in ihrer Lebensführung stark eingeschränkt und in vielen Bereichen auf die Hilfe anderer angewiesen [97].

Neben hereditären Ursachen führen in der heutigen Gesellschaft der Industriestaaten immer häufiger altersbedingte und mit anderen Erkrankungen wie z.B. Diabetes mellitus assoziierte Veränderungen zu Degenerationen der Retina und schließlich zu erheblichen Visuseinbußen bis hin zur Erblindung [20, 21, 58].

In der medizinischen Geschichte ist die Behandlung der Katarakt (Grauer Star) durch den Starstich eine seit dem Altertum bekannte Operation. Heute ist die weiterentwickelte Katarakt-Operation die am häufigsten durchgeführte Operation weltweit [7]. Der Ersatz der eingetrübten Augenlinse durch eine Kunstlinse ist ein Eingriff mit sehr hohem Erfolg, der vom Patienten schon kurz nach der Durchführung wahrgenommen werden kann. Die Begrenzung dieses Erfolges liegt jedoch immer mehr in dem Auflösungsvermögen und Funktionszustand der Retina, da hier Beeinträchtigungen nicht durch klare Brechungsmedien ausgeglichen werden können. Daher ist die Netzhaut mittlerweile als Schauplatz verschiedener Erkrankungen und somit als Therapieziel immer mehr in den Fokus der Forschung gerückt. Hier wird versucht, die pathologischen Prozesse auf molekularer Ebene zu verstehen und somit, neben den relativ begrenzten chirurgischen Möglichkeiten, medikamentöse Therapien entwickeln zu können. Dabei werden zunehmend Fortschritte gemacht [13].

1.2 Retina

In der Retina werden die eintreffenden optischen Informationen von elektromagnetischer Strahlung in elektrische Nervenimpulse umgewandelt und vorverarbeitet. Dies stellt einen hoch komplexen Prozess dar und erfordert eine hohe Stoffwechsellleistung des Gewebes, da innerhalb von Sekundenbruchteilen neue Informationen verarbeitet werden müssen, damit eine Wahrnehmung nahezu in Echtzeit möglich wird. Um diese Aufgabe erfüllen zu können ist die Retina ein klar strukturiertes Gewebe aus verschiedenen spezialisierten Zellen, die auf der einen Seite der Informationsverarbeitung und auf der anderen Seite der Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase dienen.

Als Teil des Zentralen Nervensystems (ZNS) ist die Retina korrespondierend zur Blut-Hirnschranke, bestehend aus Gliazellfortsätzen, die die Blutgefäße umgeben, über eine Blut-Retina-Schranke von den restlichen Körperkompartimenten getrennt.

Diese Schranke wird von den Zellen des retinalen Pigmentepithels sowie dem Gefäßendothel gebildet [39].

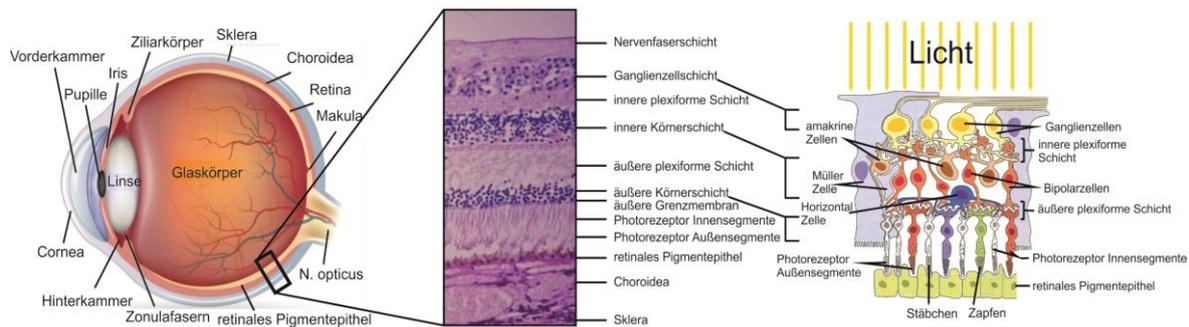


Abb. 1: Aufbau des menschlichen Auges und der Retina. Schematische Übersicht über die Anatomie des Augapfels (links, <http://augen-experte.de/auge-anatomie-aufbau-und-funktion>). Histologischer Schnitt durch die Retina (Mitte, HE-Färbung, Copyright © Online Journal of Ophthalmology) und schematischer Aufbau der Retina (rechts, [46]).

Abb. 1 zeigt den Aufbau des Auges sowie der Retina und schematisch die einzelnen Zellen. In Form gehalten wird das Auge von der Sklera (Lederhaut), welche ein straffes kollagenhaltiges Stützgewebe ist und den intraokularen Druck aufrechterhält. Ganz außen, nicht mehr zur Retina gehörend befindet sich die Choroidea (Aderhaut), deren starke Durchblutung die Versorgung der äußeren Netzhaut mit Nährstoffen sowie deren Kühlung gewährleistet [87]. Eine Kühlung ist hier notwendig, da die in Form von Licht einfallende Energie absorbiert wird und die hohe Stoffwechselleistung des Gewebes zu einer nicht unerheblichen Wärmeentwicklung führt.

Als nächstes folgt das retinale Pigmentepithel (RPE), welches für die Funktion der Retina essentiell ist, da es die abgestoßenen Segmente der Photorezeptoren phagozytiert und recycelt [88].

Die Retina ist invers aufgebaut, was bedeutet, dass die Photorezeptoren, welche die Sinneszellen sind, die den physikalischen Lichtreiz aufnehmen und weiterleiten, auf der „lichtabgewandten“ Seite der Retina liegen und somit das Licht die Retina in ihrer vollen Dicke durchdringen muss. Dafür ist die Retina transparent und sehr dünn (ca. 300 µm). Sie besteht aus mehreren Schichten von spezialisierten Zellen, die hier, dem Informationsfluss folgend, dargestellt werden sollen. Die Photorezeptoren liegen dem RPE lose auf und bilden die äußerste Schicht, in der die Innen- und Außensegmente liegen, sowie die äußere Körnerschicht (Zellkerne der Photorezeptoren). Die Photorezeptoren des Menschen werden in Stäbchen und Zapfen unterteilt. Insgesamt besitzt die Retina ca. 130 Millionen Photorezeptoren, wovon ca. 95% Stäbchen und 5% Zapfen sind [43]. Die Stäbchen haben ihre

maximale Absorption bei 498 nm und befinden sich hauptsächlich in der Peripherie. Ihre Stärke liegt im Dämmerungssehen, wo sie die höchste Lichtempfindlichkeit aufweisen (skotopisches Sehen). Die Zapfen werden weiter in blaue (420 nm), grüne (534 nm) und rote (564 nm) unterteilt, deren Kombination in einem ca. 2 Millionen Farben umfassenden Farbspektrum resultiert und deren maximale Empfindlichkeit sie bei Tageslicht haben (photopisches Sehen) [36]. Das zentrale Molekül der Phototransduktion ist das Rhodopsin. Es besteht aus dem Protein Opsin sowie dem Farbstoffmolekül Retinal, dieses ändert bei Lichteinfall seine Konformation von 11-cis zu all-trans. Diese Konformationsänderung führt zu einer Aktivierung eines Opsins, einem G-Protein gekoppelten Rezeptor und schließlich zu einer Hyperpolarisation des Photorezeptors. Das Rhodopsin wird dabei verbraucht und mit den Außensegmentscheiben zum Recycling abgestoßen.

In der inneren plexiformen Schicht geben die Photorezeptoren den Sinneseindruck an die Bipolarzelle weiter, deren Zellkerne in der inneren Körnerschicht liegen. Hier befinden sich auch Horizontalzellen und amakrine Zellen, die eine horizontale Verschaltung herstellen, die zur Vorverarbeitung der Informationen beiträgt. Von den Bipolarzellen gelangen die Informationen über Synapsen in der inneren plexiformen Schicht an die Ganglienzellen, deren Axone (ca. 1,1 Mio.) innen auf der Retina verlaufen und sich in der Sehnervenpapille zum Sehnerv vereinigen und das Auge Richtung Gehirn verlassen. An dieser Stelle befinden sich keine Photorezeptoren, womit hier ein blinder Fleck im Gesichtsfeld entsteht. Dieser wird vom Gehirn jedoch mittels Überblendung aus dem anderen Auge ausgeglichen.

Eine weitere Besonderheit des menschlichen Auges ist die Macula lutea (Gelber Fleck), sie ist der Punkt, auf den das einfallende Licht fokussiert wird und somit der zentrale Punkt des Gesichtsfeldes. In ihrer zentralen Vertiefung (Fovea centralis, Sehgrube) weicht die Schichtung von der übrigen Netzhaut ab. Es befinden sich hier ausschließlich dicht gedrängte Zapfen, wobei die restlichen Schichten zur Seite gedrängt und somit hier nicht vorhanden sind [3]. Auch ist das Verhältnis von Photorezeptoren zu Bipolar- und amakrinen Zellen hier 1:1:1, in der restlichen Retina beträgt es im Gegensatz dazu ca. 40:1:1. Dies ermöglicht eine sehr scharfe Abbildung des fokussierten Objektes. Da sich in der Fovea centralis keine Stäbchen befinden, sieht der Mensch bei Dämmerung zentral nichts.

Die Blutversorgung der Retina erfolgt zum einen, wie oben beschrieben, über die Choroidea, zum anderen durch Gefäße, die über die Sehnervenpapille ins Auge

eintreten und innen auf der Retina verlaufen. Da keine Gefäße in die innersten Schichten der Netzhaut vordringen, erfolgt hier die Ernährung via Diffusion.

Die Müllerzellen sind Stützzellen, welche alle Schichten der Retina durchziehen. Sie tragen zur Gewebshomöostase bei [72] und werden zunehmend auch als Lichtleiter betrachtet [38].

Bei der Maus befinden sich in der Retina hauptsächlich Stäbchen, da sie nachtaktiv ist und somit auf ein gutes skotopisches Sehen angewiesen ist. Sie besitzt nur zwei verschiedene Arten von Zapfen, welche für kurze- und welche für langewelliges Licht. Ein weiterer Unterschied zum Menschen ist das Fehlen einer Makula [54].

1.3 Mikroglia

Neben den unter 1.2 beschriebenen Zelltypen befindet sich in der Retina noch eine weitere Art von Zellen, nämlich die Mikrogliazellen. Sie sind die einzigen residenten Immunzellen des Zentralen Nervensystems und somit auch der Retina [76]. Sie sind wesentlich an der Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase beteiligt und tragen hiermit zur Gewährleistung von Morphologie und Funktion bei [67]. Sie stammen von hämatopoetischen Vorläuferzellen aus dem Dottersack ab und gelangen während der Embryonalentwicklung in das ZNS, bzw. die Retina [42].

Ihre Funktion ähnelt der von Gewebsmakrophagen und besteht in der Überwachung ihrer Umgebung, Reaktion auf pathologische Reize sowie deren Eliminierung [93]. Hierzu können sie ihren Funktionszustand wechseln, was rein optisch schon an der Änderung ihrer morphologischen Erscheinung zu erkennen ist. In gesundem Gewebe liegen sie im „Ruhezustand“ vor. Sie haben einen kleinen Zellkörper und lange, verzweigte Zellausläufer (Filopodien), die sie weit in ihre Umgebung ausstrecken und mit denen sie ständig ihre Umgebung scannen, sie werden als ramifiziert bezeichnet.

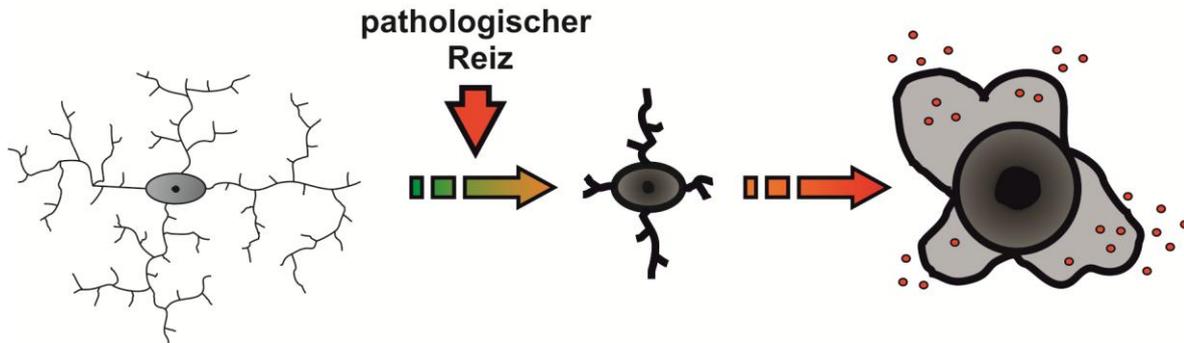


Abb. 2: Schematische Darstellung der Mikroglia Aktivierung. In gesundem Gewebe liegen die Mikroglia in ramifiziertem Zustand vor (links), detektieren sie eine Schädigung werden sie alarmiert (Mitte) und wechseln bei Bestand der Schädigung in eine reaktive Form (rechts), wobei sie proinflammatorische Substanzen ausschütten und zytotoxisch wirken können.

Registrieren sie einen pathologischen Reiz, beispielsweise Bestandteile von Bakterien wie Lipopolysaccharide (LPS) [126], welche bekannte, starke Aktivatoren von Mikroglia sind, wechseln sie in den reaktiven Zustand (Abb. 2). Dieser ist gekennzeichnet durch eine amöboide Zellform mit großem Zellkörper und kürzeren Zellfortsätzen [17]. Die Bezeichnung der Zustände ist etwas irreführend, denn während sich die Mikroglia im „Ruhezustand“ befinden sind sie nicht in Ruhe, da sie ihre Umgebung aktiv scannen.

Nach Kontakt mit pathologischen Reizen werden sie reaktiv, was bedeutet, dass sie auf den Reiz mit dessen Bekämpfung reagieren. Um dies effektiv erledigen zu können verfügen sie über ein breites Spektrum von Effektorsubstanzen [32]. Über Interleukine kommunizieren sie mit anderen Mikroglia, welche daraufhin zum Ort des Geschehens migrieren. Mit Zytokinen nehmen sie Einfluss auf umliegende Zellen [34] und können bei diesen beispielsweise zur Apoptoseinduktion beitragen [110]. Auch können sie NO synthetisieren, was, in großen Mengen, zytotoxisch wirkt [28]. Des Weiteren ist die Phagozytose eine essentielle Funktion der Mikrogliazellen sowohl zur Neutralisierung von Pathogenen als auch zur Entfernung von Zelltrümmern, was Platz für Reparationsvorgänge und Glianarbenbildung schafft [67].

Es konnte gezeigt werden, dass Mikrogliazellen durch sehr viele unterschiedliche pathologische Vorgänge zum Wechsel in den reaktiven Zustand angeregt werden können. Daher spielen sie eine entscheidende Rolle bei der Neuroinflammation, die ein typisches Merkmal nahezu aller neurodegenerativen Erkrankungen ist [83]. Dabei kommt es zu einer radikalen Bekämpfung des pathologischen Reizes, mit teilweise überschießender und fehlregulierter Immunreaktion gefolgt von gravierenden

Schäden an wichtigen ZNS-Strukturen. [125]. Beispiele für die bestehende Assoziation zur Mikrogliaaktivierung sind Erkrankungen wie Multiple Sklerose, Amyotrophe Lateralsklerose und Morbus Parkinson [9, 35, 101].

Bei dieser fehlregulierten Immunantwort haben reaktive Mikroglia hauptsächlich einen schädlichen Einfluss. Unter normalen Umständen besteht ihre Aufgabe darin, die Gewebshomöostase aufrecht zu erhalten und das Überleben von Neuronen und damit die Gewebefunktion zu sichern [12, 26]. Dies geschieht durch die Sekretion von neuroprotektiven Faktoren, wie zum Beispiel dem Nerve Growth Factor [48]. Diese schützen Neurone in Stresssituationen vor dem Absterben und fördern die Wiederherstellung nach Schädigung und somit deren Funktionserhalt.

So kann vereinfacht von „ruhenden“, reaktiven (proinflammatorischen) und antiinflammatorischen Mikrogliazellen gesprochen werden. Diese Polarisationen der Mikroglia werden auch als M1 für die pro- und M2 für die antiinflammatorischen bezeichnet. Charakterisiert werden sie durch die Expression unterschiedlicher, dem jeweiligen Effekt entsprechenden Marker. Die Übergänge zwischen den jeweiligen Zuständen sind jedoch nicht scharf getrennt, sondern verlaufen fließend. Ein Marker für M1 polarisierte Zellen ist CD68, für M2 polarisierte CD206 [27].

In der Retina kommen den Mikrogliazellen schon während der Entwicklung bedeutende Aufgaben für die Entstehung eines funktionsfähigen, hochspezialisierten Gewebes zu [63]. So steuern sie die Ausbildung von Synapsen [91], leiten gezielte Apoptose ein, um überflüssige Zellen zu entfernen, und haben beim Wachstum von Blutgefäßen regelnden Einfluss.

In der voll entwickelten Retina befinden sich die Mikroglia im Ruhezustand in der inneren und äußeren plexiformen Schicht, von wo aus sie ihre Zellausläufer weit in die anderen Netzhautschichten ausstrecken und mit einem Repertoire von Oberflächenmolekülen und Rezeptoren, beispielsweise TLR-4 für LPS [124, 126], nach Störfaktoren suchen.

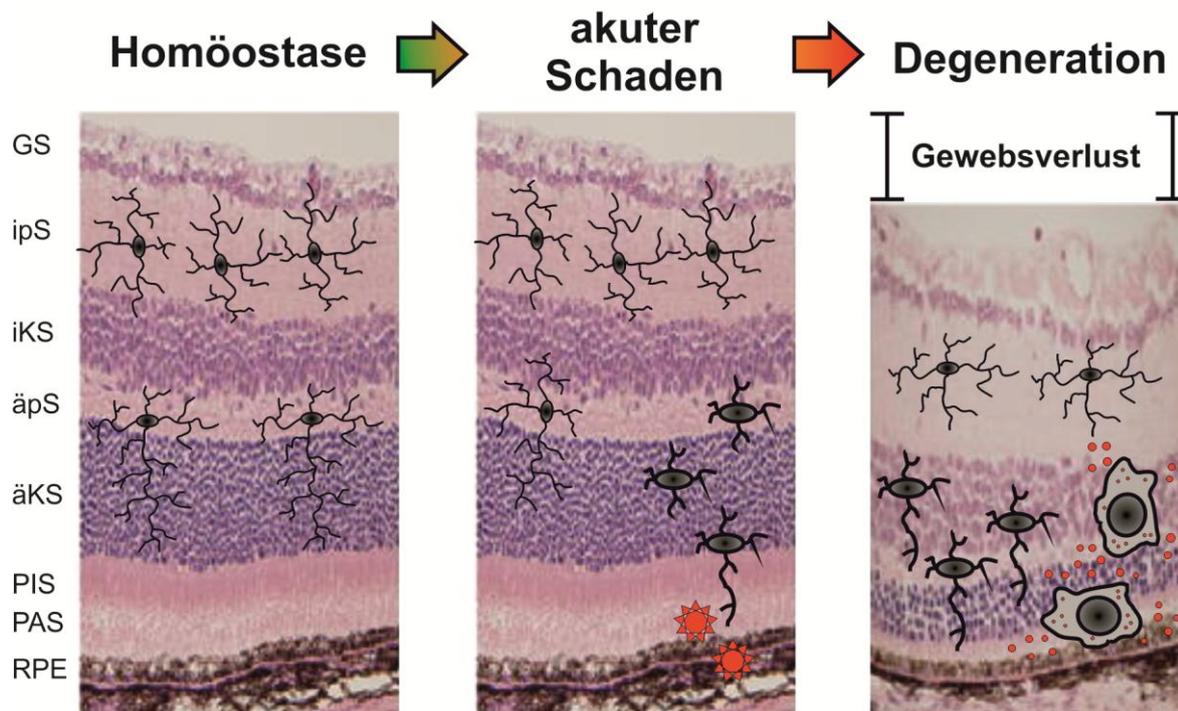


Abb. 3: Aktivierungs- und Migrationsschema von Mikroglia in der Retina. In der gesunden Retina liegen die Mikroglia in der inneren und äußeren plexiformen Schicht und scannen mit ihren lange Ausläufern ihre Umgebung (links). Erkennen sie einen Schaden, migrieren die alarmierten Mikroglia zu dessen Ort (Mitte) und führen in ihrer reaktiven Form zu einer Degeneration mit daraus resultierendem Gewebsverlust (rechts). Ganglienzellschicht (GS), innere plexiforme Schicht (ipS), innere Körnerschicht (iKS), äußere plexiforme Schicht (äpS), äußere Körnerschicht (äKS), äußere Grenzmembran (äGM), Photorezeptor Innensegmente (PIS), Photorezeptor Außensegmente (PAS), retinales Pigmentepithel (RPE) (adaptiert von:[23]).

