

# **Mechanismen der Freisetzung von Interleukin-1 $\beta$ nach Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms in retinalen Pigmentepithelzellen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

**Joshua Patt**

aus Kreuztal

2021

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Tim U. Krohne
2. Gutachter: Prof. Dr. Eicke Latz

Tag der Mündlichen Prüfung: 12.02.2021

Aus der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde  
Direktor: Prof. Dr. med. Frank G. Holz

## **Gewidmet**

Meinen Geschwistern Tom und Lina





## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>5</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>9</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>11</b>
1.1 Altersabhängige Makuladegeneration	11
1.1.1 Überblick	11
1.1.2 Pathogenese	11
1.1.3 Stadieneinteilung und Symptome der AMD	12
1.1.3.1 Frühstadien	12
1.1.3.2 Spätstadien	13
1.1.3.2.1 Geographische Atrophie	13
1.1.3.2.2 Choroidale Neovaskularisation	13
1.1.4 Behandlungsoptionen	15
1.1.4.1 Behandlung der CNV	15
1.1.4.2 Behandlung der GA	15
1.2 Das retinale Pigmentepithel bei der AMD	15
1.2.1 Aufbau und Funktion	15
1.2.2 Alterung des RPE	17
1.2.3 Lipofuszinakkumulation	18
1.2.4 Phototoxische Schädigung	19
1.2.5 Oxidative Schädigung	19
1.3 Das NLRP3-Inflammasom bei der AMD	20
1.3.1 Grundlagen: Bedeutung des NLRP3-Inflammasoms	20
1.3.2 Grundlagen: Aktivierungskaskade des NLRP3-Inflammasoms	21
1.3.3 Aktivierung im RPE	23
1.3.3.1 Aktivierung durch oxidativen Stress	23
1.3.3.2 Aktivierung durch lysosomale Membranpermeabilisation	23
1.3.3.3 Aktivierung durch K <sup>+</sup> -Efflux	23
1.3.4 Klinische Daten zur NLRP3-Inflammasomaktivierung im RPE	25

1.4	Zytokinfreisetzung	25
1.4.1	Aktive Sekretion auf unkonventionellem Weg	25
1.4.1.1	Mikrovesikel-Abknospung	26
1.4.1.2	Lysosomale Exozytose	26
1.4.1.3	Caspase-1-abhängige Kanäle	26
1.4.2	Passive Freisetzung	27
1.4.2.1	Pyroptose mit Zellmembrandesintegration	27
1.4.2.2	Apoptose	28
1.5	Fragestellung und Zielsetzung	29
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>31</b>
2.1	Material	31
2.1.1	Reagenzien	31
2.1.2	Kits	31
2.1.3	Verbrauchsmaterialien	32
2.1.4	Technische Ausrüstung	32
2.2	Methoden	33
2.2.1	Isolation boviner Photorezeptoraußensegmente	33
2.2.2	Modifikation von Photorezeptoraußensegmenten mit HNE	35
2.2.3	Bradford-Proteinassay	35
2.2.4	RPE-Zellkultur	36
2.2.4.1	Zelllinien	36
2.2.4.2	Zellpassage	37
2.2.4.3	Kryokonservierung	38
2.2.4.4	Zellzahlbestimmung	39
2.2.4.5	Priming mit IL-1 $\alpha$	39
2.2.4.6	Cathepsin-B-Inhibition	40
2.2.4.7	Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms	40
2.2.4.7.1	Induktion einer LMP	40
2.2.4.7.1.1	Lipofuszin vermittelte Phototoxizität	40
2.2.4.7.1.2	L-leucyl-L-leucyl-Methylester	41
2.2.4.7.2	Wasserstoffperoxid als oxidativer Stressor	42

2.2.4.7.3	K <sup>+</sup> -Efflux	42
2.2.4.7.3.1	Adenosintriphosphat	42
2.2.4.7.3.2	Nigericin	43
2.2.5	Zytotoxizitätsassay	43
2.2.6	Interleukin-1 $\beta$ -Assay	44
2.2.7	Statistische Analyse	46
2.2.8	Fluoreszenzmikroskopie	46
2.2.9	Färbungen	47
2.2.9.1	4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)-Färbung	47
2.2.9.2	Acridin-Orange-Färbung	48
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>49</b>
3.1	Inflammasomaktivierung durch photooxidative Schädigung	49
3.1.1	Zellkulturmodell zur Lipofuszin-Akkumulation	49
3.1.2	Effekt der Bestrahlungszeit auf die Inflammasomaktivierung	50
3.2	Inflammasomaktivierung durch lysosomale Membranpermeabilisation	51
3.2.1	Zellkulturmodell in ARPE-19-Zelllinie	51
3.2.1.1	Effekt der Konzentration von Leu-Leu-OMe auf die Inflammasomaktivierung	52
3.2.1.2	Effekt der Inkubationsdauer mit Leu-Leu-OMe auf die Inflammasomaktivierung	53
3.2.2	Zellkulturmodell in humanen primären RPE-Zellen	54
3.2.2.1	Effekt der Konzentration von Leu-Leu-OMe auf die Inflammasomaktivierung	54
3.2.2.2	Effekt der Inkubationsdauer mit Leu-Leu-OMe auf die Inflammasomaktivierung	55
3.3	Inflammasomaktivierung durch oxidative Schädigung	55
3.3.1	Effekt der Konzentration von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> auf die Inflammasomaktivierung	56
3.3.2	Charakterisierung der Mechanismen der Inflammasomaktivierung durch H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	56
3.3.2.1	Lysosomale Membranpermeabilisierung	57
3.3.2.2	Beteiligung von Cathepsin-B	58

3.4	Inflammasomaktivierung über P2X7-Signalweg	59
3.4.1	Effekt der Konzentration von ATP auf die Inflammasomaktivierung	59
3.4.2	Effekt der Konzentration von Nigericin auf die Inflammasomaktivierung	61
3.5	Zusammenfassung der Ergebnisse	62
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>63</b>
4.1	Freisetzungsmechanismen von IL-1 $\beta$	63
4.2	Bedeutung von IL-1 $\beta$ in der AMD	63
4.3	Methodische Diskussion	64
4.3.1	Photooxidative Schädigung durch Blaulicht	64
4.3.2	Lysosomale Membranpermeabilisierung durch Leu-Leu-OMe	65
4.3.3	Oxidative Schädigung durch Wasserstoffperoxid	65
4.3.4	P2X7-Rezeptoraktivierung durch ATP	66
4.3.5	Nigericin	67
4.4	Klinischer Ausblick	67
4.4.1	Selektive NLRP3-Inhibitoren	67
4.4.2	$\beta$ -hydroxybutyrat	68
4.4.3	IL-1 $\beta$ -Inhibitoren	68
4.4.4	Punicalagin als Membranstabilisator	69
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>70</b>
<b>6.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>71</b>
<b>7.</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>75</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>77</b>
<b>9.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>109</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A2E	N-retinylidene-N-retinyl-ethanolamine
AMD	altersabhängige Makuladegeneration
ARPE-19	adulte retinale pigmentepitheliale Zelllinie-19
ATP	Adenosintriphosphat
BHB	$\beta$ -hydroxybutyrat
BSA	Bovines Serum Albumin
BzATP	benzoyl-benzoyl-ATP
Ca <sup>2+</sup>	divalentes Kalziumkation
CAD	Caspase-aktivierte DNase
CNV	choroidale Neovaskularisation
CRID <sub>3</sub>	cytokine release inhibitory drug 3
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EZR	Extrazellulärraum
DPBS	Dulbecco's Phosphat Buffered Saline
FGF-B	Fibroblast Growth Factor-B
GA	geographische Atrophie
GA-1000	Gentamicin/ Amphotericin-B
GoA	Golgi-Apparat
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
H-RPE	Human Retinal Pigment Epithelial Cells
HNE	(E)-4-Hydroxynonenal-Dimethylacetal
HNE-POS	mit HNE modulierte Photorezeptoraußensegmente
IL	Interleukin
K <sup>+</sup>	Kaliumkation
Leu-Leu-OMe	L-leucyl-L-leucyl-Methylester
LMP	lysosomale Membranpermeabilisation
LPS	Lipopolysaccharide

Mg <sup>2+</sup>	divalentes Magnesiumkation
mRNA	messenger RNA
NF	nukleärer Faktor
NLRP	Nucleotide-binding oligomerization domain, Leucine rich Repeat and Pyrin domain containing
Pen./ Strep.	Penicillin 5000 U/ ml/ Streptomycin 5000 µg/ml
POS	Photorezeptoraußensegmente
pRPE	primäre humane RPE-Zellen
PRR	Pattern Recognition Receptor
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species
RPE	Retinales Pigmentepithel
RtEBM	Retinal Pigment Epithelial Basal Medium
RtEGM	Retinal Pigment Epithelial Cell Growth Medium
SLO	Scanning-Laser-Ophthalmoskop
TNF	Tumornekrosefaktor
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
w/ o	without

## **1. Einleitung**

### **1.1 Altersabhängige Makuladegeneration**

#### **1.1.1 Überblick**

Weltweit ist die altersabhängige Makuladegeneration (AMD) die dritthäufigste Erblindungsursache nach Katarakt und Glaukom (WHO, 2019). In den industrialisierten Nationen der westlichen Welt hingegen ist die AMD für die Mehrzahl der Erblindungen verantwortlich (Resnikoff et al., 2004). Die AMD ist eine Erkrankung der zentralen Retina, die vor allem ältere Menschen betrifft (Friedman et al., 2004).

Auf der Grundlage der demographischen Entwicklung wird dementsprechend eine weitere Prävalenzzunahme erwartet, wobei bereits jetzt über 150 Millionen Menschen an AMD erkrankt sind (Friedman et al., 2004; Wong et al., 2014). Es wird angenommen, dass im Jahr 2050 ungefähr jeder vierte europäische Bürger von der AMD betroffen sein wird (Li et al., 2017).

#### **1.1.2 Pathogenese**

Der als am wichtigsten erachtete Risikofaktor ist das fortschreitende Lebensalter, welches über viele Studien hinweg stark mit der Entwicklung einer AMD korrelierte (Chakravarthy et al., 2010a; Kawasaki et al., 2008; van Leeuwen et al., 2003; Varma et al., 2004). Die multifaktorielle Genese der AMD zeigt sich an dem Vorliegen zahlreicher weiterer Risikofaktoren. Zu den konstanten und stark korrelierenden Risikofaktoren gehören neben dem fortschreitenden Lebensalter das Rauchen, die familiäre Belastung mit AMD und die Sonnenlichtexposition (Chakravarthy et al., 2010a; Klein et al., 2008; van Leeuwen et al., 2003; Smith and Mitchell, 1998; Sui et al., 2013). Als ebenfalls signifikante Risikofaktoren, die jedoch lediglich ein moderates Risiko hervorrufen, werden ein hoher Body-Mass-Index (BMI), eine Historie von kardiovaskulären Erkrankungen, arterielle Hypertension und ein erhöhter Fibrinogenspiegel im Plasma angesehen (Age-Related Eye Disease Study Research Group, 2000; Chaine et al., 1998; Chakravarthy et al., 2010a; Hogg et al., 2008; Smith et al., 1998).

### 1.1.3 Stadieneinteilung und Symptome der AMD

#### 1.1.3.1 Frühstadien

Die AMD kann in Früh- und Spätstadien unterteilt werden (Pauleikhoff and Holz, 1996). Die Frühstadien beinhalten die frühe und die intermediäre AMD, in welchen eine Ansammlung von autofluoreszenten Drusen und Pigmentveränderungen des RPEs ophthalmoskopisch beobachtet werden können (Buch et al., 2005; Klein et al., 2007). Drusen bis zu einer Größe von 63  $\mu\text{m}$  werden jedoch als normale Erscheinung der Gewebeeralterung angesehen (Ferris et al., 2013). Zur genauen Unterscheidung beider Frühstadien werden Größe, Konfluenz und Anzahl der Drusen sowie die Pigmentierung beurteilt (Tab. 1). Bei den Betroffenen treten zu Beginn, also in den Frühstadien der AMD, nur kaum bemerkbare Symptome, wie eine erschwerte Dunkeladaptation und eine verminderte Kontrastwahrnehmung, auf (Brown and Lovie-Kitchin, 1987; Steinmetz et al., 1993). Daraus resultiert, als wahrscheinlich größte Alltagsbeeinträchtigung, ein erschwertes Autofahren bei Dunkelheit (Scilley et al., 2002).

**Tab. 1:** Übersicht über die Stadieneinteilung der AMD (Ferris et al., 2005, 2013, Holz et al., 2012, 2014a).

Stadium	Kennzeichen/ definierende Parameter
frühes Stadium „early AMD“	<ul style="list-style-type: none"> <li>• viele Drusen &lt;63 <math>\mu\text{m}</math></li> </ul> oder
intermediäres Stadium „intermediate AMD“	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Drusen zwischen 63 und 125 <math>\mu\text{m}</math></li> <li>• viele Drusen zwischen 63 und 125 <math>\mu\text{m}</math></li> </ul> oder
choroidale Neovaskularisation	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Drusen ab 125 <math>\mu\text{m}</math>;</li> <li>• häufig kombiniert mit Hyper- oder Hypopigmentierungen des RPEs</li> <li>• RPE- Abhebung</li> <li>• RPE- Einriss</li> <li>• disziforme Narbe nach Einriss</li> </ul>
Geographische Atrophie	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hypopigmentierungen</li> <li>• Demarkierung</li> <li>• RPE- Degeneration</li> </ul>



### 1.1.3.2 Spätstadien

Nach diesen weitestgehend symptomlosen Frühstadien können sich zwei unterschiedliche Spätformen der AMD entwickeln (Dewan et al., 2006). Zum einen die langsam voranschreitende, trockene Spätform, die sogenannte geographische Atrophie (GA) (Holz et al., 2004). Zum anderen die rasch verlaufende feuchte AMD, die durch choroidale Neovaskularisation (CNV) gekennzeichnet ist. Das Risiko für einen Stadienwechsel zur CNV bei einer bereits bestehenden, intermediären trockenen AMD liegt zwischen 10 und 15 Prozent (Gehrs et al., 2006). Es herrscht jedoch keine strikte Trennung zwischen der GA und der CNV, die sowohl ineinander übergehen oder nebeneinander am gleichen Auge auftreten können (Ambati and Fowler, 2012; Sarks et al., 2006).

#### 1.1.3.2.1 Geographische Atrophie

Bei der GA imponieren betroffene Areale in der Funduskopie als hypopigmentierte, demarkierte, scharf begrenzte Bereiche, in denen größere Gefäße der Choroidea besser zu erkennen sind als in gesunden Arealen (Holz et al., 2014a).

In den beschriebenen Spätstadien treten irreversible Gesichtsfeldeinschränkungen auf, die bis zur Erblindung reichen können (Ferris et al., 1984). Bei der GA zeigt sich der zentrale Gesichtsfeldverlust erst spät, da die Fovea in aller Regel vorerst ausgespart wird und vorwiegend der superior- temporal gelegene Bereich betroffen zu sein scheint (Herrmann et al., 2013; Sarks et al., 1988; Sunness, 1999). Ein RPE-Zellverlust wird als initialer Faktor für die Entstehung einer GA angesehen (McLeod et al., 2009).

#### 1.1.3.2.2 Choroidale Neovaskularisation

Für die CNV hingegen gibt es Belege, dass eine Überexpression des *Vascular Endothelial Growth Factors* (VEGF) für die Einsprossung neuer Gefäße verantwortlich ist. Diese VEGF-Ausschüttung ist unter anderem durch Entzündungsprozesse bedingt (Mullins et al., 2000; Nagineni et al., 2012). Auch die Ablagerung polarer Lipide steht als Ursache im Fokus, da durch diese eine Diffusionsänderung der vom RPE gebildeten Wachstumsfaktoren bedingt wird (Holz et al., 1994; Moore et al., 1995). Durch Leckage der neuen Gefäße kommt es zu einem Makulaödem mit entsprechender Visusreduktion.

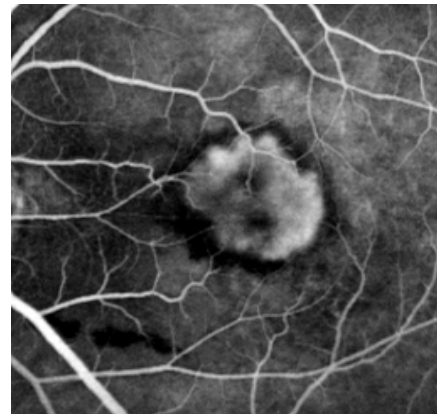
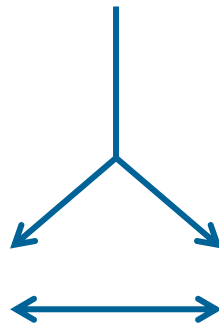
Zudem kann es zur Ansammlung subretinaler Flüssigkeit zwischen neurosensorischer Retina und RPE, Flüssigkeitseinlagerung zwischen dem RPE und der Bruch'schen Membran im Sinne einer serösen RPE-Abhebung (Ferris, 1983; Müller et al., 2002) und zu einem Riss des RPEs kommen. Das Endstadium stellt eine disziforme Narbe dar, die ein zentrales Skotom bedingt (Ferris, 1983; Junius and Kuhnt, 1926; Verhoeff and Grossman, 1937).



**Frühstadium**



**GA**



**CNV**

**Abb. 1:** Frühstadium mit Drusen, CNV und GA bei AMD. Bei der CNV kommt es durch Leckage der einsprossenden Gefäße zu Flüssigkeitseinlagerung in die Retina, während die Degeneration von RPE und Photorezeptorzellen bei der GA im Vordergrund steht und sich als hypopigmentierter scharf begrenzter Bereich präsentiert.

## **1.1.4 Behandlungsoptionen**

### **1.1.4.1 Behandlung der CNV**

Zurzeit kann die CNV durch Anti-VEGF-Medikamente wie Ranibizumab oder Bevacizumab effektiv behandelt werden (Brown et al., 2006; Campbell et al., 2012; Rich et al., 2006; Rosenfeld et al., 2006). Dennoch ist diese Therapieoption begrenzt, da einige Patienten nicht auf die Therapie ansprechen und andere die initiale Verbesserung des Sehens im weiteren Verlauf wieder verlieren (Chakravarthy et al., 2010b; Eldem et al., 2009).

### **1.1.4.2 Behandlung der GA**

Für die GA gibt es hingegen bisher noch keine genehmigte Therapieoption (Holz et al., 2014b). Es wurde jedoch beschrieben, dass eine Einnahme von Zink und Antioxidantien (Kombination aus Vitamin E, Vitamin C und beta-Carotin) das Risiko für eine GA-Entstehung reduzieren kann (Age-Related Eye Disease Study Research Group, 2001). Außerdem deuten einige Studien darauf hin, dass sich auch durch die Aufnahme von Omega-3-Fettsäuren das Progressionsrisiko der AMD verlangsamen lässt (Chong et al., 2008; Chua et al., 2006). Die Daten der in Deutschland durchgeführten LUTEGA-Studie zeigen eine Verbesserung der besten korrigierten Sehschärfe und eine erhöhte antioxidative Kapazität nach Supplementierung von Lutein, Zeaxanthin und Omega-3-Fettsäuren (Arnold et al., 2013; Dawczynski et al., 2013). Eine andere neu entwickelte und viel versprechende Therapieoption ist die subretinale Transplantation von *human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelial cells* (Bartuma et al., 2015; Lund et al., 2006; Plaza Reyes et al., 2016). Diese wird nun auch bereits in einer klinischen Phase-2-Studie am Menschen erprobt (Schwartz et al., 2012, 2015).

## **1.2 Das retinale Pigmentepithel bei der AMD**

### **1.2.1 Aufbau und Funktion**

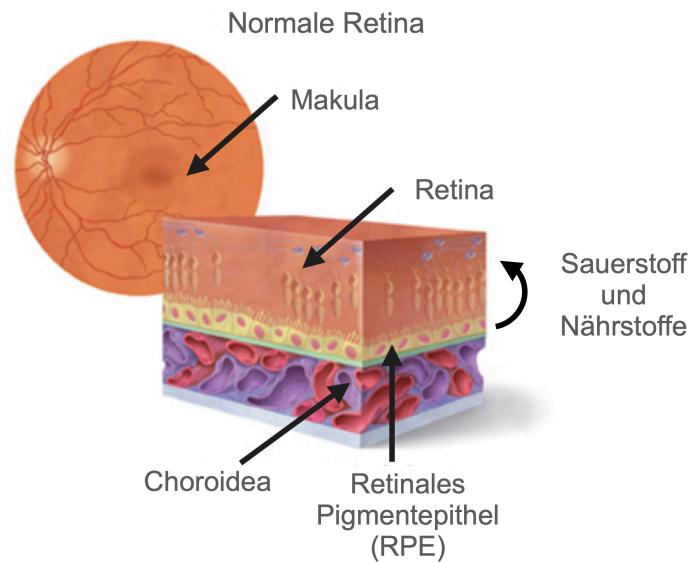
Das RPE ist eine einschichtige, polarisierte Zellreihe zwischen den neurosensorischen Zellen der Retina und der Bruch'schen Membran, welche Choroidea und RPE voneinander trennt. Durch Melanosomen ist das RPE braun pigmentiert und dient so der

Lichtabsorption. Durch seine Lage und den speziellen Aufbau obliegt dem RPE die Aufnahme, Degradierung und Erneuerung von abgestoßenen Photorezeptoraußensegmenten (POS) (Boulton, 2013; Mazzoni et al., 2014; Young, 1967).

Überblick über die Aufgaben des RPEs im Einzelnen:

- Aufrechterhaltung der Blut-Retina-Schrank
- Bestandteil des Vitamin A Zyklus
- Phagozytose distaler POS
- Enzymatischer Abbau der aufgenommenen POS in den Lysosomen
- Ausschleusung der Abbauprodukte auf der basalen Zellseite durch Diffusion
- Nutrition der Photorezeptoren
- Synthese der extrazellulären Matrix
- Molekültransport innerhalb der Interphotorezeptorenmatrix

Durch diese vielfältigen Aufgaben und aufgrund des hohen metabolischen Umsatzes ist das RPE in einem höheren Maße als andere Zellpopulationen von oxidativem Stress durch freie Sauerstoffradikale (*reactive oxygen species* - ROS) betroffen (Mitter et al., 2012). Das Verständnis dieser Umstände untermalt die Bedeutung der ROS als Risikofaktor in Bezug auf die Entwicklung einer AMD (Jarrett and Boulton, 2012).



**Abb. 2:** Angepasste Darstellung der Lage des RPEs zwischen Bruch'scher Membran und Photorezeptorzellen. Das RPE verstoffwechselt aufgenommene Produkte der Photorezeptorzellen und versorgt diese mit Sauerstoff und Nährstoffen (Quelle: Macular Disease Foundation Australia; <https://www.mdfoundation.com.au/content/what-happens-macular-degeneration>).

### 1.2.2 Alterung des RPE

Im Rahmen der AMD kommt es zu extrazellulären Ablagerungen in der äußeren Netzhaut (Wang et al., 2009). Diese werden als Drusen bezeichnet und imponieren als extrazelluläre Ablagerungen zwischen der Basalmembran der RPE-Zellen und der inneren kollagenen Schicht der Bruch'schen Membran (Burns and Feeney-Burns, 1980). Erstmals sind Drusen im späten 18. Jahrhundert als symmetrische Erkrankung der Choroidea und Retina beschrieben worden, die bei alten Menschen auftritt (Hutchinson, 1875). Sie weisen eine komplexe Zusammensetzung aus Phospholipiden, neutralen Lipiden, Proteinen und Oligosacchariden auf (Mullins and Hageman, 1999; Pauleikhoff and Holz, 1996; Pauleikhoff et al., 1992). Das RPE büßt im Laufe des Lebens einen Teil seiner Funktion in der Degradierung von anfallenden Stoffwechselprodukten der Photorezeptorzellen ein (Gu et al., 2012; Mazzoni et al., 2014; Nandrot et al., 2004). Somit wird der Ursprung dieser Bestandteile der Drusen auf das RPE zurückgeführt und unter anderem mit oxidativen Prozessen in Verbindung gebracht (Crabb et al., 2002; Pilgrim et al., 2017). Weitere Forschungen deuten auf eine begünstigte Entstehung durch

Inflammation und Sonnenlichtexposition hin (Anderson et al., 2002; Imamura et al., 2006). Solange sie jedoch eine Größe von 63  $\mu\text{m}$  nicht überschreiten und in geringer Anzahl auftreten, gelten die Drusen als physiologische Alterserscheinung (Ferris et al., 2013). Drusen, die in großer Anzahl und flächig vorkommen, werden als Risikofaktoren für eine Progression der AMD in eine der Spätformen verantwortlich gemacht (Gass, 1973; Joachim et al., 2015; Mauschitz et al., 2012; Pauleikhoff et al., 1990; Sarks et al., 1988). Mit zunehmender Größe und Anzahl können eine verminderte Kontrastwahrnehmung oder eine Abnahme der zentralen Sehschärfe bei den Betroffenen auftreten (Holz et al., 1995; Midena et al., 1994). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass Photorezeptorareale, die direkt über den Drusen oder lateral von diesen liegen, eine geringe Dichte aufweisen und Zeichen einer Degeneration zeigen (Johnson et al., 2005).

### 1.2.3 Lipofuszinakkumulation

Lipofuszin stellt gelblich-braune, granuläre, im Zytoplasma gelegene Pigmentablagerungen mit einer Größe von ungefähr einem Mikrometer dar (Feeney-Burns et al., 1980). Von den Granula geht eine Autofluoreszenz aus, deren Intensität mittels eines Scanning-Laser-Ophthalmoskops (SLO) und dem Fundusspektrophotometer in vivo dargestellt werden kann (Arend et al., 1995; Bellmann et al., 1997; Delori et al., 1995; Holz et al., 2012). Diese Ablagerungen bestehen aus einer heterogenen Mischung verschiedener Biomoleküle, die nicht mehr weiter abgebaut werden können (Ng et al., 2008).

Die Akkumulation von Lipofuszin als auffällige Veränderung beginnt um das 20. Lebensjahr und steigert sich weiter im Laufe des Lebens (Delori et al., 2001). Schlussendlich können sie bei einem 80-jährigen Menschen bis zu 19 % des gesamten Zytoplasmas ausmachen (Feeney-Burns et al., 1984). Aufgrund der altersabhängigen Anreicherung wird Lipofuszin auch das „Alterspigment“ genannt (Beatty et al., 2000).

Die genaue Entstehung der Lipofuszingranula ist zurzeit noch nicht bekannt. Es wird jedoch schon seit einiger Zeit angenommen, dass eine Unfähigkeit der RPE-Zellen phagozytiertes Material, wie retinol- und lipidreiche POS, abzubauen, die Ursache der Lipofuszinogenese darstellt (Katz, 1989; Kennedy et al., 1995). Dieser Verlust der Fähigkeit zur Autophagie wird als ursächlich für eine erhöhte Anfälligkeit des RPEs

gegenüber oxidativem Stress angesehen und für die Entstehung der AMD mitverantwortlich gemacht (Mitter et al., 2014).

Areale, die zuvor mehr Lipofuszin angereichert hatten, degenerierten im Rahmen des Krankheitsprogresses einer GA häufiger als Areale, die weniger Lipofuszingranula enthielten (Holz et al., 2001).

#### **1.2.4 Phototoxische Schädigung**

Lipofuszin besitzt photosensibilisierende Eigenschaften und kann bei Akkumulation allein oder mit weiteren toxischen Substanzen zu einem Untergang der RPE-Zellen führen, indem durch Blaulichtbestrahlung ROS entstehen (Rózanowska et al., 1998; Schütt et al., 2002). Das Bestandteil N-retinylidene-N-retinyl-ethanolamine (A2E) im Lipofuszin konnte als Auslöser für eine LMP identifiziert werden (Taylor et al., 1992; Tomany et al., 2004). Diese führt wiederum nach photooxidativem Schaden zu konsekutivem Zelltod (Brunk et al., 1995; Davies et al., 2001; Wihlmark et al., 1997).

In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass stattfindende Lipidperoxidationen zu einer lysosomalen Dysfunktion führen können (Rózanowska et al., 1998; Wassell et al., 1999). Neuere Untersuchungen zeigen, dass die phagozytische Aktivität der RPE-Zellen durch Lipofuszin-vermittelten Schaden abnimmt und antioxidative Supplemente wie Zeaxanthin und alpha-Tocopherol einen protektiven Effekt besitzen (Olchawa et al., 2017). Durch den Aktivitätsverlust des RPEs kann die Lipofuszinogenese verstärkt werden, da POS nicht mehr regelrecht abgebaut werden können und somit Erkrankungen, wie die AMD, begünstigt werden (Ferrington et al., 2016).

