

Hemmung des NLRP3-Inflammasoms in humanen RPE-Zellen als pharmakologischer Ansatz zur Behandlung der altersabhängigen Makuladegeneration

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

Sarah Schmidt
aus München
2023

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Tim U. Krohne
2. Gutachter: Prof. Dr. Harald Neumann

Tag der Mündlichen Prüfung: 21.03.2023

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

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	12
1.1 Altersabhängige Makuladegeneration (AMD)	12
1.1.1 Epidemiologie	12
1.1.2 Klassifikation	13
1.1.3 Symptomatik	15
1.1.4 Therapie	15
1.2 Das retinale Pigmentepithel (RPE)	16
1.3 Pathogenese	17
1.4 Oxidativer Stress in der AMD	17
1.4.1 Lipidperoxidation	18
1.4.2 Deuterierte mehrfach ungesättigte Fettsäuren (D-PUFAs)	19
1.5 Inflammation in der AMD	20
1.5.1 Pattern recognition receptors (PRRs)	21
1.5.2 Das NLRP3-Inflammasom	22
1.5.2.1 Aufbau	22
1.5.2.2 Aktivierung	23
1.5.3 Der P2X7-Rezeptor	25
1.5.4 Direkte NLRP3-Inhibitoren	28
1.6 Fragestellung	30
2. Material und Methoden	31
2.1 Material	31
2.1.1 Zelllinien	31
2.1.2 Medien	31
2.1.3 Reagenzien	32
2.1.4 Antikörper	34
2.1.5 Kit-Systeme	34

2.1.6	Verbrauchsmaterial	35
2.1.7	Geräte	36
2.1.8	Software	36
2.2	Methoden	37
2.2.1	Zellkultur	37
2.2.1.1	ARPE-19-Zellen	37
2.2.1.2	THP-1-Zellen	41
2.2.2	Immunfluoreszenzfärbung	43
2.2.3	Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms	44
2.2.4	Inhibierung des NLRP3-Inflammasoms	44
2.2.4.1	Ansetzen der D-PUFAs	44
2.2.4.2	Small molecule inhibitors	45
2.2.5	LDH-Zytotoxizitätsassay	45
2.2.6	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	47
2.2.7	Westernblot	49
2.2.8	Statistische Auswertung	54
3.	Ergebnisse	55
3.1	Etablierung des ARPE-19-Zellkulturmodells	55
3.1.1	Charakterisierung der verwendeten humanen RPE-Zelllinie	55
3.2	Zellkulturmodell 1: Inflammasomaktivierung durch lysosomale Membranpermeabilisation	56
3.2.1	Effekt von Konzentration und Priming auf die Leu-Leu-OMe-induzierte Inflammasomaktivierung	56
3.3	Zellkulturmodell 2: Inflammasomaktivierung durch oxidativen Stress	58
3.3.1	Effekt von Konzentration und Priming auf die H ₂ O ₂ -induzierte Inflammasomaktivierung	58
3.3.2	Effekt deuterierter mehrfach ungesättigter Fettsäuren auf die H ₂ O ₂ -induzierte Inflammasomaktivierung	60
3.4	Zellkulturmodell 3: Inflammasomaktivierung über den P2X7-Rezeptor	61

3.4.1	THP-1-Zellen	62
3.4.1.1	Effekt von Konzentration und Priming auf die BzATP-induzierte Inflammasomaktivierung	62
3.4.1.2	Effekt der Inkubationszeit auf die BzATP-induzierte Inflammasomaktivierung	63
3.4.2	ARPE-19-Zellen	64
3.4.2.1	Effekt von Konzentration und divalenten Kationen auf die BzATP-induzierte Inflammasomaktivierung	64
3.4.2.2	Effekt verschiedener Medien auf die Zytotoxizität nach 24-stündiger Inkubation	66
3.4.2.3	Effekt von Priming auf die BzATP-induzierte Inflammasomaktivierung	67
3.4.2.4	Effekt der Inkubationszeit auf die BzATP-induzierte Inflammasomaktivierung	69
3.4.2.5	Effekt von MCC950 auf die BzATP-induzierte Inflammasomaktivierung	70
3.4.2.6	Effekt von IFM-632 auf die BzATP-induzierte Inflammasomaktivierung	71
3.4.2.7	Vergleich der Inhibitoren IFM-632 und MCC950	72
3.5	BzATP als Priming-Faktor des NLRP3-Inflammasoms	73
4.	Diskussion	75
4.1	ARPE-19-Zellen als Zellkulturmodell	75
4.2	Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms in ARPE-19-Zellen	76
4.3	Etablierung des P2X7-Modells in ARPE-19-Zellen	76
4.4	Messung der NLRP3-Inflammasomaktivierung anhand der LDH- und IL-1 β -Freisetzung	79
4.5	Therapeutische Ansätze zur Behandlung der AMD	80
4.6.	Fehlende Wirksamkeit von D-PUFAs im H ₂ O ₂ -Modell	81
4.7	Signifikante Reduktion der Inflammasomaktivierung durch die direkten NLRP3-Inhibitoren IFM-632 und MCC950	82