Werden die Mikroglia durch den Kontakt mit pathologischen Reizen, auch durch Bestandteile von Photorezeptoren [71], reaktiv, runden sie sich ab und migrieren amöboid durch die Netzhautschichten zum Ort der Schädigung. Dort beginnen sie mit der Sekretion von proinflammatorischen Substanzen und begünstigen ein neuroinflammatorisches Geschehen (Abb. 3).

Diese „Aktivierung“ kann sowohl in hereditären [31, 64] als auch in erworbenen Retinadegenerationen beobachtet werden und trägt maßgeblich zum Untergang von Photorezeptorzellen und Ganglienzellen bei [124]. Ein solcher Verlust resultiert in einer zunehmenden Visuseinschränkung bis hin zur vollständigen Erblindung. Daher stellt eine Beeinflussung der Mikroglia, weg von dem proinflammatorischen, hin zum antiinflammatorischen Phänotyp einen vielversprechenden Therapieansatz zum Erhalt von visuellen Funktionen dar [63].

Eine Aktivierung von Mikrogliazellen kann auch durch Schäden, hervorgerufen durch eine verstärkte Lichtexposition, erfolgen [60].

1.4 Lichtschaden

Die Retinadegeneration induziert durch weißes Licht ist ein gut etabliertes Modell um, in genetisch unveränderten Balb/c Mäusen, die dabei ablaufenden Prozesse, sowie deren Beeinflussung zu untersuchen [44]. Dabei führt die Lichtexposition innerhalb kurzer Zeit (vier Tage) zu einem deutlichen Netzhautschaden. Es ist jedoch kein Tiermodell für eine bestimmte Erkrankung, wie es beispielsweise die rd9 Maus für die Retinitis pigmentosa ist [104], sondern eignet sich, wie in dieser Arbeit verwendet, unter anderem, zur Untersuchung der Beeinflussung von immunologischen Vorgängen. Denn bei der lichtinduzierten Retinadegeneration werden Mikrogliazellen aktiviert [60, 123].

Dennoch hat Licht einen Einfluss bei retinalen Erkrankungen [5].

Die Umsetzung der Lichtenergie durch die Photorezeptorzellen der Retina in elektrische Nervenimpulse erfordert eine hohe Stoffwechselleistung und ständige Erneuerung des Sehpigments (Rhodopsin), welches bei Belichtung seine Konformation ändert und den ersten Schritt bei der Signalumwandlung darstellt [36]. Nach dieser photochemischen Reaktion muss das Sehpigment erneuert werden. Dazu stoßen die Photorezeptoren Fragmente der Außensegmente ab, die zügig abgeräumt werden müssen. Dies wird durch das retinale Pigmentepithel ausgeführt, welches die abgestoßenen Fragmente phagozytiert und abbaut [88]. Damit kommt dem RPE im Sehzyklus eine Schlüsselfunktion zu. Je mehr Licht einfällt, umso mehr Rhodopsin fällt an, das recycelt werden muss, womit das retinale Pigmentepithel stärker gefordert wird. Die dabei entstehenden photosensitiven Zwischenprodukte können, in größeren Mengen, Lichtschäden begünstigen [94], hierbei kommt es auch vermehrt zu oxidativem Stress [77].

Eine vermehrte Lichtexposition wird neben fortgeschrittenem Alter, Rauchen und genetischer Prädisposition als ein Risikofaktor für die Entstehung einer altersbedingten Makuladegeneration angenommen, wobei aufgrund vieler, schlecht zu erfassender, Variablen (Bsp.: Dauer, Stärke, Lichtspektrum und Alter bei Exposition) kein eindeutiger Zusammenhang gefunden werden konnte [56]. Die vermehrt anfallenden Stoffwechselprodukte und das Vorhandensein von phototoxischen Substanzen, was beides vorwiegend natürliche Alterserscheinungen sind, führt dann zu einer Zellschädigung und nachfolgend zu einer Inflammation.

Dabei kommt es zu einer Aktivierung der retinalen Mikrogliazellen, die das Entzündungsgeschehen steuern [71].

Es wurden zwei pathomechanistische Modelle des Lichtschadens entwickelt, beim Noell-Schaden [90] spielt das Sehpigment eine zentrale Rolle, beim Ham-Schaden [47] photosensitive Substanzen, speziell Lipofuszeine. Ein Unterschied liegt ebenso in dem unterschiedlichen Lichtspektrum, der Noell-Schaden wird durch grünes, der Ham-Schaden durch weißes Licht hervorgerufen.

Dennoch sind die Pathomechanismen nicht eindeutig trennbar und so scheint bei starker Lichtexposition eine Kombination von Schaden am retinalen Pigmentepithel und den Photorezeptoren über eine Neuroinflammation zu einer Netzhautdegeneration zu führen [114].

Auch wenn eine gesunde Retina, gerade beim Menschen, der an Tageslicht angepasst ist, nur bedingt anfällig für Lichtschäden ist, so kann sich die Situation bei vorgeschädigter Netzhaut ändern und hier starke Lichtexposition die Funktion zusätzlich beeinträchtigen, da das Licht hierbei als zusätzlicher Stressor wirkt und die physiologischen Kompensationsmechanismen überbeansprucht werden [86].

Auch bei Mäusen gibt es Unterschiede in der Anfälligkeit für Lichtschäden, die genetisch bedingt sind. Dazu gehört eine Mutation im RPE65 Gen, welches für ein Protein kodiert, was zu einer Verlangsamung des Sehzyklus führt und damit vor Überbeanspruchung schützt [30, 103].

1.5 Minocyclin

Das Antibiotikum Minocyclin ist ein semi-synthetisches Tetracyclinderivat, das schon seit langer Zeit zur Behandlung von Infektionen eingesetzt wird. Es wurde 1967 zusammen mit Doxycyclin, einem weiteren Tetracyclinderivat eingeführt. Die Modifikationen im Vergleich zum ursprünglichen Tetracyclin verleihen ihm bessere pharmakokinetische Eigenschaften, wie bessere Resorption, Diffusion und längere Wirkdauer. Tetracycline haben ein breites Wirkspektrum, unter anderem sind sie wirksam gegen Mycoplasmen, Chlamydien und Borrelien. Auch ihre Anwendung in der Malariaphylaxe ist möglich [82]. Ihr Nebenwirkungsprofil ist relativ klein, weshalb sie gut verträglich sind. Eine wichtige unerwünschte Wirkung ist jedoch eine

Photosensibilisierung, weshalb mit Tetracyclinen behandelte Personen vor Sonneneinstrahlung geschützt werden sollen [49]. Die antibiotische, bakteriostatische Wirkung erzielen Tetracycline, indem sie die Translation durch Verhinderung der Bindung von tRNA an den mRNA-Ribosomen-Komplex hemmen [96].

Ein häufiges Anwendungsgebiet von Minocyclin ist die Acne vulgaris, gegen das dabei beteiligte Propionibacterium acnes es besonders aktiv ist [33].

Neben der guten antibiotischen Wirkung der Tetracycline zeigte sich, dass sie auch die Expression entzündungsassoziierter Faktoren reduzieren. Dabei handelt es sich unter anderem um die induzierbare NO-Synthase (iNOS), Matrix-Metalloproteinasen sowie proinflammatorische Zytokine [53, 69, 84].

Da es bei ischämischen Infarkten des Gehirns im Verlauf zu einer Inflammation mit Einwanderung von Entzündungszellen und Sekretion proinflammatorischer Faktoren kommt, untersuchten Yrjanheikki et al. [119, 120] erstmals den protektiven Effekt von Minocyclin bei Neuroinflammation. Mittlerweile wurde Minocyclin bei den unterschiedlichsten neurodegenerativen Erkrankungen getestet, deren gemeinsames Merkmal eine Neuroinflammation ist [41]. Hierzu gehören unter anderem der Morbus Parkinson, die Multiple Sklerose, die amyotrophe Lateralsklerose, sowie retinale Degenerationen verschiedener Genese [25, 35, 117]. Ein großer Vorteil von Minocyclin liegt in der Fähigkeit die Blut-Hirn-Schranke gut zu überwinden und so im ZNS therapeutische Konzentrationen zu erreichen [41]. Ebenso kann die Tatsache, dass das Medikament als für den Menschen sicher eingestuft und zugelassen ist, seine Erforschung erleichtern. In Pilotstudien wurde Minocyclin nicht nur an Mausmodellen, sondern auch am Menschen ausprobiert. So scheint es das Fortschreiten des Visusverlustes bei Retinitis pigmentosa zu verlangsamen [11].

Die genaue Funktionsweise der von dem antibiotischen Effekt unabhängigen Wirkung ist bis heute immer noch ungeklärt.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den immunmodulatorischen Effekt von Minocyclin zu untersuchen. Im Besonderen soll dabei der Einfluss auf Mikrogliazellen anhand von Genexpressionsänderungen muriner BV-2 Mikroglia betrachtet werden.

Auch der mikrogliavermittelte zytotoxische bzw. protektive Effekt von Minocyclin auf Photorezeptorzellen soll evaluiert werden.

In vivo soll dieser Einfluss dann am Beispiel einer lichtinduzierten Retinadegeneration sowohl morphologisch, mittels OCT-Untersuchungen, als auch auf Genexpressionsebene erhoben werden.

2. Materialien

2.1 Zellen

2.1.1 BV-2 Mikrogliazellen

BV-2 Zellen sind durch eine mit einem v-raf/v-map Vektor beladenen J2-Retrovirus immortalisierte murine Mikrogliazellen [15], die ein geeignetes Modell zur Untersuchung von Mikroglia sind [78]. Die Zellen wurden in DMEM high glucose Medium mit L-Glutamin mit 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin in T75-Zellkulturflaschen kultiviert und montags, mittwochs und freitags durch Abschaben gesplittet (Verhältnis 1:3). Kultiviert wurden die Kulturen im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂.

2.1.2 661W Photorezeptorzellen

661W Zellen sind durch Expression des SV40 T Antigens immortalisierte murine Photorezeptorzellen [4]. Die Zellen wurden in DMEM high glucose Medium mit L-Glutamin mit 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin in T75-Zellkulturflaschen kultiviert und montags, mittwochs und freitags durch Abschaben gesplittet (Verhältnis 1:3). Kultiviert wurden die Kulturen im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂.

2.2 Tiere

Für die *in vivo* Experimente wurden Balb/c Mäuse aus eigener Zucht verwendet. Dabei handelt es sich um Albino Mäuse, die eine RPE65 Variante (Leu 450) tragen, die einen schnellen Sehzyklus begünstigt und dadurch anfällig für Lichtschäden sind. Das durchschnittliche Alter aller Tiere am Tag der Lichtexposition betrug 80 Tage (\pm 1,291)

2.3 Chemikalien/etc.

Tabelle 1: Verwendete Lösungen, Chemikalien und Reagenzien mit Anwendung und Hersteller

| Puffer/Lösung/Chemikalien/etc. | Verwendung | Hersteller/Rezept |
|---|-----------------------------|--|
| PBS | Verschiedenes | Gibco; 14190-094 |
| Penicillin/Streptomycin (100x) | Kulturmedien | Gibco; 15140-122 |
| 10x PBS | Verschiedenes | 1,5M NaCl, 83mM Na ₂ HPO ₄ , 17mM H ₂ PO ₄ *H ₂ O (pH 7,4) |
| 2x TaqMan® Mastermix | qRT-PCR | Roche, 04673433001 |
| Sonden | qRT-PCR | Roche |
| 100% Ethanol, biological grade | Verschiedenes | |
| Phenylephrin 2,5% + Tropicamid 0,5% Augentropfen | Mydriasis für OCT | Apotheke Uniklinik Köln |
| Hylo-Vision sine Augentropfen | Augenbefeuchtung bei OCT | Omni-Vision |
| β-Mercapthoethanol | RNA-Isolation | Merck, 1.07209 |
| Minocyclin Hydrochlorid | Zell-/Mausbehandlung | Sigma, M9511 |
| Escherichia coli 0111:B4 - LPS | Zellstimulation | Sigma, L4391 |
| FCS | Zellkulturmedien | Gibco, 10270-106 |

2.4 Kitsysteme

Tabelle 2: Verwendete Kitsysteme mit Anwendung und Hersteller

| Kit | Verwendung | Hersteller, Art.-Nr. |
|---|-------------------------------|------------------------|
| NucleoSpin RNA Mini Kit | RNA-Isolation | Macherey-Nagel; 740955 |
| RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit | cDNA-Synthese | Fermentas; K1632 |
| Griess Reagent System | NO-Messung | Promega; G2930 |
| Caspase-Glo® 3/7 Assay | Caspase-Aktivitäts Messung | Promega; G8091 |

2.5 Medien

Tabelle 3: Verwendete Zellkulturmedien mit Rezept und Hersteller

| Medium | Rezept | Hersteller |
|------------------------------------|---|-----------------------|
| DMEM High Glucose (4,5 g/l) | | Sigma; D5796 |
| BV-2 Kulturmedium | DMEM High Glucose, 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin | eigene Herstellung |
| 661W Kulturmedium | DMEM High Glucose, 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin | eigene Herstellung |
| Einfriermedium | 60% des Kulturmediums, 30% FCS, 10% DMSO | eigene Herstellung |

2.6 Oligonukleotide

Tabelle 4 Verwendete qRT-PCR Primer und zugehörige Sonden der Universal Probe Library von Roche.

| Amplikon | Größe (bp) | Primer | Sequenz (5' - 3') | Sonde (UPL Roche) |
|------------------|------------|--------|-------------------------|----------------------|
| CCL2 | 821 | F | catccacgtgttgctca | #62 |
| CCL2 | 821 | R | gatcatcttctggtgaatgagt | #62 |
| IL-6 | 85 | F | gatggatgctaccaaactggat | #6 |
| IL-6 | 85 | R | ccaggtagctatggtactccaga | #6 |
| iNOS | 66 | F | cttgccacggacgagac | #13 |
| iNOS | 66 | R | tcattgtactctgagggtga | #13 |
| CD68 | 72 | F | ctctctaaggctacaggctgct | #27 |
| CD68 | 75 | R | tcacggttgcaagagaaaca | #27 |
| Caspase 8 | 60 | F | tgaacaatgagatccccaaat | #11 |
| Caspase 8 | 60 | R | caaaaattcaagcaggctca | #11 |
| AMWAP | 96 | F | ttgatcactgtgggatga | #1 |
| AMWAP | 96 | R | acactttctggtgaaggctg | #1 |
| TSPO | 75 | F | actgtattcagccatggggta | #33 |
| TSPO | 75 | R | accatagcgtcctctgtgaaa | #33 |
| ATPase | 77 | F | ggcacaatgcaggaaagg | #77 |
| ATPase | 77 | R | tcagcaggcacatagatagcc | #77 |

2.7 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5: Verwendete Verbrauchsmaterialien mit Anwendung und Hersteller

| Artikel | Verwendung | Hersteller |
|---|-------------------------------|-------------------|
| 1 ml Insulinspritzen | Injektion in Mäuse | Becton Dickinson |
| 1,5 ml Eppis | Verschiedenes | Eppendorf |
| 2,5 µl, 10 µl; 200 µl, 1000 µl Pipettenspitzen | Verschiedenes | Sarstedt |
| 10 µl; 200 µl; 1000 µl Filterspitzen | Verschiedenes | Sarstedt |
| 15 ml; 50 ml Röhren | Verschiedenes | Sarstedt |
| 2 ml Eppis | Verschiedenes | Sarstedt |
| 2 ml; 5 ml; 10 ml; 20 ml und 50 ml serologische Pipetten | Verschiedenes | Sarstedt |
| 30Gx1/2" Kanülen 0,3 x 13mm BD Microlance | Injektionen in Mäuse | Becton Dickinson |
| 5 ml; 10 ml; 25 ml Glaspipetten | Verschiedenes | Brandt |
| 6-Well Platten | Zellkultur | Sarstedt |
| sterile Einwegskalpelle, Nr. 11 | Präparation | Feather |
| Frame Star 384-well Platten | qRT-PCR | 4titude |
| Matrix Pipettenspitzen 30 µl | qRT-PCR | Thermo Scientific |
| Micro Test 96-well Platten | NO-Messung | Sarstedt |
| Pasteur Pipetten, Glass | Verschiedenes | Brandt |
| PCR-Strips | cDNA-Synthese | Sarstedt |
| QPCR Adhesive Clear Seals | qRT-PCR | 4titude |
| T75 Flaschen | Zellkultur | Sarstedt |
| 96-Well Platten, schwarze Wände, transparenter Boden | Caspase-Aktivitäts Messung | Sarstedt |
| Zellschaber, 24 cm | Zellkultur | TPP |

2.8 Geräte

Tabelle 6: Verwendete Geräte mit Anwendung und Hersteller

| Gerät | Verwendung | Hersteller |
|-------------------------------------|------------|--------------------|
| 7900 HT Fast Realtime PCR System | qRT-PCR | Applied Biosystems |

| | | |
|---|---|-----------------------------|
| S1 Pipette Filler | Verschiedenes | Thermo Scientific |
| Wasserbad TW20 | Erwärmen von Zellkulturmedien | Julabo |
| Stickstofftank ARPEGE 75 | Langzeitlagerung von Zellen | Air Liquide |
| Barnstead Easy Pure II | destilliertes Wasser | Thermo Scientific |
| Tissue Lyser LT | Lysieren von Retinae für RNA-Isolation | Qiagen |
| Vortex Genie II G-560E | Verschiedenes | Scientific Industries |
| NanoDrop 2000 | Messung von RNA-Konzentration | Thermo Scientific |
| Thermomixer compact 5436 | Verschiedenes | Eppendorf |
| Matrix Pipette | qRT-PCR pipettieren | Thermo Scientific |
| Neubauer Hämozytometer | Zellzahl-Auszählung | Marienfeld |
| Heraeus Labofuge 450R | Verschiedenes | Thermo Scientific |
| Eppendorf Zentrifuge 5415R | Verschiedenes | Eppendorf |
| Peqstar 2X Gradient Thermocycler | cDNA-Synthese | Peqlab |
| Microplate Reader | Absorptions-, Lumineszenzmessung | Tecan |
| Infinite F200 Pro | | |
| Mini Star Mikrozentrifuge | Verschiedenes | VWR |
| Sterilbank MSC-Advantage | Zellkultur | Thermo Scientific |
| Nikon TMS inverted Mikroskop | Verschiedenes | Nikon |
| Heracell 240i Co₂ Inkubator | Lagerung von Zellkulturen | Thermo Scientific |
| Stereo Zoom Binokular Mikroskop | Verschiedenes | VWR |
| Savant DNA Speed Vac Konzentrator | Aufkonzentrierung von RNA | Thermo Scientific |
| Zentrifuge Rotina 420R | Verschiedenes | Hettich |
| Spectralis-OCT | OCT-Untersuchung von Mäusen | Heidelberger Engineering |
| BVC professional Absaugpumpe | Verschiedenes | vacubrand |
| Weißlicht-Bank | Lichtexposition der Mäuse | Eigenbau |
| Savant DNA Speed Vac Concentrator | RNA-Proben Eindampfen | Thermo Scientific |

2.9 Software

Tabelle 7: Verwendete Software mit Anwendung und Hersteller

| Software | Verwendung | Hersteller |
|------------------|---------------------|--------------------|
| Corel Draw X5 | Grafiken | Corel |
| Microsoft Office | Verschiedenes | Microsoft |
| RQ Manager 1.2 | qRT-PCR | Applied Biosystems |
| SDS 2.3 | qRT-PCR | Applied Biosystems |
| GraphPad Prism 5 | Grafiken, Statistik | GraphPad |
| i-control 1.9 | No-, Caspase-Assay | TECAN |

3. Methoden

3.1 In vitro

3.1.1 Zellzahl-Auszählung

Um eine definierte Zahl an Zellen aussäen zu können, wurde die Gesamtzellzahl pro ml mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Hierzu wurden 10µl Zellsuspension auf die Zählkammer pipettiert und 4 Quadrate mit der Kantenlänge 1mm, die zum einfacheren Zählen in 16 kleinere Quadrate aufgeteilt sind, ausgezählt. Die Tiefe der Kammer beträgt 0,1mm, sodass sich ein Volumen von 0,1µl für jedes der 4 großen Quadrate ergibt. Um nun die Gesamtzellzahl pro ml zu erhalten, wurde die Durchschnittszellzahl der 4 großen Quadrate mit 10^4 multipliziert. Hieraus konnte berechnet werden, wie viel µl Zellsuspension der gewünschten Zellzahl entsprachen.