#### **1.2.5 Oxidative Schädigung**

Die Retina ist eines der Gewebe im Körper, welche die höchste Sauerstoffabsorption aufweisen (Yu and Cringle, 2005). Trotz des altersabhängigen Funktionsverlusts der Antioxidationsysteme bleibt die Retina auch im höheren Alter diesen hohen Sauerstoffpartialdrücken ausgesetzt, wodurch eine Schädigung des Gewebes durch freie Sauerstoffradikale (ROS) wahrscheinlicher wird (Beatty et al., 2000). Die ROS entstehen unter anderem durch Photonenabsorption bei Lichteinfall und bei hoher mitochondrialer Aktivität (Gutteridge and Halliwell, 2000; Kruff and Greer, 2011; Winkler et al., 1999). Auch

exogene Faktoren können die Entstehung von ROS begünstigen. Hier sind Nikotin- und Alkoholkonsum, aber auch Luftverschmutzung und Entzündungsprozesse zu nennen (Machlin and Bendich, 1987; Pryor, 1992; Tsukamoto and Lu, 2001). Im Alter kommt es unter anderem durch die geringere Enzymaktivität der Antioxidationsysteme und durch die Abnahme des Makulapigments zu einer fehlenden Kompensation der ROS (Shamsi and Boulton, 2001). Diese überschüssigen ROS sind in der Lage, Fettsäuren, Desoxyribonukleinsäure (DNA) oder Proteine zu verändern und eine gestörte Funktion der betroffenen Zellen zu bewirken (Gutteridge and Halliwell, 2000).

### **1.3 Das NLRP3-Inflammasom bei der AMD**

#### **1.3.1 Grundlagen: Bedeutung des NLRP3-Inflammasoms**

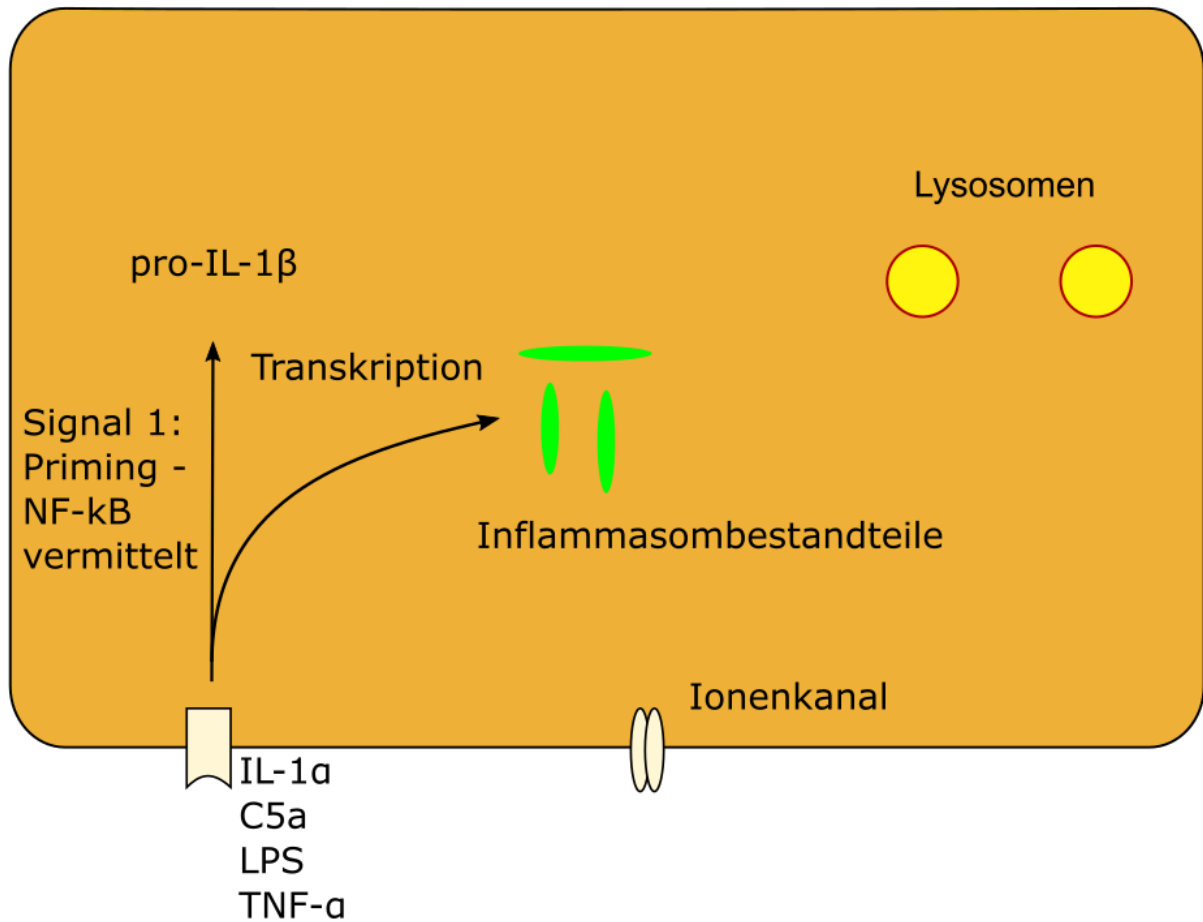
Die Beteiligung des NLRP3-Inflammasoms, das ein Bestandteil des angeborenen Immunsystems ist, an vielen inflammatorischen und immunologischen Prozessen veranschaulicht seine große Bedeutung (Guo et al., 2015).

Eine Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms konnte in verschiedenen Zellarten des angeborenen Immunsystems, wie dendritischen Zellen, Mikroglia und neutrophilen Granulozyten, nachgewiesen werden (Bakele et al., 2014; Hanamsagar et al., 2011; Sharp et al., 2009). Aber auch in epithelialen Zellen, wie Keratinozyten oder Zellen des bronchialen Flimmerepithels ist eine Aktivität dieses inflammatorischen Systems beschrieben (Feldmeyer et al., 2007; Peeters et al., 2013). Die Pathogenese vieler Erkrankungen mit chronischer Inflammation wird mit einer NLRP3-Inflammasomaktivierung in Verbindung gebracht. Dazu gehören unter anderem Gicht, Diabetes mellitus Typ 2, Adipositas, Morbus Alzheimer und Arteriosklerose (Düwell et al., 2010; Leemans et al., 2011; Robbins et al., 2014). Neue Erkenntnisse beschreiben außerdem eine Beteiligung des NLRP3-Inflammasoms an der Pathogenese von Leberfibrose und verschiedenen Formen der Hepatitis (Csak et al., 2011; Wree et al., 2014). Sowohl für die atrophe, als auch für die neovaskuläre Spätform der AMD haben aktuelle Studien ebenfalls eine Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms gezeigt (Tarallo et al., 2012; Tseng et al., 2013).



### **1.3.2 Grundlagen: Aktivierungskaskade des NLRP3-Inflammasoms**

Das NLRP3-Inflammasom ist ein im Zytosol vorkommender Multiproteinkomplex, für dessen Aktivierung zwei Signale nötig sind (Stutz et al., 2009). Der erste Aktivierungsschritt ist als sogenanntes Priming-Signal definiert, durch welches der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B aktiviert wird. Mögliche Priming-Signale sind die Stimulation von Pattern Recognition Rezeptoren (PRR) und Toll-like Rezeptoren (TLR) durch TNF- $\alpha$  und bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) (Bauernfeind et al., 2009). Auch die Zytokine IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  sind in der Lage via IL-1 Rezeptoren das Priming-Signal auszulösen (Franchi et al., 2009). NF- $\kappa$ B ist hierbei essentiell für eine gesteigerte Transkription von pro-IL-1 $\beta$ , pro-IL-18 und NLRP3-mRNA (Bauernfeind et al., 2009). Das Priming-Signal ist für die Aktivierung zwingend notwendig, da die im Zytoplasma konstitutiv vorliegenden NLRP3-Bestandteile für eine Aktivierung nicht ausreichen und pro-IL-1 $\beta$  nicht konstitutiv exprimiert wird (Bauernfeind et al., 2009; Hornung and Latz, 2010; Tseng et al., 2013).



**Abb. 3:** Priming Signal. Durch ein Priming-Signal (IL-1 $\alpha$ , C5a, LPS, TNF- $\alpha$ ) wird durch NF- $\kappa$ B die Expression von NLRP3 und pro-IL-1 $\beta$  gesteigert.

Im zweiten Schritt leitet ein Aktivierungs-Signal die Rekrutierung des Adaptermoleküls ASC und pro-Caspase-1 ein, wodurch pro-IL-1 $\beta$  oder pro-IL-18 in ihre aktiven Formen umgewandelt werden (Franchi et al., 2012, 2014; Juliana et al., 2012).

Die Spaltung von pro-IL-1 $\beta$  zum murenen IL-1 $\beta$  erfolgt hierbei durch die aktivierte Caspase-1 (Thornberry et al., 1992). Mögliche Aktivierungssignale sind die Überproduktion von ROS, die Freisetzung von Cathepsin B aus destabilisierten Lysosomen, ein Ausstrom von Kaliumionen aus der Zelle oder auch eine Veränderung des Zellvolumens (Compan et al., 2012; Hornung et al., 2008; Muñoz-Planillo et al., 2013a; Zhou et al., 2011).

### **1.3.3 Aktivierung im RPE**

#### **1.3.3.1 Aktivierung durch oxidativen Stress**

Neuere Studien untermauern die Annahme, dass ROS zu einer Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms und nachfolgend zu einer erhöhten IL-1 $\beta$ -Freisetzung führen können (Choe and Kim, 2017; Zhang et al., 2015). Es wird angenommen, dass Mitochondrien, die ROS generiert haben und nicht durch autophagische Prozesse weiter degradiert werden können, diese NLRP3-Aktivierung auslösen (Shi et al., 2015; Youle and Narendra, 2011). Demnach werden entstandene ROS durch Autophagie innerhalb der Zellen abgebaut, um ein Gleichgewicht zu erhalten und auf diese Weise die Zellen zu schützen (Zhou et al., 2011).

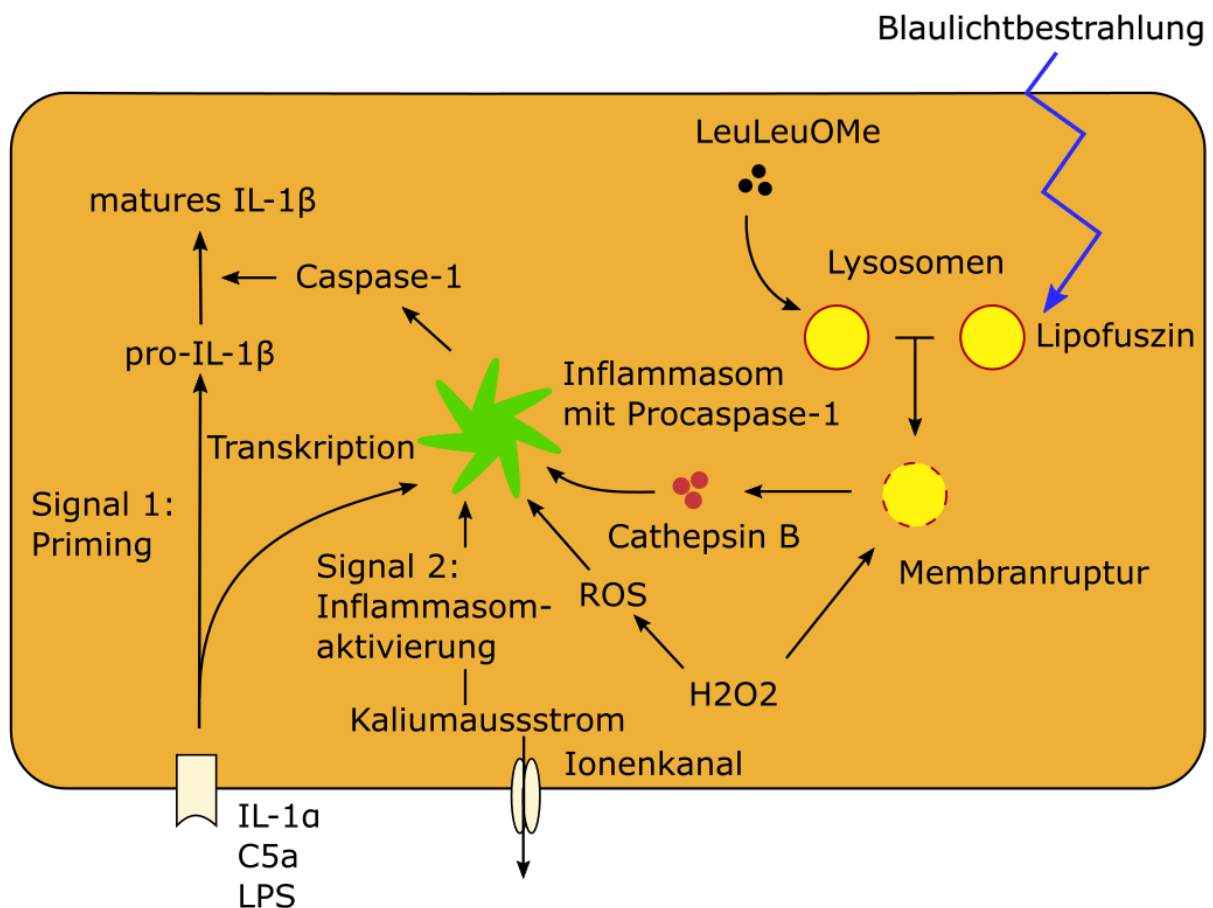
#### **1.3.3.2 Aktivierung durch lysosomale Membranpermeabilisation**

Die LMP als Aktivierungsmechanismus ist ein Schlüsselmechanismus in der Aktivierungskaskade des NLRP3-Inflammasoms. Hierbei werden nachfolgend die Inhalte der Lysosomen ins Zytosol freigesetzt (Hornung et al., 2008; Stutz et al., 2009). Nach der LMP werden weitere Vorgänge in Gang gesetzt, welche die NLRP3-Aktivierung, autophagische Prozesse und den Zelltod umfassen (Okada et al., 2014). Weitere Untersuchungen zeigen, dass eine durch Lipofuszin vermittelte LMP in geprimten RPE-Zellen das NLRP3-Inflammasom aktiviert (Brandstetter et al., 2015a; Tseng et al., 2013). Ursächlich hierfür kann unter anderem das Bestandteil N-retinylidene-N-retinylethanolamine (A2E) im Lipofuszin sein (Taylor et al., 1992; Tomany et al., 2004). Auch das im Lipofuszin enthaltene Lipidperoxidationsprodukt HNE führt zu einer Erhöhung der NLRP3-mRNA und der vermehrten Freisetzung von IL-18 und IL-1 $\beta$  (Kauppinen et al., 2012; Schutt et al., 2003). Vergleichbar mit der LMP durch die Phototoxizität des Lipofuszins ist die Wirkung von L-Leucyl-L-Methylester (Leu-Leu-OMe) (Mohr et al., 2015; Tseng et al., 2013).

#### **1.3.3.3 Aktivierung durch K<sup>+</sup>-Efflux**

Die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms kann außerdem über den Efflux von Kaliumkationen aus der Zelle erfolgen (Franceschini et al., 2015; Franchi et al., 2007; Pétrilli et al., 2007). Dieser Efflux kann im Anschluss an eine LMP, nach der Behandlung

von dendritischen Zellen mit Leu-Leu-OMe oder nach Aktivierung des P2X7-Rezeptors auftreten (Katsnelson et al., 2015; Muñoz-Planillo et al., 2013a; Pelegrin and Surprenant, 2006; Sanz and Virgilio, 2000). Der P2X7-Rezeptor ist auch auf RPE-Zellen zu finden und führt nach Stimulation durch Adenosin triphosphat (ATP) zu einer NLRP3-Aktivierung und zu konsekutivem Zelltod (Franceschini et al., 2015; Yang et al., 2011). ATP wird unter anderem von retinalen, cholinergen Neuronen und dem RPE freigesetzt, im RPE degradiert und kann somit zur NLRP3-Inflammasomaktivierung im RPE und zur Pathogenese der AMD beitragen (Mitchell, 2001; Neal and Cunningham, 1994; Reigada et al., 2005).



**Abb. 4:** Aktivierungs-Signal. Durch ein Aktivierungs-Signal (LMP, K<sup>+</sup>-Ausstrom, ROS) wird nach Priming der Zusammenbau des NLRP3-Inflammasoms eingeleitet und mittels Caspase-1 wird pro-IL-1β in seine mature, inflammatorisch aktive Form transformiert.

### **1.3.4 Klinische Daten zur NLRP3-Inflammasomaktivierung im RPE**

Die Ergebnisse von Tarallo et al. (2012) zeigten eine erhöhte Konzentration der mRNA von NLRP3, IL-18 und IL-1 $\beta$  im RPE von Personen, die an AMD litten, im Vergleich zu Proben von gesunden, altersgleichen Kontrollaugen. Auch andere Autoren zeigten eine Hochregulierung der genannten mRNAs in Proben aus dem Vitreus von Patienten, die entweder an der GA oder an der neovaskulären Spätform der AMD erkrankt waren (Cao et al., 2016; Wang et al., 2016). Auch der direkte Nachweis von IL-1 $\beta$  und IL-18 mittels ELISA aus Glaskörperproben von Patienten mit AMD veranschaulicht die inflammatorische Komponente der Erkrankung (Zhao et al., 2015). Eine andere Untersuchung konnte eine Aktivität von NLRP3 in den Regionen des humanen RPEs nachweisen, die von der GA betroffen waren (Tseng et al., 2013).

## **1.4 Zytokinfreisetzung**

Die Freisetzung der meisten Proteine in den Extrazellulärraum (EZR) erfolgt über die Beteiligung von Endoplasmatischem Retikulum (ER) und Golgi-Apparat (GoA), die Bestandteile des Endomembransystems sind (Halban and Irminger, 1994; Palade, 1975; Rothman, 1994). IL-1 $\beta$  hingegen folgt einem alternativen und unkonventionellen Freisetzungsmechanismus, was darauf zurückzuführen ist, dass das Zytokin keine Signalsequenz besitzt (Rubartelli et al., 1990). Der genaue Mechanismus der IL-1 $\beta$ -Freisetzung konnte bisher nicht definiert werden, da mehrere Untersuchungen zeigten, dass es verschiedene Wege gibt, auf denen IL-1 $\beta$  freigesetzt werden kann (Lopez-Castejon and Brough, 2011). Bisher wird die Vermutung angestellt, dass der Freisetzungsmechanismus vom Zelltyp oder auch vom aktivierenden Stimulus selbst abhängig sein könnte (Monteleone et al., 2015).

### **1.4.1 Aktive Sekretion auf unkonventionellem Weg**

Unkonventionelle Freisetzungsmechanismen von lebenden Zellen bezeichnen Wege der Proteinfreisetzung, ohne dass diese das Endomembransystem mit ER und GoA passieren (Nickel and Rabouille, 2009; Rabouille et al., 2012).

#### **1.4.1.1 Mikrovesikel-Abknospung**

Die Abknospung von Mikrovesikeln ist durch eine Verschmelzung mit der Plasmamembran der Zelle gekennzeichnet, wodurch die intravesikulären Stoffe in den Extrazellulärraum (EZR) gelangen (Simpson et al., 2008). Mikrovesikel werden von zahlreichen Zelltypen gebildet und finden sich in diversen biologischen Flüssigkeiten wie Muttermilch, Blut, Speichel und Urin (Qin and Xu, 2014). Sie sind an zahlreichen Zellvorgängen beteiligt, können eine immunmodulatorische Kompetenz besitzen, eine Zellantwort durch Zytokinfreisetzung hervorrufen, Zellwachstum stimulieren, die Angiogenese anregen oder zur Zellkommunikation dienen (Boilard et al., 2010; Holder et al., 2012; Simpson et al., 2008; Skog et al., 2008). In menschlichen Monozyten konnte nach der Aktivierung des P2X7-Rezeptors durch Applikation von ATP eine Abknospung von Mikrovesikeln, die mit IL-1 $\beta$  beladen waren, beobachtet werden (MacKenzie et al., 2001). Ähnliche Ergebnisse wurden auch in Mikroglia und humanen dendritischen Zellen reproduziert (Bianco et al., 2005; Pizzirani et al., 2007).

#### **1.4.1.2 Lysosomale Exozytose**

Durch Verschmelzung mit der Plasmamembran können sekretorische Lysosomen ihren Inhalt aus der Zelle freisetzen (Reddy et al., 2001). Die lysosomale Exozytose wurde unter anderem bei der Freisetzung von Transmittern oder auch bei der Aussprossung von neuronalen Zellfortsätzen beobachtet (Arantes and Andrews, 2006; Dou et al., 2012). In menschlichen Monozyten konnte pro-IL-1 $\beta$  in Vesikeln des endolysosomalen Systems nachgewiesen werden (Andrei et al., 1999). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass IL-1 $\beta$  auch in Makrophagen, die erst mit LPS und im Folgenden mit ATP stimuliert wurden, durch lysosomale Exozytose freigesetzt wird (Andrei et al., 2004).

#### **1.4.1.3 Caspase-1-abhängige Kanäle**

Es konnte nachgewiesen werden, dass Caspase-1 bei Proteinen wie HGMB-1, FGF-2, IL-1 $\beta$  und IL-1 $\alpha$ , die alle keine Signalsequenz für die konventionelle Sekretion über ER und GoA aufweisen, eine aktive Rolle bei der Freisetzung durch einen unkonventionellen Mechanismus einnimmt (Eder, 2009; Keller et al., 2008; Lamkanfi et al., 2010).

Der Einbau von nicht-selektiven Poren in die zelluläre Plasmamembran könnte ebenfalls als Mechanismus für die IL-1 $\beta$ -Freisetzung dienen. Es wurde gezeigt, dass die Porenbildung nach Caspase-1-Aktivierung schließlich zu einer Zellschwellung und zu einer osmotischen Zellyse führt, woraufhin der Inhalt der Zellen, unter anderem matures IL-1 $\beta$ , freigesetzt werden kann (Fink and Cookson, 2006). Russo et al. (2016) konnten jedoch nachweisen, dass die Porenbildung vor der schlussendlichen Zellyse stattfindet, sie den Durchlass für große organische Kationen und Anionen ermöglicht und an der unkonventionellen Freisetzung von IL-1 $\beta$  beteiligt ist.

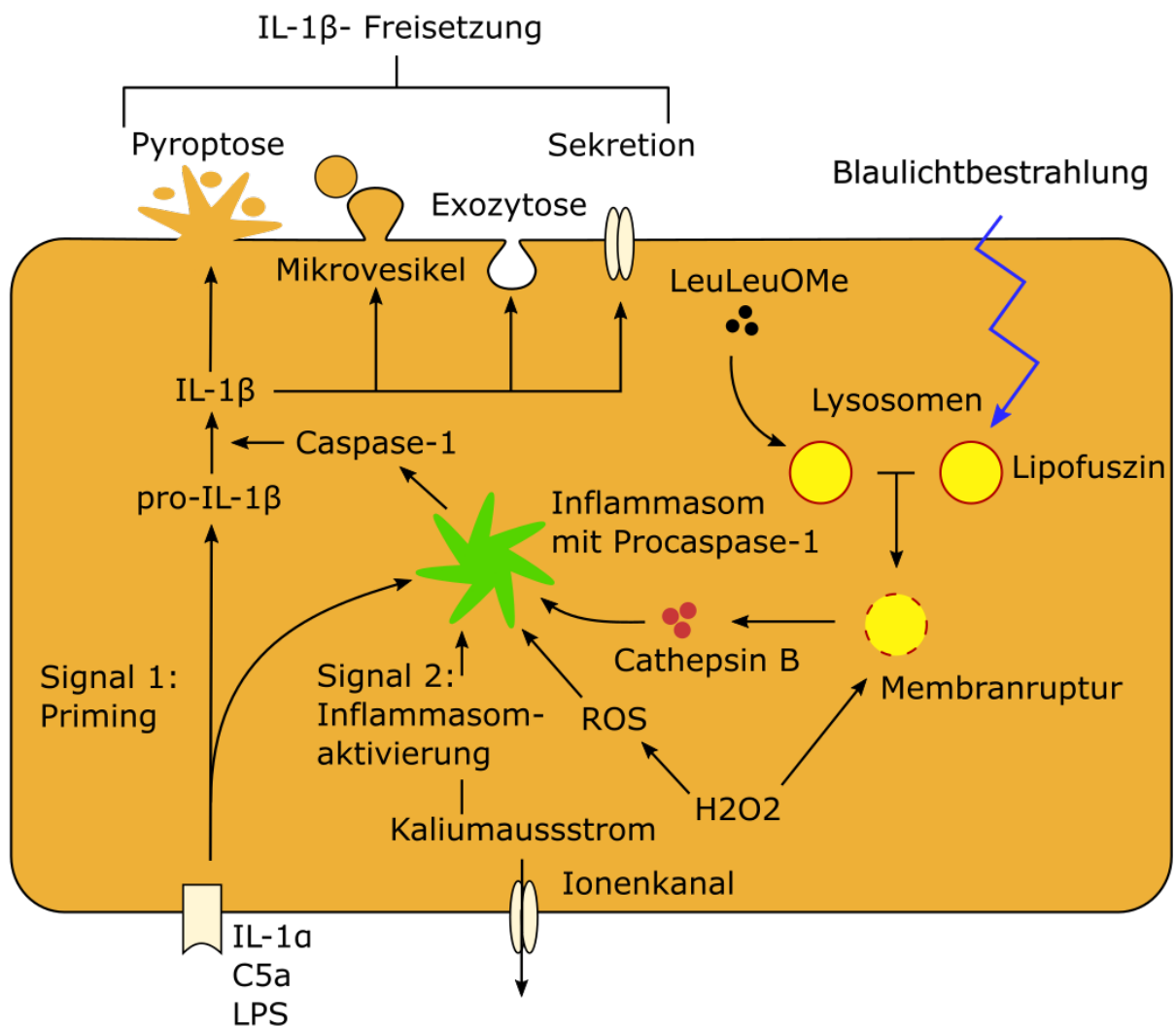
#### **1.4.2 Passive Freisetzung**

Auch eine passive Freisetzung durch Zellyse von IL-1 $\beta$  enthaltenden Zellen wurde in der Literatur thematisiert und als Mechanismus eines proinflammatorischen Signalweges gesehen (Fernandes-Alnemri et al., 2007; Lamkanfi, 2011).

##### **1.4.2.1 Pyroptose mit Zellmembrandesintegration**

Die Pyroptose wurde zuerst bei Makrophagen, die mit *Salmonella typhimurium* infiziert worden waren, von Brennan und Cookson im Jahre 2000 als atypischer Zelltod beschrieben (Brennan and Cookson, 2000). Heutzutage ist bekannt, dass die Pyroptose nicht nur bei bakteriellen Infektionen, sondern beispielsweise auch bei immunologischen Vorgängen vorherrschen kann (Bergsbaken et al., 2009). Die Pyroptose ist eine Form des programmierten Zelltods, der durch die Aktivierung von Caspase-1 gekennzeichnet ist (Cookson and Brennan, 2001). Caspase-1 wird benötigt, um die Vorläuferproteine pro-IL-1 $\beta$  und pro-IL-18 in ihre proinflammatorischen maturen Formen zu spalten (Black et al., 1989; Kostura et al., 1989).

Nach dem Einbau von Poren in die Plasmamembran kommt es aufgrund der Ionenflüsse zur konsekutiven Zellschwellung und osmotischen Zellyse (Fink and Cookson, 2006; Lamkanfi, 2011). Des Weiteren erfolgt im Rahmen des pyroptotischen Zelltods die Freisetzung der intrazellulären Bestandteile, wozu auch IL-1 $\beta$  gehören kann, in den EZR, sowie eine DNA-Fragmentierung, welche wahrscheinlich durch eine bisher nicht identifizierte, von Caspase-1 aktivierte Nuklease erfolgt (Bergsbaken and Cookson, 2007; Fernandes-Alnemri et al., 2007).



**Abb. 5:** Mögliche Freisetzungsmechanismen von IL-1 $\beta$ . Nach NLRP3-Inflammasomaktivierung können verschiedene Mechanismen (Pyroptose, Mikrovesikel-Abknospung, Exozytose, Sekretion) zu einer Zytokinfreisetzung führen.