5.	Zusammenfassung	84
6.	Abbildungsverzeichnis	85
7.	Tabellenverzeichnis	88
8.	Literaturverzeichnis	89
9.	Danksagung	101

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC4	ATP-binding cassette transporter 4
ADP	Adenosindiphosphat
AIM2	Absent in melanoma 2
Alu-RNA	Arthrobacter luteus-RNA (Ribonukleinsäure)
AMD	Altersabhängige Makuladegeneration
AML	Akute Myeloische Leukämie
ANOVA	Varianzanalyse (Analysis of variance)
Aqua dest.	Aqua destillata
AREDS	Age-Related Eye Disease Study
ARPE-19	Arising retinal pigment epithelia
ASC	Adaptor molecule apoptosis-associated speck-like protein
ATCC	American Type Cultur Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BBG	Brilliant Blue G
BSA	Bovines Serumalbumin
BzATP	2' (3') -O-(4-Benzoylbenzoyl) -ATP
Ca ²⁺	Calcium
CAPS	Cyropyrin-associated periodic syndromes
CARD	Caspase recruiting domain
CDSs	Cytosolic DNA sensors

CLRs	C-type-lectin-like receptors
CRIDs	Cytokine-release inhibitory drugs
C-Terminus	Carboxyl-Terminus (-COOH)
D2-Lin	11,11-D2-Linolsäure (RT001)
D4- α -Lnn	11,11,14,14-D4- α -Linolensäure
DAMPs	Damage-associated molecular patterns
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOC	Deoxycholic acid
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
D-PUFAs	Deuterated polyunsaturated fatty acids
DTT	Dithiothreitol
EC50	Halbmaximale effektive Konzentration
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EU	Europäische Union
FBS	Fetales Rinderserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HNE	4-Hydroxynonenal

IC50	Halbmaximale inhibitorische Konzentration
IL	Interleukin
IPAF	Ice protease-activating factor
LDH	Lactat-Dehydrogenase
Leu-Leu-OMe	L-leucyl-L-leucyl-Methylester (LLO)
Lin	Linolsäure
LMP	Lysosomale Membranpermeabilisation
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucin-rich-repeat
MDA	Malondialdehyd
MDP	Muramyl dipeptide
Mg ²⁺	Magnesium
mRNA	Messenger-RNA (Ribonukleinsäure)
n.d.	not determined
NACHT	NAIP (neuronal apoptosis inhibitor protein), C2TA (Class II Major Histocompatibility Complex Transactivator), HET-E (incompatibility locus protein from <i>Podospora anserina</i>), TP1 (telomerase-associated protein)
NAD ⁺ /NADH/H ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid
NF-κB	Nuclear factor kappa B
NLRC4	NLR family CARD domain containing 4
NLRP	Nucleotide-binding oligomerization domain, Leucine rich Repeat and Pyrin domain containing
NLRs	NOD-like receptors

NOD	Nucleotide-binding oligomerization domain
NP-40	Nonylphenoxypolyethoxylethanol
N-Terminus	Amino-Terminus (-NH2)
OH•	Hydroxylradikal
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PBS	Phosphate buffered saline
PBST	PBS-Tween
PFA	Paraformaldehyd
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PRRs	Pattern recognition receptors
PRN	Pro-re-nata
PYD	Pyrin domaine
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
R•	Alkylradikal
R-00•	Peroxylradikal
RLRs	RIG-like receptors
ROS	Reactive oxygen species
RPE	Retinales Pigmentepithel
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
T&E	Treat&extend
Tab.	Tabelle
THP-1	Tohoku Hospital Pediatrics-1

TLRs	Toll-like receptors
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TRX	Thioredoxin
TXNIP	Thioredoxin-interacting protein
UDP	Uridindiphosphat
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
VEGF	Vascular endothelial growth factor
w	With (mit)
w/o	Without (ohne)
ZO-1	Zonula occludens 1
α-Lnn	α-Linolensäure

1. Einleitung

1.1 Altersabhängige Makuladegeneration (AMD)

Die altersabhängige Makuladegeneration (AMD) ist eine degenerative Netzhauterkrankung, bei der es durch den Untergang von Photorezeptorzellen im Bereich der Netzhautmitte (Makula) zu einem progredienten Verlust des zentralen Sehens kommt (Arroyo, 2020; Holz et al., 2011).

1.1.1 Epidemiologie

Weltweit macht die AMD nach der Katarakt und dem Glaukom die dritthäufigste Erblindungsursache aus. In Deutschland und allen anderen Industrienationen stellt sie mit 40-50 % den mit Abstand häufigsten Grund für Blindheit dar, gefolgt vom Glaukom und der diabetischen Retinopathie (Finger et al., 2011; Resnikoff et al., 2004).

Nach epidemiologischen Schätzungen von 2017 ist jeder vierte Europäer ab dem 60. Lebensjahr an AMD erkrankt. Damit sind allein in der Europäischen Union (EU) ca. 34 Millionen Menschen betroffen, davon etwa 5,8 Millionen Menschen in Deutschland. Infolge des demographischen Wandels ist bis zum Jahre 2050 in der EU mit einer weiteren Zunahme der Prävalenz um bis zu 25 % zu rechnen (Li et al., 2017).

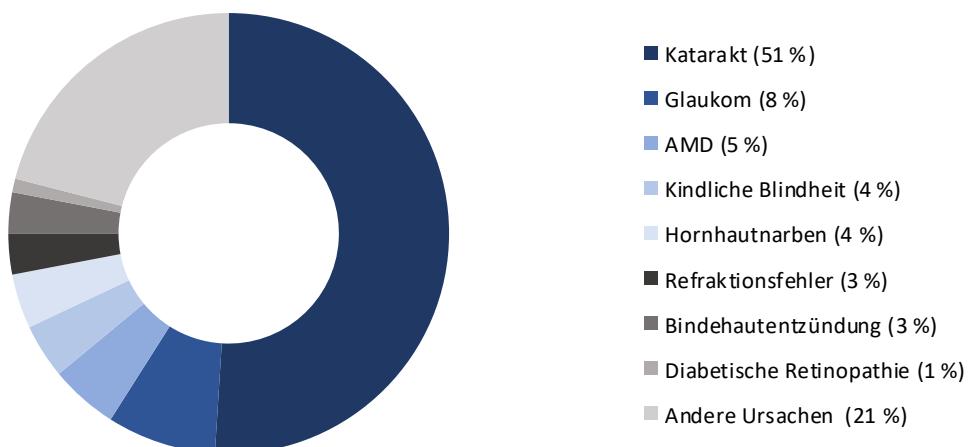


Abb. 1: Die häufigsten Ursachen für Erblindung weltweit (Robert Koch-Institut (RKI), 2017)