3.1.2 Stimulation

BV-2 Zellen wurden am Tag vor der Stimulation in Kulturmedium (DMEM high glucose, + 10% FCS, + 1% Penicillin/Streptomycin) in einer Dichte von 200.000 Zellen pro Well in Six-Well Platten für die Genexpressions-Versuche und 400.000 Zellen pro Well in Six-Well Platten für die NO-Messung ausgesät. Kultiviert wurden die Kulturen bei 37°C und 5% CO₂ im Inkubator.

Zu Beginn wurde das pulverförmige Minocyclin zum Lösen in sterilem NaCl unter Agitation 40 sek bei 97°C erhitzt. Nach Entfernung des alten Mediums, einmaligem Waschen mit PBS und Hinzugabe von neuem Kulturmedium wurden die Zellen auf unterschiedliche Weisen stimuliert, zum einen zwei unbehandelte Gruppen, dann zwei Gruppen mit 50 µg/ml Minocyclin. 30 Minuten nach Minocyclinbehandlung wurde zu je einer unbehandelten und einer Minocyclin-Gruppe LPS hinzugefügt, dass eine Konzentration von 50 ng/ml erreicht wurde. So ergaben sich eine unbehandelte Kontrollgruppe, eine LPS-Gruppe, eine Minocyclin-Gruppe und eine Minocyclin + LPS-Gruppe. Ab dem Zeitpunkt der LPS-Zugabe wurde für 6h bzw. 24h kultiviert.

Zur Messung der Caspase-Aktivität in 661W Photorezeptorzellen wurden diese in einer Dichte von 10.000 Zellen pro Well in einer 96-Well Platte mit schwarzen

Wänden und transparentem Boden am Vortag der Stimulation ausgesät. Nach Entfernung des Mediums wurden 100 µl konditionierter BV-2 Überstand für 48 h auf die Zellen gegeben.

3.1.3 Trypanblau-Färbung

Zur Bestimmung des prozentualen Anteils von lebenden Zellen an der Gesamtzellzahl, nach verschiedenen langen Stimulationszeiten mit LPS und/oder Minocyclin sowie einer unstimulierten Kontrolle, wurden 10µl Zellsuspension von jedem Stimulationszustand mit 10µl Trypanblau (0,5%, 1:3 mit PBS verdünnt) vermischt und anschließend mit der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Trypanblau färbt nur abgestorbene Zellen, lebende Zellen hingegen bleiben farblos. Um den prozentualen Anteil der lebenden Zellen zu bestimmen, wurden sowohl die farblosen als auch die gefärbten Zellen wie unter 3.1.1 beschrieben ausgezählt. Hieraus wurde die Gesamtzellzahl hochgerechnet. Aufgrund der Verdünnung mit dem Farbstoff musste die nach der oben beschriebenen Rechnung resultierende Zellzahl verdoppelt werden. Jetzt konnte die Zahl der lebendigen Zellen ins Verhältnis zur Gesamtzellzahl gesetzt werden.

3.1.4 RNA-Isolation aus Zellen

Die RNA-Isolation wurde nach dem Mini-Protokoll des NucleoSpin[®]RNA-Kit von MACHEREY-NAGEL durchgeführt. Die Zellen wurden zuvor mit β -Mercaptoethanol + RA1-Puffer (1:101, Lyse-Puffer) lysiert, der dazu chaotrope Salze enthält, die Proteine denaturieren und so die RNA auch vor dem Abbau durch RNasen schützen. Um möglichst alle Zellen aus den Wells zu lösen, wurden sie mit einem Zellschaber abgekratzt. Zur Reduktion der Viskosität und zum Reinigen des Lysats wurde es nun durch einen NucleoSpin[®] Filter laufen gelassen. Jetzt wurde durch Zugabe von 70%igem Ethanol das Lysat homogenisiert und somit die Bedingungen für eine Bindung an eine Silikat-Membran geschaffen. Da neben der RNA auch DNA an die Membran bindet, wurde diese durch eine rekombinante DNase verdaut. Zuvor wurde die Membran mit einem Entsalzungspuffer behandelt. Auf den DNA-Verdau folgten Waschschrte, die Salze und sonstige noch verbliebene Zellbestandteile entfernen. Beim letzten Schritt wurde die RNA in 40µl RNase-freiem Wasser eluiert.

3.1.5 RNA-Konzentrations Bestimmung

Die RNA-Konzentration der einzelnen Proben wurde mit dem NanoDrop® 2000 Spektrometer von Thermo Scientific gemessen. Hierzu wurde 1 µl RNase-freies Wasser als Leerprobe vor der eigentlichen Messung analysiert. Dann wurde in 1 µl von jeder Probe die RNA-Konzentration bestimmt. Zur Abschätzung der Reinheit der RNA-Proben wurde das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm genutzt, dabei entsprechen 260 nm dem Absorptionsmaximum von RNA und 280 nm dem von Proteinen, welche eine Kontamination darstellen. Als reine RNA werden Proben betrachtet, die ein Verhältnis von 2,0 aufweisen. Gelagert wurden die RNA-Proben bei -80°C.

3.1.6 Eindampfen der RNA-Proben

Wenn die RNA-Konzentration zu gering war, um in den zur cDNA-Synthese maximal eingesetzten 11 µl eine genügende Menge an RNA zu haben, wurden die RNA-Proben eingedampft. Dazu wurde der Savant DNA Speed Vac Concentrator verwendet. Die Proben wurden je nach Bedarf unterschiedlich lange eingedampft und anschließend wurde wieder die RNA-Konzentration gemessen (siehe 3.1.6).

3.1.7 cDNA-Synthese

Zum Umschreiben der RNA in cDNA (komplementäre DNA) als Vorbereitung auf die qRT-PCR wurde das Quick Protokoll™ (Synthesis of First Strand cDNA Suitable for PCR Amplification) des RevertAid™ H Minus First Stand cDNA Synthesis Kit verwendet. Hierbei wird mRNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase sowie entsprechenden Puffern und Substraten in cDNA umgeschrieben. Pro Probe wurde 1 µg RNA in 1 µg cDNA umgesetzt. Zu dem 1 µg RNA entsprechenden Probenvolumen wurde so viel RNase-freies Wasser hinzugefügt, dass alle Proben 11 µl Volumen hatten. Nun wurde 1 µl Random Hexamer Primer (0,2 µg/µl) hinzugefügt und für 5 min bei 70°C inkubiert. In jede Probe wurden hiernach 4 µl 5X reaction buffer, 1 µl RNase-freies Wasser und 2 µl 10 mM dNTP Mix pipettiert. Jetzt wurde für 5 min bei 25°C inkubiert und dann 1 µl RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase (200 U/µl) hinzugesetzt. Zum Schluss des Protokolls wurde für 10 min

bei 25°C gefolgt von 60 min bei 42°C und 10 min bei 70°C inkubiert. Die Inkubation erfolgte mit dem peqstar 2x Cycler von peqlab. Die gewonnenen cDNA-Proben wurden bei -20°C gelagert.

3.1.8 Taqman Quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR)

Zur Bestimmung der relativen Genexpression wurde das 7900 HT Fast Realtime PCR System von Applied Biosystems verwendet.

Um die Stärke der Expression eines Genes messen zu können, wird die Menge der mRNA relativ zu einer Vergleichsprobe bestimmt. Dazu wurde wie unter 3.1.7 beschrieben die mRNA in cDNA umgeschrieben. Diese wird nun durch eine Polymerase-Kettenreaktion vervielfältigt (amplifiziert). Hier wird bei jedem Zyklus die DNA durch eine DNA-Polymerase (hitzestabile Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*) und den nötigen „Bausteinen“ (Deoxinukleotide, dNTP) kopiert, durch mehrfach aufeinander folgende Zyklen ergibt sich eine exponentielle Vervielfältigung. Ein Zyklus besteht aus drei Phasen, dem Aufschmelzen der DNA, dem Anlagern (Annealing) der Primer und der Elongation durch die Polymerase. Für jede Phase gibt es ein Temperaturoptimum, auf das die Probe erhitzt, bzw. abgekühlt werden muss und das für unterschiedlich lange Zeit gehalten werden muss.

Um die Menge bestimmter Gene messen zu können werden Primer hinzugegeben, welche eine Amplifikation nur der dem gesuchten Gen abstammenden cDNA erlauben. Die Primer lagern sich nur an die gewünschte cDNA an und bieten der Polymerase den Ansatzort, um mit der Vervielfältigung zu beginnen.

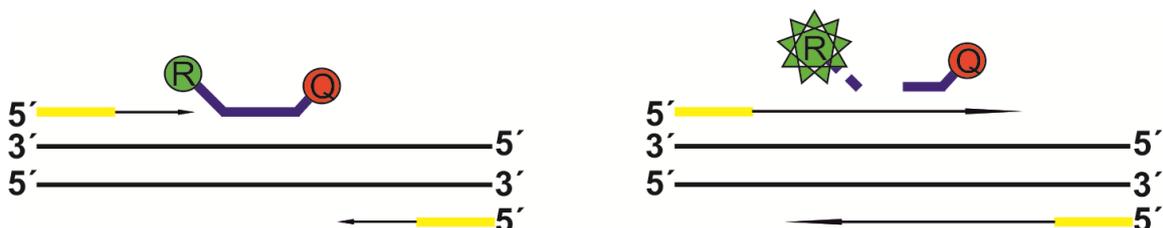


Abb. 4: Taqman-Prinzip. Primer (gelb) und Sonde (blau) mit Reporterfarbstoff (R) und Quencher (Q) lagern sich an die DNA an. Sobald die Polymerase die Sonde erreicht spaltet sie diese auf und ein Fluoreszenzsignal kann generiert werden.

Bei dem Taqman real-time Verfahren wird zusätzlich eine Sonde hinzugegeben, welche sich hinter den Primern ebenfalls an die gesuchte cDNA anlagert. Sie besitzt einen Reporterfarbstoff sowie einen sogenannten Quencher, welcher das Fluoreszenzsignal des Reporterfarbstoffs unterdrückt. Sobald die Polymerase die

Sonde erreicht, wird diese durch die 5' - 3'-Endonukleaseaktivität der Polymerase aufgespalten und der Quencher trennt sich räumlich von dem Reporter, dadurch kann dieser nun ein Signal emittieren (

Abb. 4). Dieses wird erzeugt, indem der Reporter durch einen Laser angeregt wird. Die resultierende Fluoreszenz wird gleichzeitig photometrisch gemessen. Sie ist proportional zur in der Probe enthaltenen cDNA-Menge. Nach jedem Zyklus tastet der Laser die Proben ab, wodurch man eine Kurve erhält, die nach einem exponentiellen Anteil in ein Plateau übergeht, wenn alle Substrate verbraucht sind.

Bei der relativen Genexpressionsmessung wird eine Probe als Kalibrator bestimmt, deren Genexpression als 1 festgelegt wird, mit der die Fluoreszenzsignale der anderen Proben verglichen werden und so eine Aussage über die Genexpression der einzelnen Proben relativ zur Kalibratorprobe gemacht. Dazu legt man nun bei jeder Kurve den Wendepunkt des exponentiellen Bereichs als Schwellenwert fest und ermittelt die diesem Signalwert entsprechende Zykluszahl (Ct; Abb. 5). Jetzt folgt über die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode die Berechnung der relativen Genexpression. Zunächst wird, um kleine Unterschiede in der eingesetzten cDNA-Menge auszugleichen, jedes gemessene Gen auf ein Haushaltsgen bezogen, welches unabhängig von experimenteller Beeinflussung konstant exprimiert wird. Die einzelnen Rechenschritte für jede Probe sind:

- Bildung der Ct-Mittelwerte der gemessenen Zielgene, sowie des Haushaltsgens
- Differenzbildung aus Mittelwert Zielgen und Haushaltsgen ergibt ΔCt -Wert
- Differenzbildung aus ΔCt -Wert der zu untersuchenden Proben und ΔCt -Wert der Kontrollprobe ergibt den $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert
- Bildung der Potenz $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ ergibt die relative Expression im Vergleich zur Kontrollprobe (RQ)

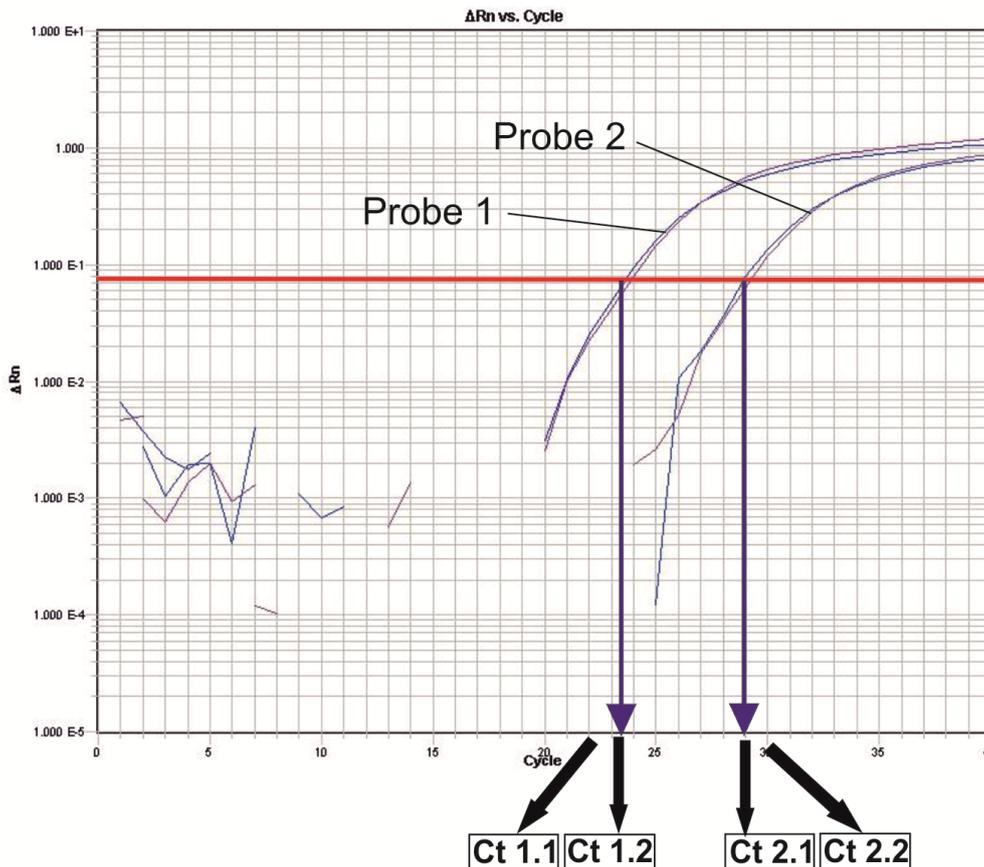


Abb. 5: Amplifikationskurve und Ermittlung der Ct-Werte. Kurven des Fluoreszenzsignals zweier in Duplikaten gemessenen Proben. Die Schnittstelle der Kurven mit der Schwelle (rot) ergibt die Ct-Werte der einzelnen Messungen, die für jede Probe gemittelt werden.

Um Ct-Mittelwerte zu erhalten, wurden alle Proben in Duplikaten untersucht. Ebenso wurden Negativkontrollen mitlaufen gelassen, damit Verunreinigungen der verwendeten Reagenzien ausgeschlossen werden konnten. Es wurden 50 ng (2,5 μ l der 1:2,5 verdünnten cDNA-Proben) cDNA pro Well eingesetzt, sowie Mastermix mit 2x konzentriertem FastStart Universal Probe Master (je 5 μ l), Vorwärts- und Rückwärtsprimer (je 1 μ l, 10 μ M), Sonde (je 0,125 μ l) sowie Aqua. dest. (je 0,375 μ l), sodass ein Probenvolumen von 10 μ l resultierte. Die Proben sowie die Negativkontrollen wurde auf eine 384 well Platte pipettiert, mit Folie abgeklebt und 5 min bei 900 Umdrehungen/min bei 20°C zentrifugiert. Die Programmierung des Taqman erfolgt mit dem Programm SDS 2.4. Es wurde das Programm $\Delta\Delta$ Ct (RQ) verwendet. Die ATPase, als Haushaltsgen, wurde als endogene Kontrolle gesetzt und die Gene als Ziele. Das Temperaturprofil begann mit 10 min bei 95°C, gefolgt von 40 Zyklen mit 15 sek 95°C gefolgt von 1 min 60°C. Analysiert wurden die Daten mit dem RQ-Manager 1.2.1 nach der oben beschriebenen Methode. Die RQ-Werte

der Proben wurden je nach Zugehörigkeit zu einer Gruppe (Kontrolle, unbehandelt, behandelt) zusammengefasst und wie unter 3.3 beschrieben ausgewertet.

3.1.9 NO-Messung

Zur Messung der NO-Produktion von stimulierten BV-2 Mikroglia wurde das Griess Reagent System von Promega verwendet. Gemessen wurden wie unter 3.1.2 beschrieben stimulierte Zellen. Nach 24 h Stimulation wurden die Überstände abgenommen und 10 Minuten bei 4000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Hiervon wurde der Überstand abgenommen und das Pellet verworfen. Von jeder Probe wurden 50 µl in Triplikaten in einer weißen 96 Well Platte gemessen. Als Referenz wurde eine Verdünnungsreihe verwendet. Hierfür wurde 1 µl der Nitrit-Standardlösung (100mM) aus dem Kit mit 999 µl des Kulturmediums verdünnt (1:1000), sodass die Endkonzentration 100 µM betrug. Hiervon kamen 100 µl in die Wells A 1 – 3, in die restlichen Wells der Spalten 1 – 3 kamen 50 µl Kulturmedium. Nun wurden 50 µl aus den Wells der Reihe A genommen und mit dem Medium in Reihe B gemischt, davon wurden wiederum 50 µl mit Reihe C gemischt. Dies wurde fortgeführt bis Reihe G, sodass von Reihe A bis H eine Verdünnungsreihe mit den Nitrit-Konzentrationen 100 µM; 50 µM; 25 µM; 12,5 µM; 6,25 µM; 3,13 µM; 1,56 µM und 0 µM entstand in einem Volumen von 50 µl pro Well.

Nun wurden 50 µl Sulfanilamid-Lösung in jedes Well der Platte gegeben und 10 Minuten bei Raumtemperatur (RT) in Dunkelheit inkubiert. Hiernach wurden 50 µl NED-Lösung (N -1-Naphthyl Ethylendiamindihydrochlorid) in jedes Well gegeben und wiederum 10 Minuten bei RT in Dunkelheit inkubiert. In Abhängigkeit der Nitrit-Konzentration führt diese Reaktion (Griess-Reaktion) zu einem Farbumschlag, der nun bei 540 nm über die Absorption der Proben mit dem TECAN infinite F200 PRO gemessen werden konnte. Bei Nitrit handelt es sich um ein Abbauprodukt von NO, dessen Konzentration äquivalent zu der von NO ist, daher kann die Nitrit-Konzentration der NO-Konzentration gleichgesetzt werden. Bei der unter sauren Bedingungen ablaufenden zweistufigen Reaktion reagiert zuerst Sulfonamid mit Nitrit, wobei Wasser freigesetzt wird. Danach verbindet sich das Produkt der ersten Reaktion mit NED zu einem Azo-Farbstoff, was den sofortigen Farbumschlag bewirkt. Mit Hilfe der Verdünnungsreihe wurde eine Standardkurve erstellt, mit der

von der Absorption auf die Nitrit-Konzentration in μM der Proben zurückgerechnet werden konnte.