#### 1.4.2.2 Apoptose

Die Apoptose ist ein aktiver und programmierter Zelltod und kann sowohl bei der embryonalen Entwicklung, als auch beim Zellumsatz von gesundem Gewebe des erwachsenen Menschen beobachtet werden (Kerr et al., 1972). Bei der Apoptose sind vor allem die Caspasen 2, 3 und 6-10 als katalysierende Proteasen bekannt (Earnshaw et al., 1999; Riedl and Shi, 2004; Shi, 2002). Caspase-1, die als proinflammatorische Caspase charakterisiert wird, spielt jedoch keine Rolle bei dem apoptotischen Zelltod (Brydges et al., 2013; Kuida et al., 1995; Li et al., 1995). Apoptotisch bedingt stehen eine



Zellschrumpfung, Bildung von Bläschen an der Zellmembran, Kondensation des Chromatins und die immunologisch stumme Phagozytose des Apoptosekörperchens im Vordergrund, wobei keine Inhalte des Zytosols in den EZR ausgeschüttet werden (Elmore, 2007; Kerr et al., 1972; Kurosaka et al., 2003; Savill and Fadok, 2000). Die Fragmentierung der DNA und die Kondensation des Chromatins wird unter anderem durch den Apoptose-induzierenden Faktor und eine durch Caspase-3 und Caspase-7 aktivierte DNase (CAD) katalysiert (Enari et al., 1998; Joza et al., 2001; Sakahira et al., 1998).

**Tab. 2:** Unterschiede zwischen Pyroptose und Apoptose im Überblick. Die Tabelle ist angelehnt an die Darstellung von Labbe und Saleh, sowie deren modifizierte Form von Brandstetter (Brandstetter, 2016; Labbé and Saleh, 2011).

	Pyroptose	Apoptose
Morphologische Kriterien	Zellschwellung	Zellschrumpfung
	Porenbildung	Bläschenbildung der Plasmamembran
	DNA-Fragmentierung	
aktivierte Enzyme	durch Caspase-1 aktivierte, bisher unidentifizierte Nuklease	CAD
	Caspase-1	Caspasen 2, 3 und 6-10
Inflammation	proinflammatorisch	immunologisch stumm

### 1.5 Fragestellung und Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifikation des vorherrschenden Freisetzungsmechanismus‘ für Interleukin-1 $\beta$  nach einer NLRP3-Inflammasom-aktivierung in humanen RPE-Zellen.

Das Arbeitsprogramm beinhaltete die Untersuchung des Freisetzungsmechanismus‘ nach NLRP3-Inflammasomaktivierung durch unterschiedliche Trigger, wie chemisch induzierter lysosomaler Membranpermeabilisation (LMP), photooxidativ induzierter LMP, oxidativer Schädigung und P2X7-Rezeptoraktivierung. Hier stand zudem der Signaltransduktionsweg im Fokus der Untersuchungen. Geklärt werden sollte

insbesondere, ob IL-1 $\beta$  durch aktive Sekretion von lebenden RPE-Zellen oder passiv durch pyroptotische Zellyse (*terminal release*) freigesetzt wird.

Die Arbeit soll Grundlagenerkenntnisse liefern, die zur Entwicklung einer neuen therapeutischen Strategie bei atrophischer AMD durch pharmakologische Inhibition von NLRP3 beitragen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Reagenzien

Aqua (destilliert)	Braun
Betaisodona	
Bradford-Reagenz	Sigma
BSA	Sigma
CA-074 (Cathepsin-B-Inhibitor)	Merck
DAPI	AppliChem
DMEM/ HAM's F12 Mix (1:1)	PAN Biotech
DPBS Ca/ Mg	PAN-Biotech
DPBS w/ o Ca/ Mg	PAN-Biotech
Ethanol (70 %)	Fischar
FBS	Gibco
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Roth
HCl	Roth
HNE-DMA	Sigma-Aldrich
Immumount	Thermo Scientific
Leu-Leu-OMe	Sigma
Methanol	Merck
Penicillin/ Streptomycin	PAN
rekombinantes humanes Interleukin-1 $\alpha$	R&D-Systems
Stickstoff	Linde
Triton X-100 20 %- Lösung	AppliChem
Trypanblau	
Trypsin-EDTA (0,05 %)	Gibco

#### 2.1.2 Kits

Cytotoxicity Detection Kit	Roche
----------------------------	-------

Human IL-1 $\beta$  ELISA Kit II

BD OptEIA

### 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

6/ 96 Multiwell-Platten

Falcon

Deckgläser

Glaspipetten (5/ 10/ 25 ml)

Cellstar

Pipettenspitzen (10/ 100/ 200/ 1000  $\mu$ l)

Axygen

Plattenabdeckung

Cellstar

Reaktionsgefäße (15/ 50 ml):

Cellstar,

Reaktionsgefäße (2 ml)

eppendorff

Skalpell

Zellkulturflasche (75 cm<sup>2</sup>)

Falcon

### 2.1.4 Technische Ausrüstung

Analysenwaage AE160

mettler

Blaulichtlampe mit Lüfter

Centrifuge 5424R

eppendorf

Fluoreszenzmikroskop DM RXE

Leica

Freezer Forma 906

Thermo scientific

Horizontalschüttler Seastar

Heathrow Scientific,  
Illinois, USA

Inkubator „Hera Cell 150“

Thermo Scientific

Kamera

Leica

Lichtmikroskop

Magnetheizrührer

VELP Scientifica

Multifuge 1S-R

Heraeus

Multiwell- Pipette (300  $\mu$ l)

Eppendorf research

Neubauer-Zählkammer

Photometer (LDH)

Pipetten (5/ 10/ 20/ 100/ 200/ 1000  $\mu$ l)

Eppendorf research

Pipettierhilfe „pipetus®“

Hirschmann Laborgeräte

Rechner

hp

Rotor für Multifuge TTH 400	Heraeus
Sauger	
SmartSpec™Plus	Bio-Rad
Spektrophotometer DU650	Beckmann
Sterilwerkbank	Thermo Scientific
Sterilwerkbank Antair ZKB	Anton
Stickstofftanks	
Varioklav 250 T	H + P
Wasseraufbereitungssystem Direct Q	Millipore
Wasserbad W350	memmert

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Isolation boviner Photorezeptoraußensegmente

Die hier angewandte Methode lehnt sich an die Arbeitsbeschreibungen für porcine POS an (Schraermeyer et al., 1997) (Bergmann et al., 2004). Diese wurden von Frau Dr. Nina Kristina Stratmann weiter verfeinert (Stratmann, 2009).

Reagenzien:

Betaisodona

HEPES-Lösung:

- 1,19 g HEPES (MW: 238,8 g/mol; 100 mM)
- in 50 ml Aqua dest. lösen

Ca<sup>2+</sup>/ Mg<sup>2+</sup>-Lösung:

- 0,368 g CaCl<sub>2</sub> (MW: 147,0 g/mol; 5 mM)
- 1,017 g MgCl<sub>2</sub> (MW: 203,3 g/mol; 10 mM)
- in 500 ml Aqua dest. lösen

KCl-Puffer mit und ohne Sucrose (je 50 ml):

- 2,256 g KCl (MW: 74,6 g/mol; 0,3 M)
- 10 ml HEPES-Lösung (10 mM)

- 10 ml  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Lösung ( $\text{CaCl}_2$ : 0,5 mM;  $\text{MgCl}_2$ : 1 mM)
- in 80 ml Aqua dest. lösen
  
- 50 ml des KCl Puffers mit 24 g Sucrose versetzen (MW: 342,3 g/mol; 1,4 M)
- pH-Wert auf 7 einstellen
- Lösung steril filtrieren

Arbeitsschritte:

- 10 Reaktionsgefäße (15 ml) mit 1,5 ml KCl-Sucrose-Puffer befüllen und auf Eis lagern
- auf Eis gelagerte bovine Bulbi (ca. 40 Stück) mit Betaisodona desinfizieren
- Bulbi radiär auftrennen, Glaskörper entnehmen und die Retinae herauslösen
- je drei bis vier Retinae in ein Reaktionsgefäß hineingeben
- Retinae durch Pipettieren mit einer angeschnittenen Pipettenspitze zu einer homogenen Masse mit dem Sucrose-KCl-Puffer verarbeiten
- Retina-Suspension bei 4000 U/min und 4 °C 5 min zentrifugieren
- Überstand durch vierlagige Gaze steril filtrieren
- Pellet mit 1,5 ml KCl-Sucrose-Lösung resuspendieren und erneut zentrifugieren
- erneut sterile Filtration des Überstands und Pellet mit 2 ml KCl-Sucrose-Lösung resuspendieren und ein drittes Mal zentrifugieren
- wiederholt Überstand steril filtrieren, Pellet verwerfen
- steril filtrierte Überstände zusammenführen und 1:1 mit KCl-Puffer ohne Sucrose versetzen (0,7 M Sucrose)
- diese Lösung mit je 12 ml pro Reaktionsgefäß vollständig aliquotieren
- Zentrifugation bei 2000 U/min und 4 °C für 7 min
- Überstand verwerfen und Pellet in 1 ml PBS resuspendieren
- Suspension auf 8 Eppendorfer Reaktionsgefäße aufteilen und für 10 min bei 4 °C und 15.000 U/min zentrifugieren
- Überstand verwerfen und das Pellet in 1 ml PBS resuspendieren
- fertige POS-Lösung bei -80 °C tiefrieren

Im Anschluss an diese Arbeitsschritte wurde der Proteingehalt der einzelnen POS-Lösungen mittels Bradford-Proteinassay bestimmt.

### 2.2.2 Modifikation von Photorezeptoraußensegmenten mit HNE

Durch die Modifikation der Photorezeptoraußensegmente mit HNE akkumulierten die ARPE-19-Zellen Lipofuszin. Um dies zu erreichen, wurden die ARPE-19-Zellen über 7 Tage mit 4 µl HNE-POS pro ml Medium versetzt. Nina Kristina Stratmann konnte bereits dokumentieren, dass nach 7 Tagen eine ausreichende Menge an modifizierten POS in den Zellen akkumuliert wird (Stratmann, 2009).

Arbeitsschritte:

- 100 µl des HNE in Eppendorfer-Reaktionsgefäße abfüllen
- Unter Stickstoff verdampfen
- 100 µl Salzsäure (HCl) [1 mM] hinzugeben
- 30 min bei 4 °C inkubieren
- 540 µl DPBS hinzufügen
- 250-500 µg gewaschene POS 10 min bei 1500 U/min zentrifugieren und Überstand verwerfen
- Zentrifugierte POS in 500 µl HNE-DMA-Lösung resuspendieren
- Über Nacht auf dem Schüttler inkubieren (auf Eis/ im Kühlschrank)
- Zentrifugieren und Überstand verwerfen
- In DPBS lösen, zentrifugieren und Überstand verwerfen (Waschvorgang)
- In DPBS lösen und bis zur Verwendung bei -80 °C tiefrieren

### 2.2.3 Bradford-Proteinassay

Um den Proteingehalt der isolierten bovinen POS zu bestimmen, wurde der Bradford-Proteinassay angewandt.

Reagenzien:

- DPBS w Ca/ Mg; PAA Laboratories
- Indikatorlösung: Protein-Assay-Farbstoffkonzentrat, Bio Rad
- Proteinstandard: 100 mg BSA, Gibco

Materialien:

- Messküvetten

Arbeitsschritte:

- 100 mg BSA in 10 ml DPBS lösen (→10 mg/ml)
- Davon 1 ml mit 9 ml DPBS zusammenführen (→ 1 mg/ml)
- 100 µl der BSA Stammlösung in 8 ml DPBS lösen
- Standard vorlegen (Standard und Proben werden in Triplets gemessen)
- Für die Proben 5 µl POS- Suspension in 795 µl DPBS geben
- Zu allen Proben 200 µl Indikatorlösung hinzufügen und vortexen
- 10 min bei Raumtemperatur inkubieren
- Umfüllen in die Messküvetten und bei 590 nm die Absorption messen

Anhand der gemessenen Absorptionen konnte im Vergleich mit der Standardreihe der Proteingehalt der einzelnen Proben kalkuliert werden.

## 2.2.4 RPE-Zellkultur

### 2.2.4.1 Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden stets bei einer Temperatur von 37 °C, einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 5 % und einer Luftfeuchtigkeit von 10 % im Inkubator kultiviert. Die ARPE-19-Zellen sind eine spontan immortalisierte humane RPE-Zelllinie (Dunn et al., 1996). Diese wurden mit einem Standardmedium für ARPE-19-Zellen kultiviert, welches spätestens nach einer Kulturdauer von 7 Tagen ausgewechselt wurde. Die primären humanen RPE-Zellen (pRPE-Zellen) wurden entsprechend der Herstellerangaben nach der Passage mit Wachstumsmedium und nach Erreichen der Konfluenz mit Kulturmedium versetzt.

Zelllinien:

- |                                     |                          |
|-------------------------------------|--------------------------|
| • ARPE-19-Zellen (CRL-2302)         | ATCC, Rockville, MD, USA |
| • pRPE-Zellen (LOT-No.: 0000424472) | Lonza, Köln Deutschland  |

Zellkulturmedien:

Standardmedium für ARPE-19-Zellen (560,6 ml)



- 10 % hitzeinaktiviertes FBS, Gibco (55 ml)
- 1 % Pen./ Strep., Gibco (5,6 ml)
- in DMEM/ Ham´s F12 Mix (1:1), Gibco (500 ml)

Wachstumsmedium für pRPE-Zellen (Menge nach Bedarf)

- 2 % hitzeinaktiviertes FBS
- in RtEGM (versetzt mit L-Glutamin, GA-1000, FBF-B), Lonza
  - RtEGM mit 1 % Pen./ Strep., Gibco

Kulturmedium für pRPE-Zellen:

- 1 % Penicillin 5000 U/ml/ Streptomycin 5000 µg/ml, Gibco
- 99 % RtEBM (versetzt mit L-Glutamin, GA-1000), Lonza

#### **2.2.4.2 Zellpassage**

Bei konfluentem Zellrasen konnten die Zellen in einem Verhältnis von 1:3 passagiert werden. Die Zellzahl einer konfluenten 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche beträgt  $8,4 \times 10^6$  Zellen. Bei der Zellpassage wurden  $2,8 \times 10^6$  Zellen für eine neue 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche ausgesät.

Reagenzien:

- Standardmedium für ARPE-19-Zellen
- DPBS w/ o Ca/ Mg; Gibco
- Trypsin-EDTA (0.05 %); Gibco

Arbeitsschritte:

- Absaugen des Mediums
- Waschen des Zellrasens mit 10 ml DPBS w/ o Ca/ Mg (wieder Absaugen)
- Gabe von 3 ml Trypsin und Inkubation im Brutschrank für 3-5 Minuten
- zwischenzeitlich Zellablösung mit Lichtmikroskop kontrollieren
- Unterstützung der Ablösung durch leichtes Klopfen
- Stoppen der Ablösungsreaktion durch 6 ml Standardmedium

- Je 3 ml der Zellsuspension auf neue Zellkulturflaschen mit vorgelegten 10 ml Standardmedium verteilen.

### 2.2.4.3 Kryokonservierung

Die Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff diene der längerfristigen Lagerung der ARPE-19-Zellen.

Reagenzien:

- DMSO, Sigma

Materialien:

- *Cryo-Vials* (Einfrierröhrchen), Greiner

Arbeitsschritte:

- *Cryo-Vials* vorkühlen
- Trypsinierung der einzufrierenden Zellen mit kaltem DPBS und kaltem Trypsin
- Zentrifugation mit 1500 U/min bei 4 °C, Überstand verwerfen
- 100 µl DMSO pro *Cryo-Vial*
- Resuspension des Zellpellets in 900 µl kaltem Standardmedium
- Umfüllung der Zellsuspension in *Cryo-Vial*
- über Nacht bei -80 °C tiefrieren (bis einige Tage)
- Umlagerung in flüssigen Stickstoff

Auftauen:

- *Cryo-Vial* rasch in der Hand auftauen
- Aufgetaute Zellsuspension zu 10 ml angewärmtem Standardmedium im Reaktionsgefäß (15 ml) hinzugeben
- Reaktionsgefäß mit 1200 U/min für 5 min zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Resuspension des Zellpellets in 9 ml Medium
- ausplattieren in 75er-Zellkulturflasche je *Cryo-Vial*

#### 2.2.4.4 Zellzahlbestimmung

Reagenzien:

- Trypanblau

Materialien

- Neubauer-Zählkammer, Marienfeld

Arbeitsschritte:

- Abtrypsinierung der Zellen
- 30 µl Zellsuspension mit 30 µl Trypanblau färben
- Auszählung der nicht angefärbten Zellen in der Neubauer-Zählkammer

Berechnung der Zellsuspension nach folgender Formel:

$$\text{Zellzahl} = Z \times 10^4 \text{ ml}^{-1} \times S / V$$

S: Volumen der Zellsuspension

V: Verdünnung der Zellsuspension (hier: 1:2)

Z: durchschnittliche Zellzahl über vier großen Quadraten der Neubauer-Zählkammer (Volumen eines großen Quadrats beträgt  $10^4$  ml)

**Abb. 6:** Formel zur Zellzahlberechnung

#### 2.2.4.5 Priming mit IL-1 $\alpha$

Die Behandlung der Zellen mit 4 ng/ml IL-1 $\alpha$  über 48 h diente in den durchgeführten Versuchen als Priming-Signal. Durch dieses Verfahren wurde sichergestellt, dass die ARPE-19-Zellen pro-IL-1 $\beta$  produzieren und die NLRP3-Transkription steigern (Tseng et al., 2013).

#### **2.2.4.6 Cathepsin-B-Inhibition**

Die Behandlung der Zellen mit dem Cathepsin-B-Inhibitor (CA-074) diente der Inhibition lysosomaler Enzyme, um eine lysosomale Membranruptur nachzuweisen oder auszuschließen, indem das downstream freigesetzte IL-1 $\beta$  quantifiziert wurde. Der Cathepsin-B-Inhibitor wurde dem Medium in einer Konzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  eine Stunde vor der Induktion der LMP und währenddessen zugegeben.

#### **2.2.4.7 Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms**

Allgemeine Arbeitsschritte für die folgenden Unterpunkte von **2.2.4.7**:

- Herstellung der jeweils verwendeten Lösung (z.B. 0,5 mM Leu-Leu-OMe-Lösung in farblosem DMEM)
- Absaugen des Mediums
- Versetzen der Zellen mit der zuvor hergestellten Lösung
- Inkubation nach jeweiligem Schema
- Abpipettieren und Verwendung von 100  $\mu\text{l}$  für den LDH-Assay und von 100  $\mu\text{l}$  für den IL-1 $\beta$ -ELISA

##### **2.2.4.7.1 Induktion einer LMP**

In den folgenden Versuchsmodellen wurden nur ARPE-19-Zellen und pRPE-Zellen verwendet, die zuvor auf einen konfluenten Zellrasen in den Wells überprüft worden waren.

##### **2.2.4.7.1.1 Lipofuszin vermittelte Phototoxizität**

ARPE-19-Zellen wurden zuerst über 7 Tage mit HNE-POS inkubiert, um eine Lipofuszinogenese zu induzieren. Die Konzentration wurde so gewählt, dass sie einer Inkubation von 4 mg HNE-POS pro  $\text{cm}^2$  entsprach. Im Anschluss wurden die Zellen mit IL-1 $\alpha$  geprimt und über verschiedene Zeiten mit Blaulicht bestrahlt. Es wurde eine dominante Wellenlänge von 448 nm verwendet und damit eine Leistungsdichte von 0,8  $\text{mW/cm}^2$  erreicht.

**Tab. 3:** Messreihen in Triplets mit je 200 µl und aufsteigenden Bestrahlungszeiten, um gleichzeitig Zytotoxizität und IL-1β-Freisetzung zu detektieren.

Bestrahlungsdauer nach Lipofuszinanreicherung	0 h	1 h	3 h	6 h
Messreihen:	Triplets je 200 µl; 100 µl für LDH-Assay und 100 µl für IL-1β-ELISA			

#### 2.2.4.7.1.2 L-leucyl-L-leucyl-Methylester

Leu-Leu-OMe induziert chemisch eine LMP und aktiviert das NLRP3-Inflammasom in RPE-Zellen. Dieser Effekt ist mit der Lipofuszin-Toxizität vergleichbar. Dieses Versuchsmodell bestand aus zwei Teilen. Im ersten Teil wurden sowohl ARPE-19-Zellen, als auch pRPE-Zellen über 3 h aufsteigenden Konzentrationen von Leu-Leu-OMe ausgesetzt.

**Tab. 4:** Messreihen in Triplets mit je 200 µl und aufsteigenden Leu-Leu-OMe-Konzentrationen, um gleichzeitig Zytotoxizität und IL-1β-Freisetzung zu detektieren.

Leu-Leu-OMe über 3 h	0 mM	0,125 mM	0,25 mM	0,5 mM	1 mM
Messreihen:	Triplets je 200 µl; 100 µl für LDH-Assay und 100 µl für IL-1β-ELISA				

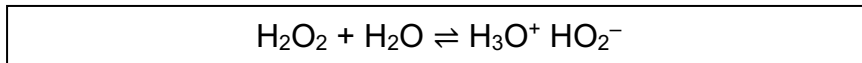
Der zweite Abschnitt des Modells beinhaltet eine Stimulation beider genannten Zellreihen mit einer Konzentration von 1 mM Leu-Leu-OMe über ansteigende Zeiträume.

**Tab. 5:** Veranschaulichung der untersuchten Inkubationszeiten bei einer Konzentration von 1 mM Leu-Leu-OMe. Von 200 µl Überstand wurden je 100 µl verwendet, um Zytotoxizität und IL-1β-Freisetzung zu quantifizieren.

Inkubationszeit bei 1 mM Leu- Leu-OMe	0 h	0,5 h	1 h	3 h
Messreihen:	Triplets je 200 µl; 100 µl für LDH-Assay und 100 µl für IL-1β-ELISA			

### 2.2.4.7.2 Wasserstoffperoxid als oxidativer Stressor

Um oxidativen Stress als NLRP3-Inflammasomaktivator zu untersuchen, wurde  $\text{H}_2\text{O}_2$  verwendet.  $\text{H}_2\text{O}_2$  wurde dafür in einer Lösung aus Wasser und Nährmedium gelöst. Da  $\text{H}_2\text{O}_2$  als schwache Säure wirkt, stellt sich in einer wässrigen Lösung folgendes Gleichgewicht ein:



**Abb. 7:** Gleichgewichtsreaktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  in  $\text{H}_2\text{O}$

In diesem Modell wurden mit IL-1 $\alpha$  geprimte ARPE-19-Zellen mit aufsteigenden Konzentrationen von  $\text{H}_2\text{O}_2$  versetzt.

**Tab. 6:** Messreihen in Triplets mit je 200  $\mu\text{l}$  und aufsteigenden  $\text{H}_2\text{O}_2$ - Konzentrationen bei einer Inkubationszeit über 3 h, um gleichzeitig Zytotoxizität und IL-1 $\beta$ -Freisetzung zu detektieren.

$\text{H}_2\text{O}_2$ über 3 Stunden	0 mM	2,5 mM	5 mM	10 mM
Messreihen:	Triplets je 200 $\mu\text{l}$ ; 100 $\mu\text{l}$ für LDH-Assay und 100 $\mu\text{l}$ für IL-1 $\beta$ -ELISA			

### 2.2.4.7.3 K<sup>+</sup>-Efflux

Da auch der K<sup>+</sup>-Efflux zu einer NLRP3-Inflammasomaktivierung führen kann, verwendeten wir ATP und Nigericin, um die Wirkung des Kaliumausstroms auf ARPE-19-Zellen zu untersuchen.

#### 2.2.4.7.3.1 Adenosintriphosphat

ATP bedingt als Aktivator des P2X7-Rezeptors einen Kaliumausstrom. Um den Effekt von ATP auf die NLRP3-Inflammasomaktivierung in ARPE-19-Zellen zu untersuchen, wurden mit IL-1 $\alpha$  geprimte Zellen über 2 Stunden aufsteigenden Dosierungen von ATP ausgesetzt.

**Tab. 7:** Messreihen in Triplets mit je 200 µl und aufsteigenden ATP-Konzentrationen bei einer Inkubationszeit von 2 h, um gleichzeitig Zytotoxizität und IL-1β-Freisetzung zu detektieren.

ATP über 2 Stunden	0 mM	1 mM	2 mM	3 mM	4 mM	5 mM	10 mM
Messreihen	Triplets je 200 µl; 100 µl für LDH-Assay und 100 µl für IL-1β-ELISA						

#### 2.2.4.7.3.2 Nigericin

Auch Nigericin kann mittels Porenbildung einen Kaliumausstrom in den Extrazellulärraum herbeiführen. Die Wirkung dieses Mechanismus' auf ARPE-19-Zellen und eine mögliche nachfolgende Inflammation sollte durch die Einwirkung von aufsteigenden Nigericin-Konzentrationen über 3 Stunden untersucht werden.

**Tab. 8:** Messreihen in Triplets mit je 200 µl und aufsteigenden Nigericin-Konzentrationen bei einer Inkubationszeit von 3 h, um gleichzeitig Zytotoxizität und IL-1β-Freisetzung detektieren zu können.

Nigericin über 3 Stunden	0 mM	1 mM	2 mM	3 mM	4 mM	5 mM	10 mM
Messreihen	Triplets je 200 µl; 100 µl für LDH-Assay und 100 µl für IL-1β-ELISA						

#### 2.2.5 Zytotoxizitätsassay

Die Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein permanent im Zytoplasma vorliegendes Enzym. Bei einem Zelltod mit Plasmamembrandesintegration werden zytoplasmatische Enzyme und Stoffe freigesetzt, so auch die LDH. Bei der Nutzung von LDH als Marker ermöglicht das obligate Vorkommen somit eine Quantifizierung der zelltodassoziierten Zellyse. Die Durchführung erfolgte anhand der Bedienungsanleitung des verwendeten *Cytotoxicity Detection Kit* von Roche.

Reagenzien:

- Färbelösung: Iodotetrazolium chloride und sodium lactate
- Katalysator: Diaphorase/ NAD<sup>+</sup> mixture, lyophilisiert, stabilisiert (beide aus *Cytotoxicity Detection Kit*, Roche 11 644 793 001)

Reaktionsmischung:

- 2,5 µl Katalysator/ 96er-Well
- 0,1125 ml Färbelösung/ 96er-Well

Arbeitsschritte

- Neue 96-Well Platte mit 100 µl Überstand der behandelten Zellen befüllen
- 100 µl frisch angesetzte Assay-Reaktionslösung hinzugeben
- Lichtgeschützte Inkubation bei Raumtemperatur für 30 min
- Photometrische Messung bei 490 nm und bei 620 nm als Referenzwellenlänge

Durch die photometrische Messung wurde der Farbumschlag erfasst, welcher bei der Umsetzung des Formalansalzes durch LDH entsteht. Bei dieser Durchführung ist die Intensität der Rotfärbung proportional zur Anzahl der abgestorbenen Zellen, bei denen ein Verlust der Plasmamembran vorliegt.

### 2.2.6 Interleukin-1 $\beta$ -Assay

IL-1 $\beta$  ist ein immunmodulatorisches Zytokin, welches zu den Peptidhormonen zählt. Zur Quantifizierung der Freisetzung des IL-1 $\beta$  wurde das *Human IL-1 $\beta$  ELISA Kit II* von BD OptEIA verwendet. Die Anwendung erfolgte anhand der Bedienungsanleitung:

Reagenzien:

- lyophilisierter Standard
- Detektionsantikörper
- Enzymkonzentrat (250x)
- Enzym-Verdünnungsmittel
- ELISA Verdünnungs-Reagenz
- Wasch-Konzentrat (20x)
- TMB One-Step Substrat-Reagenz
- Stopp-Lösung, aus *Human IL-1 $\beta$  ELISA Kit II*, BD OptEIA

Materialien:

- Antikörper beschichtete Wells



- Abdeckfolie

Arbeitsschritte:

(nach „Human IL-1 $\beta$  ELISA Kit II Instruction Manual“, BD OptEIA)

- Die bei 4 °C gelagerten Reagenzien und die bei -20 °C eingefrorenen Proben müssen auf Raumtemperatur gebracht werden
- Standardpräparation: Verdünnungsreihe von 125 pg/ml auf 1,95 pg/ml
- Waschpuffer herstellen: 25 ml Waschkonzentrat + 475 ml Aqua dest.
- Je 100  $\mu$ l Standard und Proben auf die beschichteten Wells auftragen und 2 h bei Raumtemperatur inkubieren (mit Plattenabdeckung).
- waschen (4-5 Mal) mit mindestens 300  $\mu$ l Waschpuffer pro 96er-Well
- 100  $\mu$ l Detektionsantikörper auf die Wells pipettieren und 1 h inkubieren (mit Plattenabdeckung)
- präparieren der Enzymarbeitsreagenz: 0,5  $\mu$ l Enzymkonzentrat (250x) + 125  $\mu$ l Enzym-Verdünnungsmittel pro verwendetes Well
- erneutes Waschen (4-5 Mal) mit mindestens 300  $\mu$ l Waschpuffer
- hinzufügen von 100  $\mu$ l Enzymarbeitsreagenz pro Well und Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur (mit Plattenabdeckung)
- erneutes Waschen (7 Mal) mit mindestens 300  $\mu$ l Waschpuffer und einer Einwirkzeit von 30-60 s
- hinzugeben von 100  $\mu$ l TMB One-Step Substrat-Reagenz pro Well und Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur und in Dunkelheit (ohne Plattenabdeckung)
- hinzufügen von 50  $\mu$ l Stop-Lösung pro Well
- photometrische Messung der Absorption bei 450 nm und 570 nm innerhalb einer halben Stunde
- Um die so erhobenen Daten auszuwerten, konnte mit den Werten für den lyophilisierten Standard eine Funktion erstellt werden, anhand derer die exakte Menge an IL-1 $\beta$  [pg/ml] der Proben bestimmt werden konnte.