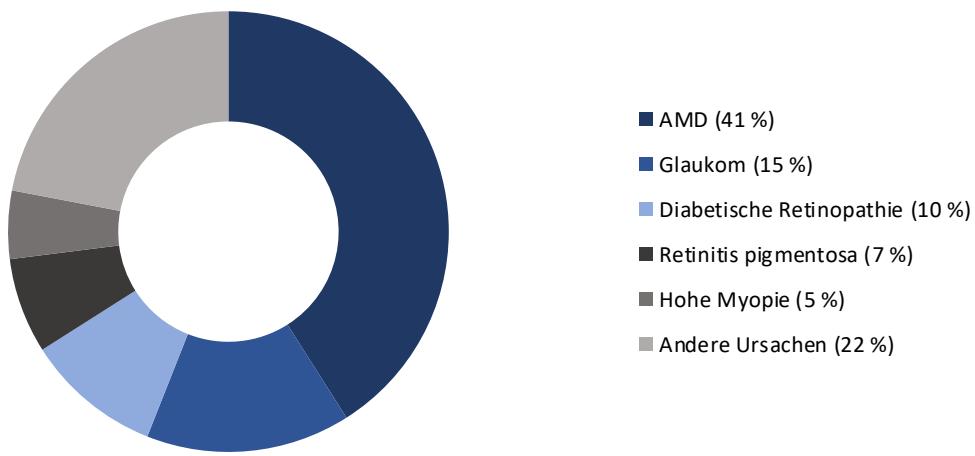


Abb. 2: Die häufigsten Ursachen für Erblindung in Deutschland (Robert Koch-Institut (RKI), 2017)

Auch wenn systematisch erhobene Daten zu den Auswirkungen hochgradiger Sehbehinderung und Blindheit in Deutschland fehlen (Robert Koch-Institut (RKI), 2017), sind die sozialen und volkswirtschaftlichen Folgen, die durch die AMD hervorgerufen werden, erheblich (Li et al., 2017). Zentrales Sehen ist entscheidend für wichtige Alltagsaktivitäten wie Lesen, Autofahren und Gesichtserkennung (Arroyo, 2020; Brandstetter, 2016). Gehen diese Fähigkeiten verloren, wird die Alltagskompetenz der Betroffenen deutlich eingeschränkt. Dies führt nicht nur zu einer reduzierten Lebensqualität, sondern fördert auch das Auftreten psychischer Erkrankungen wie Depression und Angststörungen und trägt zu einer erhöhten Arbeitslosenquote bei (Li et al., 2017).

1.1.2 Klassifikation

Klinisch wird die AMD in ein Frühstadium und ein Spätstadium unterteilt (Berufsverband der Augenärzte Deutschlands e.V. (BVA), Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft e.V. (DOG), 2015; Holz et al., 2011). Zu Beginn der Erkrankung lassen sich in der Fundoskopie sogenannte Drusen nachweisen. Dabei handelt es sich um gelblich-weiße Ablagerungen unterhalb der Retina, die aus Stoffwechselabbauprodukten wie Lipiden, Lipoproteinen, Zelldebris und Komplementfaktoren bestehen. Zudem lassen sich fokale Hyper- und Hypopigmentierungen der Netzhaut feststellen (Holz et al., 2011). Je nach Größe der

Drusen und Art der Pigmentveränderungen, wird im Frühstadium zwischen einer frühen und intermediären Form der AMD differenziert (Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft (DOG) et al., 2014). Im fortgeschrittenen Stadium der AMD werden zwei Verlaufsformen unterschieden, die geographische Atrophie und die neovaskuläre AMD (Holz et al., 2011). Dabei tritt die neovaskuläre AMD etwa doppelt so häufig auf wie die geographische Atrophie und ist für ca. 80 % der Fälle schweren Sehverlusts verantwortlich (Arroyo, 2020; Kaszubski et al., 2016). Bei der geographischen Atrophie kommt es zu einem Untergang des retinalen Pigmentepithels, in dessen Folge auch die benachbarten Photorezeptorzellen zugrunde gehen. So bilden sich landkartenähnlich konfluierende Atrophiezonen im Bereich der Makula aus, die in ihrer Spätform als geographische Atrophie bezeichnet werden. Bei der neovaskulären Verlaufsform der AMD kommt es dagegen getriggert durch den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) zu einem Einsprießen von Gefäßen aus der Choriokapillaris durch die Bruch'sche Membran in den subretinalen Raum. Diese choroidalen Neovaskularisationen neigen zu Gefäßleckagen, sodass sich Flüssigkeitsansammlungen bzw. Hämorrhagien unterhalb der Retina ausbilden, die zu Abhebungen und Rissen der Retina sowie im Endstadium zu der Entstehung einer disziformen Narbe führen (Berufsverband der Augenärzte Deutschlands e.V. (BVA), Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft e.V. (DOG), 2015; Holz et al., 2011).