3.1.10 Caspase-Aktivitäts Messung

Zur Messung des anti-apoptotischen Einflusses von Minocyclin behandelten BV-2 Zellen auf 661W Photorezeptorzellen wurde der Caspase-Glo® 3/7 Assay verwendet. BV-2 Zellen wurden mit LPS, Minocyclin und Minocyclin + LPS 24 h lang stimuliert (siehe 3.1.2). Die Überstände wurden abgenommen und 10 Minuten bei 4000 Umdrehungen/min zentrifugiert, um Zellreste zu entfernen. Von einem Teil jeder Probe dieser Überstände wurde zuvor wie oben beschrieben die NO-Konzentration gemessen, mit dem verbleibenden Rest der Überstände wurden die 661W Photorezeptorzellen stimuliert. Hierzu wurden am Tag vorher ca. 10.000 661W Zellen pro Well auf eine 96 Well Platte mit schwarzen Wänden und transparentem Boden ausgesät. Die konditionierten BV-2 Überstände wurden in Duplikaten auf die 661W Zellen gegeben, je 100 μl pro Well. Als Leerprobe wurde die Caspase-Aktivität im Medium ohne Zellen gemessen. Auch wurde die basale Caspase-Aktivität der 661W Zellen gemessen, die statt mit BV-2 Überständen nur mit Medium behandelt wurden. Der Assay wurde nach 48 Stunden Stimulation mit den BV-2 Überständen durchgeführt. Die Messung wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Es wurden 100 μl Caspase-Glo® Reagenz zu jeden Well hinzugefügt und die Platte wurde für 30 Sekunden bei 300 Umdrehungen/min geschüttelt. Das Reagenz lysiert die Zellen und enthält das Tetrapeptid DEVD als Substrat, welches durch Caspase-3 und -7 umgesetzt wird. Das dabei entstehende Produkt wird nun mit ATP und O_2 von der ebenfalls im Reagenz enthaltenen Luziferase umgesetzt, wobei ein Lichtsignal emittiert wird. Dieses Signal ist zu der in der Probe vorhandenen Caspase-Aktivität proportional. Nach 30-minütiger Inkubation wurde die Lumineszenz pro Probe 1 sek lang mit dem TECAN infinite F200 PRO in relative light units (RLU) gemessen. Bei dieser Einheit handelt es sich um eine Zählung von Photonen pro Sekunde. Vor der Auswertung wurde von den Roh-Daten der Wert der Leerprobe abgezogen.

3.2 In vivo

3.2.1 Tierhaltung

Die Mäuse wurden unter klimatisierten Bedingungen bei 22°C und einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus mit freiem Zugang zu Wasser und Nahrung gehalten. Die Gesundheit der Tiere wurde regelmäßig überprüft und alle Experimente wurden in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt.

3.2.2 Lichtschaden und Behandlungsprotokoll

Zur Untersuchung des Effekts von Minocyclin auf lichtinduzierte retinale Degeneration wurde bei mit Minocyclin behandelten und unbehandelten BALB/c Mäusen ein Lichtschaden hervorgerufen. Dazu wurden dunkeladaptierte Mäuse mit weitgestellten (Phenylephrin 2,5% und Tropicamid 0,5%) Pupillen 1h lang einer Lichtintensität von 15.000 lx ausgesetzt.

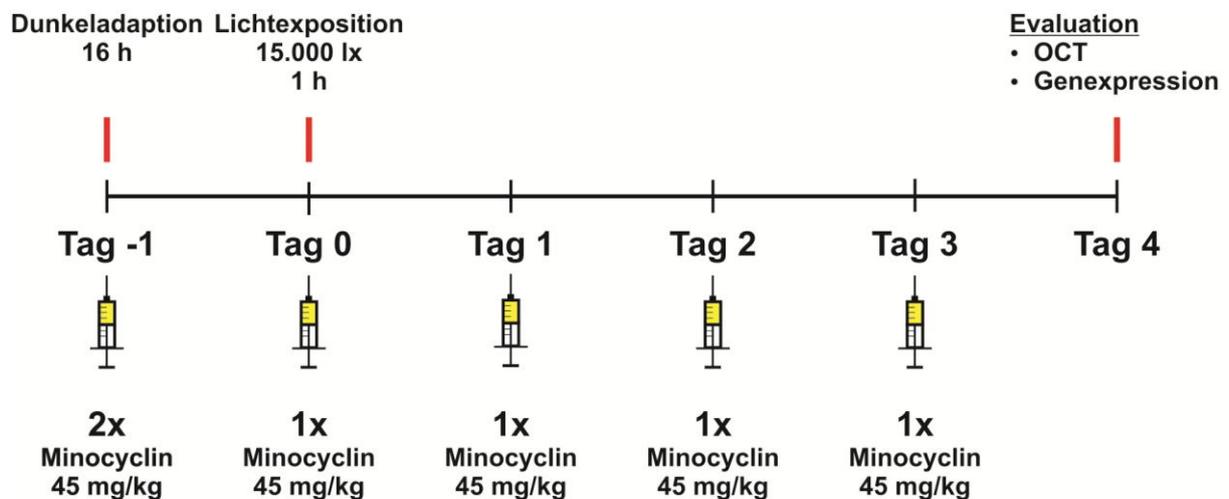


Abb. 6: Versuchsschema der *in vivo* Experimente.

Die Behandlung mit Minocyclin erfolgte nach folgendem Schema (Abb. 6): Am Tag vor der Lichtexposition wurde den Tieren im Abstand von ca. 6 Stunden je 45mg/kg Körpergewicht Minocyclin gelöst in NaCl, welches zum Lösen 40 sec bei 97°C erhitzt wurde, injiziert. Am Tag der Lichtexposition sowie am ersten, zweiten und dritten darauffolgenden Tag wurden jeweils einmal 45mg/kg Körpergewicht injiziert. Am

vierten Tag erfolgte die OCT-Untersuchung und schließlich die Präparation der Retinae zur Messung der Genexpression.

3.2.3 Optische Kohärenztomographie (OCT)

Die optische Kohärenztomographie ist ein relativ neues Verfahren, das in der Augenheilkunde in den letzten Jahren enorm an Bedeutung zugenommen hat [40]. Konnte man den hinteren Augenabschnitt, insbesondere die Retina, früher nur mit Hilfe der direkten bzw. indirekten Ophthalmoskopie als Gesamtbild betrachten, ermöglicht die OCT-Technik eine retinale Schnittbilddarstellung, wobei auch die einzelnen Schichten der Retina differenziert werden können [2].

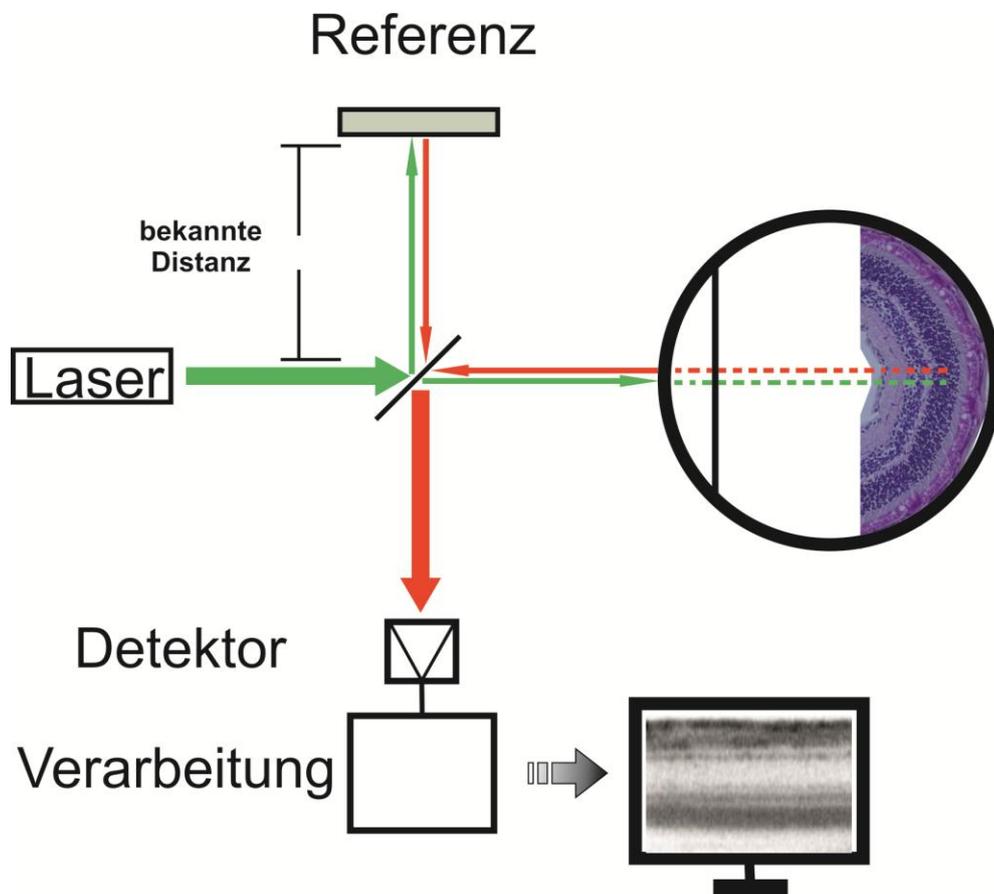


Abb. 7: Vereinfachte Darstellung des Prinzips der Spektral-Domänen OCT. Das von den Retinaschichten reflektierte Licht wird mit dem eines Referenzarms verglichen, welches eine bekannte Distanz zurückgelegt hat. Das Interferenzmuster eines bestimmten Spektrums wird mittels einer Fourier-Transformation analysiert, wodurch auf die Ursprungstiefe des Signals im Gewebe geschlossen werden kann. Die Reflektivität der Strukturen wird anhand der Intensität des Signals ermittelt. Aus diesen beiden Informationen kann ein zweidimensionales Bild erstellt werden. Mehrere solcher Schnitte können zu einer dreidimensionalen Volumendarstellung zusammengefügt werden (adaptiert von: [37], Quelle Histo: R. Maniu).

Hierbei wird die Netzhaut mit einem Laser abgetastet (Abb. 7). Durch die unterschiedliche Reflektivität der einzelnen Netzhautschichten kann ein dem histologischen Schnitt vergleichbares Bild erzeugt werden (Abb. 8).

Konventionelle Bildgebung beruht auf Absorption, ein OCT jedoch auf Reflektivität, dies resultiert in einer invertierten Abbildung der Graustufen. Zusätzlich gibt dies noch weiter Informationen über die gescannten Strukturen, es muss bedacht werden, dass membranöse Oberflächen stark reflektieren und so ein kräftigeres Signal entsteht.

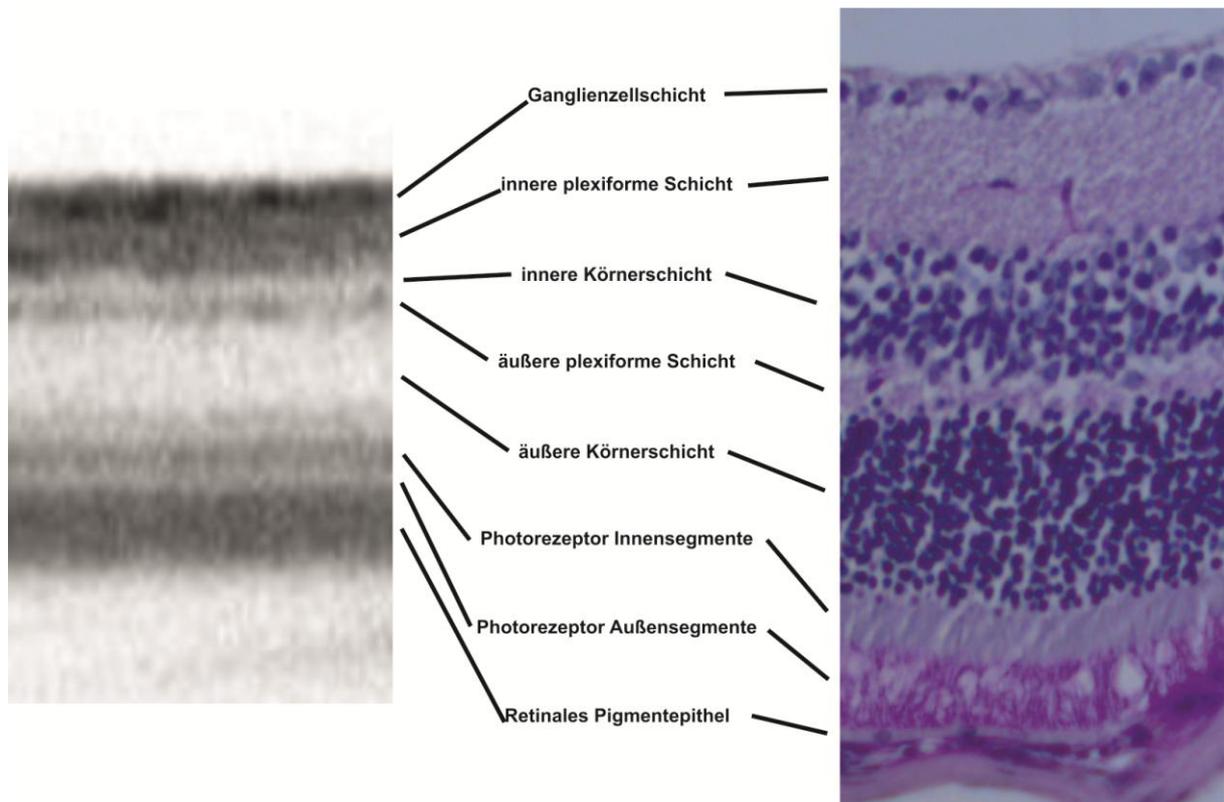


Abb. 8: Schichtvergleich zwischen OCT und histologischem Schnitt. OCT-Scan (links), HE-gefärbter histologischer Schnitt durch die Retina (rechts, Quelle: R. Maniu)

Die OCT-Technik stellt auch für die Forschung eine gut zu evaluierende Methode dar, die mittlerweile dank der stattgefundenen Fortschritte, die Auflösung und Untersuchungsgeschwindigkeit betreffend, genaue Aussagen über die retinale Morphologie auch bei Mäusen erlaubt [37]. Die stetig stattfindenden Verbesserungen der Technik lassen eine immer genauere Auflösung erwarten, die evtl. bis auf zelluläre Ebene reicht, womit dann beispielsweise Mikrogliazellen *in vivo* beobachtet werden könnten.

Des Weiteren handelt es sich hierbei um eine nichtinvasive Untersuchung, weshalb mit weniger Mäusen mehr Versuche gemacht werden können und, es ist, im

Gegensatz zu histologischen Schnitten, eine Evaluierung zu verschiedenen Zeitpunkten bei ein und demselben Tier durchführbar.

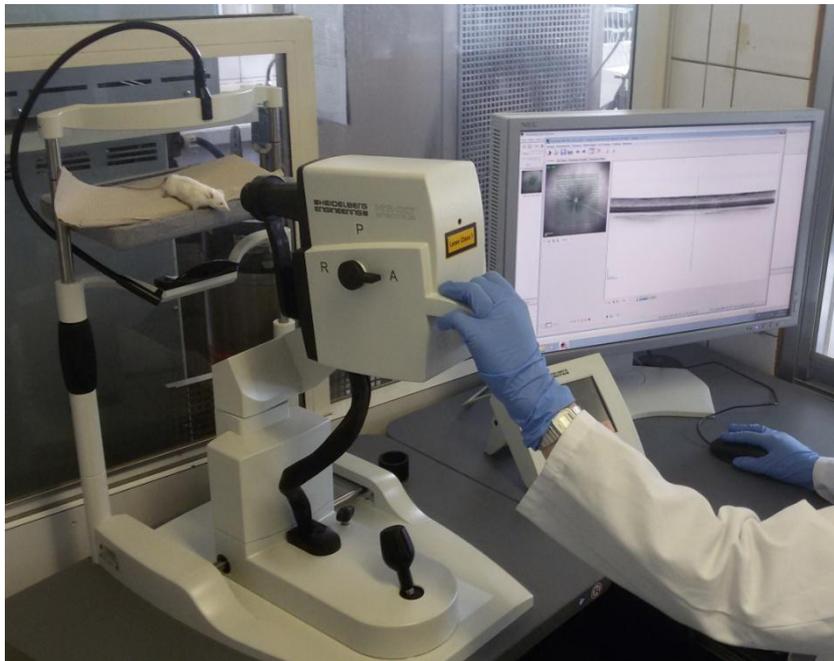


Abb. 9: Spektral-Domänen OCT SPECTRALIS® von Heidelberger Engineering. Aufbau mit modifizierter Halterung für Mäuse.

Für die OCT-Untersuchungen wurden die Tiere mit 100 µl Narkoselösung, bestehend aus: Ketamin (Ketavet, 15 mg/ml) und Xylanzinhydrochlorid (Rompun, 1,166 mg/ml) intraperitoneal anästhesiert und die Pupille weitgetropft (Phenylephrin 2,5% und Tropicamid 0,5%). Zwischendurch wurden die Augen zur Vermeidung von Austrocknung und dadurch bedingter Hornhauttrübung mit Hylo-Vision sine befeuchtet.

Ausschließlich eine leichte Modifikation an dem für den Menschen entwickelten Gerät war nötig, um die Tiere in geeigneter Position vor dem Tomographen zu platzieren, es wurden keine zusätzlichen Linsen benötigt (Abb. 9).

Beide Augen jedes Tieres wurden mit einem Spectralis OCT von Heidelberger Engineering untersucht (Abb. 9). Um bei allen Tieren eine vergleichbare Stelle der Netzhaut zu untersuchen, wurde ein Gitter zentral über den Sehnerv gelegt. Abb. 10 zeigt die Auswertung der OCT-Scans, dabei wurde die Netzhautdicke mit dem automatisierten Messwerkzeug der Analysesoftware gemessen. Hierfür wurden die Bilder nachbearbeitet, um Ungenauigkeiten der automatischen Festlegung der Retinagrenzen auszugleichen. Als ein Messpunkt wurde der Mittelwert der in Abb.

10 mit einem Stern markierten Sektoren gewählt, dieser stellt die durchschnittliche zentrale Retinadicke eines Auges dar.

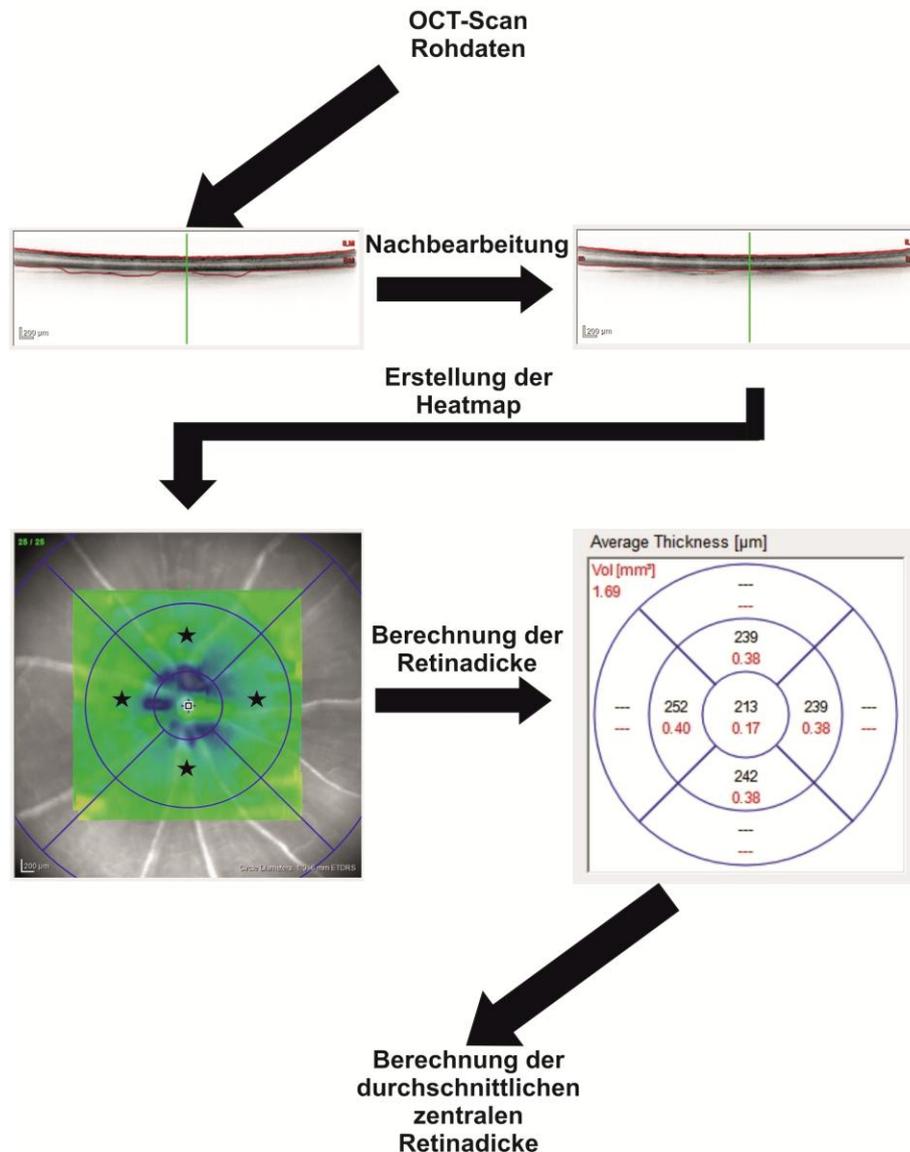


Abb. 10: Auswertung der OCT-Untersuchung. Nach der Aufnahme der Scans wird die automatische Festlegung der Retinagrenzen korrigiert und hieran die durchschnittliche Dicke in bestimmten Gebieten der Netzhaut berechnet.