### 2.2.7 Statistische Analyse

Alle LDH-Zytotoxizitätsassays sind in Triplets untersucht worden, während die IL-1 $\beta$ -Assays in allen Experimenten in Doublets durchgeführt wurden. Diese Versuchsgruppengrößen entsprechen den Empfehlungen der jeweiligen Hersteller. Die Ergebnisse werden in dieser Arbeit mit einem Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Mittels zweiseitigem unverbundenen Student-t-Test für unabhängige Variablen sind die statistischen Analysen durchgeführt worden. Gemessene Unterschiede wurden ab  $p < 0,05$  als statistisch signifikant betrachtet. In allen Abbildungen gelten folgende Beschreibungen für die Signifikanzniveaus: ns für nicht signifikant, \* für  $p < 0,05$ , \*\* für  $p < 0,01$  und \*\*\* für  $p < 0,01$ .

### 2.2.8 Fluoreszenzmikroskopie

Für die Dokumentation der Lipofuszinogenese und der LMP nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung wurde die Fluoreszenzmikroskopie verwendet.

Geräte:

Fluoreszenzmikroskop „DM RXE“ von Leica

Arbeitsschritte:

- ARPE-19-Zellen konfluent auf 6-Well-Platten heranzüchten
- POS-Gabe über 7 Tage

oder

- (b) Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 mM für 3 h)
- Färbung mit DAPI

oder

- (b) Färbung mit Acridin-Orange
- fluoreszenzmikroskopische Betrachtung von behandelten Zellen und den Kontrollgruppen unter den zu verwendenden Wellenlängen

**Tab. 9:** In der folgenden Tabelle sind die für die Fluoreszenzmikroskopie benötigten Wellenlängen für die unterschiedlichen Messmethoden eingeteilt.

Struktur	Exzitation	Detektion
Zellkerne (DAPI)	~365 nm Range: 30 nm	~440 nm (blau) Range: 40 nm
Lipofuszin (Autofluoreszenz)	450-490 nm	>505 nm (gelb)
Zellkerne (Acridin-Orange)	~480 nm Range: 18 nm (482)	~525 nm (grün) Range: 59 (532)
Lysosomen (Acridin-Orange)	~460 nm Range: 15 nm (586)	~650 nm (rot) Range: 68 (646)

## 2.2.9 Färbungen

### 2.2.9.1 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)-Färbung

DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der spezifisch an DNA bindet und in einem blauen Farbton fluoresziert.

Reagenzien:

- DAPI
- Immumount

Arbeitsschritte:

- eisgekühltes Methanol zur Fixierung (-80°C)
- 10 min bei -20 °C fixieren
- Methanol abnehmen
- DAPI mit DPBS mischen (1:1000) und auftragen
- 30 min bei 37 °C inkubieren
- alles abnehmen
- mit DPBS waschen
- Immumount auftropfen
- Deckgläschen auflegen

- 30 min bei 4 °C inkubieren
- Fluoreszenzmikroskopie

### **2.2.9.2 Acridin-Orange-Färbung**

Acridin-Orange ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der mit DNA interkalieren kann. Bei neutralem pH-Wert (z.B. im Zytoplasma oder im defekten Lysosom) fluoresziert es grün, bei saurem pH-Wert (z.B. im intakten Lysosom) dagegen rot.

Reagenzien

- Acridin-Orangelösung (1 mg/ml)
- Immumount

Arbeitsschritte:

- Medium von den Zellen abnehmen und bis zur Mikroskopie auf Eis
- Zellen mit PBS (4 °C) waschen
- Färbelösung 1:100 verdünnen (10 µg/ml) und auf die Zellen geben
- 30 min lichtgeschützte Inkubation auf dem Horizontalschüttler
- zweimalig 15 min mit PBS (4 °C) auf dem Horizontalschüttler waschen
- Immumount dazugeben
- 10 min bei 4 °C inkubieren
- Fluoreszenzmikroskopie

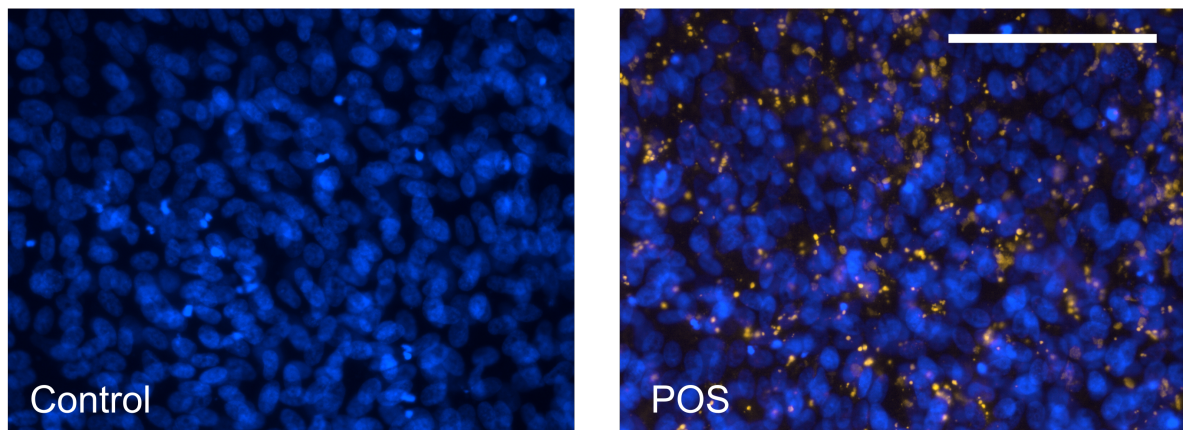
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Inflammasomaktivierung durch photooxidative Schädigung

##### 3.1.1 Zellkulturmodell zur Lipofuszin-Akkumulation

ARPE-19-Zellen wurden über 7 Tage täglich mit HNE-POS (4 ng/ml) versetzt, um eine Akkumulation von Lipofuszin-ähnlichem Material in den Zellen zu erreichen. Als Kontrolle dienten ARPE-19-Zellen, die über eine Woche mit täglich gewechseltem Standardmedium ohne HNE-POS kultiviert wurden. Um die Ablagerung des autofluoreszenten Lipofuszin-ähnlichen Materials zu detektieren, wurden die Zellen nach 7 Tagen Inkubationszeitraum mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht und dafür zusätzlich mit DAPI gefärbt (Abb. 8).

Die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie zeigten eine deutliche Akkumulation von gelblich fluoreszierenden Ablagerungen von Lipofuszin-ähnlichem Material bei der mit HNE-POS versetzten Zellreihe. In der Kontrollgruppe hingegen wurde eine solche Akkumulation nicht beobachtet.

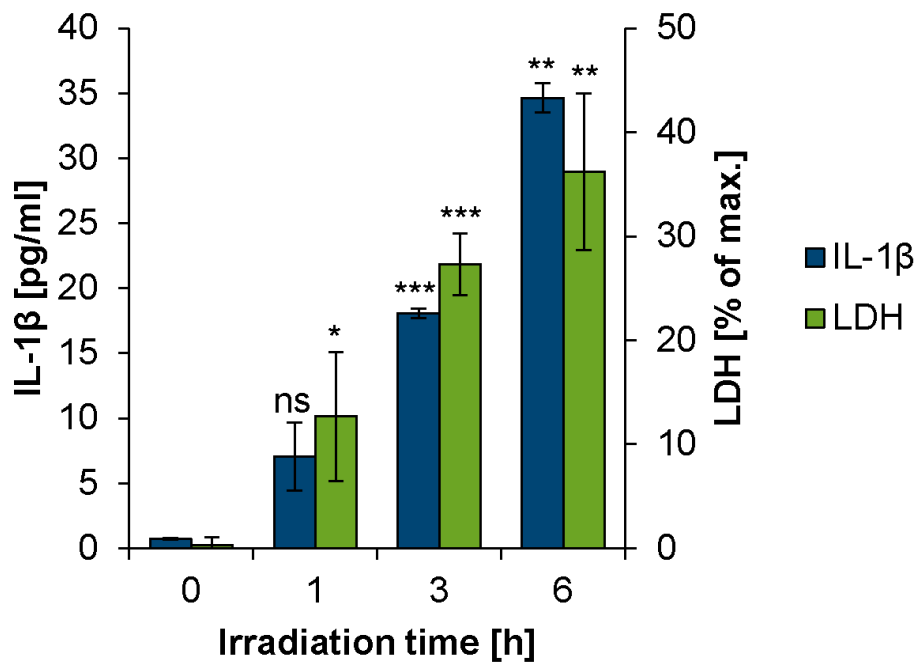


**Abb. 8:** Vergleich unbehandelter ARPE-19-Zellen (Control) mit ARPE-19-Zellen, die über 7 Tage mit einem Nährmedium versetzt wurden, welches isolierte und mit HNE-POS versetzte bovine POS enthielt (POS). DAPI- Färbung. Fluoreszenzmikroskopie (GFP- Filterset: Exzitation: 450-490 nm, Detektion: >505 nm). Vergrößerung: 400fach. Maßstab: 100  $\mu$ m

### 3.1.2 Effekt der Bestrahlungszeit auf die Inflammasomaktivierung

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die ARPE-19-Zellen nach 7 Tagen POS-Inkubation Lipofuszin-ähnliches Material akkumulierten, wurden sie während der letzten 24 h der 7-tägigen POS-Inkubation zusätzlich mit IL-1 $\alpha$  inkubiert. Dieser Schritt ist notwendig, um ein Priming des Inflammasoms zu erreichen und um durch ein zweites Signal das NLRP3-Inflammasom aktivieren zu können. Nun wurden die Zellen nach dem Priming für unterschiedliche Zeiten mit Blaulicht in einer dominanten Wellenlänge von 448 nm bestrahlt, was in diesem Modell das Aktivierungssignal für das NLRP3-Inflammasom darstellte. Nach der Bestrahlung wurden die Zellüberstände im Folgenden verwendet, um parallel LDH- und IL-1 $\beta$ -Freisetzung zu quantifizieren (Abb. 9).

In den Messungen zeigte sich eine signifikant erhöhte IL-1 $\beta$ -Freisetzung ab einer Bestrahlungsdauer von drei Stunden. Eine LDH-Freisetzung als Marker für die pyroptotische Zellyse war bereits nach einer Stunde Bestrahlungsdauer signifikant messbar. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass eine IL-1 $\beta$ -Freisetzung in Assoziation mit einer Zellyse auftrat. Sowohl die Höhe der IL-1 $\beta$ -Freisetzung als auch die LDH-Freisetzung korrelierten in diesem Modell mit der Bestrahlungsdauer. Zusammenfassend deuten die erhobenen Ergebnisse auf ein *terminal release* als vorherrschenden Freisetzungsmechanismus für IL-1 $\beta$  in dem hier verwendeten Zellkulturmodell hin, bei dem die IL-1 $\beta$ -Freisetzung als Folge der pyroptotischen Zellyse nach Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms angesehen wird (Lopez-Castejon and Brough, 2011).



**Abb. 9:** ARPE-19-Zellen mit akkumuliertem Lipofuszin-ähnlichem Material wurden über verschiedene Zeiten mit Blaulicht bestrahlt. Im Anschluss wurden LDH- und IL-1 $\beta$ -Freisetzung in den Überständen gemessen. LDH: jeweils n = 3, IL-1 $\beta$ : jeweils n = 2. Die Signifikanzniveaus verglichen mit der unbehandelten Kontrolle entsprechen nicht signifikant (ns),  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0,05$  (\*\*) und  $p < 0,001$  (\*\*\*).

## 3.2 Inflammasomaktivierung durch lysosomale Membranpermeabilisation

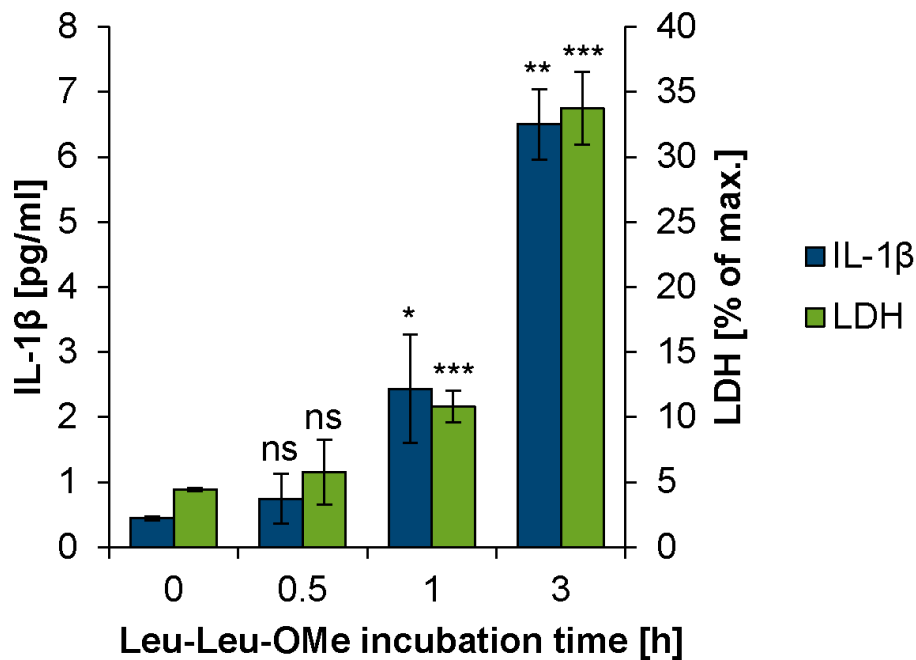
### 3.2.1 Zellkulturmodell in ARPE-19-Zelllinie

Dieses Zellkulturmodell beinhaltet die chemische Induktion einer LMP durch Leu-Leu-OMe. Um die Auswirkungen dieses Stressors zu untersuchen, wurden ARPE-19-Zellen verwendet.

Zum einen sollte der Effekt von aufsteigenden Dosierungen von Leu-Leu-OMe über einen festgelegten Zeitraum untersucht werden. Zum anderen sollte bei einer festgelegten Konzentration von Leu-Leu-OMe die Auswirkung von diversen Inkubationszeiten geprüft werden. Dabei sollten die Effekte verschiedener Inkubationszeiten und Konzentrationen auf die IL-1 $\beta$ -Freisetzung gemessen werden.

### 3.2.1.1 Effekt der Konzentration von Leu-Leu-OMe auf die Inflammasomaktivierung

Eine LMP wurde durch aufsteigende Inkubationszeiten bei einer konstanten Konzentration von 1 mM Leu-Leu-OMe induziert (Abb. 10). Der Überstand wurde verwendet, um die enthaltenen Mengen von LDH und IL-1 $\beta$  zu bestimmen. Die ausschließlich simultane Freisetzung von IL-1 $\beta$  mit LDH deutet darauf hin, dass auch in diesem Zellkulturmodell eine IL-1 $\beta$ -Freisetzung in Assoziation mit einer Zelllyse erfolgte. Dies deutet darauf hin, dass hier ebenfalls das *terminal release* als Freisetzungsmechanismus dominierte. Außerdem kann beobachtet werden, dass auch die Dauer, über die man den Stressor auf die ARPE-19-Zellen einwirken lässt, zu einer Steigerung der LDH- und IL-1 $\beta$ -Messwerte führte.



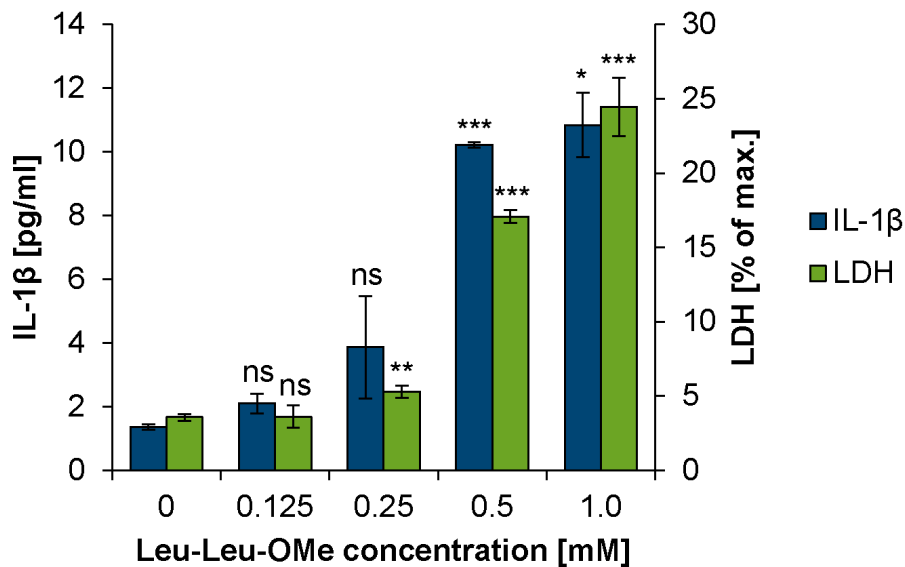
**Abb. 10:** ARPE-19-Zellen wurden mit einer Konzentration von 1 mM Leu-Leu-OMe über verschiedene Zeiten inkubiert. Im Anschluss wurden LDH- und IL-1 $\beta$ -Freisetzung gemessen. LDH: jeweils n = 3, IL-1 $\beta$ : jeweils n = 2. Die Signifikanzniveaus verglichen mit der unbehandelten Kontrolle entsprechen nicht signifikant (ns), p < 0.05 (\*), p < 0,05 (\*\*), und p < 0,001 (\*\*\*).



### 3.2.1.2 Effekt der Inkubationsdauer mit Leu-Leu-OMe auf die Inflammasomaktivierung

ARPE-19-Zellen wurden mit fünf verschiedenen Konzentrationen von Leu-Leu-OMe über ein festgelegtes Intervall von drei Stunden inkubiert, nachdem durch IL-1 $\alpha$  das Primingsignal für das NLRP3-Inflammasom gesetzt worden war (Abb. 11).

Die simultanen Messungen von IL-1 $\beta$  und LDH veranschaulichen, dass bei diesem Versuchsansatz eine signifikant erhöhte IL-1 $\beta$ -Freisetzung nur mit gleichzeitiger LDH-Freisetzung auftrat, wobei die Freisetzung von IL-1 $\beta$  ab einer Konzentration von 0,5 mM Leu-Leu-OMe signifikant erhöht war. Sowohl LDH- als auch IL-1 $\beta$ -Freisetzung zeigten einen Anstieg mit steigender Dosis des verwendeten Stressors. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass unter den verwendeten Bedingungen das *terminal release* der vorherrschende Freisetzungsmechanismus von IL-1 $\beta$  war.



**Abb. 11:** ARPE-19-Zellen wurden über drei Stunden mit aufsteigenden Konzentrationen von Leu-Leu-OMe inkubiert. Im Anschluss wurden LDH- und IL-1 $\beta$ -Freisetzung gemessen. LDH: jeweils n = 3, IL-1 $\beta$ : jeweils n = 2. Die Signifikanzniveaus verglichen mit der unbehandelten Kontrolle entsprechen nicht signifikant (ns), p<0.05 (\*), p<0,05 (\*\*), und p<0,001 (\*\*\*)

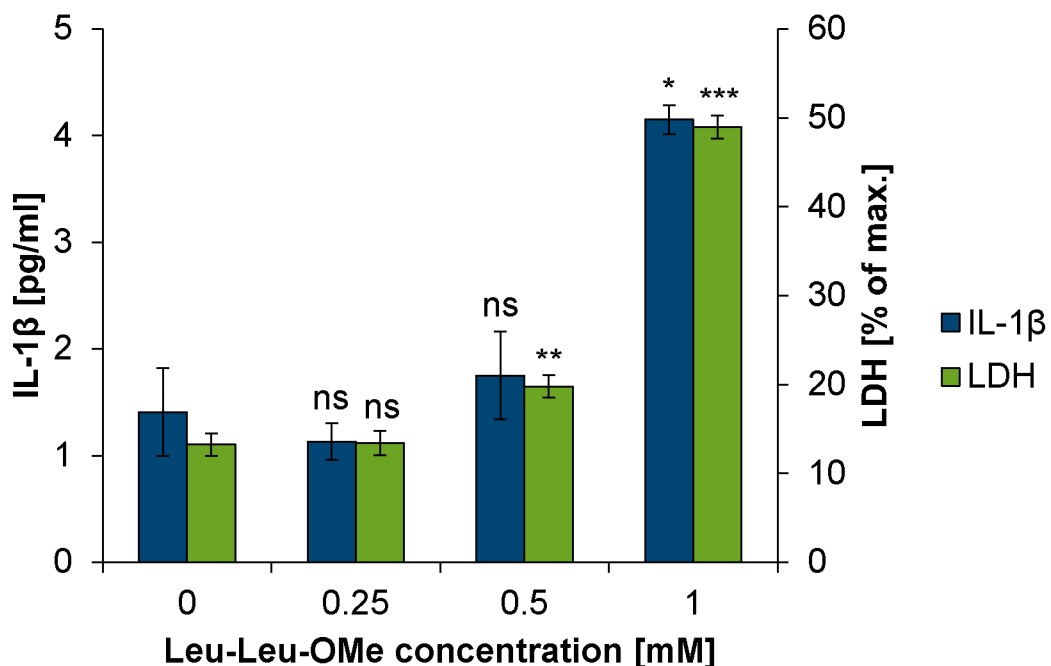
### 3.2.2 Zellkulturmodell in humanen primären RPE-Zellen

Um die an ARPE-19-Zellen untersuchten Mechanismen zu bestätigen, wurden die oben beschriebenen Zellkulturmodelle zur LMP-Induktion auch an humanen pRPE-Zellen angewandt. Die pRPE-Zellen wurden für diese Validierung angewandt, weil deren Eigenschaften denen der RPE-Zellen *in vivo* sehr nahestehen.

#### 3.2.2.1 Effekt der Konzentration von Leu-Leu-OMe auf die Inflammation

Um zu zeigen, wie die pRPE-Zellen auf Leu-Leu-OMe und die durch diesen chemischen Stressor induzierte LMP reagieren, wurden hier ebenfalls verschiedene Konzentrationen von Leu-Leu-OMe für 3 h zu den Zellen dazugegeben (Abb. 12).

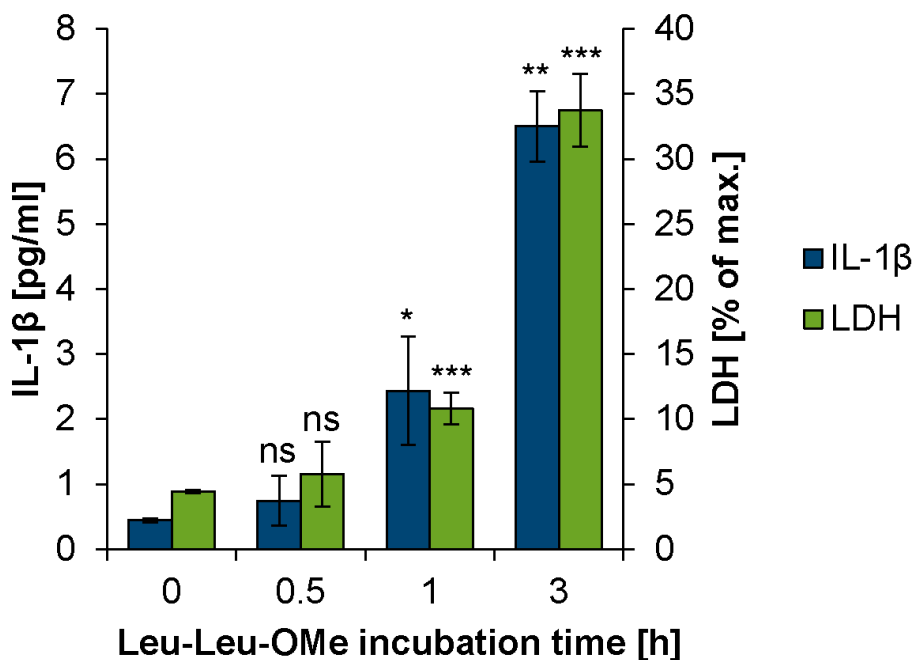
In der Quantifizierung der LDH- und IL-1 $\beta$ -Freisetzung zeigte sich eine dosisabhängige Steigerung der Messwerte. Da IL-1 $\beta$  nur zusammen mit LDH im Überstand zu finden war, erscheint das *terminal release* als wahrscheinlichster Freisetzungsmechanismus.



**Abb. 12:** pRPE-Zellen wurden über drei Stunden mit aufsteigenden Konzentrationen von Leu-Leu-OMe inkubiert. Im Anschluss wurden LDH- und IL-1 $\beta$ -Freisetzung gemessen. LDH: jeweils n = 3, IL-1 $\beta$ : jeweils n = 2. Die Signifikanzniveaus verglichen mit der unbehandelten Kontrolle entsprechen nicht signifikant (ns), p<0.05 (\*), p<0,05 (\*\*), und p<0,001 (\*\*\*).

### 3.2.2.2 Effekt der Inkubationsdauer mit Leu-Leu-OMe auf die Inflammasomaktivierung

Die Inkubation mit 1 mM Leu-Leu-OMe wurde auch bei den pRPE-Zellen über diverse Inkubationszeiten vorgenommen (Abb. 13). Unter diesen Versuchsbedingungen zeigten sich ähnliche Ergebnisse wie bei dem Versuchsaufbau mit ARPE-19-Zellen. Eine von den Inkubationszeiten abhängige NLRP3-Inflammasomaktivierung mit konsekutiver IL-1 $\beta$ -Freisetzung nach dem Mechanismus des *terminal release* muss als vorherrschender Mechanismus in Betracht gezogen werden.



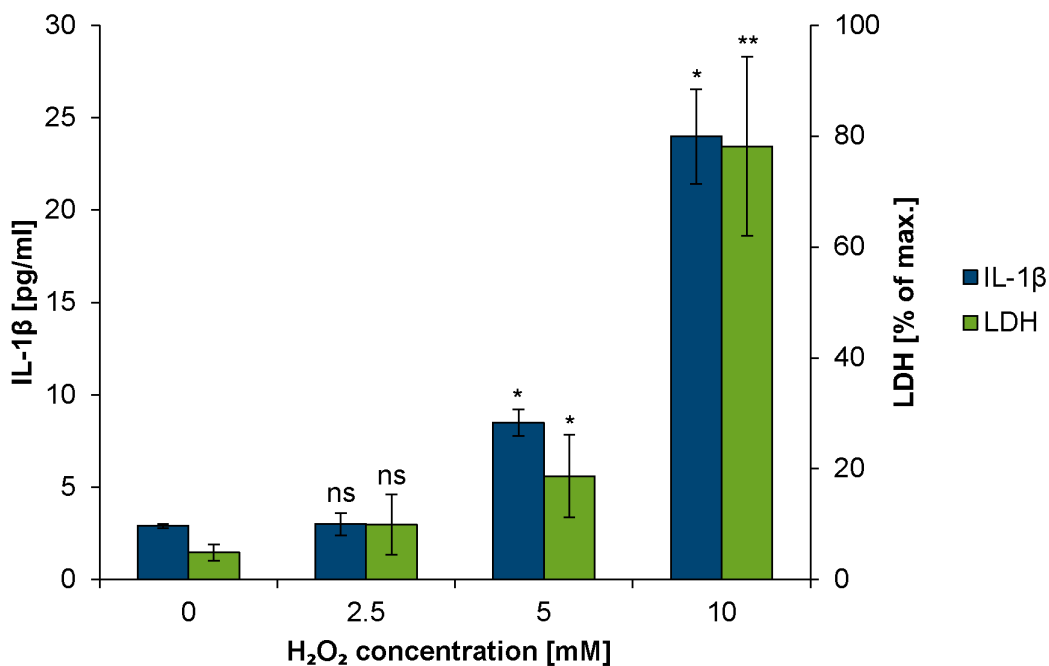
**Abb. 13:** pRPE-Zellen wurden mit einer Konzentration von 1 mM Leu-Leu-OMe über verschiedene Zeiten inkubiert. Im Anschluss wurden LDH- und IL-1 $\beta$ -Freisetzung gemessen. LDH: jeweils n = 3, IL-1 $\beta$ : jeweils n = 2. Die Signifikanzniveaus verglichen mit der unbehandelten Kontrolle entsprechen nicht signifikant (ns), p < 0.05 (\*), p < 0,05 (\*\*), und p < 0,001 (\*\*\*).