Tab. 1: Stadieneinteilung der AMD (Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft (DOG) et al., 2014; Ferris et al., 2013)

Klassifikation der AMD	Definition (bewertet innerhalb 2 Papillendurchmessern um die Fovea in einem von beiden Augen)
Keine Altersveränderungen	Keine Drusen und keine AMD-Pigmentveränderungen*
Normale Altersveränderungen	Nur Drupelets (kleine Drusen $\leq 63 \mu\text{m}$) und keine AMD-Pigmentveränderungen*
Frühe AMD	Mittlere Drusen $>63 \mu\text{m}$ und $\leq 125 \mu\text{m}$ und keine AMD-Pigmentveränderungen*
Intermediäre AMD	Große Drusen $>125 \mu\text{m}$ und/oder jegliche AMD-Pigmentveränderungen*
Späte AMD	Neovaskuläre AMD und/oder jegliche geographische Atrophie

*AMD-Pigmentveränderungen = jede definitive Hyper- oder Hypopigmentierung assoziiert mit mittleren oder großen Drusen, aber nicht assoziiert mit anderen bekannten Netzhauterkrankungen

1.1.3 Symptomatik

In den frühen Stadien der AMD sind die Patienten meist asymptomatisch. Im Verlauf der Erkrankung kommt es jedoch zu einer zunehmenden Beeinträchtigung des zentralen Sehens. Bei der geographischen Atrophie bildet sich diese langsam und progredient aus, bei der neovaskulären AMD kommt es typischerweise zu plötzlichen Verschlechterungen des zentralen Sehens im Zeitraum von wenigen Tagen bis Wochen (Arroyo, 2020). Die Patienten berichten von zentralen Gesichtsfeldausfällen (Skotomen) sowie bei der neovaskulären AMD über das verzerrte Wahrnehmen gerader Linien (Metamorphopsien) (Lim et al., 2012).

1.1.4 Therapie

Seit 2007 stehen zur Behandlung der neovaskulären Form der AMD VEGF-Inhibitoren zur Verfügung, die intravitreal appliziert werden und den Krankheitsverlauf verlangsamen (Brown et al., 2006; Rosenfeld et al., 2006). Mittlerweile sind in dieser Indikation die Medikamente Ranibizumab (Lucentis), Aflibercept (Eylea) und Brolucizumab (Beovu) zugelassen. Off-label steht zudem das Präparat Bevacizumab (Avastin) zur Verfügung. Das Therapieschema sieht vor, dass die Patienten zunächst drei intravitreale Medikamentengaben im Abstand von jeweils vier Wochen zueinander erhalten. Anschließend werden zwei verschiedene Behandlungsstrategien angewandt. Bei dem pro-re-nata (PRN) Behandlungskonzept werden die Patienten monatlich nachkontrolliert. Dabei werden weitere Injektionen nur bei Zeichen der Krankheitsaktivität vorgenommen. Bei dem Treat&Extend (T&E)-Konzept wird das Behandlungsintervall bei jeder Kontrolle angepasst und das Injektionsintervall je nach Krankheitsaktivität um zwei Wochen verlängert oder verkürzt (Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft (DOG) et al., 2020; Joussen und Bornfeld, 2009).

Für die geographische Atrophie gibt es dagegen trotz intensiver Forschungsbemühungen bislang immer noch keine wirksamen Therapieoptionen (Arroyo, 2020; Holz et al., 2011). In den Frühphasen der Erkrankung wird zur Verlangsamung der Krankheitsprogression nach dem AREDS-Protokoll die prophylaktische Einnahme der Antioxidantien Vitamin E (400 I.E.), Vitamin C (500 mg), beta-Carotin (15 mg) sowie Zink (80 mg) empfohlen.

Insbesondere für das Endstadium der geographischen Atrophie gibt es allerdings bislang keine wirksamen Behandlungsmöglichkeiten (Age-Related Eye Disease Study Research Group, 2001; Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft (DOG) et al., 2014).

Dieser Mangel an Therapieoptionen gepaart mit der hohen Anzahl Betroffener unterstreicht die Notwendigkeit, die Pathophysiologie der Erkrankung weiter zu erforschen, um neue Therapieansätze entwickeln zu können.

1.2 Das retinale Pigmentepithel (RPE)

Studien haben mittlerweile übereinstimmend nachgewiesen, dass der Ausgangspunkt der Erkrankung im retinalen Pigmentepithel liegt, dessen Funktionsverlust dem Untergang der Photorezeptorzellen vorausgeht (Sparrow et al., 2010; Strauss, 2005; Young, 1987).

Bei dem retinalen Pigmentepithel handelt es sich um eine einlagige Schicht pigmentierter Zellen, die zwischen der Photorezeptorschicht der Retina und der Bruch'schen Membran gelegen ist. Entwicklungsgeschichtlich leiten sich diese Zellen aus der Augenblase ab und sind daher ebenso wie der neurosensorische Anteil der Retina neuroektodermen Ursprungs. Das RPE übernimmt eine Vielzahl an Aufgaben, die wichtig für die Funktion und das Überleben der retinalen Photorezeptorzellen sind, und ist daher entscheidend für die Aufrechterhaltung des Sehvermögens. Die durch Tight junctions verbundene Epithelzellschicht des RPE bildet die sogenannte äußere Blut-Retina-Schranke, die zusammen mit der inneren Blut-Retina-Schranke des Netzhautgefäßendothels das Eindringen von Immunzellen und Makromolekülen in die Retina verhindert. Darüber hinaus erfüllt das RPE eine Reihe von metabolischen Funktionen. So ist das RPE an dem Austausch von Nährstoffen, Ionen und Stoffwechselprodukten zwischen Choriokapillaris und Retina beteiligt und hält durch die Pufferung von Ionen im subretinalen Raum die Erregbarkeit der Photorezeptorzellen aufrecht. Zudem sorgt das RPE für die Reisomerisierung von all-trans-retinal zu 11-cis-retinol im Rahmen des Sehzzyklus sowie für die Phagozytose und den lysosomalen Abbau der Photorezeptor-Außensegmente. Eine weitere wichtige Funktion besteht in der Absorption von Licht. Die RPE-Zellen verfügen zu diesem Zweck über spezielle Zellorganellen, die Melanosomen, die das Pigment Melanin enthalten. Damit absorbiert das RPE ein Großteil des einfallenden UV-

Lichts und schützt die Retina vor Streulicht sowie photooxidativen Schäden (Sparrow et al., 2010; Strauss, 2005).