3.2.4 Präparation der Retinae

Zur Präparation der Retinae wurden die Mäuse unmittelbar nach der OCT-Untersuchung mittels Genickbruch getötet. Die Augen wurden entnommen und in einer mit PBS gefüllten Petrischale unter einem Binokularmikroskop mit zwei Pinzetten am Limbus gehalten. Nun wurden durch Zug in limbusparalleler Richtung die Augen eröffnet. Durch die resultierende Aufhebung des intraokulären Drucks löst sich die Netzhaut vom retinalen Pigmentepithel, dem sie nur lose aufliegt. Da sie

über die Iris (Regenbogenhaut) mit der Linse verbunden ist, lösen sich beim Auseinanderziehen beide gemeinsam von Sklera (Lederhaut) und Kornea (Hornhaut). Jetzt kann die Retina durch sanften Zug vorsichtig von der Linse getrennt werden, wobei das Corpus vitreum (Glaskörper), das aufgrund der verhältnismäßig großen Linse klein ist, ebenfalls mit entfernt wird.

3.2.5 RNA-Isolation aus Retina

Bei der mRNA-Isolation wurde nach dem Mini-Protokoll des NucleoSpin[®]RNA-Kit von MACHEREY-NAGEL verfahren. Beide zu einem Tier gehörende Retinae wurden zu einer Probe zusammengegeben und in den Lyse-Puffer überführt. Nun wurde eine Metallkugel hinzugegeben und das Gewebe 1 min bei 40 Hz mit dem TissueLyser LT von Qiagen zerkleinert und lysiert. Die weitere Isolation erfolgte wie bei der Isolation aus Zellen (siehe 3.1.4). Da die RNA-Menge in Retinae geringer ist als in einem Well mit Zellen, wurde, um höhere Konzentrationen zu erzielen, in nur 20 µl RNase-freiem Wasser eluiert.

Die Messung der RNA-Konzentration erfolgte wie unter 3.1.5 beschrieben.

3.2.6 cDNA-Synthese/qRT-PCR

Die cDNA-Synthese erfolgte wie unter 3.1.7 beschrieben. Aufgrund von geringeren Mengen an RNA wurde teilweise weniger als 1 µg umgeschrieben.

Die qRT-PCR wurde wie unter 3.1.8 durchgeführt. Aufgrund der unterschiedlichen Mengen an cDNA und um möglichst viele Gene messen zu können wurde die Verdünnung der cDNA so angepasst, dass 25 ng pro Well eingesetzt werden konnten.

3.3 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurde mit Hilfe von GraphPad Prism 5 für die *in vitro* Experimente eine einfaktorielle ANOVA durchgeführt und als Post Test ein Bonferroni's Multiple Comparison Test gewählt. Für die *in vivo* Experimente wurde ebenfalls eine einfaktorielle ANOVA genutzt, jedoch ein Dunnett's Multiple

Comparison Test als Post Test, bei dem die Gruppe der unbehandelten Tiere mit Lichtschaden als Bezugsgruppe herangezogen wurden. Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als signifikant betrachtet. Die Signifikanzstufen wurden in den Grafiken wie folgt dargestellt: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (***). Alle Ergebnisse stellen den Mittelwert \pm Standardfehler dar.

4. Ergebnisse

4.1 In vitro

4.1.1 Minocyclin reduziert die Expression von proinflammatorischen Genen in LPS-stimulierten BV-2 Mikrogliazellen

Um den Effekt von Minocyclin auf Mikrogliazellen zu untersuchen wurden, BV-2 Mikrogliazellen mit einer Dichte von 200.000 Zellen pro Well in Six-Well Platten kultiviert und mit 50 ng/ml LPS für 6 und 24 h stimuliert. In der Minocyclin- und Minocyclin + LPS-Gruppe erfolgte eine 30 minütige Vorstimulation mit 50 µg/ml Minocyclin. Als Kontrolle wurden unstimulierte Zellen genutzt, die lediglich in Medium kultiviert wurden. Zusätzlich wurden auch Zellen ausschließlich mit Minocyclin behandelt. 6 bzw. 24 h nach LPS Zugabe wurde die Genexpression ausgewählter proinflammatorischer Gene mittels qRT-PCR gemessen.

Die Vitalität der Zellen wurde durch eine Trypanblau-Färbung geprüft. Abb. 11 zeigt das Ergebnis der Trypanblau-Färbung nach 24 h Stimulation und Auszählung von jeweils einem Well pro Bedingung. Unter allen vier Bedingungen sind über 93% der Zellen lebendig.

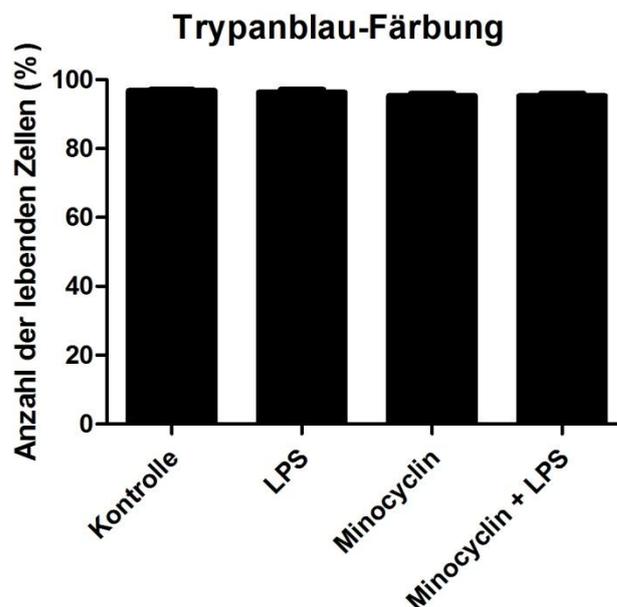


Abb. 11: BV-2 Zellvitalitätsmessung nach 24 h. Nach 24 h Stimulation wurde der prozentuale Anteil an lebenden Zellen mittels Trypanblau-Färbung bestimmt. In allen Gruppen waren über 93% lebendig und kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen messbar. (n = 1, p > 0,1)

Die Expression der proinflammatorischen Gene CCL2, IL-6 und iNOS konnte durch Minocyclin signifikant reduziert werden. Der deutlichste Effekt zeigte sich dabei nach 6 h (Abb. 12).

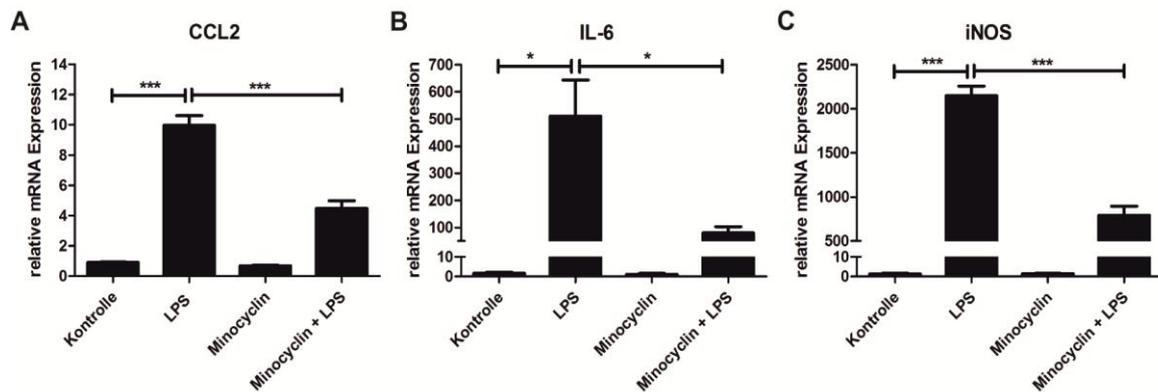


Abb. 12: Effekt von Minocyclin auf die Genexpression von BV-2 nach 6 h. Minocyclin (50 µg/ml) reduziert die durch LPS (50 ng/ml) in BV-2 induzierte Genexpression von CCL2 (A), IL-6 (B) und iNOS (C). Messung (qRT-PCR) 6 h nach LPS Zugabe zuvor 30-minütige Vorstimulation mit Minocyclin. (n = 5, Mittelwert ± Standardfehler, ***p < 0,001, *p < 0,05)

Bei CCL2 konnte durch Minocyclin eine 9,968 (± 0,6421) fache Induktion durch LPS auf 4,472 (± 0,5157) fach reduziert werden (n = 5, p < 0,001). IL-6 ließ sich von 510,0 (± 133,4) auf 79,51 (± 23,38) senken (n = 5, p < 0,01). Den sehr deutlichen Effekt konnte Minocyclin bei iNOS erreichen, von 2149,0 (± 107,3) auf 791,6 (± 103,6) (n = 5, p < 0,001).

Die Genexpression von iNOS war nach 24 h durch Minocyclin weiterhin deutlich reduzierbar, nämlich von 3,794 (± 0,8258) auf 0,4853 (± 0,08469) (n = 8, p < 0,001)(Abb. 13). Die Induktion bei CCL2 und IL-6 war nicht signifikant, ebenso der Minocyclineffekt.

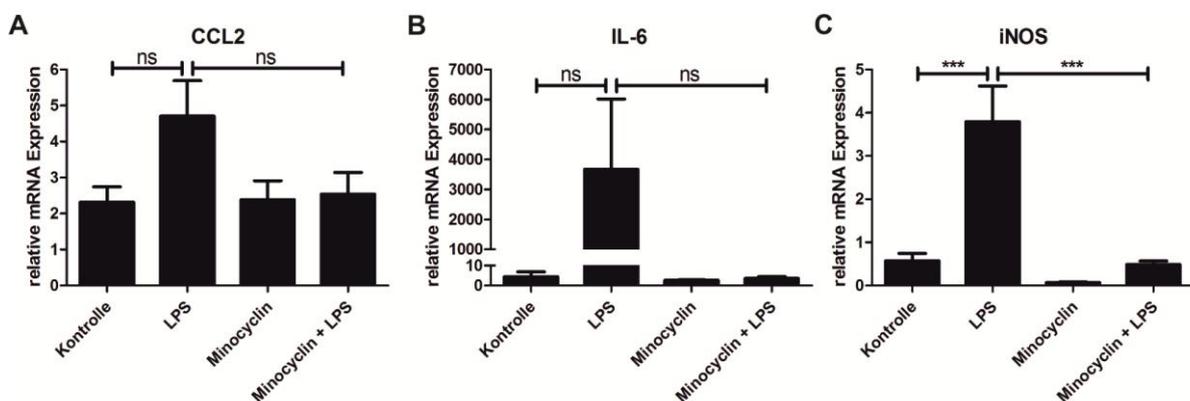


Abb. 13: Effekt von Minocyclin auf die Genexpression von BV-2 nach 24 h. Minocyclin (50 µg/ml) reduziert die durch LPS (50 ng/ml) in BV-2 induzierte Genexpression von iNOS (C), nicht jedoch von CCL2 (A) und IL-6 (B). 30 Messung (qRT-PCR) 24 h nach LPS Zugabe zuvor 30-minütige Vorstimulation mit Minocyclin. (n = 8, Mittelwert ± Standardfehler, ***p < 0,001, ns = nicht signifikant)

4.1.2 Minocyclin reduziert die NO-Produktion von LPS-stimulierten BV-2 Mikrogliazellen

Bei inflammatorischen Prozessen spielt NO eine wichtige Rolle in der Makrophagen-vermittelten Immunabwehr. Es wird in hohen Konzentrationen von der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) hergestellt und wirkt zytotoxisch. Da Minocyclin die Expression von iNOS, dem Schlüsselenzym in der NO-Synthese, sowohl nach 6 h als auch nach 24 h herunterreguliert, sollte über eine Messung der Nitrit-Konzentration, als äquivalentes Abbauprodukt von NO, im Überstand der stimulierten BV-2 Zellen getestet werden, ob auch die Konzentration des Syntheseprodukt der iNOS durch Minocyclin reduziert werden kann. Dazu wurden BV-2 Zellen wie unter 3.1.2 beschrieben stimuliert und nach 24 h die Nitrit-Konzentration in den Überständen mittels Griess Reaktion gemessen (Abb. 14).

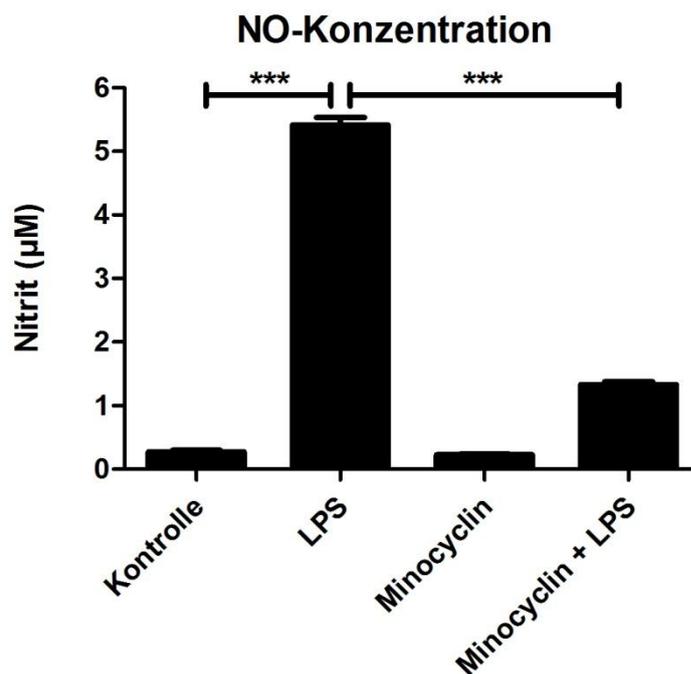


Abb. 14: Effekt von Minocyclin auf die Nitrit-Produktion von BV-2 nach 24 h. Minocyclin (50 µg/ml) reduziert die in BV-2 durch LPS (50 ng/ml) induzierte NO-Produktion. Messung (Griess Reaktion) 24 h nach LPS Zugabe zuvor 30-minütige Vorstimulation mit Minocyclin. (n = 3, Mittelwert ± Standardfehler, ***p < 0,001)

Hierbei zeigte sich, dass die durch LPS induzierte Erhöhung der Nitrit-Konzentration auf 5,411 µM (± 0,12) durch Minocyclin auf 1,335 µM (± 0,04035) gesenkt werden konnte, dieser Effekt war hoch signifikant (n = 3, p < 0,001). Bei den unstimulierten Zellen betrug die Nitrit-Konzentration 0,2723 µM (± 0,02323).

4.1.3 Minocyclin reduziert die durch reaktive Mikroglia vermittelte Apoptose in 661W Photorezeptorzellen

Photorezeptor Apoptose ist das zentrale Kennzeichen retinaler Degenerationen, hierbei spielen auch reaktive Mikroglia eine wichtige Rolle, da sie verschiedene proinflammatorische und proapoptotische Faktoren sezernieren, die degenerative Prozesse begünstigen. Da Minocyclin, wie oben beschrieben (4.1.1, 4.1.2), die Expression einiger Zytokine sowie die Produktion von NO in BV-2 Zellen senken kann, sollte jetzt geprüft werden, ob die Behandlung von Mikrogliazellen mit Minocyclin einen protektiven Effekt auf 661W Photorezeptor Zellen hat bzw. deren proinflammatorischen Effekt abmildert. Dazu wurden die konditionierten BV-2 Überstände, von denen auch die NO-Konzentration gemessen wurde, auf 661W Zellen gegeben. Nach 48 h Kultivierung wurde die Caspase-Aktivität anhand der Lumineszenz in relative light units (RLU) gemessen (Abb. 15).

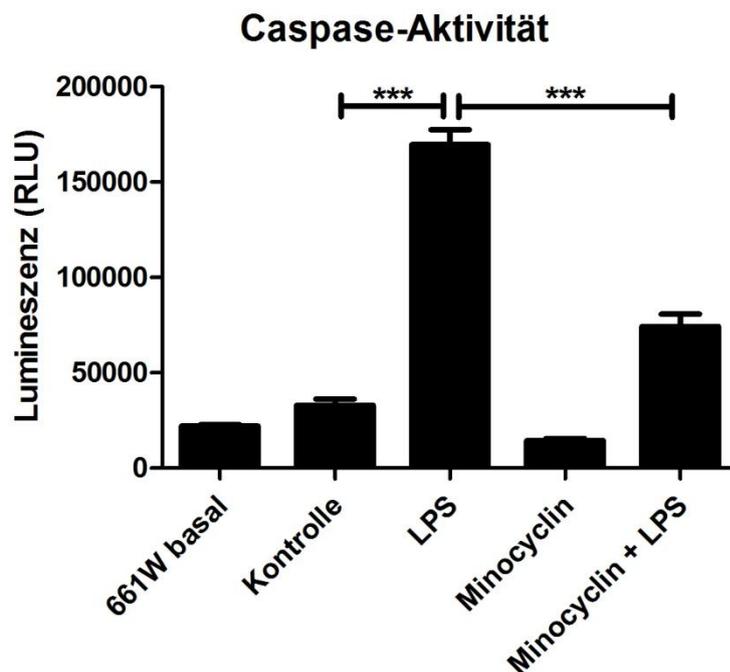


Abb. 15: Effekt von Minocyclin auf die BV-2 vermittelte Apoptoseinduktion in 661W nach 48 h. Caspase-Aktivität in mit verschiedenen konditionierten BV-2 Überständen (Minocyclin 50 µg/ml, LPS 50 ng/ml) behandelten 661W Photorezeptorzellen. Minocyclin reduziert den zytotoxischen Einfluss von BV-2. (n = 3, Mittelwert ± Standardfehler, ***p < 0,001)

Die 661W Zellen, die mit dem Überstand von mit Minocyclin + LPS stimulierten BV-2 Zellen kultiviert wurden, zeigten eine Caspase-Aktivität, in RLU, von 74244 (± 7802). Dies war deutlich geringer als bei den mit Überständen von nur mit LPS stimulierten

BV-2 kultivierten 661W, bei denen 169666 RLU (± 6512) gemessen wurden. Diese deutliche Reduktion der Caspase-Aktivität war hoch signifikant ($n = 3$, $p < 0,001$). Die basale Caspase-Aktivität der 661W Zellen, die, ohne konditionierte Überstände, nur in eigenem Medium kultiviert wurden, betrug 22153 ($\pm 812,7$).

4.2 In vivo

4.2.1 Minocyclin reduziert die Mikrogliaaktivierung sowie die Expression von proinflammatorischen Genen und einem proapoptotischen Gen bei lichtinduzierter Retinadegeneration in Balb/c Mäusen

Zur Messung des protektiven Effekts von Minocyclin auf die lichtgeschädigte Retina wurden bei mit 45 mg/kg Minocyclin behandelten und unbehandelten Balb/c Mäusen, die für eine Stunde 15.000 lx hellem weißen Licht ausgesetzt waren, die Expression ausgewählter Mikrogliamarker, proinflammatorischer und proapoptotischer Gene mittels qRT-PCR gemessen. Zum Vergleich wurden gesunde Wildtyp-Mäuse ohne Lichtschaden herangezogen.