### 3.3 Inflammasomaktivierung durch oxidative Schädigung

In einem weiteren Zellkulturmodell wurde geprüft, ob durch oxidativen Stress eine NLRP3-Inflammasomaktivierung bei mit IL-1 $\alpha$  geprimten ARPE-19-Zellen herbeigeführt werden kann. Als oxidativer Stressor wurde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verwendet, das in wässriger Lösung reaktive Sauerstoffradikale ausbildet (Abb. 14).

### 3.3.1 Effekt der Konzentration von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf die Inflammasomaktivierung

Der oxidative Stress wurde während einer dreistündigen Inkubation der mit IL-1 $\alpha$  geprimten ARPE-19-Zellen durch verschiedene Konzentrationen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> herbeigeführt. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Aktivator in aufsteigenden Dosierungen über 3 h bewirkte in zuvor mit IL-1 $\alpha$  geprimten ARPE-19-Zellen eine IL-1 $\beta$ -Freisetzung in Kombination mit einer LDH-Ausschüttung, was auf ein *terminal release* als Freisetzungsmechanismus hindeutet (Abb. 14).

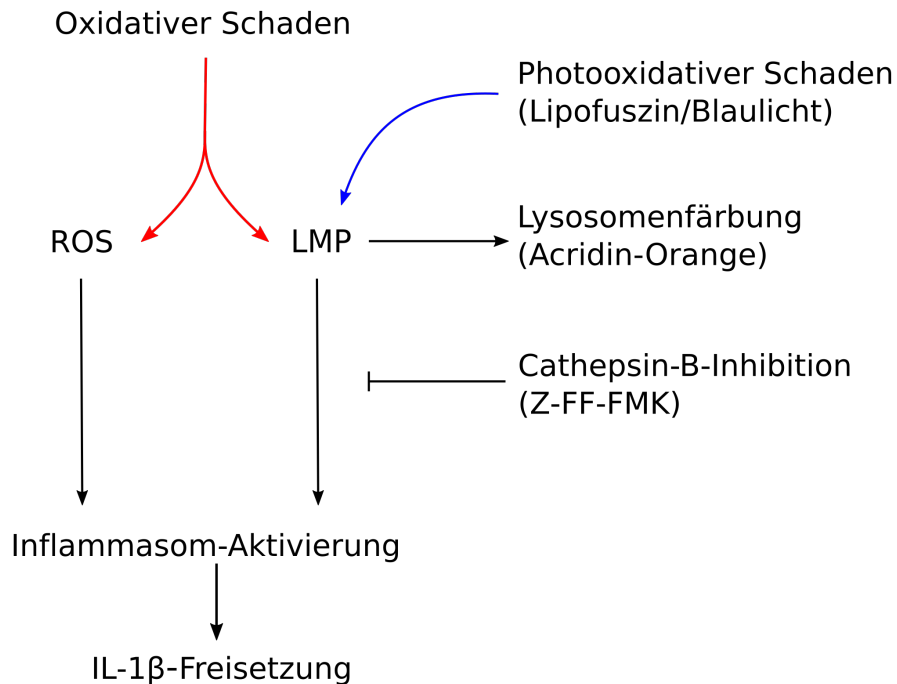


**Abb. 14:** ARPE-19-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> über 3 h behandelt und zeigten in der anschließenden Messung von IL-1 $\beta$  und LDH eine Freisetzung des Zytokins, die an den Zelltod gekoppelt war. LDH: jeweils n = 3, IL-1 $\beta$ : jeweils n = 2. Die Signifikanzniveaus verglichen mit der unbehandelten Kontrolle entsprechen nicht signifikant (ns), p<0.05 (\*), p<0,05 (\*\*), und p<0,001 (\*\*\*).

### 3.3.2 Charakterisierung der Mechanismen der Inflammasomaktivierung durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Oxidativer Stress kann sowohl direkt über die ROS das Inflammasom aktivieren, als auch über eine oxidative Schädigung der lysosomalen Membran eine LMP induzieren, die wiederum zu einer Inflammasomaktivierung führen kann (Abb. 15). Um zu analysieren, ob die durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzierte Inflammasomaktivierung in RPE-Zellen vorrangig durch eine

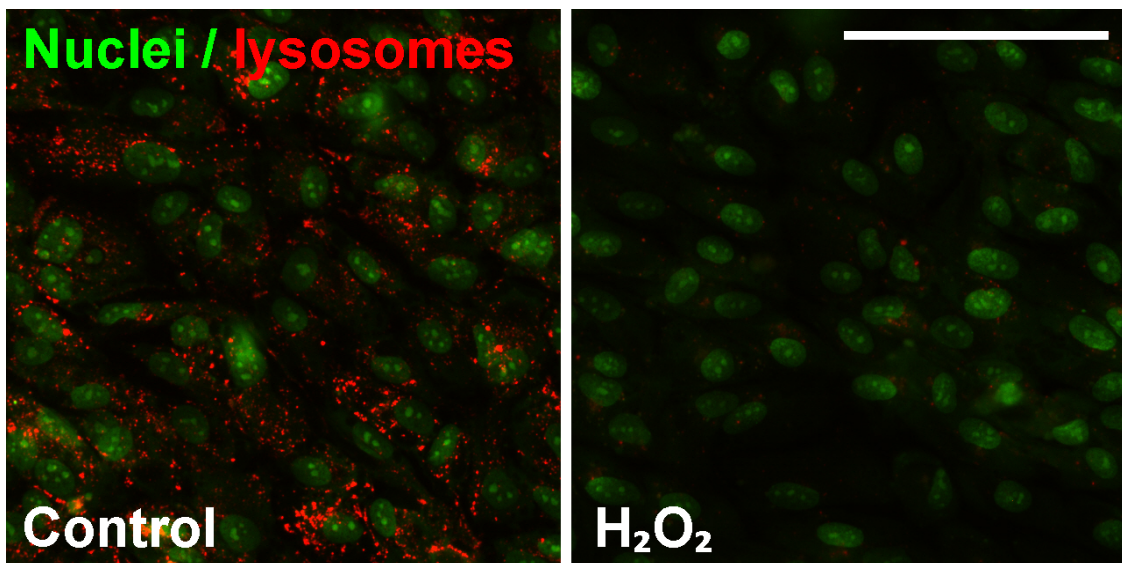
induzierte LMP oder durch die ROS selbst verursacht ist, wurden die Acridin-Orange-Färbung und die Cathepsin-B-Hemmung angewandt.



**Abb. 15:** Hypothese zu den möglichen Mechanismen der Inflammasonaktivierung durch oxidativen Schaden.

### 3.3.2.1 Lysosomale Membranpermeabilisierung

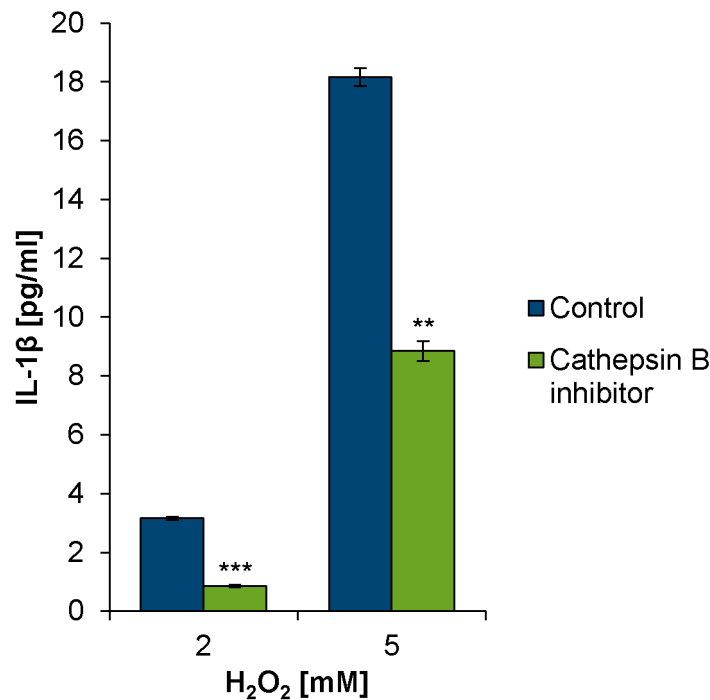
Um eine mögliche LMP nach einer  $H_2O_2$ -Behandlung zu detektieren, wurden die Zellen nach der Behandlung mit Acridin-Orange gefärbt (Abb. 16). Intakte lysosomale Strukturen lassen sich mit dieser Färbung aufgrund ihres sauren pH-Wertes rot fluoreszierend darstellen, während Strukturen mit neutralem pH-Wert, wie Zytoplasma oder geschädigte Lysosomen, grün fluoreszieren. Der in diesem Modell detektierte Verlust der roten lysosomalen Färbung im Vergleich mit der Kontrollgruppe spricht dafür, dass die lysosomalen Membranen durch  $H_2O_2$  geschädigt wurden.



**Abb. 16:** Nach Inkubation der Zellen mit 5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  über 3 h konnte ein deutlich sichtbarer Verlust der lysosomalen Färbung im Vergleich mit der Kontrolle detektiert werden. Acridin-Orange-Färbung. Fluoreszenzmikroskopie (Exzitation 460-480 nm; Detektion: 525-650 nm). Vergrößerung: 400fach. Der Maßstab beträgt 50  $\mu\text{m}$ .

### 3.3.2.2 Beteiligung von Cathepsin-B

Cathepsin B ist ein lysosomales Enzym, welches bei der LMP aus dem Lysosom ins Zytosol freigesetzt wird und dort zu einer Inflammasomaktivierung führen kann. Der Cathepsin-B-Inhibitor CA-074Me wurde in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  eine Stunde vor und während der dreistündigen Behandlung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  verwendet. Diese zusätzliche Inkubation verringerte die IL-1 $\beta$ -Freisetzung signifikant (Abb. 17). Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass eine LMP an der Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms beteiligt ist. Da jedoch trotz Cathepsin-B-Inhibition weiterhin IL-1 $\beta$  freigesetzt wurde, ist die LMP nicht der einzige Signalweg, der zur Zytokinfreisetzung führt. Im Umkehrschluss kann man annehmen, dass eine Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms auch über weitere Signalwege, wie zum Beispiel die Bildung von ROS, stattfindet.

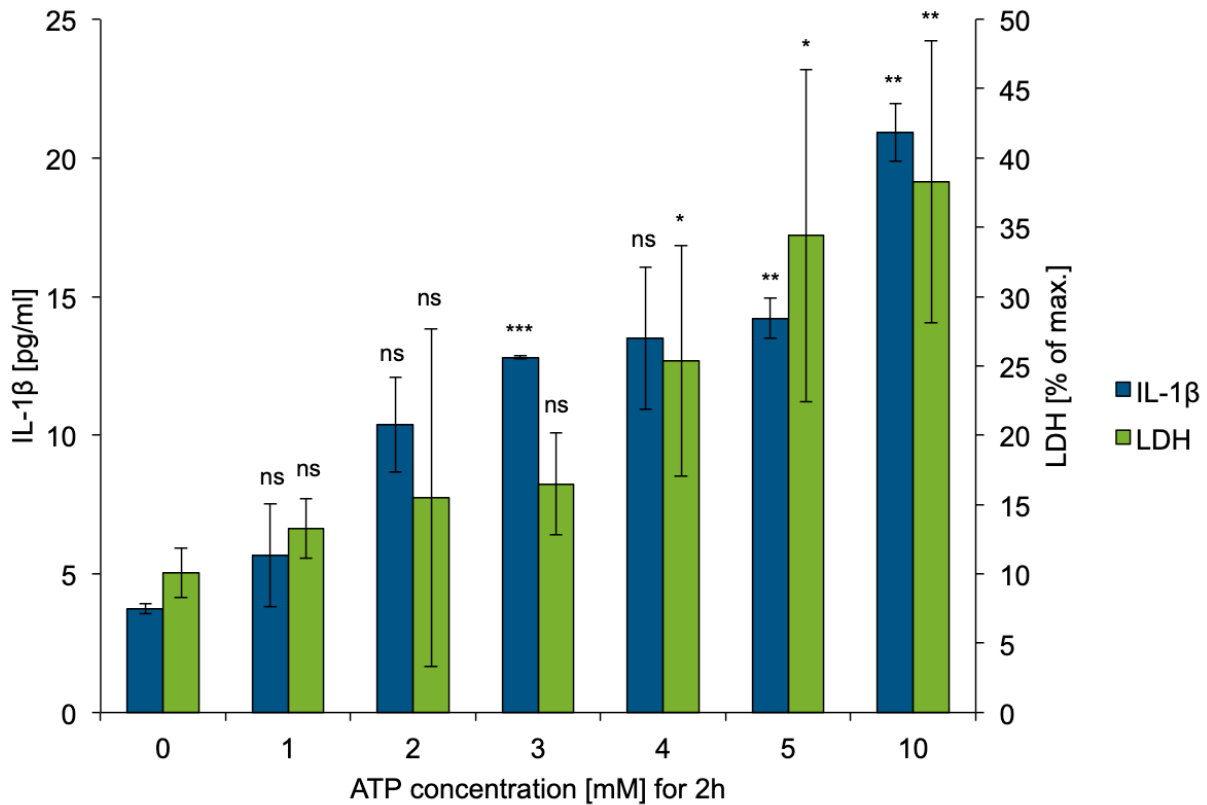


**Abb. 17:** Die zusätzliche Inkubation mit einem Cathepsin-B-Inhibitor (CA-074Me) verringerte die IL-1 $\beta$ -Freisetzung. Die Cathepsin-B-Inhibition ermöglichte zwar eine Senkung der IL-1 $\beta$ -Freisetzung, unterdrückte diese jedoch nicht vollständig. Control: jeweils n = 2, Cathepsin B inhibitor: jeweils n = 2. Die Signifikanzniveaus verglichen mit der unbehandelten Kontrolle entsprechen nicht signifikant (ns), p<0.05 (\*), p<0,05 (\*\*), und p<0,001 (\*\*\*)

### 3.4 Inflammasomaktivierung über P2X7-Signalweg

#### 3.4.1 Effekt der Konzentration von ATP auf die Inflammasomaktivierung

ATP bewirkt über die Aktivierung des P2X7-Rezeptors einen Ausstrom von monovalenten Kaliumionen aus den RPE-Zellen. Durch diese Reduktion des Ruhemembranpotentials der Zellen kann eine NLRP3-Inflammasomaktivierung bei Zellen, die zuvor ein Priming-Signal erhalten haben, induziert werden (Perregaux and Gabel, 1994a).



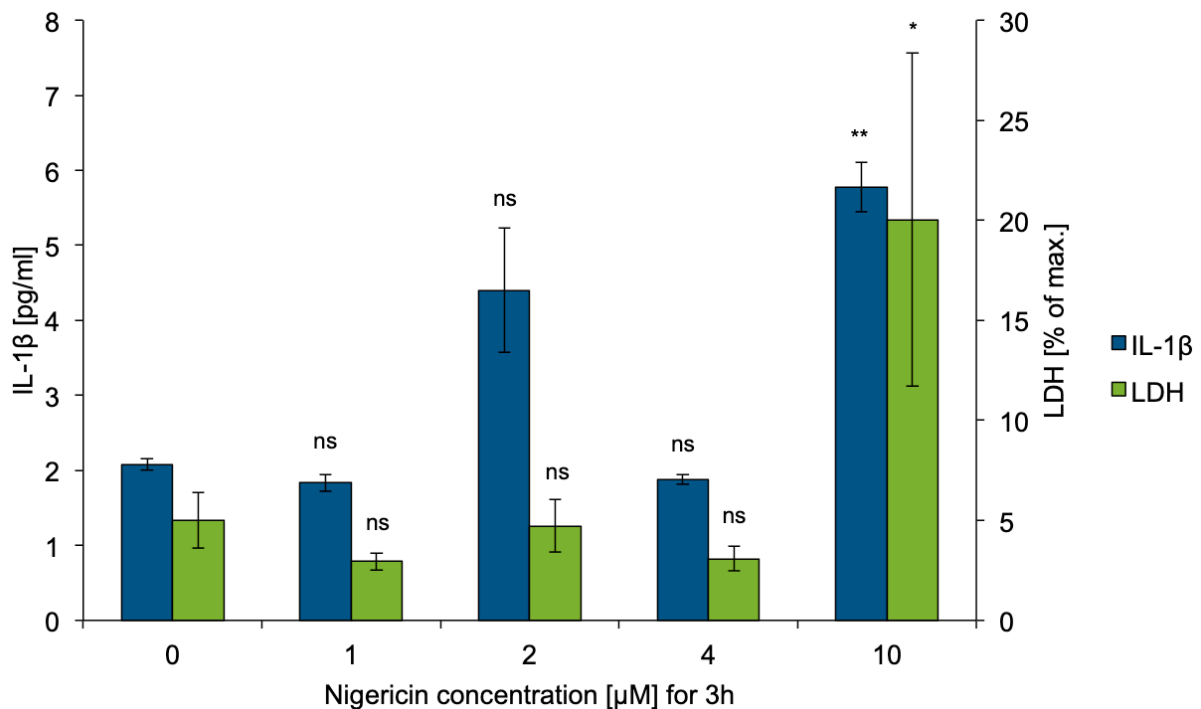
**Abb. 18:** ARPE-19-Zellen wurden für zwei Stunden mit verschiedenen Konzentrationen ATP versetzt und simultan wurde die Freisetzung von IL-1 $\beta$  und LDH gemessen. LDH: jeweils  $n = 3$ , IL-1 $\beta$ : jeweils  $n = 2$ . Die Signifikanzniveaus verglichen mit der unbehandelten Kontrolle entsprechen nicht signifikant (ns),  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) und  $p < 0.001$  (\*\*\*).

Um den Effekt des P2X7-Signalwegs auf die Inflammation in ARPE-19-Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen mit ansteigenden Konzentrationen von ATP inkubiert. Ein Beispielergebnis ist dargestellt und zeigt eine signifikante IL-1 $\beta$ -Freisetzung bei einer Konzentration von 3 mM ATP nach zweistündiger Inkubation (Abb. 18). Allerdings stellte sich dieses Zellkulturmodell der ATP-induzierten Inflammation als sehr inkonsistent dar und lieferte trotz wiederholter Durchführungen nur sehr variable Ergebnisse. Der Grund für diese Variabilität konnte nicht gefunden werden. Aufgrund dessen können die Ergebnisse dieses Versuchs nicht als gesichert gelten, und erlauben keine validierte Aussage über den vorherrschenden Freisetzungsmechanismus von IL-1 $\beta$  nach NLRP3-Inflammation durch P2X7-Rezeptoraktivierung.



### 3.4.2 Effekt der Konzentration von Nigericin auf die Inflammasomaktivierung

Nigericin wirkt als Ionophore und bedingt bei Zellkontakt unter anderem eine Reduktion der intrazellulären Kaliumionen durch deren Austausch mit Wasserstoffionen (Elinav et al., 2011). Über diese Wirkung kann durch Nigericin eine Inflammasomaktivierung induziert werden. Um eine mögliche NLRP3-Inflammasomaktivierung bei ARPE-19-Zellen durch Nigericin zu untersuchen, wurden die mit IL-1 $\alpha$  geprimten Zellen über drei Stunden verschiedenen Konzentrationen von Nigericin ausgesetzt (Abb. 19).



**Abb. 19:** ARPE-19-Zellen wurden für drei Stunden mit verschiedenen Konzentrationen Nigericin versetzt und simultan wurde die Freisetzung von IL-1 $\beta$  und LDH gemessen. LDH: jeweils n = 3, IL-1 $\beta$ : jeweils n = 2. Die Signifikanzniveaus verglichen mit der unbehandelten Kontrolle entsprechen nicht signifikant (ns), p<0.05 (\*), p<0,05 (\*\*), und p<0,001 (\*\*\*).

Auch in diesem Aktivierungsmodell waren die Ergebnisse sehr variabel und nicht reproduzierbar, ohne dass der Grund dafür gefunden werden konnte. Aufgrund dieser Schwankungen lassen diese Versuche keine Aussage über den Effekt von Nigericin in ARPE-19-Zellen zu.

### 3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

In den durchgeführten Versuchen wurden Dosis, Behandlungs- oder Bestrahlungszeit so lange erhöht, bis eine signifikante IL-1 $\beta$ -Freisetzung gemessen werden konnte. An diesem Umschlagspunkt sollte eruiert werden, ob gleichzeitig auch eine LDH-Freisetzung stattgefunden hatte, oder ob IL-1 $\beta$ -Freisetzung auch ohne LDH-Freisetzung nachweisbar ist. Die LDH-Freisetzung geht auf einen lytischen Zelltod, am ehesten durch Inflammasom-vermittelte Pyroptose, zurück, da hier die Inhaltsstoffe aus dem Zytosol der Zellen in die Umgebungsflüssigkeit ausgeschüttet werden. Vergleicht man die aufgeführten Versuche miteinander, fällt auf, dass in allen Versuchsmodellen eine IL-1 $\beta$ -Freisetzung nur in Kombination mit einer LDH-Freisetzung auftrat. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das untersuchte Zytokin IL-1 $\beta$  vorwiegend und unabhängig vom jeweiligen Aktivierungssignal für das NLRP3-Inflammasom im Rahmen eines *terminal release* freigesetzt wird.

## 4. Diskussion

### 4.1 Freisetzungsmechanismen von IL-1 $\beta$

Da IL-1 $\beta$  keine Signalsequenz besitzt, kann es nicht auf konventionellem Weg in den Extrazellulärraum freigesetzt werden (Rubartelli et al., 1990). Mögliche Wege der Freisetzung sind eine Abknospung von Mikrovesikeln, eine passive Freisetzung im Rahmen eines Zelltodes mit Zelllyse, Caspase-1-abhängige Kanäle oder lysosomale Exozytose (Lopez-Castejon and Brough, 2011).

Bisherige Untersuchungen konnten zeigen, dass sich unterschiedliche Zellarten auch unterschiedlicher Freisetzungsmechanismen bedienen. Auch wird angenommen, dass unterschiedliche Stimuli den Mechanismus der Freisetzung beeinflussen können (Monteleone et al., 2015). Beispielsweise wurde gezeigt, dass mit *Salmonella typhimurium* infizierte Makrophagen IL-1 $\beta$  passiv nach Zellmembrandisintegration freisetzen, während sie nach Stimulation mit LPS und ATP jedoch IL-1 $\beta$  über den Weg der lysosomalen Exozytose in den Extrazellulärraum ausschütten (Andrei et al., 2004; Brennan and Cookson, 2000). In Monozyten, Mikroglia und dendritischen Zellen hingegen scheint die Freisetzung von IL-1 $\beta$  vor allem durch Mikrovesikel-Abknospung stattzufinden (Bianco et al., 2005; MacKenzie et al., 2001; Pizzirani et al., 2007).

In unseren Versuchen wurde das NLRP3-Inflammasom durch verschiedene Stimuli, wie photooxidativen Schaden, chemische LMP oder freie Sauerstoffradikalbildung durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aktiviert. Trotz divergierender Stimuli zeigte sich, dass IL-1 $\beta$  in RPE-Zellen im Rahmen einer Zelllyse freigesetzt wird. Eine aktive Freisetzung von lebenden Zellen konnte dagegen nicht nachgewiesen werden. Die Zelllyse tritt hier nach Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms auf und geht mit der Zelltodform der Pyroptose einher (Brandstetter et al., 2015a). Den Mechanismus der passiven Freisetzung von IL-1 $\beta$  durch Zelllyse mit Zellmembrandisintegration bezeichnet man auch als *terminal release*.

### 4.2 Bedeutung von IL-1 $\beta$ in der AMD

Mehrere klinische Studien belegen eine Aktivität des Inflammasoms im RPE von Patienten, die von AMD betroffen waren (Cao et al., 2016; Tseng et al., 2013; Wang et al., 2016). Auch erhöhte Konzentrationen des Inflammasom-regulierten Zytokins IL-1 $\beta$

wurden im Vergleich mit gesunden und altersgleichen Kontrollaugen im RPE und im Glaskörper betroffener Augen nachgewiesen (Tarallo et al., 2012; Zhao et al., 2015).

Interleukin-1 $\beta$  induziert über den IL-1-Rezeptor eine gesteigerte Synthese seines eigenen Vorläuferproteins pro-IL-1 $\beta$  (Hornung and Latz, 2010; Warner et al., 1987). Durch diesen, sich selbst verstärkenden Mechanismus kommt es zu einer gesteigerten Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms mit folgender IL-1 $\beta$ -Freisetzung, welche diesen Kreislauf erneut anstößt (Brandstetter et al., 2015b). Diese Aktivierungsschleife könnte eine Ursache für eine gesteigerte Immunantwort und die Progression der geographischen Atrophie nach photooxidativem Schaden darstellen (Brandstetter et al., 2015a). Außerdem könnte auch in RPE-Zellen, die nicht direkt einem photooxidativen Schaden ausgesetzt waren, das NLRP3-Inflammasom aktiviert werden, was wiederum zu einem Absterben dieser nicht primär geschädigten Zellpopulation führen könnte. Kongruent dazu zeigen RPE-Zellen, die mit dem Medium von pyroptotischen RPE-Zellen versetzt wurden, eine gesteigerte Toxizität nach photooxidativer Schädigung, die auf eine IL-1-Rezeptor-Aktivierung zurückzuführen ist (Brandstetter et al., 2016).

Ein noch besseres Verständnis der IL-1 $\beta$ -Freisetzungsmechanismen in RPE-Zellen kann dabei helfen die Stadien der geographischen Atrophie einzugrenzen, in denen das NLRP3-Inflammasom zur Progression beiträgt. Dieses Kenntnis ist von großer Bedeutung, um den richtigen Zeitpunkt für eine mögliche Therapie mit NLRP3-Inflammasominhibitoren zu bestimmen, damit die Betroffenen bestmöglich von der Therapie profitieren können.

### **4.3 Methodische Diskussion**

#### **4.3.1 Photooxidative Schädigung durch Blaulicht**

Die Anreicherung von granulären lipofuszinähnlichen Strukturen in ARPE-19 Zellen durch bovine POS ließ sich durch Fluoreszenzmikroskopie nachweisen (Abb. 8). Durch die typischen Charakteristika der intrazellulären Lage, der gelben Autofluoreszenz bei einem Exzitationsspektrum von 450 – 490 nm und der granulären Struktur ähnelt das akkumulierte Material dem Lipofuszin in vivo sehr. Dieses Modell der Lipofuszin-Anreicherung durch von RPE-Zellen phagozytierte POS konnte in unserer Arbeitsgruppe etabliert werden (Krohne et al., 2010). Die Blaulichtbestrahlung in vitro bedingt eine

Lipofuszin-abhängige Entstehung von ROS, eine LMP durch photooxidative Schädigung der lysosomalen Membran und einen konsekutiven Zelltod (Davies et al., 2001; Rózanowska et al., 1995; Schütt et al., 2000; Wihlmark et al., 1997). Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits zeigen, dass in diesem Zuge auch eine Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms stattfindet (Brandstetter et al., 2015b, 2015a; Tarallo et al., 2012; Tseng et al., 2013).

Nach dem durch IL-1 $\alpha$  ausgelösten Priming und nachfolgender Inflammasomaktivierung durch Blaulichtbestrahlung wird in den betroffenen ARPE-19 Zellen die Zelltodform der Pyroptose ausgelöst (Brandstetter et al., 2015b, 2015a). In dieser Arbeit konnte erhoben werden, dass einhergehend mit diesem pyroptotischen Zelltod IL-1 $\beta$  ausschließlich in Kombination mit LDH freigesetzt wurde (Abb. 9). Der vorherrschende Freisetzungsmechanismus von IL-1 $\beta$  nach photooxidativer Schädigung scheint demnach das *terminal release* mit Zellmembrandisintegration zu sein.

#### **4.3.2 Lysosomale Membranpermeabilisierung durch Leu-Leu-OMe**

Die LMP ist ein gut etablierter Mechanismus zur Induktion einer NLRP3-Inflammasomaktivierung in verschiedenen Zelllinien (Stutz et al., 2009). Leu-Leu-OMe ist ein chemischer Induktor einer LMP (Hornung et al., 2008). Bei mit IL-1 $\alpha$  geprimten ARPE-19- und pRPE-Zellen erhöhte eine durch Leu-Leu-OMe induzierte LMP signifikant die Freisetzung von IL-1 $\beta$  und IL-18 (Tseng et al., 2013).