1.3 Pathogenese

Bei der AMD handelt es sich um eine komplexe multifaktorielle Erkrankung, deren genaue Pathogenese immer noch unzureichend verstanden ist (Finger et al., 2011; Holz et al., 2011; Li et al., 2017; Roth et al., 2004; Scholl et al., 2007). Neben dem Alter gelten als Hauptsrisikofaktoren Nikotinabusus, Übergewicht, fettreiche Ernährung sowie kardiovaskuläre Erkrankungen. Aber auch genetischen Faktoren wird eine wichtige Rolle in der Krankheitsentstehung zugeschrieben. Hier sind vor allem Gene betroffen, die an der Regulation von Komplementproteinen, Lipiden, der extrazellulären Matrix und Angiogenese beteiligt sind (Lim et al., 2012; Scholl et al., 2007).

In den letzten Jahren haben sich insbesondere zwei zelluläre Prozesse herauskristallisiert, die entscheidend zu der Entwicklung der AMD beitragen: oxidativer Stress sowie eine chronische Entzündungsreaktion im Sub-RPE-Raum, ausgelöst durch eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems (Ambati et al., 2013; Anderson et al., 2002; Anderson et al., 2010; Beatty et al., 2000; Bok, 2005; Brown et al., 2006; Kauppinen et al., 2016).

1.4 Oxidativer Stress in der AMD

Ergebnisse zahlreicher Studien belegen, dass oxidative Schädigungsmechanismen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der AMD spielen (Beatty et al., 2000). So konnte die AREDS-Studie von 2001 zeigen, dass die regelmäßige Einnahme antioxidativer Nahrungsergänzungsmittel einen protektiven Effekt auf die Krankheitsprogression ausübt (Age-Related Eye Disease Study Research Group, 2001).

Im Alter lassen die antioxidativen Reparaturmechanismen in RPE-Zellen zunehmend nach, sodass die Zellen vermehrt oxidativem Stress ausgesetzt sind (Beatty et al., 2000; Hill et al., 2011). Besonders gefährdet durch oxidativen Stress sind mehrfach ungesättigte

Fettsäuren, die sich unter anderem in der Zellmembran, aber auch in den Membranen der Zellorganellen befinden (Hill et al., 2012).

1.4.1 Lipidperoxidation

Freie Sauerstoffradikale wie Hydroxylradikale ($\text{OH}\cdot$) reagieren mit ungesättigten Fettsäuren, indem sie ihnen ein Wasserstoff-Atom entziehen. Dabei entsteht ein Alkyrradikal ($\text{R}\cdot$), das wiederum mit Sauerstoff zu einem Peroxylradikal ($\text{R}-\text{OO}\cdot$) reagiert. Durch Abspaltung eines Wasserstoffatoms aus einem weiteren Fettsäuremolekül entsteht schließlich als stabiles Endprodukt ein Lipidhydroperoxid sowie ein neues Fettsäure-Radikal. Damit wird eine autokatalytische Kettenreaktion in Gang gesetzt, die erst zum Erliegen kommt, wenn zwei Radikale unter Bildung einer kovalenten Bindung zu einem stabilen Nicht-Radikal reagieren oder das Radikal auf einen Radikalfänger übertragen wird. Dieser Prozess wird als Lipidperoxidation bezeichnet (Schönfelder, 1999).

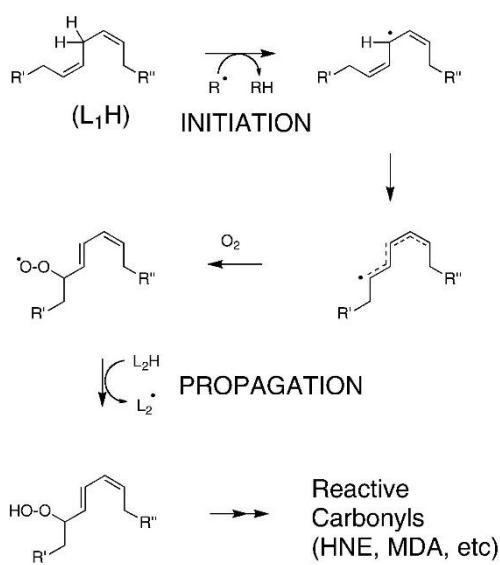


Abb. 3: Lipidperoxidation mit autokatalytischer Kettenreaktion (Hill et al., 2011)