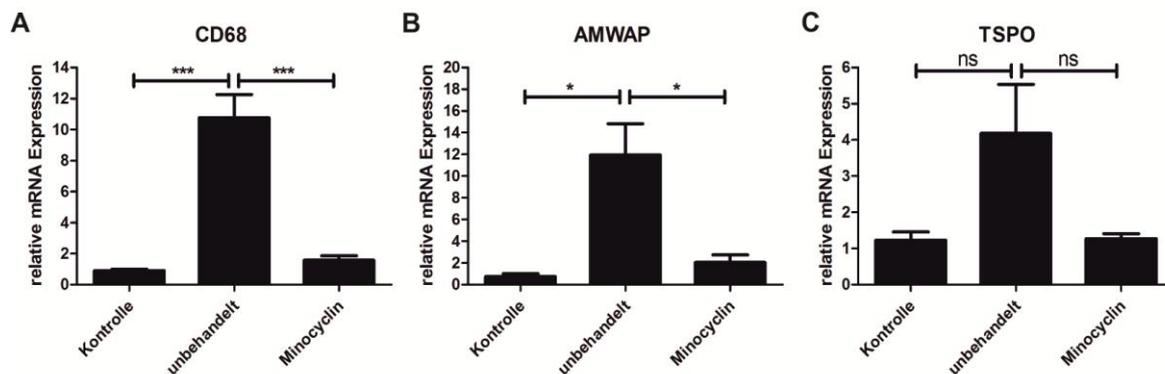


Abb. 16: Effekt von Minocyclin auf die Genexpression von Mikrogliamarkern in lichtgeschädigten Retinae. Minocyclin (45 mg/kg) reduziert die Expression von CD68 (A), AMWAP (B) und nicht signifikant TSPO (C) in Retinae von für 1 h 15.000 lx starkem weißen Licht ausgesetzten Balb/c Mäusen. Gemessen am vierten Tag nach Lichtexposition mit qRT-PCR. (Kontrolle: n = 2, unbehandelt: n = 4, Minocyclin: n = 5, Mittelwert \pm Standardfehler, ***p < 0,001, *p < 0,05, ns = nicht signifikant)

Die Expression der Mikrogliamarker CD68 und AMWAP konnte durch die Minocyclintherapie signifikant gesenkt werden (Abb. 16). Bei CD68 konnte eine Reduktion von im Vergleich zu gesunden Tieren auf 10,76 (\pm 1,498) fach erhöhte Expression auf 1,571 (\pm 0,2914) erzielt werden (p < 0,001). AMWAP ließ sich von 11,95 (\pm 2,884) auf 2,048 (\pm 0,6997) reduzieren (p < 0,05). Die Senkung der Expression von TSPO als weiterer Aktivitätsmarker von 4,178 (\pm 1,356) fach auf 1,273 (\pm 0,1348) fach war nicht signifikant (Abb. 16).

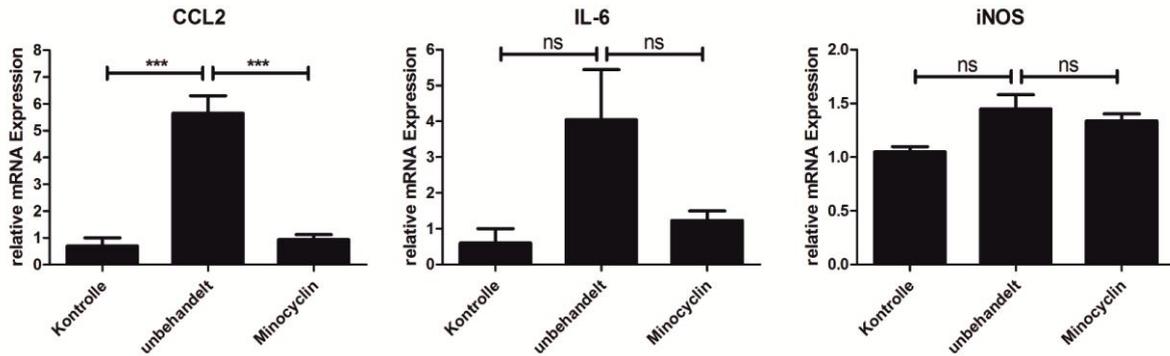


Abb. 17: Effekt von Minocyclin auf die Genexpression proinflammatorischer Gene in lichtgeschädigten Retinae. Minocyclin (45 mg/kg) reduziert die Expression von CCL2 (A) und nicht signifikant IL-6 (B) und iNOS (C) in Retinae von für 1 h 15.000 lx starkem weißen Licht ausgesetzten Balb/c Mäusen. Gemessen am vierten Tag nach Lichtexposition mit qRT-PCR. (Kontrolle: n = 2, unbehandelt: n = 4, Minocyclin: n = 5, Mittelwert \pm Standardfehler, ***p < 0,001, ns = nicht signifikant)

Die Genexpression des proinflammatorischen Zytokins CCL2 sank durch Minocyclin signifikant von 5,652 (\pm 0,6536) fach auf 0,9352 (\pm 0,1856) fach ($p < 0,001$). Die durch den Lichtschaden bewirkte nicht signifikante Induktion von IL-6 (4,043, \pm 1,4) ließ sich durch Minocyclin zwar senken, IL-6 auf 1,232 (\pm 0,2662), jedoch war diese Reduktion nicht signifikant. Bei iNOS zeigte sich sowohl keine deutliche Induktion als auch kein Therapieeffekt durch Minocyclin (Abb. 17).

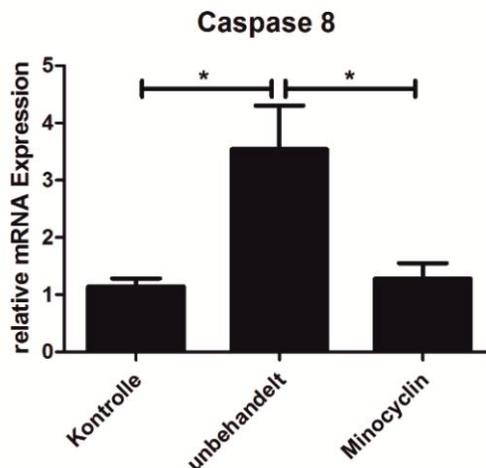


Abb. 18: Effekt von Minocyclin auf die Genexpression des proapoptotischen Gens Caspase 8 in lichtgeschädigten Retinae. Minocyclin (45 mg/kg) reduziert die Expression von Caspase 8 in Retinae von für 1 h 15.000 lx starkem weißen Licht ausgesetzten Balb/c Mäusen. Gemessen am vierten Tag nach Lichtexposition mit qRT-PCR. (Kontrolle: n = 2, unbehandelt: n = 4, Minocyclin: n = 5, Mittelwert \pm Standardfehler, *p < 0,05)

Die Expression der proapoptotischen Caspase 8 sank mit Minocyclinbehandlung von 3,539 (\pm 0,7623) fach auf 1,280 (\pm 0,5238) fach ($p < 0,05$) (Abb. 18).

Die Gruppengröße betrug für die gesunde Kontrollgruppe zwei, für die Lichtschadensgruppe ohne Behandlung vier und die Lichtschadensgruppe mit

Minocyclinthherapie fünf, dabei sind in jeder Probe beide Retinae eines Tieres, weshalb eine Probe einem Tier entspricht.

4.2.2 Minocyclin erhält die retinale Struktur und Dicke bei lichtinduzierter Retinadegeneration in Balb/c Mäusen

Um neben dem Effekt von Minocyclin auf die Genexpression auch den morphologischen Einfluss von Minocyclin auf lichtgeschädigte Retinae evaluieren zu können, wurden bei allen Mäusen eine OCT-Untersuchung der zentralen Retina beider Augen um den Sehnervenkopf herum durchgeführt. Abb. 19 zeigt beispielhafte OCT-Scans, sowie Heatmaps als flächige Darstellung der Retinadicke mit einem Infrarotbild des Fundus im Hintergrund. Es wurde die mittlere Retinadicke in diesem Bereich berechnet und verglichen.

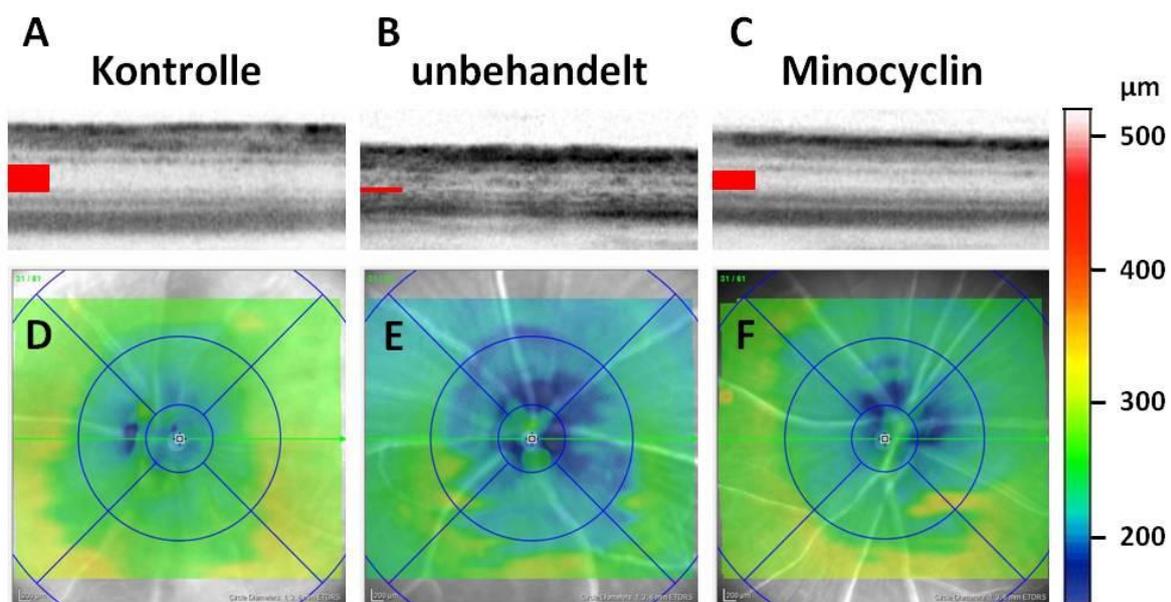


Abb. 19: Beispielhafte OCT-Scans und Heatmaps von gesunden, lichtgeschädigten unbehandelten und Minocyclin behandelten Balb/c Mäusen. Die OCT-Scans zeigen eine deutliche Abnahme der Retinadicke durch Lichtschaden, dieser kann durch Minocyclin abgemildert werden (A, B, C). Besonders ausgeprägt ist die Veränderung der äußeren Körnerschicht (rote Balken). Die Heatmaps (D, E, F) veranschaulichen die Dickenveränderung über die gesamte zentrale Retina (vgl. Skala rechts).

Hierbei zeigte sich, dass die durchschnittliche Retinadicke von gesunden Tieren $258,9 \mu\text{m}$ ($n = 16, \pm 3,054\mu\text{m}$) betrug. Durch die einstündige Lichteinwirkung von 15.000 lx verringerte sich die durchschnittliche Dicke auf $220,5 \mu\text{m}$ ($n = 30, \pm 3,46 \mu\text{m}$). Durch die Behandlung mit Minocyclin nahm die Dicke der Retina nur auf $244,7$

($n = 32, \pm 1,808 \mu\text{m}$) ab (Abb. 20). Die Reduktion der Retinadicke durch den Lichtschaden war mit $p < 0,001$ hoch signifikant (gesund zu unbehandelt), ebenso war der Unterschied zwischen unbehandelten und behandelten Tier mit $p < 0,001$ hoch signifikant.

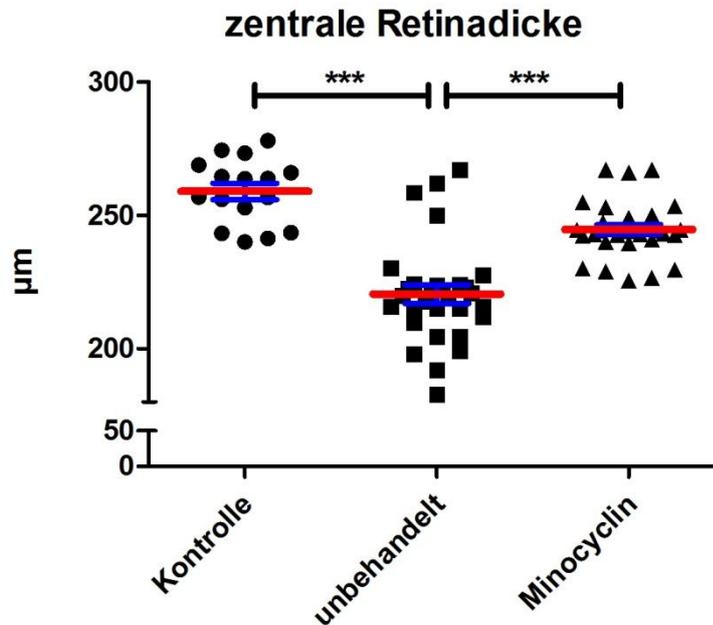


Abb. 20: Effekt von Minocyclin auf die Retinadicke bei Lichtschaden. Minocyclin verringert den Verlust von Retinadicke bei für 1 h 15.000 lx starkem weißem Licht ausgesetzten Balb/c Mäusen. Gemessen am vierten Tag nach Lichtexposition mit SD-OCT. (Kontrolle: $n = 16$, unbehandelt: $n = 30$, Minocyclin: $n = 32$, Mittelwerte \pm Standardfehler, *** $p < 0,001$)

Die OCT-Scans zeigten, dass im Besonderen die äußere Körnerschicht nach Lichtexposition stark an Dicke verliert und dieser Verlust somit die Hauptveränderung ist, die die Reduktion der Gesamretinadicke darstellt (Abb. 19). Auch weitere innere Schichten der Retina scheinen geschädigt zu sein, was die aufgehobene klare Strukturierung in der unbehandelten Gruppe erahnen lässt. Diesen Strukturveränderungen wird durch die Minocyclintherapie ebenfalls vorgebeugt.

5. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, zum einen den immunmodulatorischen Effekt des Antibiotikums Minocyclin auf die Mikrogliazellen sowie zum anderen den Einfluss des Medikaments bei durch Licht induzierten Retinadegenerationen zu untersuchen.

5.1 In vitro

Zunächst sollte der immunmodulatorische Effekt von Minocyclin auf Mikroglia auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden, dazu wurde mittels qRT-PCR die Stärke der Genexpression von unterschiedlich stimulierten Zellen im Vergleich zu unstimulierten gemessen. Des Weiteren wurde der Einfluss auf die NO-Produktion sowie die Auswirkung von mit Minocyclin behandelten Mikroglia auf Photorezeptoren anhand der Caspase-Aktivität untersucht.

5.1.1 Effekt von Minocyclin auf BV-2 Mikrogliazellen

Zum Ausschluss eines toxischen Effekts von Minocyclin auf Mikrogliazellen, wurde durch eine Tod-/Lebendfärbung mit Trypanblau gezeigt, dass durch 24-stündige Stimulation die Zellen durch LPS und/oder Minocyclin nicht absterben. Dies ist Voraussetzung, um sicher zu sein, dass man das Verhalten lebender Zellen misst sowie Zelltrümmer abgestorbener Zellen dieses Verhalten nicht unabhängig von den vorgegebenen Bedingungen stören und dadurch zu falschen Ergebnissen führen. Diese wären aufgrund des unbekanntes Einflusses nicht genau beurteilbar.

Die Aktivierung der Mikroglia erfolgte durch LPS, was über den Toll-like-Rezeptor-4 (TLR-4) erkannt wird und dessen Signalweg in einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B mündet, was zur Expression von vielen verschiedenen Entzündungsmediatoren führt [81].

Durch Minocyclin wurde nach 6 Stunden die Expression der proinflammatorischen Gene von CCL2, IL-6 und iNOS signifikant gesenkt. Bei iNOS war der Effekt nach 24 Stunden weiterhin signifikant. Bei CCL2 und IL-6 war tendenziell auch noch ein Effekt sichtbar, dieser war jedoch nicht signifikant, dies liegt an der stark

unterschiedlichen Genexpression der einzelnen Proben innerhalb der Gruppen, was an dem hohen Standardfehler erkennbar ist.

Die durch Minocyclin bewirkte Reduktion senkte die Genexpression jedoch nicht wieder auf den Ausgangslevel unstimulierter Zellen, sondern ließ weiterhin eine erhöhte Expression erkennen. Dies passt auch zu bisher veröffentlichten Studien, so untersuchten Henry, Huang et al. unter anderem die Expression von IL-6 und IL-1 β im Gehirn nach LPS-Injektion [50, 69, 74, 89, 110, 116]. Auch hier ließ sich die Genexpression der proinflammatorischen Gene durch Minocyclin nicht vollständig absenken.

Ebenso war diese Suppression proinflammatorischer Gene auch auf Proteinebene nachweisbar. Besonders die Phosphorylierung und damit Aktivierung der MAP-Kinase, als wichtigem Enzym unter anderem in der Signalkaskade von TLR4, scheint hier gemindert zu werden. Die nicht vollständige Unterdrückung der Genexpression könnte vermutlich mit der Dosis zusammenhängen, da mit steigender Minocyclinkonzentration die Expression proinflammatorischer Marker abnimmt [50, 89]. Jedoch wird hier auch bei hohen Dosen eine vollständige Blockade nicht erreicht.

Kremlev und Roberts et al. zeigten zusätzlich eine Reduktion der Expression von proinflammatorischen Chemokinrezeptoren wie C-X-C Chemokinrezeptor 3 (CXCR3) und C-C-Motiv- Chemokinrezeptor 5 (CCR5) [75], wodurch die Kommunikation unter den Mikrogliazellen behindert und somit auch ihre Aktivierung vermindert werden könnte.

Alle Protokolle nutzen bei der Behandlung mit Minocyclin eine Vorstimulation von mindestens 30 Minuten, was darauf hindeutet, dass eine Behandlung von Mikroglia nach Kontakt mit LPS zu keinem inhibitorischen Effekt führt [10]. Auch in dieser Arbeit wurde Minocyclin 30 Minuten vor Hinzugabe von LPS auf die Zellen gegeben. Ein möglicher Grund für dieses Verhalten der Zellen mag darin liegen, dass LPS ein sehr starker Aktivator ist, der innerhalb weniger Minuten unter anderem über die Aktivierung der Transkriptionsfaktors NF κ B zu vermehrter Genexpression führt [98, 109] und Minocyclin keine Zeit hat genügend Signalmoleküle zu blockieren. Somit muss Minocyclin seinen Effekt auf vortranskriptionaler Ebene in der Blockade verschiedener Signalwege bewirken [89, 92], denn auch NF κ B wird von Minocyclin supprimiert [70].

Hierzu gibt es jedoch noch keine genaueren Untersuchungen. Da Minocyclin wohl an mehreren Stellen in der Signaltransduktion ansetzt, ist bisher kein exakter Wirkmechanismus bekannt. Dieser ist aber unabhängig von seinen antibiotischen Eigenschaften, die an der Translation, also posttranskriptional ansetzen [68].

5.1.2 Effekt von Minocyclin auf die NO-Produktion von BV-2 Mikrogliazellen

Die Expression von iNOS wurde durch Minocyclin sowohl nach 6 als auch nach 24 Stunden reduziert, daher war zu vermuten, dass auch das Syntheseprodukt dieses Enzyms (NO) durch Minocyclinbehandlung in geringeren Mengen von Mikrogliazellen sezerniert wird. Dies konnte mit einer Messung der Nitrit-Konzentration, als äquivalentes Abbauprodukt von NO, nach 24 Stunden bestätigt werden. Auch diese Ergebnisse stimmen mit denen anderer Studien überein [69, 85, 89, 110]. Dabei findet sich auch hier, wie bei der Genexpression eine nicht vollständige Unterdrückung der NO-Produktion sowie eine inverse Korrelation zwischen Minocyclindosis und NO-Konzentration. Die Ergebnisse lassen die durch Minocyclin verringerte NO-Produktion auf die verminderte Expression des Schlüsselenzyms der NO-Synthese, der iNOS zurückführen und nicht auf eine Inhibition des Enzyms selber. Dies wird durch die Studie von Amin, Patel et al., die einen möglichen Mechanismus in der Degradierung von iNOS mRNA zeigten [6], gestützt. NO, das in geringen Mengen für die Gewebshomöostase wichtig ist [106], wirkt in hohen Konzentrationen zytotoxisch und ist daher als Effektormolekül der Mikroglia bei deren apoptoseinduzierendem Einfluss von Bedeutung [115].

5.1.3 Effekt von Minocyclin auf die BV-2 Mikrogliazellen vermittelte Apoptoseinduktion in 661W Photorezeptorzellen

Die Bedeutung von NO und die Expression verschiedener Entzündungsmediatoren machen deutlich, dass Mikroglia einen starken Einfluss bei immunologischen Prozessen haben. Eine der drastischsten Folgen dieses Einflusses ist die Zerstörung von Gewebe durch die Apoptose. Diese wird von Mikroglia schon während der Entwicklung der Retina induziert, um zu der Entstehung eines geordneten Gewebes beizutragen. Mit der Messung der Caspase-Aktivität von Photorezeptorzellen, die mit

konditionierten BV-2 Überständen kultiviert wurden, konnte gezeigt werden, dass Mikroglia ebenso bei pathologischen Reizen, wie hier LPS, zur Apoptoseinduktion beitragen.