Wir verwendeten dieses Modell, um herauszufinden, ob eine IL-1 $\beta$ -Freisetzung in RPE-Zellen auch bei einer rein chemisch induzierten LMP ausschließlich in Kombination mit einer LDH-Freisetzung auftritt. Reproduzierbare Ergebnisse zeigten in ARPE-19 und pRPE-Zellen, dass nach einer LMP durch Leu-Leu-OMe IL-1 $\beta$  wie nach photooxidativer Schädigung nur gemeinsam mit LDH freigesetzt wird. Davon kann abgeleitet werden, dass die pyroptotische Zelllyse den vorherrschenden Mechanismus für die IL-1 $\beta$ -Freisetzung darstellt.

#### **4.3.3 Oxidative Schädigung durch Wasserstoffperoxid**

ROS fallen im RPE in hohem Maße an und besitzen das Potential diese Zellen zu schädigen (Tate et al., 1995). Eine Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms durch oxidativen

Stress ist bereits hinreichend belegt und auch  $H_2O_2$  wies bei ARPE-19-Zellen diesen Effekt auf (Wang et al., 2013).

Um den zellulären Mechanismus genauer zu untersuchen, etablierten wir ein Modell, um zwischen einer Inflammasomaktivierung durch ROS allein oder durch eine ROS-induzierte LMP zu differenzieren (Muñoz-Planillo et al., 2013b). Durch Hemmung des lysosomalen Enzyms Cathepsin B und Lysosomenfärbung mittels Acridin-Orange konnten wir zeigen, dass die Inflammasomaktivierung durch  $H_2O_2$  zumindest teilweise durch eine LMP vermittelt ist.

#### **4.3.4 P2X7-Rezeptoraktivierung durch ATP**

Ein weiterer Aktivator für das NLRP3-Inflammasom ist der P2X7-Rezeptor, welcher einen ATP-gesteuerten Ionenkanal darstellt (Arulkumaran et al., 2011; Di Virgilio et al., 2017; Giuliani et al., 2017). Dieser Rezeptor findet sich unter anderem auf RPE-Zellen von Mäusen und Menschen (Guha et al., 2013; Kerur et al., 2013; Yang et al., 2011). Die Aktivierung des P2X7-Rezeptors kann eine Apoptose von Photorezeptoren und RPE-Zellen auslösen (Notomi et al., 2011, 2013; Yang et al., 2011). Außerdem konnte in Glaskörperproben von Patienten mit geographischer Atrophie eine erhöhte ATP-Konzentration gemessen werden, was für eine Beteiligung von ATP an der Pathogenese der Erkrankung sprechen könnte (Notomi et al., 2013). Unsere Arbeitsgruppe konnte kürzlich belegen, dass Benzoyl-benzoyl-ATP (BzATP) in RPE-Zellen die Freisetzung von IL-1 $\beta$  und LDH bewirkt (Wang et al., 2019). Der Effekt von BzATP war verstärkt, wenn ein Zellmedium ohne Calcium und Magnesium verwendet wurde, da divalente Kationen die Funktion des P2X7-Rezeptors reduzieren (Dutot et al., 2008; Guha et al., 2013; Katsnelson et al., 2015; Wang et al., 2019).

In den Untersuchungen dieser Arbeit konnten keine reproduzierbaren Ergebnisse für die IL-1 $\beta$ -Freisetzung nach NLRP3-Inflammasomaktivierung durch ATP erreicht werden. Eine mögliche Fehlerquelle könnte darin liegen, dass zu viele der divalenten Kationen im Medium verblieben sind und somit eine Inhibition des P2X7-Rezeptors stattfand.

### 4.3.5 Nigericin

Für die K<sup>+</sup>-Ionophore Nigericin konnte bereits früh eine Freisetzung von IL-1 $\beta$  in mit LPS stimulierten Makrophagen detektiert werden (Perregaux and Gabel, 1994b; Perregaux et al., 1992). Auch eine Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms durch Nigericin konnte in Makrophagen nachgewiesen werden (Mariathasan et al., 2006; Muñoz-Planillo et al., 2013b).

In dieser Arbeit sollte auch der Effekt von Nigericin auf die Freisetzung von IL-1 $\beta$  in RPE-Zellen untersucht werden. In mehreren Versuchsreihen konnten die Ergebnisse jedoch nicht reproduziert werden. Die Versuche unterlagen großen Schwankungen, was damit zusammenhängen könnte, dass Nigericin zwar einen Kaliumausstrom aus der Zelle bewirkt, in seiner Selektivität jedoch eingeschränkt bleibt und somit auch andere Ionen ausgeschleust werden (Pressman, 1973). Außerdem wurde eine Gegenregulation der Natrium-Kalium-ATPase beschrieben, deren unterschiedlich hohe Aktivität im Zellkulturmodell ebenfalls eine Rolle beim Ansprechen der Zellen auf verschiedene Konzentrationen von Nigericin spielen könnte (Daniele et al., 1978; Segel and Lichtman, 1976).

## 4.4 Klinischer Ausblick

### 4.4.1 Selektive NLRP3-Inhibitoren

Mehrere neue Studien weisen auf eine Beteiligung des NLRP3-Inflammasoms in der Pathogenese der AMD hin (Brandstetter et al., 2015a; Gao et al., 2018). In diesem Zuge kam der Gedanke auf, dass NLRP3-Inflammasominhibitoren auch für die AMD eine mögliche Therapie darstellen könnten. Für die geographische Atrophie als Spätform existieren bislang keine etablierten Therapiemodelle.

Ein bereits ausgiebig getesteter und frei verfügbarer NLRP3-Inhibitor ist die *cytokine release inhibitory drug 3* (CRID3, auch: MCC950), der sowohl in menschlichen Zellen in vitro als auch im Mausmodell eine selektive Blockade des NLRP3-Inflammasoms zeigte (Coll et al., 2015). CRID3 zeigte bei Makrophagen, Mikroglia, dendritischen Zellen und Myeloblasten eine signifikante Abnahme der NLRP3-Inflammasomaktivität (Dempsey et al., 2017; Ludwig-Portugall et al., 2016; Nalbandian et al., 2017; Primiano et al., 2016). Auch konnte im Tiermodell eine Reduktion der Symptomschwere bei Multipler Sklerose

detektiert werden (Coll et al., 2015). Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass auch in ARPE-19-Zellen und in humanen pRPE-Zellen eine Verminderung der LDH- und IL-1 $\beta$ -Freisetzung nach Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms durch verschiedene Stimuli auftritt (Wang et al., 2019).

Zwei weitere neu entwickelte NLRP3-Inhibitoren auf Sulfonylurea-Basis stellen die Substanzen IFM-632 und IFM-514 dar (Glick et al., 2017). Für beide Substanzen konnte ein Effekt nach NLRP3-Inflammasomaktivierung in RPE-Zellen nachgewiesen werden (Wang et al., 2019). Auch hier zeigt sich das vielversprechende therapeutische Potenzial der NLRP3-Inflammasominhibitoren, die in der Lage sind das an der AMD-Pathogenese beteiligte NLRP3-Inflammasom und den sich selbst verstärkenden Mechanismus der IL-1 $\beta$ -Induktion zu beeinflussen. Somit könnte der Beginn der GA hinausgezögert oder die weitere Progression aufgehalten werden. Nun sind weitere präklinische und klinische Untersuchungen nötig, um das Potential dieser Therapie für die von der geographischen Atrophie Betroffenen zu evaluieren.

#### **4.4.2 $\beta$ -hydroxybutyrat**

Ein weiterer Inflammasominhibitor ist der Ketonkörper  $\beta$ -Hydroxybutyrat (BHB). In menschlichen Monozyten ist die Substanz in der Lage die IL-1 $\beta$ -Freisetzung zu vermindern, wobei BHB einen Kaliumionenausstrom aus den Zellen unterbindet (Youm et al., 2015). Weitere Studien zeigen eine Inhibition des NLRP3-Inflammasoms in Neutrophilen und im Hippocampus von Ratten (Goldberg et al., 2017; Yamanashi et al., 2017). Erste Untersuchungen veranschaulichen, dass die systemische Applikation von BHB im Mausmodell auch in der Retina eine Reduktion der IL-1 $\beta$ -Freisetzung und zudem verminderte Caspase-1- und NLRP3-Protein-Konzentrationen bewirkt (Trotta et al., 2019). Auch wenn die bisherigen Ergebnisse vielversprechend anmuten, müssen noch weitere Untersuchungen, speziell an RPE-Zellen, erfolgen, um das therapeutische Potenzial von BHB in Bezug auf die GA abschätzen zu können.

#### **4.4.3 IL-1 $\beta$ -Inhibitoren**

Aufgrund der Bedeutung von IL-1 $\beta$  in der Pathogenese der AMD könnte auch die Inhibition dieses Zytokins einen möglichen therapeutischen Ansatz darstellen, um die



Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms zu unterbrechen. Mögliche einsetzbare Substanzen wären hier Canakinumab als monoklonaler und selektiver IL-1 $\beta$ -Antikörper oder der IL-1-Rezeptor-Antagonist Anakinra. Diese Medikamente erwiesen sich in klinischen Studien bereits als effektiv in der Behandlung einer Morbus Behcet-assoziierten Uveitis (Cantarini et al., 2015; Emmi et al., 2016; Ugurlu et al., 2012; Vitale et al., 2014). Eventuell könnten von dieser Therapie auch von der AMD Betroffene profitieren. Geeignete Untersuchungen hierzu fehlen derzeit jedoch noch.

#### **4.4.4 Punicalagin als Membranstabilisator**

Im Rahmen des *terminal release* als Freisetzungsmechanismus für IL-1 $\beta$  in RPE-Zellen scheint eine Destabilisierung der Zellmembran von Bedeutung zu sein. Dieser Umstand konnte auch für den in Makrophagen vorherrschenden Freisetzungsmechanismus belegt werden (Shirasaki et al., 2015). Für Punicalagin, ein im Granatapfel enthaltener Gerbstoff, konnte unter anderem ein antiinflammatorischer und antioxidativer Effekt nachgewiesen werden (BenSaad et al., 2017; Chen et al., 2012). Durch Einsatz von Punicalagin konnte in Makrophagen die Freisetzung von IL-1 $\beta$  und LDH herabgesetzt werden. Dieser Effekt könnte auf die membranstabilisierenden Eigenschaften von Punicalagin zurückzuführen sein (Martín-Sánchez et al., 2016). Weitere Untersuchungen sind notwendig, um auch in RPE-Zellen einen möglichen Effekt von Punicalagin nachzuweisen und somit eine andere Strategie zur Verhinderung von IL-1 $\beta$ -Freisetzung und RPE-Zelltod zu erproben.

## 5. Zusammenfassung

Die altersabhängige Makuladegeneration (AMD) ist die häufigste Erblindungsursache in allen Industrieländern. Bei der geographischen Atrophie, einer der beiden Spätformen der Erkrankung, steht der fortschreitende Untergang des retinalen Pigmentepithels (RPE) im Vordergrund. Bisher existiert keine wirksame Therapie für die geographischen Atrophie. Um Therapieansätze entwickeln zu können, ist es notwendig, die molekularen Mechanismen zu verstehen, die an der Pathogenese der AMD beteiligt sind. Neuere Studien weisen auf eine Rolle des NLRP3-Inflammasoms im RPE in der AMD-Pathogenese hin. Die Inflammasomaktivierung führt zu einer Freisetzung des inflammatorischen Zytokins IL-1 $\beta$ . IL-1 $\beta$  besitzt keine Signalsequenz und wird daher nicht konventionell über den Golgi-Apparat und das ER freigesetzt. Mögliche unkonventionelle Freisetzungsmechanismen sind eine passive Freisetzung im Rahmen eines lytischen Zelltodes (*terminal release*), eine Abknospung von Mikrovesikeln, Caspase-1-abhängige Kanäle oder lysosomale Exozytose. In dieser Arbeit wurden die Mechanismen der Freisetzung von IL-1 $\beta$  in RPE-Zellen untersucht.

In verschiedenen Modellen der Aktivierung des NLRP-3-Inflammasoms, einschließlich der chemisch induzierten lysosomalen Membranpermeabilisierung (Leu-Leu-OMe), der Lipofuszin-vermittelten photooxidativen Schädigung und der oxidativen Schädigung (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), wurde eine Freisetzung von IL-1 $\beta$  ausschließlich in Assoziation mit einer Zelllyse beobachtet. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass IL-1 $\beta$  in RPE-Zellen, unabhängig vom zugrundeliegenden Aktivierungsmechanismus des Inflammasoms, vorwiegend durch *terminal release* ausgeschüttet wird. In Bezug auf die Inflammasomaktivierung durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konnte zudem festgestellt werden, dass eine lysosomale Membranpermeabilisierung und eine zytosolische Cathepsin-B-Freisetzung beteiligt sind. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Inflammasomaktivierung und IL-1 $\beta$ -Freisetzung in humanen RPE-Zellen, unabhängig vom Aktivierungsmechanismus, in vitro immer mit dem Untergang der Zellen assoziiert sind. Inflammasomaktivierung könnte somit vor allem im atrophischen Spätstadium der AMD eine Rolle spielen. Diese Erkenntnisse sind wichtig, um die AMD-Pathogenese besser zu verstehen und um geeignete Krankheitsstadien für die klinische Evaluation von selektiven NLRP3-Inhibitoren als neuen therapeutischen Ansatz für die AMD zu identifizieren.

## 6. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1:** Frühstadium mit Drusen, CNV und GA bei AMD. Bei der CNV kommt es durch Leckage der einsprießenden Gefäße zu Flüssigkeitseinlagerung in die Retina, während die Degeneration von RPE und Photorezeptorzellen bei der GA im Vordergrund steht und sich als hypopigmentierter scharf begrenzter Bereich präsentiert. .... 14
- Abb. 2:** Angepasste Darstellung der Lage des RPEs zwischen Bruch'scher Membran und Photorezeptorzellen. Das RPE verstoffwechselt aufgenommene Produkte der Photorezeptorzellen und versorgt diese mit Sauerstoff und Nährstoffen (Quelle: Macular Disease Foundation Australia; <https://www.mdfoundation.com.au/content/what-happens-macular-degeneration>). 17
- Abb. 3:** Priming Signal. Durch ein Priming-Signal ( $IL-1\alpha$ , C5a, LPS,  $TNF-\alpha$ ) wird durch  $NF-\kappa B$  die Expression von NLRP3 und pro- $IL-1\beta$  gesteigert. .... 22
- Abb. 4:** Aktivierungs-Signal. Durch ein Aktivierungs-Signal (LMP,  $K^+$ -Ausstrom, ROS) wird nach Priming der Zusammenbau des NLRP3-Inflammasoms eingeleitet und mittels Caspase-1 wird pro- $IL-1\beta$  in seine mature, inflammatorisch aktive Form transformiert. .... 24
- Abb. 5:** Mögliche Freisetzungsmechanismen von  $IL-1\beta$ . Nach NLRP3-Inflammasomaktivierung können verschiedene Mechanismen (Pyroptose, Mikrovesikel-Abknospung, Exozytose, Sekretion) zu einer Zytokinfreisetzung führen. .... 28
- Abb. 6:** Formel zur Zellzahlberechnung ..... 39
- Abb. 7:** Gleichgewichtsreaktion von  $H_2O_2$  in  $H_2O$ ..... 42

- Abb. 8:** Vergleich unbehandelter ARPE-19-Zellen (Control) mit ARPE-19-Zellen, die über 7 Tage mit einem Nährmedium versetzt wurden, welches isolierte und mit HNE-POS versetzte bovine POS enthielt (POS). DAPI- Färbung. Fluoreszenzmikroskopie (GFP-Filterset: Exzitation: 450-490 nm, Detektion: >505 nm). Vergrößerung: 400fach. Maßstab: 100 µm .....49
- Abb. 9:** ARPE-19-Zellen mit akkumuliertem Lipofuszin-ähnlichen Material wurden über verschiedene Zeiten mit Blaulicht bestrahlt. Im Anschluss wurden LDH- und IL-1β-Freisetzung in den Überständen gemessen. LDH: jeweils n = 3, IL-1β: jeweils n = 2. Die Signifikanzniveaus verglichen mit der unbehandelten Kontrolle entsprechen nicht signifikant (ns), p<0.05 (\*), p<0,05 (\*\*) und p<0,001 (\*\*\*). .....51
- Abb. 10:** ARPE-19-Zellen wurden mit einer Konzentration von 1 mM Leu-Leu-OMe über verschiedene Zeiten inkubiert. Im Anschluss wurden LDH- und IL-1β-Freisetzung gemessen. LDH: jeweils n = 3, IL-1β: jeweils n = 2. Die Signifikanzniveaus verglichen mit der unbehandelten Kontrolle entsprechen nicht signifikant (ns), p<0.05 (\*), p<0,05 (\*\*) und p<0,001 (\*\*\*). .....52
- Abb. 11:** ARPE-19-Zellen wurden über drei Stunden mit aufsteigenden Konzentrationen von Leu-Leu-OMe inkubiert. Im Anschluss wurden LDH- und IL-1β-Freisetzung gemessen. LDH: jeweils n = 3, IL-1β: jeweils n = 2. Die Signifikanzniveaus verglichen mit der unbehandelten Kontrolle entsprechen nicht signifikant (ns), p<0.05 (\*), p<0,05 (\*\*) und p<0,001 (\*\*\*). .....53
- Abb. 12:** pRPE-Zellen wurden über drei Stunden mit aufsteigenden Konzentrationen von Leu-Leu-OMe inkubiert. Im Anschluss wurden LDH- und IL-1β-Freisetzung gemessen. LDH: jeweils n = 3, IL-1β: jeweils n = 2. Die Signifikanzniveaus verglichen mit der unbehandelten Kontrolle entsprechen nicht signifikant (ns), p<0.05 (\*), p<0,05 (\*\*) und p<0,001 (\*\*\*). .....54
- Abb. 13:** pRPE-Zellen wurden mit einer Konzentration von 1 mM Leu-Leu-OMe über verschiedene Zeiten inkubiert. Im Anschluss wurden LDH- und IL-1β-Freisetzung

gemessen. LDH: jeweils n = 3, IL-1 $\beta$ : jeweils n = 2. Die Signifikanzniveaus verglichen mit der unbehandelten Kontrolle entsprechen nicht signifikant (ns), p<0.05 (\*), p<0,05 (\*\*), und p<0,001 (\*\*\*). .....55

**Abb. 14:** ARPE-19-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> über 3 h behandelt und zeigten in der anschließenden Messung von IL-1 $\beta$  und LDH eine Freisetzung des Zytokins, die an den Zelltod gekoppelt war. LDH: jeweils n = 3, IL-1 $\beta$ : jeweils n = 2. Die Signifikanzniveaus verglichen mit der unbehandelten Kontrolle entsprechen nicht signifikant (ns), p<0.05 (\*), p<0,05 (\*\*), und p<0,001 (\*\*\*). .....56

**Abb. 15:** Hypothese zu den möglichen Mechanismen der Inflammasomaktivierung durch oxidativen Schaden.....57

**Abb. 16:** Nach Inkubation der Zellen mit 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> über 3 h konnte ein deutlich sichtbarer Verlust der lysosomalen Färbung im Vergleich mit der Kontrolle detektiert werden. Acridin-Orange-Färbung. Fluoreszenzmikroskopie (Exzitation 460-480 nm; Detektion: 525-650 nm). Vergrößerung: 400fach. Der Maßstab beträgt 50  $\mu$ m. ....58

**Abb. 17:** Die zusätzliche Inkubation mit einem Cathepsin-B-Inhibitor (CA-074Me) verringerte die IL-1 $\beta$ -Freisetzung. Die Cathepsin-B-Inhibition ermöglichte zwar eine Senkung der IL-1 $\beta$ -Freisetzung, unterdrückte diese jedoch nicht vollständig. Control: jeweils n = 2, Cathepsin B inhibitor: jeweils n = 2. Die Signifikanzniveaus verglichen mit der unbehandelten Kontrolle entsprechen nicht signifikant (ns), p<0.05 (\*), p<0,05 (\*\*), und p<0,001 (\*\*\*). .....59

**Abb. 18:** ARPE-19-Zellen wurden für zwei Stunden mit verschiedenen Konzentrationen ATP versetzt und simultan wurde die Freisetzung von IL-1 $\beta$  und LDH gemessen. LDH: jeweils n = 3, IL-1 $\beta$ : jeweils n = 2. Die Signifikanzniveaus verglichen mit der unbehandelten Kontrolle entsprechen nicht signifikant (ns), p<0.05 (\*), p<0,05 (\*\*), und p<0,001 (\*\*\*). .....60

**Abb. 19:** ARPE-19-Zellen wurden für drei Stunden mit verschiedenen Konzentrationen Nigericin versetzt und simultan wurde die Freisetzung von IL-1 $\beta$  und LDH gemessen. LDH: jeweils n = 3, IL-1 $\beta$ : jeweils n = 2. Die Signifikanzniveaus verglichen mit der unbehandelten Kontrolle entsprechen nicht signifikant (ns), p<0.05 (\*), p<0,05 (\*\*) und p<0,001 (\*\*\*). .....61

## 7. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht über die Stadieneinteilung der AMD (Ferris et al., 2005, 2013, Holz et al., 2012, 2014a). .....	12
Tab. 2: Unterschiede zwischen Pyroptose und Apoptose im Überblick. Die Tabelle ist angelehnt an die Darstellung von Labbe und Saleh, sowie deren modifizierte Form von Brandstetter (Brandstetter, 2016; Labbé and Saleh, 2011). .....	29
Tab. 3: Messreihen in Triplets mit je 200 µl und aufsteigenden Bestrahlungszeiten, um gleichzeitig Zytotoxizität und IL-1β-Freisetzung zu detektieren. ....	41
Tab. 4: Messreihen in Triplets mit je 200 µl und aufsteigenden Leu-Leu-OMe-Konzentrationen, um gleichzeitig Zytotoxizität und IL-1β-Freisetzung zu detektieren. ....	41
Tab. 5: Veranschaulichung der untersuchten Inkubationszeiten bei einer Konzentration von 1 mM Leu-Leu-OMe. Von 200 µl Überstand wurden je 100 µl verwendet, um Zytotoxizität und IL-1β-Freisetzung zu quantifizieren. ....	41
Tab. 6: Messreihen in Triplets mit je 200 µl und aufsteigenden H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Konzentrationen bei einer Inkubationszeit über 3 h, um gleichzeitig Zytotoxizität und IL-1β-Freisetzung zu detektieren. ....	42
Tab. 7: Messreihen in Triplets mit je 200 µl und aufsteigenden ATP-Konzentrationen bei einer Inkubationszeit von 2 h, um gleichzeitig Zytotoxizität und IL-1β-Freisetzung zu detektieren. ....	43
Tab. 8: Messreihen in Triplets mit je 200 µl und aufsteigenden Nigericin-Konzentrationen bei einer Inkubationszeit von 3 h, um gleichzeitig Zytotoxizität und IL-1β-Freisetzung detektieren zu können.....	43

Tab. 9: In der folgenden Tabelle sind die für die Fluoreszenzmikroskopie benötigten Wellenlängen für die unterschiedlichen Messmethoden eingeteilt. ....47



## 8. Literaturverzeichnis

Age-Related Eye Disease Study Research Group (2000). Risk factors associated with age-related macular degeneration. A case-control study in the age-related eye disease study: Age-Related Eye Disease Study Report Number 3. *Ophthalmology* 107, 2224–2232

Age-Related Eye Disease Study Research Group (2001). A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report no. 8. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill* 1960 119, 1417–1436

Ambati, J., and Fowler, B.J. (2012). Mechanisms of age-related macular degeneration. *Neuron* 75, 26–39

Anderson, D.H., Mullins, R.F., Hageman, G.S., and Johnson, L.V. (2002). A role for local inflammation in the formation of drusen in the aging eye. *Am. J. Ophthalmol.* 134, 411–431

Andrei, C., Dazzi, C., Lotti, L., Torrisi, M.R., Chimini, G., and Rubartelli, A. (1999). The secretory route of the leaderless protein interleukin 1beta involves exocytosis of endolysosome-related vesicles. *Mol. Biol. Cell* 10, 1463–1475

Andrei, C., Margiocco, P., Poggi, A., Lotti, L.V., Torrisi, M.R., and Rubartelli, A. (2004). Phospholipases C and A2 control lysosome-mediated IL-1 beta secretion: Implications for inflammatory processes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 9745–9750

Arantes, R.M.E., and Andrews, N.W. (2006). A role for synaptotagmin VII-regulated exocytosis of lysosomes in neurite outgrowth from primary sympathetic neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 4630–4637

Arend, O., Weiter, J.J., Goger, D.G., and Delori, F.C. (1995). [In vivo fundus fluorescence

measurements in patients with age related macular degeneration]. *Ophthalmol. Z. Dtsch. Ophthalmol. Ges.* 92, 647–653

Arnold, C., Winter, L., Fröhlich, K., Jentsch, S., Dawczynski, J., Jahreis, G., and Böhm, V. (2013). Macular xanthophylls and  $\omega$ -3 long-chain polyunsaturated fatty acids in age-related macular degeneration: a randomized trial. *JAMA Ophthalmol.* 131, 564–572

Arulkumaran, N., Unwin, R.J., and Tam, F.W. (2011). A potential therapeutic role for P2X7 receptor (P2X7R) antagonists in the treatment of inflammatory diseases. *Expert Opin. Investig. Drugs* 20, 897–915

Bakele, M., Joos, M., Burdi, S., Allgaier, N., Poschel, S., Fehrenbacher, B., Schaller, M., Marcos, V., Kummerle-Deschner, J., Rieber, N., et al. (2014). Localization and Functionality of the Inflammasome in Neutrophils. *J. Biol. Chem.* 289, 5320–5329

Bartuma, H., Petrus-Reurer, S., Aronsson, M., Westman, S., André, H., and Kvant, A. (2015). In Vivo Imaging of Subretinal Bleb-Induced Outer Retinal Degeneration in the Rabbit. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 56, 2423–2430

Bauernfeind, F.G., Horvath, G., Stutz, A., Alnemri, E.S., MacDonald, K., Speert, D., Fernandes-Alnemri, T., Wu, J., Monks, B.G., Fitzgerald, K.A., et al. (2009). Cutting edge: NF- $\kappa$ B activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 183, 787–791

Beatty, S., Koh, H., Phil, M., Henson, D., and Boulton, M. (2000). The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv. Ophthalmol.* 45, 115–134

Bellmann, C., Holz, F.G., Schapp, O., Völcker, H.E., and Otto, T.P. (1997). [Topography of fundus autofluorescence with a new confocal scanning laser ophthalmoscope]. *Ophthalmol. Z. Dtsch. Ophthalmol. Ges.* 94, 385–391

BenSaad, L.A., Kim, K.H., Quah, C.C., Kim, W.R., and Shahimi, M. (2017). Anti-inflammatory potential of ellagic acid, gallic acid and punicalagin A&B isolated from *Punica granatum*. *BMC Complement. Altern. Med.* 17

Bergmann, M., Schütt, F., Holz, F.G., and Kopitz, J. (2004). Inhibition of the ATP-driven proton pump in RPE lysosomes by the major lipofuscin fluorophore A2-E may contribute to the pathogenesis of age-related macular degeneration. *FASEB J*

Bergsbaken, T., and Cookson, B.T. (2007). Macrophage activation redirects yersinia-infected host cell death from apoptosis to caspase-1-dependent pyroptosis. *PLoS Pathog.* 3, e161

Bergsbaken, T., Fink, S.L., and Cookson, B.T. (2009). Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 99–109

Bianco, F., Pravettoni, E., Colombo, A., Schenk, U., Möller, T., Matteoli, M., and Verderio, C. (2005). Astrocyte-derived ATP induces vesicle shedding and IL-1 beta release from microglia. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 174, 7268–7277

Black, R.A., Kronheim, S.R., and Sleath, P.R. (1989). Activation of interleukin-1 beta by a co-induced protease. *FEBS Lett.* 247, 386–390

Boilard, E., Nigrovic, P.A., Larabee, K., Watts, G.F.M., Coblyn, J.S., Weinblatt, M.E., Massarotti, E.M., Remold-O'Donnell, E., Farndale, R.W., Ware, J., et al. (2010). Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science* 327, 580–583

Boulton, M.E. (2013). Ageing of the Retina and Retinal Pigment Epithelium. In *Age-Related Macular Degeneration*, F.G. Holz, D. Pauleikhoff, R.F. Spaide, and A.C. Bird, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 45–63

Brandstetter, C. (2016). NLRP3 inflammasome activation by photooxidative damage

provides a novel link between hallmark pathogenic features of age-dependent macular degeneration

Brandstetter, C., Mohr, L.K.M., Latz, E., Holz, F.G., and Krohne, T.U. (2015a). Light induces NLRP3 inflammasome activation in retinal pigment epithelial cells via lipofuscin-mediated photooxidative damage. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 93, 905–916