Eine besonders hohe Dichte an mehrfach ungesättigten Fettsäuren ist in den Photorezeptoraußensegmenten zu finden (Krohne et al., 2010a). Hier dominieren insbesondere die Fettsäuren Docosahexaensäure, Arachidonsäure und Linolsäure (Brandstetter, 2016; Esterbauer et al., 1991). Durch Lipidperoxidation entstehen hochreaktive Verbindungen wie 4-Hydroxynonenal (HNE) und Malondialdehyd (MDA), die

kovalent an benachbarte Proteine binden und sie damit gegen den Abbau in den Lysosomen der RPE-Zellen stabilisieren (Schutt et al., 2003). Auf diese Weise akkumulieren unverdaute Bestandteile der Photorezeptoraußensegmente in den Lysosomen, die zum einen die Abbaufunktion der Lysosomen beeinträchtigen, zum anderen zu einer verstärkten Anreicherung von Lipofuszin beitragen (Kaemmerer et al., 2007; Krohne et al., 2010a; Krohne et al., 2010b). Lipofuszin verfügt selbst über photosensitive Eigenschaften und erhöht damit die Anfälligkeit der RPE-Zellen für oxidativen Stress (Davies et al., 2001). Davon ist insbesondere die lysosomale Membran betroffen, die durch die Peroxidation der Membranlipide durchlässig wird. Dieser als lysosomale Membranpermeabilisation (LMP) bezeichnete Mechanismus führt zu der Freisetzung lysosomaler Enzyme in das Zytosol, die unter anderem zelluläre Prozesse wie Inflamasomaktivierung, Autophagie und apoptotischen Zelltod induzieren (Ambati et al., 2013; Bok, 2005; Nozaki et al., 2006).

1.4.2 Deuterierte mehrfach ungesättigte Fettsäuren (D-PUFAs)

Ein möglicher Therapieansatz, um den oxidativen Schaden durch Lipidperoxidation zu verhindern, ist der Einsatz deuterierter mehrfach ungesättigter Fettsäuren (D-PUFAs). Dabei handelt es sich um mehrfach ungesättigte Fettsäuren, bei denen Wasserstoffatome der Allylgruppen durch das schwerere Isotop Deuterium ersetzt wurden. D-PUFAs sind aufgrund des kinetischen Isotopeneffekts weniger anfällig gegenüber freien Radikalen und sind daher in der Lage die Kettenreaktion zu durchbrechen, die im Rahmen der Lipidperoxidation in Gang gesetzt wird. Auf diese Weise schützen sie andere nicht-deuterierte Fettsäuren vor der Peroxidation (Andreyev et al., 2015; Cotticelli et al., 2013; Hill et al., 2012; Shchepinov et al., 2011). Ein prominenter Vertreter der D-PUFAs ist RT001 (Retropope), die zweifach deuterierte Fettsäure Linolsäure. Studien konnten nachweisen, dass RT001 sowohl *in vivo* als auch *in vitro* die Rate oxidativer Zellschäden signifikant reduziert. Dabei ist nur ein geringer Anteil D-PUFAs (20-50 %) notwendig, um einen ausreichenden Effekt zu erzielen (Andreyev et al., 2015; Hill et al., 2012). Aufgrund dieser vielversprechenden Ergebnisse laufen bereits klinischen Phase 2/3-Studien zur Erprobung von RT001 bei Patienten mit Friedreich-Ataxie (Retropope, 2021a). Als weiterer Medikamentenkandidat wird RT011, die mehrfach deuterierte Fettsäure

Docosahexaensäure, als orale Therapie der geographischen Atrophie evaluiert (Retrotope, 2021b).

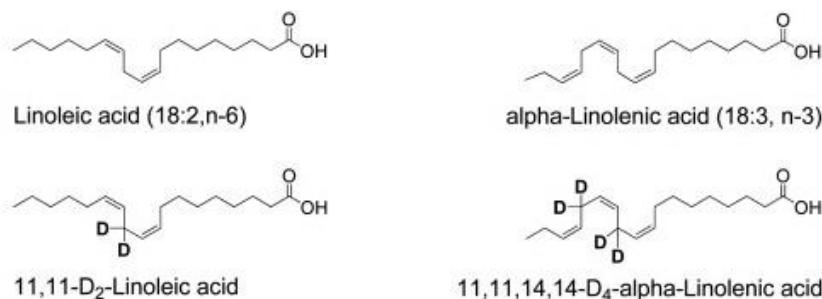


Abb. 4: Die mehrfach ungesättigten Fettsäuren Linolsäure (Lin) und α -Linolensäure (α -Lnn) sowie ihre deuterierten Vertreter 11,11-D₂-Linolsäure (D₂-Lin) und 11,11,14,14-D₄-Linolensäure (D₄- α -Lnn) (Cotticelli et al., 2013)

1.5 Inflammation in der AMD

Neben der oxidativen Schädigung der RPE-Zellen trägt auch eine chronische Aktivierung des angeborenen Immunsystems entscheidend zu der Pathogenese der AMD bei (Ambati et al., 2013; Anderson et al., 2002; Bok, 2005; Kauppinen et al., 2016). So lassen sich in den Drusen, die das Frühstadium der AMD charakterisieren, aktivierte Komplementkomponenten wie C3a und C5a nachweisen (Anderson et al., 2002; Anderson et al., 2010; Johnson et al., 2001). Zudem gehen bestimmte genetische Varianten verschiedener Komplementfaktoren mit einem erhöhten AMD-Risiko einher. Hierbei ist insbesondere der Einzelnukleotid-Polymorphismus im Komplementfaktor H zu nennen, bei dem die Aminosäure Tyrosin an Position 402 durch Histidin ersetzt ist. Er findet sich bei knapp 50 % aller Patienten mit fortgeschrittener AMD (Cao et al., 2016; Maller et al., 2006).