Minocyclin konnte diese Induktion signifikant senken. Jedoch mag eine Beschränkung dieses Experimentes darin liegen, dass in den konditionierten Überständen neben den von den BV-2 Zellen sezernierten Substanzen sowohl LPS als auch Minocyclin enthalten sind und diese damit einen direkten Einfluss auf die 661W Photorezeptorzellen haben können, der in das Ergebnis mit einfließt. Ein solcher Einfluss von Minocyclin auf 661W Zellen ist bei Lichtexposition untersucht und schützt die Zellen [118]. Auch werden TLR-4 konstitutiv von Photorezeptoren exprimiert, welche somit durch LPS stimuliert werden können. Des Weiteren kann LPS Photorezeptoren über die Hochregulation der IL-6 Expression, was vor oxidativem Stress schützen kann [14], vor dem toxischen Einfluss von NO schützen [99, 107].

Für das in dieser Arbeit durchgeführte Experiment würde dies bedeuten, dass LPS auf der einen Seite vor dem toxischen Einfluss des von den BV-2 sezernierten NO schützt und andererseits die Photorezeptoren zusätzlich stresst. Hier muss auch bedacht werden, dass neben NO noch weitere proinflammatorische und zytotoxische Substanzen von Mikrogliazellen sezerniert werden, die auch in den konditionierten Überständen vorhanden sind und zur Beeinflussung der Photorezeptorzellen beitragen. So kann der LPS-Einfluss also entweder in einer geringeren oder höheren Caspase-Aktivität resultieren. In der Minocyclin + LPS Gruppe ist es komplexer, da hier nicht nur LPS als Störfaktor enthalten ist, sondern auch Minocyclin, was alleine schon die Caspase-Aktivität von Photorezeptoren verringert. Unter Berücksichtigung dieser direkten Effekte von LPS und Minocyclin auf 661W Zellen kann ein Teil des Ergebnisses dieses Experimentes darauf zurückgeführt werden. Auch wenn zwischen der Kontroll- und der Minocyclin-Gruppe kein signifikanter Unterschied bestand, ist ein Einfluss von Minocyclin auf die 661W Zellen nicht auszuschließen, da das Medikament möglicherweise erst bei durch pathologische Reize aktivierten Zellen eine Wirkung zeigt. Da LPS in beiden Gruppen ist, wäre die dadurch bewirkte Veränderung gleichsinnig, nur die Minocyclingehalt in der Minocyclin + LPS Gruppe kann den Unterschied verstärkt haben. In den konditionierten Überständen waren Minocyclin und LPS gleichzeitig enthalten, daher erfolgte bei Zugabe der Überstände auf die 661W Zellen keine Vorstimulation mit Minocyclin, die um einen protektiven

Effekt zu erzielen bei den BV-2 Zellen immer nötig war. Diese Tatsache lässt den Schluss zu, dass die Senkung der Apoptoserate in Photorezeptoren hauptsächlich durch die durch Minocyclin veränderte Sekretion von pro- und antiinflammatorischen Substanzen von Mikrogliazellen vermittelt wird.

5.2 In vivo: Effekt von Minocyclin auf lichtinduzierte Retinadegeneration

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der Effekt von Minocyclin auf lichtinduzierten Retinaschaden untersucht. Auch hier wurde die Analyse der Genexpression genutzt. Jedoch wurde diese nicht speziell von den retinalen Mikrogliazellen gemessen, was technisch sehr aufwändig wäre, sondern von der gesamten Retina. Daher wurden hier zusätzlich zu den in der Zellkultur gemessenen Genen noch mikroglia-spezifische Aktivitätsmarker wie AMWAP, CD68 und TSPO gemessen [52, 62, 65]. Auch die Apoptoserate wurde anhand der Expression von Caspase 8 evaluiert, die unter anderem zusammen mit anderen Enzymen, wie Caspase 3 und Caspase 7, eine wichtige Rolle bei der Apoptose spielt.

Die Reduktion der mikroglialen Aktivitätsmarker durch Minocyclin war bis auf TSPO signifikant. IL-6 zeigte ebenfalls eine nicht signifikante Reduktion, iNOS lediglich eine tendenzielle. CCL2 wurde signifikant gesenkt, wie auch die Caspase 8 Expression. Bei den *in vivo* Experimenten kommen mehr Variablen hinzu, wodurch sie anders als Zellkultur Experimente nicht unter vollständig kontrollierten Bedingungen ablaufen. Auch wurde RNA aus einem aus mehreren Zellarten bestehenden Gewebe, der Netzhaut, isoliert. Ein möglicher interindividueller Unterschied der Genexpression ist nicht sehr groß, denn obwohl die Tiere sich während der Lichtexposition unterschiedlich verhalten, ist bei allen unbehandelten Tieren ein deutlicher Schaden sichtbar, was dafür spricht, dass das Versuchsprotokoll mehr als die für einen Schaden erforderliche „Lichtdosis“ hat.

Die Induktion von drei Mikroglia-markern spricht für eine deutliche Aktivierung dieser Zellen bei Lichtschaden, dies ist auch übereinstimmend mit der Studie von Zhang, Shen et al. [123]. Die vermehrte Expression der Zytokine IL-6 und CCL2 lässt einen entzündlichen Prozess vermuten und die Caspase 8 schließlich retinale Degeneration. Diese konnte in den OCT-Untersuchungen gut an der Abnahme der

äußeren Körnerschicht, in welcher die Zellkörper der Photorezeptoren liegen, gesehen werden. Der Verlust von Photorezeptoren schlug sich messbar auf die Gesamtreinadicke nieder. Auch dies ist in der Literatur belegt [30, 57, 123].

Durch die Behandlung mit Minocyclin konnten die Expression von mikroglialen Aktivitätsmarkern, Zytokinen sowie des Apoptosenzyms Caspase 8 gesenkt werden. Morphologisch blieb die äußere Körnerschicht mit minimalem Dickenverlust erhalten, was wiederum anhand der Gesamtreinadicke messbar war.

Zusammengenommen lassen diese Ergebnisse vermuten, dass es durch Lichteinwirkung zu einer Schädigung im Bereich der Photorezeptoren und einer Aktivierung von Mikroglia kommt, welche eine Neuroinflammation bewirken und schließlich zur Apoptoseinduktion beitragen, was in einer Degeneration der Retina mit Verlust von Photorezeptoren mündet. Minocyclin verhindert die Mikrogliaaktivierung und die retinale Degeneration und erhält damit die Struktur und vermutlich auch die Funktion des Gewebes.

Die Aktivierung von Mikroglia bei Lichtexposition [123] sowie der protektive Effekt von Minocyclin [24, 122] sind in Studien beschrieben, ebenso der inhibitorische Einfluss von Minocyclin auf Mikroglia [105].

Im Unterschied zu den Studien von Zhang, Shen et al. und Chang, Cherg et al. wurde in der vorliegenden Studie weißes statt grünes Licht verwendet, auch das Protokoll ist hinsichtlich Dauer der Exposition, Spritzschema und Beobachtungszeitpunkte nicht identisch. Die von den unterschiedlichen Wellenlängen bewirkten Pathomechanismen sind zwar nicht komplett voneinander trennbar, weisen aber geringe Differenzen auf. So wäre in dieser Studie ein Schaden ausgehend vom RPE zu vermuten [47], da durch das weiße Licht, was das gesamte Spektrum an sichtbarem Licht enthält, das Sehpigment komplett ausgebleicht ist und somit nicht als photosensitive Substanz zur Schädigung beitragen kann [56].

Da es sich bei Balb/c Mäusen um Albinos handelt, kommt Melanin als photosensitive Substanz nicht in Frage. Da aber auch eine andere als die bei Balb/c Mäusen vorkommende Variante des RPE65 Gens protektiv bei Lichtexposition wirkt [103] muss der Schaden in einer Überbeanspruchung der Stoffwechselprozesse zwischen

Photorezeptoren und RPE liegen. Dies wird unterstützt durch die Beobachtung, dass Tiere ohne Rhodopsin keinen Lichtschaden entwickeln [45].

Alle diese Mechanismen kommen beim Einwirken von weißem Licht zusammen und führen dazu, dass wahrscheinlich RPE sowie Photorezeptoren zum einen selber ihre Überforderung mit Zytokinen signalisieren [99] und zum anderen durch ihre Schädigung zu Grunde gehen und Zelltrümmer sich im Gewebe ablagern. Beides sind Reize für Mikrogliazellen [71] zum Ort des Geschehens zu migrieren, wodurch eine Inflammation getriggert wird. Die Aktivierung der Mikroglia erfolgt über deren breites Spektrum an Rezeptoren und bewirkt eine Änderung ihrer Polarisierung von M2 zu M1 [27]. Sie entfalten dann, durch die Sekretion von Substanzen wie NO und diversen Chemokinen, ihren zytotoxischen Einfluss auf die Photorezeptoren. Dabei können Mikroglia über ihr Ziel hinauschießen und auch Photorezeptoren zerstören, die noch überlebensfähig sind [125].

Die Mikrogliaaktivierung ist dabei direkt mit dem retinalen Schaden assoziiert, denn sie ist eine frühes Phänomen während des Entzündungsgeschehens, von dessen Auftreten und Stärke auf die später entstehende Degeneration geschlossen werden kann [19].

Durch Minocyclin werden diese Prozesse moduliert bzw. inhibiert [16].

Wie oben beschrieben ist der genaue Mechanismus dieser Wirkung nicht geklärt. Mehrere Studien lassen aber auf eine Beeinflussung in der Signaltransduktionkaskade vom Erkennen eines pathologischen Reizes bis zur Transkription proinflammatorischer Gene schließen [35, 51, 74, 85, 89]. So wird durch Minocyclin das Genexpressionsmuster stark verändert [32, 59, 80, 95] und die Aktivierung von Mikroglia nicht nur verhindert [70], sondern auch ein neuroprotektiver Phänotyp gefördert [22, 79]. So wäre denkbar, dass die überschießende Immunreaktion verhindert wird und weiterhin durch die Sekretion neuroprotektiver Substanzen Photorezeptoren, die, obwohl sie überlebensfähig wären abgetötet werden [125], durch die Beeinflussung von Mikroglia durch Minocyclin geschützt werden.

All dies lässt mehr als einen Angriffspunkt vermuten, bzw. sehr zentrale Angriffspunkte in der Regulation der Genexpression. Andererseits wird durch Minocyclin nicht nur die Transkription beeinflusst, sondern es werden auch Enzyme direkt blockiert, wie die Matrix-Metalloproteinasen direkt inhibiert [108]

Neben dem Effekt von Minocyclin auf Mikroglia scheint es auch einen direkten Einfluss auf die Photorezeptoren zu haben, der zusätzlich protektiv wirkt [55, 118]. So ist nicht ganz ausgeschlossen, dass die Beeinflussung von Mikrogliazellen durch Minocyclin nicht der einzige Effekt ist, der zur geringeren Netzhautdegeneration führt und das die Mikrogliabeeinflussung nur ein Randgeschehen sein könnte.

Minocyclin ist bei einer Vielzahl von Erkrankungen, bei denen Mikroglia eine Rolle spielen, getestet worden und wirkt in Tiermodellen protektiv [41, 121], auch bei Netzhautdegenerationen unterschiedlicher Genese, wie Retinitis pigmentosa [16], Glaukom [18, 111], diabetischer Retinopathie [73], subretinalen Blutungen [124] und Gefäßerkrankungen [1, 102]. Auch hier wurde immer eine Vorbehandlung mit Minocyclin vorgenommen. Eine protektive Wirkung von Minocyclin kann jedoch auch durch Behandlung nach Auftreten des Schadens erreicht werden. Dies könnte durch die unterschiedlichen Angriffspunkte von Minocyclin erklärt werden, da beispielsweise eine Proteininhibition nach Schadenseintritt hilft, jedoch bei transkriptioneller Beeinflussung Signalmoleküle schon früher blockiert werden müssen [112]. Chang, Cherng et al. testeten neben der Vorbehandlung auch eine Nachbehandlung mit Minocyclin [24]. Diese konnte ebenfalls einen protektiven Effekt erzielen, der jedoch schwächer ausgeprägt war. Wieso Minocyclin abhängig vom Zeitpunkt der Behandlung wirkt, bleibt weiterhin anhand seiner Pharmakodynamik zu klären.

Es ist bekannt, dass es bei Tetracyclintherapie zu phototoxischen Hautreaktionen kommen kann [49], dennoch mildert Minocyclin durch Licht induzierte Schäden in der Retina. Es gibt jedoch keine Untersuchungen, die diese phototoxischen Eigenschaften von Minocyclin in der Retina berücksichtigen.

Erste Studien zum Effekt von Minocyclin bei Patienten mit altersbedingter Makuladegeneration und Retinitis pigmentosa lassen auch hier eine protektive Wirkung vermuten [11, 29, 100].

Ebenso werden immer mehr Substanzen und Ansatzpunkte gefunden, über die Mikroglia Aktivität reguliert wird und mit denen therapeutisch darauf Einfluss genommen werden kann. Hier sei das mikrogliaeigene Protein AMWAP genannt, welches vermutlich einen Rückkopplungsmechanismus darstellt, da es von reaktiven

Mikroglia sezerniert wird und auf diese inhibierend wirkt [8]. Auch das Translokatorprotein (TSPO), welches für den Cholesteroltransport über die äußere Mitochondrienmembran zuständig ist, kann medikamentös beeinflusst und somit Mikrogliazellen inhibiert werden [62]. Das pflanzliche Curcumin ist ein weiteres mögliches Mittel zur Behandlung von durch Mikroglia bewirkter Neuroinflammation [61]. So ist zu vermuten, dass es in Zukunft vielversprechende Therapieoptionen für neurodegenerative Erkrankungen geben wird.

6. Zusammenfassung

Mikroglia spielen als alleinige Immunzellen des ZNS bei allen neurodegenerativen Erkrankungen eine zentrale Rolle. Dies trifft auch für Schädigungen der Netzhaut zu, sowohl bei hereditären als auch bei erworbenen Erkrankungen bewirken sie eine Inflammation. Die Änderung ihrer Polarisierung ist dabei der erste Schritt einer fehlregulierten Immunantwort bis hin zur neurotoxischen Zelle. Ein Ansatz zur Behandlung der damit verbundenen Erkrankungen ist die Modulation der Mikrogliaaktivierung bzw. die Begünstigung eines neuroprotektiven Phänotyps.

In dieser Arbeit wurde der inhibierende Effekt von Minocyclin auf Mikrogliazellen *in vitro* durch Verringerung der Expression proinflammatorischer Gene, sowie NO-Sekretion, und Apoptoseinduktion in Photorezeptorzellen gezeigt. In einem Mausmodell einer retinalen Degeneration konnte Minocyclin ebenfalls proinflammatorische und proapoptotische Gene supprimieren und morphologisch die Netzhautstruktur und -dicke erhalten werden.

Da Minocyclin schon lange auf dem Markt zugelassen und seine Verträglichkeit bewiesen ist, ist es eine potentielle Therapieoption für neurodegenerative Erkrankungen. Eine Einschränkung bei Minocyclin liegt jedoch zum einen darin, dass eine Dauertherapie Antibiotikaresistenzen fördern würde und zum anderen in der nötigen Vorbehandlung vor Auftreten des Schadens. Doch schließt der pathomechanistische Unterschied zwischen Mausmodellen einer Erkrankung und dem Menschen einen Nutzen einer Minocyclintherapie nach Auftreten des initialen Schadens nicht aus. Da der genaue Wirkmechanismus von Minocyclin nicht bekannt ist, kann dessen Erforschung vielversprechende Ansatzpunkte für zukünftige

Arzneimittel aufdecken und somit zur Verlangsamung der Progredienz und Milderung der Symptome neurodegenerativer Erkrankungen beitragen.

7. Literaturverzeichnis

1. Abcouwer, S. F., et al. 2013, *Minocycline prevents retinal inflammation and vascular permeability following ischemia-reperfusion injury*, in *J Neuroinflammation*. p. 149.
2. Abramoff, M. D., et al. 2010, *Retinal Imaging and Image Analysis*, in *IEEE Trans Med Imaging*. p. 169-208.
3. Ahnelt, P. K. 1998, *The photoreceptor mosaic*, in *Eye (Lond)*. p. 531-40.
4. al-Ubaidi, M. R., et al. 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*, in *J Cell Biol*. p. 1681-7.
5. Algvere, P. V., et al. 2006, *Age-related maculopathy and the impact of blue light hazard*, in *Acta Ophthalmol Scand*. p. 4-15.
6. Amin, A. R., et al. 1997, *Post-transcriptional regulation of inducible nitric oxide synthase mRNA in murine macrophages by doxycycline and chemically modified tetracyclines*, in *FEBS Lett*. p. 259-64.
7. Ashwin, P. T., et al. 2009, *Advances in cataract surgery*, in *Clin Exp Optom*. p. 333-42.
8. Aslanidis, A., et al. 2015, *Activated microglia/macrophage whey acidic protein (AMWAP) inhibits NFkappaB signaling and induces a neuroprotective phenotype in microglia*, in *J Neuroinflammation*. p. 77.
9. Azevedo, E. P., et al. 2013, *Activated microglia mediate synapse loss and short-term memory deficits in a mouse model of transthyretin-related oculoleptomeningeal amyloidosis*, in *Cell Death Dis*. p. e789.
10. Baptiste, D. C., et al. 2004, *An investigation of the neuroprotective effects of tetracycline derivatives in experimental models of retinal cell death*, in *Mol Pharmacol*. p. 1113-22.
11. Baumgartner, W. A. and Baumgartner, A. M. 2013, *Rationale for an experimental treatment of retinitis pigmentosa: 140-month test of hypothesis with one patient*, in *Med Hypotheses*. p. 720-8.
12. Benarroch, E. E. 2013, *Microglia: Multiple roles in surveillance, circuit shaping, and response to injury*, in *Neurology*. p. 1079-88.
13. Bhagat, N. and Zarbin, M. 2015, *Recent Innovations in Medical and Surgical Retina*, in *Asia Pac J Ophthalmol (Phila)*. p. 171-9.
14. Bissonnette, C. J., et al. 2004, *Interleukin 1alpha and interleukin 6 protect human neuronal SH-SY5Y cells from oxidative damage*, in *Neurosci Lett*. p. 40-3.
15. Blasi, E., et al. 1990, *Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus*, in *J Neuroimmunol*. p. 229-37.
16. Bo Peng, J. X., Ke Wang, Kwok-Fai So, George L. Tipoe, and Bin Lin. 2014, *Suppression of Microglial Activation Is Neuroprotective in a Mouse Model of Human Retinitis Pigmentosa*, in *The Journal of Neuroscience*. p. 8139–8150
17. Boche, D., et al. 2013, *Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain*, in *Neuropathol Appl Neurobiol*. p. 3-18.
18. Bosco, A., et al. 2008, *Reduced retina microglial activation and improved optic nerve integrity with minocycline treatment in the DBA/2J mouse model of glaucoma*, in *Invest Ophthalmol Vis Sci*. p. 1437-46.

19. Bosco, A., et al. 2015, *Neurodegeneration severity can be predicted from early microglia alterations monitored in vivo in a mouse model of chronic glaucoma*, in *Dis Model Mech.* p. 443-55.
20. Bourne, R. R., et al. 2014, *Prevalence and causes of vision loss in high-income countries and in Eastern and Central Europe: 1990-2010*, in *Br J Ophthalmol.* p. 629-38.
21. Bourne, R. R., et al. 2013, *Causes of vision loss worldwide, 1990-2010: a systematic analysis*, in *Lancet Glob Health.* p. e339-49.
22. Burke, N. N., et al. 2014, *Minocycline modulates neuropathic pain behaviour and cortical M1-M2 microglial gene expression in a rat model of depression*, in *Brain Behav Immun.* p. 147-56.
23. Chang, B., et al. 2006, *In-frame deletion in a novel centrosomal/ciliary protein CEP290/NPHP6 perturbs its interaction with RPGR and results in early-onset retinal degeneration in the rd16 mouse*, in *Hum Mol Genet.* p. 1847-57.
24. Chang, C. J., et al. 2005, *Minocycline partially inhibits caspase-3 activation and photoreceptor degeneration after photic injury*, in *Ophthalmic Res.* p. 202-13.
25. Chen, X., et al. 2011, *The prospects of minocycline in multiple sclerosis*, in *J Neuroimmunol.* p. 1-8.
26. Chen, Z. and Trapp, B. D. 2015, *Microglia and neuroprotection*, in *J Neurochem.*
27. Cherry, J. D., et al. 2014, *Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed*, in *J Neuroinflammation.* p. 98.
28. Cobb, C. A. and Cole, M. P. 2015, *Oxidative and nitrative stress in neurodegeneration*, in *Neurobiol Dis.*
29. Cukras, C. A., et al. 2012, *Oral minocycline for the treatment of diabetic macular edema (DME): results of a phase I/II clinical study*, in *Invest Ophthalmol Vis Sci.* p. 3865-74.
30. Danciger, M., et al. 2004, *New retinal light damage QTL in mice with the light-sensitive RPE65 LEU variant*, in *Mamm Genome.* p. 277-83.
31. Dannhausen, K., et al. 2015, *Acid sphingomyelinase (aSMase) deficiency leads to abnormal microglia behavior and disturbed retinal function*, in *Biochem Biophys Res Commun.*
32. Das, A., et al. 2015, *Dual RNA sequencing reveals the expression of unique transcriptomic signatures in lipopolysaccharide-induced BV-2 microglial cells*, in *PLoS One.* p. e0121117.
33. Del Rosso, J. Q. 2015, *Oral Doxycycline in the Management of Acne Vulgaris: Current Perspectives on Clinical Use and Recent Findings with a New Double-scored Small Tablet Formulation*, in *J Clin Aesthet Dermatol.* p. 19-26.
34. Dong, N., et al. 2014, *Retinal neuronal MCP-1 induced by AGEs stimulates TNF-alpha expression in rat microglia via p38, ERK, and NF-kappaB pathways*, in *Mol Vis.* p. 616-28.
35. Du, Y., et al. 2001, *Minocycline prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease*, in *Proc Natl Acad Sci U S A.* p. 14669-74.
36. Eysel, U. 2005, *Physiologie*, in *Sehsystem*, Georg Thieme Verlag KG. p. 686 - 712.
37. Fischer, M. D., et al. 2009, *Noninvasive, in vivo assessment of mouse retinal structure using optical coherence tomography*, in *PLoS One.* p. e7507.
38. Franze, K., et al. 2007, *Muller cells are living optical fibers in the vertebrate retina*, in *Proc Natl Acad Sci U S A.* p. 8287-92.