Brandstetter, C., Holz, F.G., and Krohne, T.U. (2015b). Complement Component C5a Primes Retinal Pigment Epithelial Cells for Inflammasome Activation by Lipofuscin-mediated Photooxidative Damage. *J. Biol. Chem.* 290, 31189–31198

Brandstetter, C., Patt, J., Holz, F.G., and Krohne, T.U. (2016). Inflammasome priming increases retinal pigment epithelial cell susceptibility to lipofuscin phototoxicity by changing the cell death mechanism from apoptosis to pyroptosis. *J. Photochem. Photobiol. B* 161, 177–183

Brennan, M.A., and Cookson, B.T. (2000). Salmonella induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis. *Mol. Microbiol.* 38, 31–40

Brown, B., and Lovie-Kitchin, J. (1987). Contrast sensitivity in central and paracentral retina in age related maculopathy. *Clin. Exp. Optom.* 70, 145–148

Brown, D.M., Kaiser, P.K., Michels, M., Soubrane, G., Heier, J.S., Kim, R.Y., Sy, J.P., and Schneider, S. (2006). Ranibizumab versus Verteporfin for Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *N. Engl. J. Med.* 355, 1432–1444

Brunk, U.T., Wihlmark, U., Wrigstad, A., Roberg, K., and Nilsson, S.E. (1995). Accumulation of lipofuscin within retinal pigment epithelial cells results in enhanced sensitivity to photo-oxidation. *Gerontology* 41 *Suppl 2*, 201–212

Brydges, S.D., Broderick, L., McGeough, M.D., Pena, C.A., Mueller, J.L., and Hoffman, H.M. (2013). Divergence of IL-1, IL-18, and cell death in NLRP3 inflammasomopathies. *J.*

Clin. Invest. 123, 4695–4705

Buch, H., Nielsen, N.V., Vinding, T., Jensen, G.B., Prause, J.U., and la Cour, M. (2005). 14-year incidence, progression, and visual morbidity of age-related maculopathy: the Copenhagen City Eye Study. *Ophthalmology* 112, 787–798

Burns, R.P., and Feeney-Burns, L. (1980). Clinico-morphologic correlations of drusen of Bruch's membrane. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* 78, 206–225

Campbell, J.P., Bressler, S.B., and Bressler, N.M. (2012). Impact of availability of anti-vascular endothelial growth factor therapy on visual impairment and blindness due to neovascular age-related macular degeneration. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill 1960* 130, 794–795

Cantarini, L., Vitale, A., Scalini, P., Dinarello, C.A., Rigante, D., Franceschini, R., Simonini, G., Borsari, G., Caso, F., Lucherini, O.M., et al. (2015). Anakinra treatment in drug-resistant Behcet's disease: a case series. *Clin. Rheumatol.* 34, 1293–1301

Cao, S., Wang, J.C.C., Gao, J., Wong, M., To, E., White, V.A., Cui, J.Z., and Matsubara, J.A. (2016). CFH Y402H polymorphism and the complement activation product C5a: effects on NF- $\kappa$ B activation and inflammasome gene regulation. *Br. J. Ophthalmol.* 100, 713–718

Chaine, G., Hullo, A., Sahel, J., Soubrane, G., Espinasse-Berrod, M.-A., Schutz, D., Bourguignon, C., Harpey, C., Brault, Y., Coste, M., et al. (1998). Case-control study of the risk factors for age related macular degeneration. *Br. J. Ophthalmol.* 82, 996–1002

Chakravarthy, U., Wong, T.Y., Fletcher, A., Piau, E., Evans, C., Zlateva, G., Buggage, R., Pleil, A., and Mitchell, P. (2010a). Clinical risk factors for age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. *BMC Ophthalmol.* 10, 31

Chakravarthy, U., Evans, J., and Rosenfeld, P.J. (2010b). Age related macular

degeneration. *BMJ* 340, c981–c981

Chen, B., Tuuli, M.G., Longtine, M.S., Shin, J.S., Lawrence, R., Inder, T., and Michael Nelson, D. (2012). Pomegranate juice and punicalagin attenuate oxidative stress and apoptosis in human placenta and in human placental trophoblasts. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* 302, E1142–E1152

Choe, J.-Y., and Kim, S.-K. (2017). Quercetin and Ascorbic Acid Suppress Fructose-Induced NLRP3 Inflammasome Activation by Blocking Intracellular Shuttling of TXNIP in Human Macrophage Cell Lines. *Inflammation* 40, 980–994

Chong, E.W.-T., Kreis, A.J., Wong, T.Y., Simpson, J.A., and Guymer, R.H. (2008). Dietary  $\omega$ -3 Fatty Acid and Fish Intake in the Primary Prevention of Age-Related Macular Degeneration: A Systematic Review and Meta-analysis. *Arch. Ophthalmol.* 126, 826–833.

Chua, B., Flood, V., Rochtchina, E., Wang, J.J., Smith, W., and Mitchell, P. (2006). Dietary fatty acids and the 5-year incidence of age-related maculopathy. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill* 1960 124, 981–986

Coll, R.C., Robertson, A.A.B., Chae, J.J., Higgins, S.C., Muñoz-Planillo, R., Inserra, M.C., Vetter, I., Dungan, L.S., Monks, B.G., Stutz, A., et al. (2015). A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nat. Med.* 21, 248–255

Compan, V., Baroja-Mazo, A., López-Castejón, G., Gomez, A.I., Martínez, C.M., Angosto, D., Montero, M.T., Herranz, A.S., Bazán, E., Reimers, D., et al. (2012). Cell Volume Regulation Modulates NLRP3 Inflammasome Activation. *Immunity* 37, 487–500.

Cookson, B.T., and Brennan, M.A. (2001). Pro-inflammatory programmed cell death. *Trends Microbiol.* 9, 113–114

Crabb, J.W., Miyagi, M., Gu, X., Shadrach, K., West, K.A., Sakaguchi, H., Kamei, M.,

Hasan, A., Yan, L., Rayborn, M.E., et al. (2002). Drusen proteome analysis: an approach to the etiology of age-related macular degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 14682–14687

Csak, T., Ganz, M., Pespisa, J., Kodys, K., Dolganiuc, A., and Szabo, G. (2011). Fatty acid and endotoxin activate inflammasomes in mouse hepatocytes that release danger signals to stimulate immune cells. *Hepatology*. Baltimore, Md 54, 133–144

Daniele, R.P., Holian, S.K., and Nowell, P.C. (1978). A potassium ionophore (Nigericin) inhibits stimulation of human lymphocytes by mitogens. *J. Exp. Med.* 147, 571–581.

Davies, S., Elliott, M.H., Floor, E., Truscott, T.G., Zareba, M., Sarna, T., Shamsi, F.A., and Boulton, M.E. (2001). Photocytotoxicity of lipofuscin in human retinal pigment epithelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 31, 256–265

Dawczynski, J., Jentsch, S., Schweitzer, D., Hammer, M., Lang, G.E., and Strobel, J. (2013). Long term effects of lutein, zeaxanthin and omega-3-LCPUFAs supplementation on optical density of macular pigment in AMD patients: the LUTEGA study. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* Albrecht Von Graefes Arch. Klin. Exp. Ophthalmol. 251, 2711–2723

Delori, F.C., Dorey, C.K., Staurenghi, G., Arend, O., Goger, D.G., and Weiter, J.J. (1995). In vivo fluorescence of the ocular fundus exhibits retinal pigment epithelium lipofuscin characteristics. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 36, 718–729

Delori, F.C., Goger, D.G., and Dorey, C.K. (2001). Age-Related Accumulation and Spatial Distribution of Lipofuscin in RPE of Normal Subjects. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 1855–1866

Dempsey, C., Rubio Araiz, A., Bryson, K.J., Finucane, O., Larkin, C., Mills, E.L., Robertson, A.A.B., Cooper, M.A., O'Neill, L.A.J., and Lynch, M.A. (2017). Inhibiting the NLRP3 inflammasome with MCC950 promotes non-phlogistic clearance of amyloid- $\beta$  and

cognitive function in APP/PS1 mice. *Brain. Behav. Immun.* 61, 306–316

Dewan, A., Liu, M., Hartman, S., Zhang, S.S.-M., Liu, D.T.L., Zhao, C., Tam, P.O.S., Chan, W.M., Lam, D.S.C., Snyder, M., et al. (2006). HTRA1 promoter polymorphism in wet age-related macular degeneration. *Science* 314, 989–992

Di Virgilio, F., Dal Ben, D., Sarti, A.C., Giuliani, A.L., and Falzoni, S. (2017). The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. *Immunity* 47, 15–31

Dou, Y., Wu, H., Li, H., Qin, S., Wang, Y., Li, J., Lou, H., Chen, Z., Li, X., Luo, Q., et al. (2012). Microglial migration mediated by ATP-induced ATP release from lysosomes. *Cell Res.* 22, 1022–1033

Duewell, P., Kono, H., Rayner, K.J., Sirois, C.M., Vladimer, G., Bauernfeind, F.G., Abela, G.S., Franchi, L., Nuñez, G., Schnurr, M., et al. (2010). NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* 464, 1357–1361.

Dunn, K.C., Aotaki-Keen, A.E., Putkey, F.R., and Hjelmeland, L.M. (1996). ARPE-19, A Human Retinal Pigment Epithelial Cell Line with Differentiated Properties. *Exp. Eye Res.* 62, 155–170

Dutot, M., Liang, H., Pauloin, T., Brignole-Baudouin, F., Baudouin, C., Warnet, J.-M., and Rat, P. (2008). Effects of toxic cellular stresses and divalent cations on the human P2X7 cell death receptor. *Mol. Vis.* 14, 889–897

Earnshaw, W.C., Martins, L.M., and Kaufmann, S.H. (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 383–424

Eder, C. (2009). Mechanisms of interleukin-1beta release. *Immunobiology* 214, 543–553

Eldem, M.B., Bartz-Schmidt, K.-U., Schlingemann, R.O., Guymer, R., Axer-Siegel, R., and



Group, on behalf of the E. study (2009). Visual Acuity Response Profiles in Patients With Neovascular Age-related Macular Degeneration Treated Quarterly With Ranibizumab in the EXCITE Trial. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50, 2374–2374

Elinav, E., Strowig, T., Henao-Mejia, J., and Flavell, R.A. (2011). Regulation of the antimicrobial response by NLR proteins. *Immunity* 34, 665–679

Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 35, 495–516

Emmi, G., Talarico, R., Lopalco, G., Cimaz, R., Cantini, F., Viapiana, O., Olivieri, I., Goldoni, M., Vitale, A., Silvestri, E., et al. (2016). Efficacy and safety profile of anti-interleukin-1 treatment in Behçet's disease: a multicenter retrospective study. *Clin. Rheumatol.* 35, 1281–1286

Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43–50

Feeney-Burns, L., Berman, E.R., and Rothman, H. (1980). Lipofuscin of Human Retinal Pigment Epithelium. *Am. J. Ophthalmol.* 90, 783–791

Feeney-Burns, L., Hilderbrand, E.S., and Eldridge, S. (1984). Aging human RPE: morphometric analysis of macular, equatorial, and peripheral cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 25, 195–200

Feldmeyer, L., Keller, M., Niklaus, G., Hohl, D., Werner, S., and Beer, H.-D. (2007). The Inflammasome Mediates UVB-Induced Activation and Secretion of Interleukin-1 $\beta$  by Keratinocytes. *Curr. Biol.* 17, 1140–1145

Fernandes-Alnemri, T., Wu, J., Yu, J.-W., Datta, P., Miller, B., Jankowski, W., Rosenberg, S., Zhang, J., and Alnemri, E.S. (2007). The pyroptosome: a supramolecular assembly of

ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. *Cell Death Differ.* 14, 1590–1604

Ferrington, D.A., Sinha, D., and Kaarniranta, K. (2016). Defects in retinal pigment epithelial cell proteolysis and the pathology associated with age-related macular degeneration. *Prog. Retin. Eye Res.* 51, 69–89

Ferris, F.L. (1983). Senile macular degeneration: review of epidemiologic features. *Am. J. Epidemiol.* 118, 132–151

Ferris, F.L., Fine, S.L., and Hyman, L. (1984). Age-related macular degeneration and blindness due to neovascular maculopathy. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill 1960* 102, 1640–1642

Ferris, F.L., Davis, M.D., Clemons, T.E., Lee, L.-Y., Chew, E.Y., Lindblad, A.S., Milton, R.C., Bressler, S.B., Klein, R., and Age-Related Eye Disease Study (AREDS) Research Group (2005). A simplified severity scale for age-related macular degeneration: AREDS Report No. 18. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill 1960* 123, 1570–1574

Ferris, F.L., Wilkinson, C.P., Bird, A., Chakravarthy, U., Chew, E., Csaky, K., Sadda, S.R., and Beckman Initiative for Macular Research Classification Committee (2013). Clinical classification of age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 120, 844–851

Fink, S.L., and Cookson, B.T. (2006). Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cell. Microbiol.* 8, 1812–1825

Franceschini, A., Capece, M., Chiozzi, P., Falzoni, S., Sanz, J.M., Sarti, A.C., Bonora, M., Pinton, P., and Di Virgilio, F. (2015). The P2X7 receptor directly interacts with the NLRP3 inflammasome scaffold protein. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 29, 2450–2461

Franchi, L., Kanneganti, T.-D., Dubyak, G.R., and Núñez, G. (2007). Differential requirement of P2X7 receptor and intracellular K<sup>+</sup> for caspase-1 activation induced by intracellular and extracellular bacteria. *J. Biol. Chem.* 282, 18810–18818

Franchi, L., Eigenbrod, T., and Núñez, G. (2009). Cutting edge: TNF- $\alpha$  mediates sensitization to ATP and silica via the NLRP3 inflammasome in the absence of microbial stimulation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 183, 792–796

Franchi, L., Muñoz-Planillo, R., and Núñez, G. (2012). Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes. *Nat. Immunol.* 13, 325–332

Franchi, L., Eigenbrod, T., Muñoz-Planillo, R., Ozkurede, U., Kim, Y.-G., Arindam, C., Gale, M., Silverman, R.H., Colonna, M., Akira, S., et al. (2014). Cytosolic double-stranded RNA activates the NLRP3 inflammasome via MAVS-induced membrane permeabilization and K<sup>+</sup> efflux. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 193, 4214–4222

Friedman, D.S., O'Colmain, B.J., Muñoz, B., Tomany, S.C., McCarty, C., de Jong, P.T.V.M., Nemesure, B., Mitchell, P., Kempen, J., and Eye Diseases Prevalence Research Group (2004). Prevalence of age-related macular degeneration in the United States. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill 1960* 122, 564–572

Gao, J., Cui, J.Z., To, E., Cao, S., and Matsubara, J.A. (2018). Evidence for the activation of pyroptotic and apoptotic pathways in RPE cells associated with NLRP3 inflammasome in the rodent eye. *J. Neuroinflammation* 15

Gass, J.D. (1973). Drusen and disciform macular detachment and degeneration. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill 1960* 90, 206–217

Gehrs, K.M., Anderson, D.H., Johnson, L.V., and Hageman, G.S. (2006). Age-related macular degeneration--emerging pathogenetic and therapeutic concepts. *Ann. Med.* 38, 450–471

Giuliani, A.L., Sarti, A.C., Falzoni, S., and Di Virgilio, F. (2017). The P2X7 Receptor-Interleukin-1 Liaison. *Front. Pharmacol.* 8, 123

Glick, G., Ghosh, S., and Roush, W.R. (2017). Compounds and Compositions for Treating Conditions Associated with Nlrp Activity

Goldberg, E.L., Asher, J.L., Molony, R.D., Shaw, A.C., Zeiss, C.J., Wang, C., Morozova-Roche, L.A., Herzog, R.I., Iwasaki, A., and Dixit, V.D. (2017).  $\beta$ -Hydroxybutyrate Deactivates Neutrophil NLRP3 Inflammasome to Relieve Gout Flares. *Cell Rep.* 18, 2077–2087

Gu, X., Neric, N.J., Crabb, J.S., Crabb, J.W., Bhattacharya, S.K., Rayborn, M.E., Hollyfield, J.G., and Bonilha, V.L. (2012). Age-related changes in the retinal pigment epithelium (RPE). *PloS One* 7, e38673

Guha, S., Baltazar, G.C., Coffey, E.E., Tu, L.-A., Lim, J.C., Beckel, J.M., Patel, S., Eysteinnsson, T., Lu, W., O'Brien-Jenkins, A., et al. (2013). Lysosomal alkalization, lipid oxidation, and reduced phagosome clearance triggered by activation of the P2X7 receptor. *FASEB J.* 27, 4500–4509

Guo, H., Callaway, J.B., and Ting, J.P.-Y. (2015). Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat. Med.* 21, 677–687

Gutteridge, J.M., and Halliwell, B. (2000). Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 899, 136–147

Halban, P.A., and Irminger, J.C. (1994). Sorting and processing of secretory proteins. *Biochem. J.* 299 ( Pt 1), 1–18

Hanamsagar, R., Torres, V., and Kielian, T. (2011). Inflammasome activation and IL-1 $\beta$ /IL-18 processing are influenced by distinct pathways in microglia: NLRP3 inflammasome activation in microglia. *J. Neurochem.* 119, 736–748

Herrmann, P., Holz, F.G., and Charbel Issa, P. (2013). Ätiologie und Pathogenese der altersabhängigen Makuladegeneration. *Ophthalmol.* 110, 377–389

Hogg, R.E., Woodside, J.V., Gilchrist, S.E.C.M., Graydon, R., Fletcher, A.E., Chan, W., Knox, A., Cartmill, B., and Chakravarthy, U. (2008). Cardiovascular disease and hypertension are strong risk factors for choroidal neovascularization. *Ophthalmology* 115, 1046–1052.e2

Holder, B.S., Tower, C.L., Forbes, K., Mulla, M.J., Aplin, J.D., and Abrahams, V.M. (2012). Immune cell activation by trophoblast-derived microvesicles is mediated by syncytin 1. *Immunology* 136, 184–191

Holz, F.G., Sheraidah, G., Pauleikhoff, D., and Bird, A.C. (1994). Analysis of lipid deposits extracted from human macular and peripheral Bruch's membrane. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill 1960* 112, 402–406

Holz, F.G., Gross-Jendroska, M., Eckstein, A., Hogg, C.R., Arden, G.B., and Bird, A.C. (1995). Colour contrast sensitivity in patients with age-related Bruch's membrane changes. *Ger. J. Ophthalmol.* 4, 336–341

Holz, F.G., Bellman, C., Staudt, S., Schütt, F., and Völcker, H.E. (2001). Fundus autofluorescence and development of geographic atrophy in age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 1051–1056

Holz, F.G., Pauleikhoff, D., Klein, R., and Bird, A.C. (2004). Pathogenesis of lesions in late age-related macular disease. *Am. J. Ophthalmol.* 137, 504–510

Holz, F.G., Pauleikhoff, D., Spaide, R.F., and Bird, A.C. (2012). *Age-related Macular Degeneration* (Springer Science & Business Media)

Holz, F.G., Strauss, E.C., Schmitz-Valckenberg, S., and van Lookeren Campagne, M. (2014a). Geographic atrophy: clinical features and potential therapeutic approaches.

Ophthalmology 121, 1079–1091

Holz, F.G., Schmitz-Valckenberg, S., and Fleckenstein, M. (2014b). Recent developments in the treatment of age-related macular degeneration. *J. Clin. Invest.* 124, 1430–1438.

Hornung, V., and Latz, E. (2010). Critical functions of priming and lysosomal damage for NLRP3 activation. *Eur. J. Immunol.* 40, 620–623

Hornung, V., Bauernfeind, F., Halle, A., Samstad, E.O., Kono, H., Rock, K.L., Fitzgerald, K.A., and Latz, E. (2008). Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat. Immunol.* 9, 847–856

Hutchinson, J. (1875). Symmetrical central choroido-retinal disease occurring in senile persons. *R. Lond Ophthalmol Hosp Regist.* 231–244

Imamura, Y., Noda, S., Hashizume, K., Shinoda, K., Yamaguchi, M., Uchiyama, S., Shimizu, T., Mizushima, Y., Shirasawa, T., and Tsubota, K. (2006). Drusen, choroidal neovascularization, and retinal pigment epithelium dysfunction in SOD1-deficient mice: A model of age-related macular degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 11282–11287

Jarrett, S.G., and Boulton, M.E. (2012). Consequences of oxidative stress in age-related macular degeneration. *Mol. Aspects Med.* 33, 399–417

Joachim, N., Mitchell, P., Burlutsky, G., Kifley, A., and Wang, J.J. (2015). The Incidence and Progression of Age-Related Macular Degeneration over 15 Years: The Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology* 122, 2482–2489

Johnson, P.T., Brown, M.N., Pulliam, B.C., Anderson, D.H., and Johnson, L.V. (2005). Synaptic pathology, altered gene expression, and degeneration in photoreceptors impacted by drusen. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46, 4788–4795

Joza, N., Susin, S.A., Daugas, E., Stanford, W.L., Cho, S.K., Li, C.Y., Sasaki, T., Elia,

A.J., Cheng, H.Y., Ravagnan, L., et al. (2001). Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 410, 549–554

Juliana, C., Fernandes-Alnemri, T., Kang, S., Farias, A., Qin, F., and Alnemri, E.S. (2012). Non-transcriptional priming and deubiquitination regulate NLRP3 inflammasome activation. *J. Biol. Chem.* 287, 36617–36622

Junius, P., and Kuhnt, H. (1926). Die scheibenförmige Entartung der Netzhautmitte: (degeneratio maculae luteae disciformis) (Berlin: S. Karger)

Katsnelson, M.A., Rucker, L.G., Russo, H.M., and Dubyak, G.R. (2015). K<sup>+</sup> efflux agonists induce NLRP3 inflammasome activation independently of Ca<sup>2+</sup> signaling. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 194, 3937–3952

Katz, M.L. (1989). Incomplete proteolysis may contribute to lipofuscin accumulation in the retinal pigment epithelium. *Adv. Exp. Med. Biol.* 266, 109-116-118

Kauppinen, A., Niskanen, H., Suuronen, T., Kinnunen, K., Salminen, A., and Kaarniranta, K. (2012). Oxidative stress activates NLRP3 inflammasomes in ARPE-19 cells—Implications for age-related macular degeneration (AMD). *Immunol. Lett.* 147, 29–33

Kawasaki, R., Wang, J.J., Aung, T., Tan, D.T.H., Mitchell, P., Sandar, M., Saw, S.-M., Wong, T.Y., and Singapore Malay Eye Study Group (2008). Prevalence of age-related macular degeneration in a Malay population: the Singapore Malay Eye Study. *Ophthalmology* 115, 1735–1741

Keller, M., Rüegg, A., Werner, S., and Beer, H.-D. (2008). Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell* 132, 818–831

Kennedy, C.J., Rakoczy, P.E., and Constable, I.J. (1995). Lipofuscin of the retinal pigment epithelium: a review. *Eye Lond. Engl.* 9 ( Pt 6), 763–771

Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239–257

Kerur, N., Hirano, Y., Tarallo, V., Fowler, B.J., Bastos-Carvalho, A., Yasuma, T., Yasuma, R., Kim, Y., Hinton, D.R., Kirschning, C.J., et al. (2013). TLR-Independent and P2X7-Dependent Signaling Mediate *Alu* RNA-Induced NLRP3 Inflammasome Activation in Geographic Atrophy. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* 54, 7395

Klein, R., Klein, B.E.K., Knudtson, M.D., Meuer, S.M., Swift, M., and Gangnon, R.E. (2007). Fifteen-year cumulative incidence of age-related macular degeneration: the Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology* 114, 253–262

Klein, R., Knudtson, M.D., Cruickshanks, K.J., and Klein, B.E.K. (2008). Further observations on the association between smoking and the long-term incidence and progression of age-related macular degeneration: the Beaver Dam Eye Study. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill 1960* 126, 115–121

Kostura, M.J., Tocci, M.J., Limjuco, G., Chin, J., Cameron, P., Hillman, A.G., Chartrain, N.A., and Schmidt, J.A. (1989). Identification of a monocyte specific pre-interleukin 1 beta convertase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 5227–5231

Krohne, T.U., Stratmann, N.K., Kopitz, J., and Holz, F.G. (2010). Effects of lipid peroxidation products on lipofuscinogenesis and autophagy in human retinal pigment epithelial cells. *Exp. Eye Res.* 90, 465–471

Kruft, B.I., and Greer, A. (2011). Photosensitization reactions in vitro and in vivo. *Photochem. Photobiol.* 87, 1204–1213

Kuida, K., Lippke, J.A., Ku, G., Harding, M.W., Livingston, D.J., Su, M.S., and Flavell, R.A. (1995). Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 267, 2000–2003



Kurosaka, K., Takahashi, M., Watanabe, N., and Kobayashi, Y. (2003). Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *171*, 4672–4679

Labbé, K., and Saleh, M. (2011). Pyroptosis: A Caspase-1-Dependent Programmed Cell Death and a Barrier to Infection. In *The Inflammasomes*, I. Couillin, V. Pétrilli, and F. Martinon, eds. (Basel: Springer Basel), pp. 17–36

Lamkanfi, M. (2011). Emerging inflammasome effector mechanisms. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 213–220

Lamkanfi, M., Sarkar, A., Vande Walle, L., Vitari, A.C., Amer, A.O., Wewers, M.D., Tracey, K.J., Kanneganti, T.-D., and Dixit, V.M. (2010). Inflammasome-dependent release of the alarmin HMGB1 in endotoxemia. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *185*, 4385–4392

Leemans, J.C., Cassel, S.L., and Sutterwala, F.S. (2011). Sensing damage by the NLRP3 inflammasome. *Immunol. Rev.* *243*, 152–162

van Leeuwen, R., Klaver, C.C.W., Vingerling, J.R., Hofman, A., and de Jong, P.T.V.M. (2003). The risk and natural course of age-related maculopathy: follow-up at 6 1/2 years in the Rotterdam study. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill 1960* *121*, 519–526

Li, J.Q., Welchowski, T., Schmid, M., Letow, J., Wolpers, A.C., Holz, F.G., and Finger, R.P. (2017). Retinal Diseases in Europe. *Preval. Incid. Healthc. Needs*

Li, P., Allen, H., Banerjee, S., Franklin, S., Herzog, L., Johnston, C., McDowell, J., Paskind, M., Rodman, L., and Salfeld, J. (1995). Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock. *Cell* *80*, 401–411

Lopez-Castejon, G., and Brough, D. (2011). Understanding the mechanism of IL-1 $\beta$  secretion. *Cytokine Growth Factor Rev.* *22*, 189–195

Ludwig-Portugall, I., Bartok, E., Dhana, E., Evers, B.D.G., Primiano, M.J., Hall, J.P., Franklin, B.S., Knolle, P.A., Hornung, V., Hartmann, G., et al. (2016). An NLRP3-specific inflammasome inhibitor attenuates crystal-induced kidney fibrosis in mice. *Kidney Int.* *90*, 525–539

Lund, R.D., Wang, S., Klimanskaya, I., Holmes, T., Ramos-Kelsey, R., Lu, B., Girman, S., Bischoff, N., Sauv e, Y., and Lanza, R. (2006). Human embryonic stem cell-derived cells rescue visual function in dystrophic RCS rats. *Cloning Stem Cells* *8*, 189–199

Machlin, L.J., and Bendich, A. (1987). Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J.* *1*, 441–445

MacKenzie, A., Wilson, H.L., Kiss-Toth, E., Dower, S.K., North, R.A., and Surprenant, A. (2001). Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. *Immunity* *15*, 825–835

Macular Disease Foundation Australia, (2020). Macular Degeneration What Happens? <https://mdfoundation.com.au/content/what-happens-macular-degeneration> (21.12.2020)

Mao, X., Pan, T., Shen, H., Xi, H., Yuan, S., and Liu, Q. (2018). The rescue effect of mesenchymal stem cell on sodium iodate-induced retinal pigment epithelial cell death through deactivation of NF-κB-mediated NLRP3 inflammasome. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* *103*, 517–523

Mariathasan, S., Weiss, D.S., Newton, K., McBride, J., O'Rourke, K., Roose-Girma, M., Lee, W.P., Weinrauch, Y., Monack, D.M., and Dixit, V.M. (2006). Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* *440*, 228–232

Martín-Sánchez, F., Diamond, C., Zeitler, M., Gomez, A.I., Baroja-Mazo, A., Bagnall, J., Spiller, D., White, M., Daniels, M.J.D., Mortellaro, A., et al. (2016). Inflammasome-dependent IL-1β release depends upon membrane permeabilisation. *Cell Death Differ.* *23*, 1219–1231