Darüber hinaus weisen aktuelle Studien auf eine Beteiligung des NLRP3-Inflammasoms in der Pathogenese der AMD hin (Gao et al., 2015). So konnte in RPE-Zellen von AMD-Patienten eine Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms auf mRNA- und Proteinebene nachgewiesen werden (Cao et al., 2016; Tarallo et al., 2012; Wang et al., 2016; Zhao et al., 2015). Zudem fanden sich bei AMD-Patienten erhöhte intravitreale und systemische Level der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-18, die bei Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms freigesetzt werden (Iijima et al., 2014; Zhao et al., 2015).

Bei dem NLRP3-Inflammasom handelt es sich um einen zytosolischen Multiproteinkomplex aus der Gruppe der Mustererkennungsrezeptoren (PRRs), dessen Aktivierung zu der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β und IL-18 sowie einer programmierten Form des Zelltodes namens Pyroptose führt (Labbé und Saleh, 2011; Stutz et al., 2009).

1.5.1 Pattern recognition receptors (PRRs)

Mustererkennungsrezeptoren sind ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunabwehr und erkennen exogene und endogene Gefahrensignale in Form von pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), die von pathogenen Mikroorganismen exprimiert werden, oder danger-associated molecular patterns (DAMPs), die bei zellulärem Stress freigesetzt werden. Nach ihrer zellulären Lokalisation werden membrangebundene, zytosolische und lösliche PPRs unterschieden. Zu den membrangebundenen Rezeptoren zählen die Toll-like-receptors (TLRs), die C-type lectin-like receptors (CLRs), die Scavenger receptors und N-Formyl-met-leu-phe receptors. Lösliche PPRs umfassen Pentraxine, Collectine, Ficoline und Komplement-Proteine. Zu der Gruppe der zytosolischen PPRs gehören neben den RIG-like receptors (RLRs) und den cytosolic DNA sensors (CDSs) auch die NOD-like receptors (NLRs) (Abbas et al., 2015).

Insgesamt sind mehr als 20 humane NLRs beschrieben. Sie zeichnen sich mit Ausnahme von NLRP1 durch einen dreiteiligen Aufbau aus einer zentralen NACHT-Domäne, einem C-terminalen Leucin-rich-repeat (LRR) und einer N-terminalen Protein-Protein-Interaktionsdomäne aus, die entweder aus einer Pyrin-Domäne oder einer CARD-Domäne besteht. Die NACHT-Domäne verfügt über eine intrinsische ATPase-Aktivität und ermöglicht die Zusammensetzung des Signalkomplexes durch ATP-abhängige Oligomerisierung, während die carboxyterminale LRR-Domäne wichtig für die Erkennung der Signalmoleküle sowie Protein-Protein-Interaktionen ist (Stutz et al., 2009). Anhand der aminoterminalen Domäne werden die NLRs wiederum in 3 Subfamilien unterteilt, die NODs (NOD1-2, NOD3/NLRC3, NOD4/NLRC5, NOD5/NLRX1, CIITA), NLRPs (NLRP1-14) und IPAF (NLRPC4, NAIP). Die größte Subfamilie ist mit 14 Mitgliedern die NLRP-Subfamilie, die sich durch eine N-terminale Pyrin-Domäne auszeichnet (Tschopp und

Schroder, 2010). Ein Vertreter dieser Familie ist das NLRP3-Inflammasom, dessen Aktivierung eine wichtige Bedeutung in der Krankheitsgenese der AMD zugeschrieben wird.

1.5.2 Das NLRP3-Inflammasom

1.5.2.1 Aufbau

Wie andere Vertreter der NLRP-Familie verfügt das NLRP3-Inflammasom über einen dreiteiligen Aufbau. Es besteht aus dem Mustererkennungsrezeptor NLRP3, einem Adaptorprotein namens ASC sowie der Cystein-Protease Caspase 1. Im Ruhezustand liegt das NLRP3-Inflammasom in einem autoinhibitorischen Zustand vor, der vermutlich durch die LRR-Domäne des NLRP3-Proteins vermittelt wird. Bei Aktivierung kommt es zu einer Zusammensetzung der drei Bestandteile des Inflammasoms durch homotypische Interaktion der Pyrin-Domänen von NLRP3 und ASC sowie homotypische Interaktion der CARD-Domänen von ASC und Pro-Caspase 1. Über die zentrale NACHT-Domäne des NLRP3-Proteins wird ATP-abhängig eine Oligomerisierung des NLRP3-ASC-Komplexes vermittelt. Dies führt durch die Rekrutierung von Caspase 1-Monomeren zu einer autokatalytischen Aktivierung des Enzyms, indem das Proenzym in je eine 20 kDa- und 10 kDa-Untereinheit gespalten wird. Je zwei dieser Untereinheiten setzen sich schließlich zu einem p10/p20-Tetramer zusammen, das als aktives Enzym die Spaltung und Aktivierung der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-18 induziert (Abderrazak et al., 2015; Schroder und Tschopp, 2010). Beiden Zytokinen fehlt die hydrophobe Signalsequenz, die für die klassische Proteinsekretion über den Golgi-Apparat und das Endoplasmatische Reticulum notwendig ist. Daher geht man davon aus, dass die Zytokine über einen nichtkonventionellen Weg in den Extrazellulärraum freigesetzt werden (Rubartelli et al., 1990). Eine Rolle wird dabei dem Protein Gasdermin D zugeschrieben. Gasdermin D bildet eine Pore in der Plasmamembran aus, durch die IL-1 β und IL-18 sezerniert werden könnten (Kayagaki et al., 2015; Shi et al., 2015). Zusätzlich induziert die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms eine Form des programmierten Zelltodes namens Pyroptose. Darunter versteht man eine proinflammatorische Form des Zelltodes,

die durch Caspase 1 vermittelt wird. Sie zeichnet sich durch den Einbau von Poren in die Plasmamembran, Zellschwellung und Membranruptur aus (Labbé und Saleh, 2011). Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass eine Freisetzung von IL-1 β in RPE-Zellen ausschließlich im Zusammenhang mit Zelluntergang nachweisbar ist. Das legt nahe, dass die Zytokine passiv im Rahmen der pyroptotischen Zelltlyse im Sinne eines sogenannten terminal release in den Extrazellulärraum gelangen (Patt, 2021). Dort üben sie autokrine und parakrine Effekte auf verschiedene Immuneffektorzellen aus und tragen damit zu der Aufrechterhaltung des Entzündungsprozesses im Sub-RPE-Raum bei (Brandstetter, 2016; Notomi et al., 2011).