39. Frohlich, E. 2002, *Structure and function of blood-tissue barriers*, in *Dtsch Med Wochenschr.* p. 2629-34.
40. Fujimoto, J. G. 2003, *Optical coherence tomography for ultrahigh resolution in vivo imaging*, in *Nat Biotechnol.* p. 1361-7.
41. Garrido-Mesa, N., et al. 2013, *Minocycline: far beyond an antibiotic*, in *Br J Pharmacol.* p. 337-52.
42. Ginhoux, F., et al. 2010, *Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages*, in *Science.* p. 841-5.
43. Grehn. 2008, *Augenheilkunde*, Springer Medizin Verlag Heidelberg.
44. Grimm, C. and Reme, C. E. 2013, *Light damage as a model of retinal degeneration*, in *Methods Mol Biol.* p. 87-97.
45. Grimm, C., et al. 2001, *Rhodopsin-mediated blue-light damage to the rat retina: effect of photoreversal of bleaching*, in *Invest Ophthalmol Vis Sci.* p. 497-505.
46. Grüsser, S., Thews. 1990, *Physiologie des Menschen*, Editor^Editors, Springer.
47. Ham, W. T., Jr., et al. 1978, *Histologic analysis of photochemical lesions produced in rhesus retina by short-wave-length light*, in *Invest Ophthalmol Vis Sci.* p. 1029-35.
48. Harada, C., et al. 2003, *Potential role of glial cell line-derived neurotrophic factor receptors in Muller glial cells during light-induced retinal degeneration*, in *Neuroscience.* p. 229-35.
49. Hasan, T. and Khan, A. U. 1986, *Phototoxicity of the tetracyclines: photosensitized emission of singlet delta dioxygen*, in *Proc Natl Acad Sci U S A.* p. 4604-6.
50. Henry, C. J., et al. 2008, *Minocycline attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced neuroinflammation, sickness behavior, and anhedonia*, in *J Neuroinflammation.* p. 15.
51. Hollborn, M., et al. 2010, *Chemotactic and cytotoxic effects of minocycline on human retinal pigment epithelial cells*, in *Invest Ophthalmol Vis Sci.* p. 2721-9.
52. Holness, C. L. and Simmons, D. L. 1993, *Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins*, in *Blood.* p. 1607-13.
53. Hu, F., et al. 2014, *Glioma-associated microglial MMP9 expression is upregulated by TLR2 signaling and sensitive to minocycline*, in *Int J Cancer.* p. 2569-78.
54. Huberman, A. D. and Niell, C. M. 2011, *What can mice tell us about how vision works?*, in *Trends Neurosci.* p. 464-73.
55. Hughes, E. H., et al. 2004, *Minocycline delays photoreceptor death in the rds mouse through a microglia-independent mechanism*, in *Exp Eye Res.* p. 1077-84.
56. Hunter, J. J., et al. 2012, *The susceptibility of the retina to photochemical damage from visible light*, in *Prog Retin Eye Res.* p. 28-42.
57. Jaadane, I., et al. 2015, *Retinal damage induced by commercial light emitting diodes (LEDs)*, in *Free Radic Biol Med.*
58. Jonas, J. B., et al. 2014, *Visual impairment and blindness due to macular diseases globally: a systematic review and meta-analysis*, in *Am J Ophthalmol.* p. 808-15.
59. Kadiyala, C. S., et al. 2012, *Acetylation of retinal histones in diabetes increases inflammatory proteins: effects of minocycline and manipulation of histone acetyltransferase (HAT) and histone deacetylase (HDAC)*, in *J Biol Chem.* p. 25869-80.
60. Karlstetter, M., et al. 2010, *Microglia in the healthy and degenerating retina: insights from novel mouse models*, in *Immunobiology.* p. 685-91.

61. Karlstetter, M., et al. 2011, *Curcumin is a potent modulator of microglial gene expression and migration*, in *J Neuroinflammation*. p. 125.
62. Karlstetter, M., et al. 2014, *Translocator protein (18 kDa) (TSPO) is expressed in reactive retinal microglia and modulates microglial inflammation and phagocytosis*, in *J Neuroinflammation*. p. 3.
63. Karlstetter, M., et al. 2015, *Retinal microglia: just bystander or target for therapy?*, in *Prog Retin Eye Res*. p. 30-57.
64. Karlstetter, M., et al. 2014, *Disruption of the retinitis pigmentosa 28 gene *Fam161a* in mice affects photoreceptor ciliary structure and leads to progressive retinal degeneration*, in *Hum Mol Genet*. p. 5197-210.
65. Karlstetter, M., et al. 2010, *The novel activated microglia/macrophage WAP domain protein, AMWAP, acts as a counter-regulator of proinflammatory response*, in *J Immunol*. p. 3379-90.
66. Kastner, D. B. and Baccus, S. A. 2014, *Insights from the retina into the diverse and general computations of adaptation, detection, and prediction*, in *Curr Opin Neurobiol*. p. 63-9.
67. Kettenmann, H., et al. 2011, *Physiology of microglia*, in *Physiol Rev*. p. 461-553.
68. Kielian, T., et al. 2007, *Minocycline modulates neuroinflammation independently of its antimicrobial activity in staphylococcus aureus-induced brain abscess*, in *Am J Pathol*. p. 1199-214.
69. Kim, S. S., et al. 2004, *Inhibitory action of minocycline on lipopolysaccharide-induced release of nitric oxide and prostaglandin E2 in BV2 microglial cells*, in *Arch Pharm Res*. p. 314-8.
70. Kobayashi, K., et al. 2013, *Minocycline selectively inhibits M1 polarization of microglia*, in *Cell Death Dis*. p. e525.
71. Kohno, H., et al. 2013, *Photoreceptor proteins initiate microglial activation via Toll-like receptor 4 in retinal degeneration mediated by all-trans-retinal*, in *J Biol Chem*. p. 15326-41.
72. Kolb, H., H. Kolb, E. Fernandez and R. Nelson. 1995, *Glial Cells of the Retina*, in *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*: Salt Lake City (UT).
73. Krady, J. K., et al. 2005, *Minocycline reduces proinflammatory cytokine expression, microglial activation, and caspase-3 activation in a rodent model of diabetic retinopathy*, in *Diabetes*. p. 1559-65.
74. Kremlev, S. G., et al. 2004, *Differential expression of chemokines and chemokine receptors during microglial activation and inhibition*, in *J Neuroimmunol*. p. 1-9.
75. Kremlev, S. G., et al. 2007, *Minocycline modulates chemokine receptors but not interleukin-10 mRNA expression in hypoxic-ischemic neonatal rat brain*, in *J Neurosci Res*. p. 2450-9.
76. Kreutzberg, G. W. 1996, *Microglia: a sensor for pathological events in the CNS*, in *Trends Neurosci*. p. 312-8.
77. Lamb, L. E., et al. 2001, *Retinyl palmitate and the blue-light-induced phototoxicity of human ocular lipofuscin*, in *Arch Biochem Biophys*. p. 316-20.
78. Laurenzi, M. A., et al. 2001, *Effects of microenvironment on morphology and function of the microglial cell line BV-2*, in *Neurochem Res*. p. 1209-16.
79. Levkovitch-Verbin, H., et al. 2014, *Minocycline upregulates pro-survival genes and downregulates pro-apoptotic genes in experimental glaucoma*, in *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. p. 761-72.

80. Lian, H. D., et al. 2011, *Effects of minocycline on expression of bcl-2, bax in early retinal neuropathy of diabetes in rats*, in *Int J Ophthalmol*. p. 162-4.
81. Lu, Y. C., et al. 2008, *LPS/TLR4 signal transduction pathway*, in *Cytokine*. p. 145-51.
82. Lüllmann, M. K., Hein L. 2010, *Pharmakologie und Toxikologie*, Georg Thieme VerlagKG.
83. Madeira, M. H., et al. 2015, *Contribution of microglia-mediated neuroinflammation to retinal degenerative diseases*, in *Mediators Inflamm*. p. 673090.
84. MATHALONE, N., et al. 2007, *The involvement of matrix metalloproteinases 2 and 9 in rat retinal ischemia*, in *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. p. 725-32.
85. Matsui, T., et al. 2010, *Release of prostaglandin E(2) and nitric oxide from spinal microglia is dependent on activation of p38 mitogen-activated protein kinase*, in *Anesth Analg*. p. 554-60.
86. Naash, M. L., et al. 1996, *Light-induced acceleration of photoreceptor degeneration in transgenic mice expressing mutant rhodopsin*, in *Invest Ophthalmol Vis Sci*. p. 775-82.
87. Nagaoka, T. 2006, *Physiological mechanism for the regulation of ocular circulation*, in *Nihon Ganka Gakkai Zasshi*. p. 872-8.
88. Nguyen-Legros, J. and Hicks, D. 2000, *Renewal of photoreceptor outer segments and their phagocytosis by the retinal pigment epithelium*, in *Int Rev Cytol*. p. 245-313.
89. Nikodemova, M., et al. 2006, *Minocycline exerts inhibitory effects on multiple mitogen-activated protein kinases and IkappaBalpha degradation in a stimulus-specific manner in microglia*, in *J Neurochem*. p. 314-23.
90. Noell, W. K. 1980, *Possible mechanisms of photoreceptor damage by light in mammalian eyes*, in *Vision Res*. p. 1163-71.
91. Paolicelli, R. C., et al. 2011, *Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development*, in *Science*. p. 1456-8.
92. Peng Shi, J. L. G., Fiona A. Desland¹, Guannan Zhou, Xiao Z. Shen, Zhiying Shan, and Meng Liu, M. K. R., Colin Sumners. 2014, *Direct Pro-Inflammatory Effects of Prorenin on Microglia*, in *PLOS ONE*.
93. Rezaie, P. and Male, D. 2002, *Mesoglia & microglia--a historical review of the concept of mononuclear phagocytes within the central nervous system*, in *J Hist Neurosci*. p. 325-74.
94. Roberts, J. E. 2001, *Ocular phototoxicity*, in *J Photochem Photobiol B*. p. 136-43.
95. Rojewska, E., et al. 2014, *Expression profiling of genes modulated by minocycline in a rat model of neuropathic pain*, in *Mol Pain*. p. 47.
96. Ryan, M. E. and Ashley, R. A. 1998, *How do Tetracyclines Work?*, in *Advances in Dental Research*. p. 149-151.
97. Senra, H., et al. 2015, *Psychologic adjustment to irreversible vision loss in adults: a systematic review*, in *Ophthalmology*. p. 851-61.
98. Shemi, D., et al. 2000, *Time-dependent effect of LPS on PGE2 and TNF-alpha production by rat glial brain culture: influence of COX and cytokine inhibitors*, in *J Endotoxin Res*. p. 377-81.
99. Singh, P. K. and Kumar, A. 2015, *Retinal photoreceptor expresses toll-like receptors (TLRs) and elicits innate responses following TLR ligand and bacterial challenge*, in *PLoS One*. p. e0119541.
100. Sivaprasad, S., et al. 2011, *A pilot study on the combination treatment of reduced-fluence photodynamic therapy, intravitreal ranibizumab, intravitreal*

- dexamethasone and oral minocycline for neovascular age-related macular degeneration*, in *Ophthalmologica*. p. 200-6.
101. Stefanova, N., et al. 2007, *Microglial activation mediates neurodegeneration related to oligodendroglial alpha-synucleinopathy: implications for multiple system atrophy*, in *Mov Disord*. p. 2196-203.
 102. Sun, C., et al. 2013, *Neuroprotective effect of minocycline in a rat model of branch retinal vein occlusion*, in *Exp Eye Res*. p. 105-16.
 103. Tang, P. H., et al. 2011, *Regeneration of photopigment is enhanced in mouse cone photoreceptors expressing RPE65 protein*, in *J Neurosci*. p. 10403-11.
 104. Thompson, D. A., et al. 2012, *Rd9 is a naturally occurring mouse model of a common form of retinitis pigmentosa caused by mutations in RPGR-ORF15*, in *PLoS One*. p. e35865.
 105. Tikka, T. M. and Koistinaho, J. E. 2001, *Minocycline provides neuroprotection against N-methyl-D-aspartate neurotoxicity by inhibiting microglia*, in *J Immunol*. p. 7527-33.
 106. Tooker, R. E., et al. 2013, *Nitric oxide mediates activity-dependent plasticity of retinal bipolar cell output via S-nitrosylation*, in *J Neurosci*. p. 19176-93.
 107. Tu, Z., et al. 2011, *Photoreceptor cells constitutively express functional TLR4*, in *J Neuroimmunol*. p. 183-7.
 108. Uitto, V. J., et al. 1994, *Doxycycline and chemically modified tetracyclines inhibit gelatinase A (MMP-2) gene expression in human skin keratinocytes*, in *Ann N Y Acad Sci*. p. 140-51.
 109. Vedder, H., et al. 1999, *Dose-dependence of bacterial lipopolysaccharide (LPS) effects on peak response and time course of the immune-endocrine host response in humans*, in *Inflamm Res*. p. 67-74.
 110. Wang, A. L., et al. 2005, *Minocycline inhibits LPS-induced retinal microglia activation*, in *Neurochem Int*. p. 152-8.
 111. Wang, K., et al. 2014, *Fractalkine receptor regulates microglial neurotoxicity in an experimental mouse glaucoma model*, in *Glia*. p. 1943-54.
 112. Wasserman, J. K., et al. 2007, *Evolution of the inflammatory response in the brain following intracerebral hemorrhage and effects of delayed minocycline treatment*, in *Brain Res*. p. 140-54.
 113. Welsch N., L. C. 2004, *Farben*, Spektrum Akademischer Verlag.
 114. Wenzel, A., et al. 2005, *Molecular mechanisms of light-induced photoreceptor apoptosis and neuroprotection for retinal degeneration*, in *Prog Retin Eye Res*. p. 275-306.
 115. Yang, L.-p. 2007, *Minocycline delayed photoreceptor death in the rds mice through iNOS-dependent mechanism*, in *Molecular Vision*. p. 1073 - 1082.
 116. Yang, L.-p. 2007, *Minocycline and sulforaphane inhibited lipopolysaccharidemediated*, in *Molecular Vision*. p. 1083 - 1093.
 117. Yang, L., et al. 2009, *Minocycline inhibition of photoreceptor degeneration*, in *Arch Ophthalmol*. p. 1475-80.
 118. Yang, L. P., et al. 2007, *Role of NF-kappaB and MAPKs in light-induced photoreceptor apoptosis*, in *Invest Ophthalmol Vis Sci*. p. 4766-76.
 119. Yrjanheikki, J., et al. 1998, *Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia*, in *Proc Natl Acad Sci U S A*. p. 15769-74.
 120. Yrjanheikki, J., et al. 1999, *A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window*, in *Proc Natl Acad Sci U S A*. p. 13496-500.

121. Zemke, D. and Majid, A. 2004, *The potential of minocycline for neuroprotection in human neurologic disease*, in *Clin Neuropharmacol.* p. 293-8.
122. Zhang, C., et al. 2004, *Neuroprotection of photoreceptors by minocycline in light-induced retinal degeneration*, in *Invest Ophthalmol Vis Sci.* p. 2753-9.
123. Zhang, C., et al. 2005, *Activation of microglia and chemokines in light-induced retinal degeneration*, in *Mol Vis.* p. 887-95.
124. Zhao, L., et al. 2011, *Minocycline attenuates photoreceptor degeneration in a mouse model of subretinal hemorrhage microglial: inhibition as a potential therapeutic strategy*, in *Am J Pathol.* p. 1265-77.
125. Zhao, L., et al. 2015, *Microglial phagocytosis of living photoreceptors contributes to inherited retinal degeneration*, in *EMBO Mol Med.*
126. Zhou, H., et al. 2006, *A Requirement for Microglial TLR4 in Leukocyte Recruitment into Brain in Response to Lipopolysaccharide*, in *The Journal of Immunology.* p. 8103-8110.

8. Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abb. 1: Aufbau des menschlichen Auges und der Retina..... | 3 |
| Abb. 2: Schematische Darstellung der Mikroglia Aktivierung..... | 6 |
| Abb. 3: Aktivierungs- und Migrationsschema von Mikroglia in der Retina. | 8 |
| Abb. 4: Taqman-Prinzip..... | 22 |
| Abb. 5: Amplifikationskurve und Ermittlung der Ct-Werte..... | 24 |
| Abb. 6: Versuchsschema der <i>in vivo</i> Experimente. | 27 |
| Abb. 7: Vereinfachte Darstellung des Prinzips der Spektral-Domänen OCT. | 28 |
| Abb. 8: Schichtvergleich zwischen OCT und histologischem Schnitt. | 29 |
| Abb. 9: Spektral-Domänen OCT SPECTRALIS® von Heidelberger Engineering. . | 30 |
| Abb. 10: Auswertung der OCT-Untersuchung. | 31 |
| Abb. 11: BV-2 Zellvitalitätsmessung nach 24 h. | 35 |
| Abb. 12: Effekt von Minocyclin auf die Genexpression von BV-2 nach 6 h..... | 36 |
| Abb. 13: Effekt von Minocyclin auf die Genexpression von BV-2 nach 24 h..... | 36 |
| Abb. 14: Effekt von Minocyclin auf die Nitrit-Produktion von BV-2 nach 24 h. | 37 |
| Abb. 15: Effekt von Minocyclin auf die BV-2 vermittelte Apoptoseinduktion in 661W nach 48 h. | 38 |
| Abb. 16: Effekt von Minocyclin auf die Genexpression von Mikroglia markern in lichtgeschädigten Retinae..... | 40 |
| Abb. 17: Effekt von Minocyclin auf die Genexpression proinflammatorischer Gene in lichtgeschädigten Retinae. | 41 |
| Abb. 18: Effekt von Minocyclin auf die Genexpression des proapoptotischen Gens Caspase 8 in lichtgeschädigten Retinae. | 41 |
| Abb. 19: Beispielhafte OCT-Scans und Heatmaps von gesunden, lichtgeschädigten unbehandelten und Minocyclin behandelten Balb/c Mäusen. | 42 |
| Abb. 20: Effekt von Minocyclin auf die Retinadicke bei Lichtschaden. | 43 |

8.2 Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Verwendete Lösungen, Chemikalien und Reagenzien mit Anwendung und Hersteller | 14 |
| Tabelle 2: Verwendete Kitsysteme mit Anwendung und Hersteller | 14 |
| Tabelle 3: Verwendete Zellkulturmedien mit Rezept und Hersteller | 15 |
| Tabelle 4: Verwendete qRT-PCR Primer und zugehörige Sonden der Universal Probe Library von Roche. | 15 |
| Tabelle 5: Verwendete Verbrauchsmaterialien mit Anwendung und Hersteller | 16 |
| Tabelle 6: Verwendete Geräte mit Anwendung und Hersteller | 16 |
| Tabelle 7: Verwendete Software mit Anwendung und Hersteller | 18 |

9. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung meiner Arbeit nicht veröffentlicht.