Mauschitz, M.M., Fonseca, S., Chang, P., Göbel, A.P., Fleckenstein, M., Jaffe, G.J., Holz, F.G., Schmitz-Valckenberg, S., and GAP Study Group (2012). Topography of geographic atrophy in age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53, 4932–4939

Mazzoni, F., Safa, H., and Finnemann, S.C. (2014). Understanding photoreceptor outer segment phagocytosis: use and utility of RPE cells in culture. *Exp. Eye Res.* 126, 51–60

McLeod, D.S., Grebe, R., Bhutto, I., Merges, C., Baba, T., and Lutty, G.A. (2009). Relationship between RPE and choriocapillaris in age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50, 4982–4991

Midena, E., Segato, T., Blarzino, M.C., and Angeli, C.D. (1994). Macular drusen and the sensitivity of the central visual field. *Doc. Ophthalmol.* 88, 179–185

Mitchell, C.H. (2001). Release of ATP by a human retinal pigment epithelial cell line: potential for autocrine stimulation through subretinal space. *J. Physiol.* 534, 193–202

Mitter, S.K., Rao, H.V., Qi, X., Cai, J., Sugrue, A., Dunn, W.A., Grant, M.B., and Boulton, M.E. (2012). Autophagy in the retina: a potential role in age-related macular degeneration. *Adv. Exp. Med. Biol.* 723, 83–90

Mitter, S.K., Song, C., Qi, X., Mao, H., Rao, H., Akin, D., Lewin, A., Grant, M., Dunn, W., Ding, J., et al. (2014). Dysregulated autophagy in the RPE is associated with increased susceptibility to oxidative stress and AMD. *Autophagy* 10, 1989–2005

Mohr, L.K.M., Hoffmann, A.V., Brandstetter, C., Holz, F.G., and Krohne, T.U. (2015). Effects of Inflammasome Activation on Secretion of Inflammatory Cytokines and Vascular Endothelial Growth Factor by Retinal Pigment Epithelial Cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 56, 6404–6413

Monteleone, M., Stow, J.L., and Schroder, K. (2015). Mechanisms of unconventional

secretion of IL-1 family cytokines. *Cytokine* 74, 213–218

Moore, D.J., Hussain, A.A., and Marshall, J. (1995). Age-related variation in the hydraulic conductivity of Bruch's membrane. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 36, 1290–1297

Müller, C., Spital, G., Radermacher, M., Dohrmann, J., Lommatzsch, A., and Pauleikhoff, D. (2002). [Pigment epithelium detachments in AMD (age-associated macular degeneration) and "polypoid choroidal vasculopathy". A fluorescein and indocyanine green angiography study]. *Ophthalmol. Z. Dtsch. Ophthalmol. Ges.* 99, 85–89

Mullins, R.F., and Hageman, G.S. (1999). Human Ocular Drusen Possess Novel Core Domains with a Distinct Carbohydrate Composition. *J. Histochem. Cytochem.* 47, 1533–1539

Mullins, R.F., Russell, S.R., Anderson, D.H., and Hageman, G.S. (2000). Drusen associated with aging and age-related macular degeneration contain proteins common to extracellular deposits associated with atherosclerosis, elastosis, amyloidosis, and dense deposit disease. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 14, 835–846

Muñoz-Planillo, R., Kuffa, P., Martínez-Colón, G., Smith, B.L., Rajendiran, T.M., and Núñez, G. (2013a). K<sup>+</sup> efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity* 38, 1142–1153

Muñoz-Planillo, R., Kuffa, P., Martínez-Colón, G., Smith, B.L., Rajendiran, T.M., and Núñez, G. (2013b). K<sup>+</sup> Efflux Is the Common Trigger of NLRP3 Inflammasome Activation by Bacterial Toxins and Particulate Matter. *Immunity* 38, 1142–1153

Nagineeni, C.N., Kommineni, V.K., William, A., Detrick, B., and Hooks, J.J. (2012). Regulation of VEGF expression in human retinal cells by cytokines: implications for the role of inflammation in age-related macular degeneration. *J. Cell. Physiol.* 227, 116–126

Nalbandian, A., Khan, A.A., Srivastava, R., Llewellyn, K.J., Tan, B., Shukr, N., Fazli, Y.,

Kimonis, V.E., and BenMohamed, L. (2017). Activation of the NLRP3 Inflammasome Is Associated with Valosin-Containing Protein Myopathy. *Inflammation* 40, 21–41

Nandrot, E.F., Kim, Y., Brodie, S.E., Huang, X., Sheppard, D., and Finnemann, S.C. (2004). Loss of synchronized retinal phagocytosis and age-related blindness in mice lacking alphavbeta5 integrin. *J. Exp. Med.* 200, 1539–1545

Neal, M., and Cunningham, J. (1994). Modulation by endogenous ATP of the light-evoked release of ACh from retinal cholinergic neurones. *Br. J. Pharmacol.* 113, 1085–1087

Ng, K.-P., Gugi, B., Renganathan, K., Davies, M.W., Gu, X., Crabb, J.S., Kim, S.R., Rózanowska, M.B., Bonilha, V.L., Rayborn, M.E., et al. (2008). Retinal pigment epithelium lipofuscin proteomics. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 7, 1397–1405

Nickel, W., and Rabouille, C. (2009). Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 148–155

Notomi, S., Hisatomi, T., Kanemaru, T., Takeda, A., Ikeda, Y., Enaida, H., Kroemer, G., and Ishibashi, T. (2011). Critical Involvement of Extracellular ATP Acting on P2RX7 Purinergic Receptors in Photoreceptor Cell Death. *Am. J. Pathol.* 179, 2798–2809

Notomi, S., Hisatomi, T., Murakami, Y., Terasaki, H., Sonoda, S., Asato, R., Takeda, A., Ikeda, Y., Enaida, H., Sakamoto, T., et al. (2013). Dynamic Increase in Extracellular ATP Accelerates Photoreceptor Cell Apoptosis via Ligation of P2RX7 in Subretinal Hemorrhage. *PLoS ONE* 8, e53338

Okada, M., Matsuzawa, A., Yoshimura, A., and Ichijo, H. (2014). The lysosome rupture-activated TAK1-JNK pathway regulates NLRP3 inflammasome activation. *J. Biol. Chem.* 289, 32926–32936

Olchawa, M.M., Furso, J.A., Szewczyk, G.M., and Sarna, T.J. (2017). Lipofuscin-mediated photic stress inhibits phagocytic activity of ARPE-19 cells; effect of donors' age and

antioxidants. *Free Radic. Res.* 51, 799–811

Palade, G. (1975). Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189, 347–358

Pauleikhoff, D., and Holz, F.G. (1996). [Age-related macular degeneration. 1. Epidemiology, pathogenesis and differential diagnosis]. *Ophthalmol. Z. Dtsch. Ophthalmol. Ges.* 93, 299–315

Pauleikhoff, D., Harper, C.A., Marshall, J., and Bird, A.C. (1990). Aging changes in Bruch's membrane. A histochemical and morphologic study. *Ophthalmology* 97, 171–178

Pauleikhoff, D., Zuels, S., Sheraidah, G.S., Marshall, J., Wessing, A., and Bird, A.C. (1992). Correlation between biochemical composition and fluorescein binding of deposits in Bruch's membrane. *Ophthalmology* 99, 1548–1553

Peeters, P.M., Perkins, T.N., Wouters, E.F.M., Mossman, B.T., and Reynaert, N.L. (2013). Silica induces NLRP3 inflammasome activation in human lung epithelial cells. *Part. Fibre Toxicol.* 10, 3

Pelegri, P., and Surprenant, A. (2006). Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 $\beta$  release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J.* 25, 5071–5082

Perregaux, D., and Gabel, C.A. (1994a). Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. *J. Biol. Chem.* 269, 15195–15203

Perregaux, D., and Gabel, C.A. (1994b). Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. *J. Biol. Chem.* 269, 15195–15203

Perregaux, D., Barberia, J., Lanzetti, A.J., Geoghegan, K.F., Carty, T.J., and Gabel, C.A. (1992). IL-1 beta maturation: evidence that mature cytokine formation can be induced specifically by nigericin. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 *149*, 1294–1303

Pétrilli, V., Papin, S., Dostert, C., Mayor, A., Martinon, F., and Tschopp, J. (2007). Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ.* *14*, 1583–1589

Pilgrim, M.G., Lengyel, I., Lanzirrotti, A., Newville, M., Fearn, S., Emri, E., Knowles, J.C., Messinger, J.D., Read, R.W., Guidry, C., et al. (2017). Subretinal Pigment Epithelial Deposition of Drusen Components Including Hydroxyapatite in a Primary Cell Culture Model. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *58*, 708–719

Pizzirani, C., Ferrari, D., Chiozzi, P., Adinolfi, E., Sandonà, D., Savaglio, E., and Di Virgilio, F. (2007). Stimulation of P2 receptors causes release of IL-1beta-loaded microvesicles from human dendritic cells. *Blood* *109*, 3856–3864

Plaza Reyes, A., Petrus-Reurer, S., Antonsson, L., Stenfelt, S., Bartuma, H., Panula, S., Mader, T., Douagi, I., André, H., Hovatta, O., et al. (2016). Xeno-Free and Defined Human Embryonic Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelial Cells Functionally Integrate in a Large-Eyed Preclinical Model. *Stem Cell Rep.* *6*, 9–17

Pressman, B.C. (1973). Properties of ionophores with broad range cation selectivity. *Fed. Proc.* *32*, 1698–1703

Primiano, M.J., Lefker, B.A., Bowman, M.R., Bree, A.G., Hubeau, C., Bonin, P.D., Mangan, M., Dower, K., Monks, B.G., Cushing, L., et al. (2016). Efficacy and Pharmacology of the NLRP3 Inflammasome Inhibitor CP-456,773 (CRID3) in Murine Models of Dermal and Pulmonary Inflammation. *J. Immunol.* *197*, 2421–2433

Pryor, W.A. (1992). Biological effects of cigarette smoke, wood smoke, and the smoke

from plastics: the use of electron spin resonance. *Free Radic. Biol. Med.* 13, 659–676

Qin, J., and Xu, Q. (2014). Functions and application of exosomes. *Acta Pol. Pharm.* 71, 537–543

Rabouille, C., Malhotra, V., and Nickel, W. (2012). Diversity in unconventional protein secretion. *J. Cell Sci.* 125, 5251–5255

Reddy, A., Caler, E.V., and Andrews, N.W. (2001). Plasma membrane repair is mediated by Ca<sup>2+</sup>-regulated exocytosis of lysosomes. *Cell* 106, 157–169

Reigada, D., Lu, W., Zhang, X., Friedman, C., Pendrak, K., McGlenn, A., Stone, R.A., Laties, A.M., and Mitchell, C.H. (2005). Degradation of extracellular ATP by the retinal pigment epithelium. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 289, C617-624

Resnikoff, S., Pascolini, D., Etya'ale, D., Kocur, I., Pararajasegaram, R., Pokharel, G.P., and Mariotti, S.P. (2004). Global data on visual impairment in the year 2002. *Bull. World Health Organ.* 82, 844–851

Rich, R.M., Rosenfeld, P.J., Puliafito, C.A., Dubovy, S.R., Davis, J.L., Flynn, H.W.J., Gonzalez, S., Feuer, W.J., Lin, R.C., Lalwani, G.A., et al. (2006). SHORT-TERM SAFETY AND EFFICACY OF INTRAVITREAL BEVACIZUMAB (AVASTIN) FOR NEOVASCULAR AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION. *RETINA* 26, 495

Riedl, S.J., and Shi, Y. (2004). Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 897–907

Robbins, G.R., Wen, H., and Ting, J.P.-Y. (2014). Inflammasomes and metabolic disorders: old genes in modern diseases. *Mol. Cell* 54, 297–308

Rosenfeld, P.J., Brown, D.M., Heier, J.S., Boyer, D.S., Kaiser, P.K., Chung, C.Y., Kim, R.Y., and MARINA Study Group (2006). Ranibizumab for neovascular age-related



macular degeneration. *N. Engl. J. Med.* 355, 1419–1431

Rothman, J.E. (1994). Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* 372, 55–63

Rózanowska, M., Jarvis-Evans, J., Korytowski, W., Boulton, M.E., Burke, J.M., and Sarna, T. (1995). Blue light-induced reactivity of retinal age pigment. In vitro generation of oxygen-reactive species. *J. Biol. Chem.* 270, 18825–18830

Rózanowska, M., Wessels, J., Boulton, M., Burke, J.M., Rodgers, M.A., Truscott, T.G., and Sarna, T. (1998). Blue light-induced singlet oxygen generation by retinal lipofuscin in non-polar media. *Free Radic. Biol. Med.* 24, 1107–1112

Rubartelli, A., Cozzolino, F., Talio, M., and Sitia, R. (1990). A novel secretory pathway for interleukin-1 beta, a protein lacking a signal sequence. *EMBO J.* 9, 1503–1510

Russo, H.M., Rathkey, J., Boyd-Tressler, A., Katsnelson, M.A., Abbott, D.W., and Dubyak, G.R. (2016). Active Caspase-1 Induces Plasma Membrane Pores That Precede Pyroptotic Lysis and Are Blocked by Lanthanides. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 197, 1353–1367

Sakahira, H., Enari, M., and Nagata, S. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391, 96–99

Sanz, J.M., and Virgilio, F.D. (2000). Kinetics and Mechanism of ATP-Dependent IL-1 $\beta$  Release from Microglial Cells. *J. Immunol.* 164, 4893–4898

Sarks, J., Tang, K., Killingsworth, M., Arnold, J., and Sarks, S. (2006). Development of atrophy of the retinal pigment epithelium around disciform scars. *Br. J. Ophthalmol.* 90, 442–446

Sarks, J.P., Sarks, S.H., and Killingsworth, M.C. (1988). Evolution of geographic atrophy of the retinal pigment epithelium. *Eye Lond. Engl.* 2 ( Pt 5), 552–577

Savill, J., and Fadok, V. (2000). Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407, 784–788

Schraermeyer, U., Esser, P., Grisanti, S., Rack, M., and Heimann, K. (1997). Cytochemical localization of guanylate cyclase in photoreceptor cells of the mouse. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. Albrecht Von Graefes Arch. Für Klin. Exp. Ophthalmol.* 235, 176–179

Schütt, F., Davies, S., Kopitz, J., Holz, F.G., and Boulton, M.E. (2000). Photodamage to human RPE cells by A2-E, a retinoid component of lipofuscin. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 2303–2308

Schütt, F., Bergmann, M., Kopitz, J., and Holz, F.G. (2002). [Detergent-like effects of the lipofuscin retinoid component A2-E in retinal pigment epithelial cells]. *Ophthalmol. Z. Dtsch. Ophthalmol. Ges.* 99, 861–865

Schutt, F., Bergmann, M., Holz, F.G., and Kopitz, J. (2003). Proteins modified by malondialdehyde, 4-hydroxynonenal, or advanced glycation end products in lipofuscin of human retinal pigment epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 3663–3668

Schwartz, S.D., Hubschman, J.-P., Heilwell, G., Franco-Cardenas, V., Pan, C.K., Ostrick, R.M., Mickunas, E., Gay, R., Klimanskaya, I., and Lanza, R. (2012). Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *Lancet Lond. Engl.* 379, 713–720

Schwartz, S.D., Regillo, C.D., Lam, B.L., Elliott, D., Rosenfeld, P.J., Gregori, N.Z., Hubschman, J.-P., Davis, J.L., Heilwell, G., Spirn, M., et al. (2015). Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: follow-up of two open-label phase 1/2 studies. *Lancet Lond. Engl.* 385, 509–516

Scilley, K., Jackson, G.R., Cideciyan, A.V., Maguire, M.G., Jacobson, S.G., and Owsley, C. (2002). Early age-related maculopathy and self-reported visual difficulty in daily life

2The authors have no commercial interests in any device or product mentioned in this article. *Ophthalmology* 109, 1235–1242

Segel, G.B., and Lichtman, M.A. (1976). Potassium transport in human blood lymphocytes treated with phytohemagglutinin. *J. Clin. Invest.* 58, 1358–1369

Shamsi, F.A., and Boulton, M. (2001). Inhibition of RPE lysosomal and antioxidant activity by the age pigment lipofuscin. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 3041–3046

Sharp, F.A., Ruane, D., Claass, B., Creagh, E., Harris, J., Malyala, P., Singh, M., O'Hagan, D.T., Petrilli, V., Tschopp, J., et al. (2009). Uptake of particulate vaccine adjuvants by dendritic cells activates the NALP3 inflammasome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 870–875

Shi, Y. (2002). Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol. Cell* 9, 459–470

Shi, H., Zhang, Z., Wang, X., Li, R., Hou, W., Bi, W., and Zhang, X. (2015). Inhibition of autophagy induces IL-1 $\beta$  release from ARPE-19 cells via ROS mediated NLRP3 inflammasome activation under high glucose stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 463, 1071–1076

Shirasaki, Y., Yamagishi, M., Suzuki, N., Izawa, K., Nakahara, A., Mizuno, J., Shoji, S., Heike, T., Harada, Y., Nishikomori, R., et al. (2015). Real-time single-cell imaging of protein secretion. *Sci. Rep.* 4

Simpson, R.J., Jensen, S.S., and Lim, J.W.E. (2008). Proteomic profiling of exosomes: current perspectives. *Proteomics* 8, 4083–4099

Skog, J., Würdinger, T., van Rijn, S., Meijer, D.H., Gainche, L., Sena-Esteves, M., Curry, W.T., Carter, B.S., Krichevsky, A.M., and Breakefield, X.O. (2008). Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide

diagnostic biomarkers. *Nat. Cell Biol.* 10, 1470–1476

Smith, W., and Mitchell, P. (1998). Family history and age-related maculopathy: the Blue Mountains Eye Study. *Aust. N. Z. J. Ophthalmol.* 26, 203–206

Smith, W., Mitchell, P., Leeder, S.R., and Wang, J.J. (1998). Plasma fibrinogen levels, other cardiovascular risk factors, and age-related maculopathy: the Blue Mountains Eye Study. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill* 1960 116, 583–587

Steinmetz, R.L., Haimovici, R., Jubb, C., Fitzke, F.W., and Bird, A.C. (1993). Symptomatic abnormalities of dark adaptation in patients with age-related Bruch's membrane change. *Br. J. Ophthalmol.* 77, 549–554

Stratmann, N.K. (2009). Einfluss von Lipidperoxidationen auf die Lipofuszinogenese im retinalen Pigmentepithel

Stutz, A., Golenbock, D.T., and Latz, E. (2009). Inflammasomes: too big to miss. *J. Clin. Invest.* 119, 3502–3511

Sui, G.-Y., Liu, G.-C., Liu, G.-Y., Gao, Y.-Y., Deng, Y., Wang, W.-Y., Tong, S.-H., and Wang, L. (2013). Is sunlight exposure a risk factor for age-related macular degeneration? A systematic review and meta-analysis. *Br. J. Ophthalmol.* 97, 389–394

Sunness, J.S. (1999). The natural history of geographic atrophy, the advanced atrophic form of age-related macular degeneration. *Mol. Vis.* 5, 25

Tarallo, V., Hirano, Y., Gelfand, B.D., Dridi, S., Kerur, N., Kim, Y., Cho, W.G., Kaneko, H., Fowler, B.J., Bogdanovich, S., et al. (2012). DICER1 loss and Alu RNA induce age-related macular degeneration via the NLRP3 inflammasome and MyD88. *Cell* 149, 847–859

Tate, D.J., Miceli, M.V., and Newsome, D.A. (1995). Phagocytosis and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce catalase and metallothionein gene expression in human retinal pigment epithelial cells.

Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 36, 1271–1279

Taylor, H.R., West, S., Muñoz, B., Rosenthal, F.S., Bressler, S.B., and Bressler, N.M. (1992). The long-term effects of visible light on the eye. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill 1960* 110, 99–104

Thornberry, N.A., Bull, H.G., Calaycay, J.R., Chapman, K.T., Howard, A.D., Kostura, M.J., Miller, D.K., Molineaux, S.M., Weidner, J.R., and Aunins, J. (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 356, 768–774

Tomany, S.C., Cruickshanks, K.J., Klein, R., Klein, B.E.K., and Knudtson, M.D. (2004). Sunlight and the 10-year incidence of age-related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill 1960* 122, 750–757

Trotta, M.C., Maisto, R., Guida, F., Boccella, S., Luongo, L., Balta, C., D'Amico, G., Herman, H., Hermenean, A., Bucolo, C., et al. (2019). The activation of retinal HCA2 receptors by systemic beta-hydroxybutyrate inhibits diabetic retinal damage through reduction of endoplasmic reticulum stress and the NLRP3 inflammasome. *PLOS ONE* 14, e0211005

Tseng, W.A., Thein, T., Kinnunen, K., Lashkari, K., Gregory, M.S., D'Amore, P.A., and Ksander, B.R. (2013). NLRP3 Inflammasome Activation in Retinal Pigment Epithelial Cells by Lysosomal Destabilization: Implications for Age-Related Macular Degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 54, 110–120

Tsukamoto, H., and Lu, S.C. (2001). Current concepts in the pathogenesis of alcoholic liver injury. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 15, 1335–1349

Ugurlu, S., Ucar, D., Seyahi, E., Hatemi, G., and Yurdakul, S. (2012). Canakinumab in a patient with juvenile Behcet's syndrome with refractory eye disease. *Ann. Rheum. Dis.* 71, 1589–1591

Varma, R., Fraser-Bell, S., Tan, S., Klein, R., Azen, S.P., and Los Angeles Latino Eye Study Group (2004). Prevalence of age-related macular degeneration in Latinos: the Los Angeles Latino eye study. *Ophthalmology* 111, 1288–1297

Verhoeff, F.H., and Grossman, H.P. (1937). The Pathogenesis of Disciform Degeneration of the Macula. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* 35, 262–294

Vitale, A., Rigante, D., Caso, F., Brizi, M.G., Galeazzi, M., Costa, L., Franceschini, R., Lucherini, O.M., and Cantarini, L. (2014). Inhibition of interleukin-1 by canakinumab as a successful mono-drug strategy for the treatment of refractory Behçet's disease: a case series. *Dermatol. Basel Switz.* 228, 211–214

Wang, A.L., Lukas, T.J., Yuan, M., Du, N., Tso, M.O., and Neufeld, A.H. (2009). Autophagy and exosomes in the aged retinal pigment epithelium: possible relevance to drusen formation and age-related macular degeneration. *PLoS One* 4, e4160

Wang, L., Schmidt, S., Larsen, P.P., Meyer, J.H., Roush, W.R., Latz, E., Holz, F.G., and Krohne, T.U. (2019). Efficacy of novel selective NLRP3 inhibitors in human and murine retinal pigment epithelial cells. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 97, 523–532

Wang, Y., Abu-Asab, M., Shen, D., Chu, X., Ogilvy, A., Tuo, J., and Chan, C.-C. (2013). NLRP3 inflammasome activation in human retinal pigment epithelium under inflammation and oxidative stress | IOVS | ARVO Journals

Wang, Y., Hanus, J.W., Abu-Asab, M.S., Shen, D., Ogilvy, A., Ou, J., Chu, X.K., Shi, G., Li, W., Wang, S., et al. (2016). NLRP3 Upregulation in Retinal Pigment Epithelium in Age-Related Macular Degeneration. *Int. J. Mol. Sci.* 17

Warner, S.J., Auger, K.R., and Libby, P. (1987). Interleukin 1 induces interleukin 1. II. Recombinant human interleukin 1 induces interleukin 1 production by adult human vascular endothelial cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 139, 1911–1917

Wassell, J., Davies, S., Bardsley, W., and Boulton, M. (1999). The photoreactivity of the retinal age pigment lipofuscin. *J. Biol. Chem.* 274, 23828–23832

WHO (2019). WHO | Priority eye disease

Wihlmark, U., Wrigstad, A., Roberg, K., Nilsson, S.E., and Brunk, U.T. (1997). Lipofuscin accumulation in cultured retinal pigment epithelial cells causes enhanced sensitivity to blue light irradiation. *Free Radic. Biol. Med.* 22, 1229–1234

Winkler, B.S., Boulton, M.E., Gottsch, J.D., and Sternberg, P. (1999). Oxidative damage and age-related macular degeneration. *Mol. Vis.* 5, 32

Wong, W.L., Su, X., Li, X., Cheung, C.M.G., Klein, R., Cheng, C.-Y., and Wong, T.Y. (2014). Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob. Health* 2, e106–e116

Wree, A., Eguchi, A., McGeough, M.D., Pena, C.A., Johnson, C.D., Canbay, A., Hoffman, H.M., and Feldstein, A.E. (2014). NLRP3 inflammasome activation results in hepatocyte pyroptosis, liver inflammation, and fibrosis in mice. *Hepatology* 59, 898–910

Yamanashi, T., Iwata, M., Kamiya, N., Tsunetomi, K., Kajitani, N., Wada, N., Iitaka, T., Yamauchi, T., Miura, A., Pu, S., et al. (2017). Beta-hydroxybutyrate, an endogenous NLRP3 inflammasome inhibitor, attenuates stress-induced behavioral and inflammatory responses. *Sci. Rep.* 7, 7677

Yang, D., Elner, S.G., Clark, A.J., Hughes, B.A., Petty, H.R., and Elner, V.M. (2011). Activation of P2X receptors induces apoptosis in human retinal pigment epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 1522–1530

Youle, R.J., and Narendra, D.P. (2011). Mechanisms of mitophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 9–14

Youm, Y.-H., Nguyen, K.Y., Grant, R.W., Goldberg, E.L., Bodogai, M., Kim, D., D'Agostino, D., Planavsky, N., Lupfer, C., Kanneganti, T.D., et al. (2015). The ketone metabolite  $\beta$ -hydroxybutyrate blocks NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory disease. *Nat. Med.* 21, 263–269

Young, R.W. (1967). The renewal of photoreceptor cell outer segments. *J. Cell Biol.* 33, 61–72

Yu, D.-Y., and Cringle, S.J. (2005). Retinal degeneration and local oxygen metabolism. *Exp. Eye Res.* 80, 745–751

Zhang, X., Zhang, J.-H., Chen, X.-Y., Hu, Q.-H., Wang, M.-X., Jin, R., Zhang, Q.-Y., Wang, W., Wang, R., Kang, L.-L., et al. (2015). Reactive Oxygen Species-Induced TXNIP Drives Fructose-Mediated Hepatic Inflammation and Lipid Accumulation Through NLRP3 Inflammasome Activation. *Antioxid. Redox Signal.* 22, 848–870

Zhao, M., Bai, Y., Xie, W., Shi, X., Li, F., Yang, F., Sun, Y., Huang, L., and Li, X. (2015). Interleukin-1 $\beta$  Level Is Increased in Vitreous of Patients with Neovascular Age-Related Macular Degeneration (nAMD) and Polypoidal Choroidal Vasculopathy (PCV). *PloS One* 10, e0125150

Zhou, R., Yazdi, A.S., Menu, P., and Tschopp, J. (2011). A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 469, 221–225



## 9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich von Herzen für die Unterstützung und die vielen hilfreichen Vorschläge und Anregungen bedanken, die mir die Ausfertigung dieser Arbeit erleichtert und sie überhaupt erst möglich gemacht haben.

Besonders möchte ich Herrn Prof. Dr. med T. U. Krohne danken, zum einen für die Möglichkeit dieses spannende Thema erforschen zu dürfen und zum anderen für seine unentwegte Motivation und Unterstützung.

Weiterhin gilt mein Dank Prof. Dr. med F. G. Holz für die Förderung der Forschung an der Universitäts-Augenklinik Bonn und für die Möglichkeit meine Arbeit in der Klinik und auf nationalen Kongressen präsentieren zu dürfen.

Herzlich bedanke ich mich auch bei Frau Dr. rer. nat. Carolina Brandstetter für die Einarbeitung im Labor, ihre motivierende und geduldige Art und Hilfe in allen Belangen.

Außerdem möchte ich der Else-Kröner-Fresenius-Stiftung und dem **Bonner Promotionskolleg „Neuroimmunology“ (BonnNI)** für die Förderung dieser Arbeit durch ein Promotionsstipendium danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt dem gesamten Laborteam der Augenklinik. Auf der einen Seite für die wissenschaftliche Unterstützung und die spannenden Diskussionen und auf der anderen Seite für das entspannte und angenehme Arbeitsklima. Das Team und unsere gemeinsame Zeit werde ich in guter Erinnerung behalten. Herzlichen Dank an Johanna Mayer, Janine Marx, Claudine Strack, Martha Kilian, Wolf Harmening, Michael Linden, Jenny Reiniger, Niklas Domdei, Lennart Domdei, Petra Larsen, Sarah Schmidt, Luping Wang, Franziska Lörch und Heike Laser-Junga.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mich jederzeit in vielerlei Hinsicht, vor allem aber moralisch, bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt und motiviert haben.