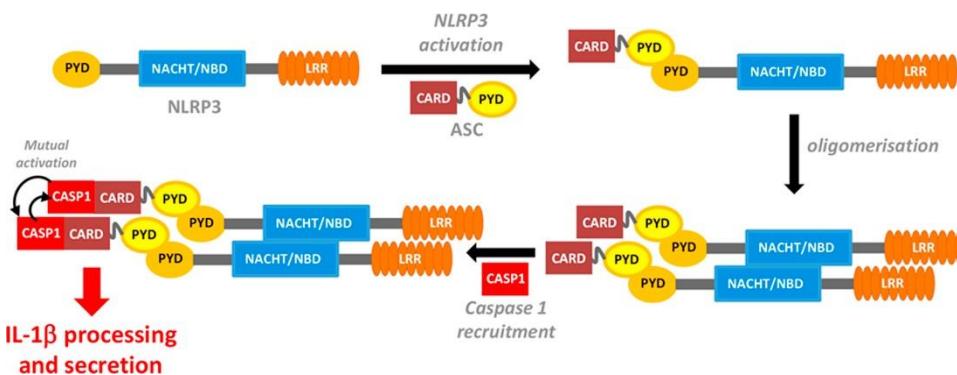


Abb. 5: Bestandteile und Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms (Abderrazak et al., 2015)

1.5.2.2 Aktivierung

Die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms ist ein zweiteiliger Prozess, für den ein Priming-Signal und ein Aktivierungssignal benötigt werden. Das Priming-Signal führt über den NF- κ B-Signalweg zu einer vermehrten Transkription von pro-IL-1 β und NLRP3. Das Zytokin IL-18, das ebenfalls im Rahmen der NLRP3-Aktivierung freigesetzt wird, wird dagegen konstitutiv in der Zelle exprimiert. Allerdings wird auch seine Expression durch den Priming-Schritt hochreguliert. Erst das Aktivierungs-Signal führt jedoch zu der Zusammensetzung der einzelnen Bestandteile des Inflammasoms sowie zu der Reifung und Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-18 (Heneka et al., 2018; Latz et al., 2013).

In der Literatur sind eine Vielzahl an Aktivierungssignalen für das NLRP3-Inflammasom beschrieben. Dazu zählen verschiedene Mikroorganismen (Viren, Bakterien, Pilze), eine Reihe von PAMPs (LPS, MDP), bakterielle Toxine und DAMPs wie extrazelluläres ATP,

kristalline Substanzen (Harnsäure, Calciumpyrophosphat, Asbest, Quarz) und Peptidaggregate (Amyloid- β). Diese große Bandbreite an Signalmolekülen legt nahe, dass diese nicht direkt mit dem NLRP3-Inflammasom interagieren, sondern auf einen gemeinsamen übergeordneten Signalweg wirken. In der Literatur werden aktuell drei Aktivierungswege des NLRP3-Inflammasoms diskutiert: das lysosomal rupture-Modell, das ROS-Modell und das P2X7-Modell (Abderrazak et al., 2015; Horvath et al., 2011; Latz et al., 2013).

Das lysosomal rupture-Modell geht davon aus, dass Substanzen nach ihrer Phagozytose nur unzureichend abgebaut werden und sich in den Lysosomen ansammeln. Diese Aggregation führt beispielsweise durch mechanische Schädigung bei kristallinen Substanzen oder durch photooxidative Schädigung bei photosensitiven Substanzen zu einer Ruptur der lysosomalen Membran. Dadurch werden lysosomale Proteine wie Cathepsin B in das Zytosol der Zelle freigesetzt, die über einen bislang unbekannten Signalweg zu einer Aktivierung des Inflammasoms führen.

Das ROS-Modell beruht auf der Annahme, dass einige der Signalmoleküle zu einer Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) beitragen, die eine Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms induzieren. Der genaue Aktivierungsmechanismus ist bislang unklar. Neuere Studien legen jedoch nahe, dass das Thioredoxin-interacting protein (TXNIP) hier eine entscheidende Rolle spielen könnte. Im Ruhezustand ist dieses Protein an seinen Inhibitor Thioredoxin (TRX) gebunden. Die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies führt zu einer Dissoziation dieses Komplexes, sodass TXNIP an die C-terminale LRR-Domäne des NLRP3-Proteins binden kann und zu einer Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms führt.

Das P2X7-Modell besagt schließlich, dass extrazelluläres ATP an den plasmamembrangebundenen Kationenkanal P2X7 bindet und diesen aktiviert. Dadurch kommt es einerseits zu einem Ausstrom von Kalium, welches einer der wichtigsten Aktivatoren des NLRP3-Inflammasoms ist, andererseits zu der Ausbildung einer Membranpore, durch die extrazelluläre Signalmoleküle ins Zytosol gelangen und direkt mit dem NLRP3-Inflammasom interagieren könnten (Tschopp und Schroder, 2010).

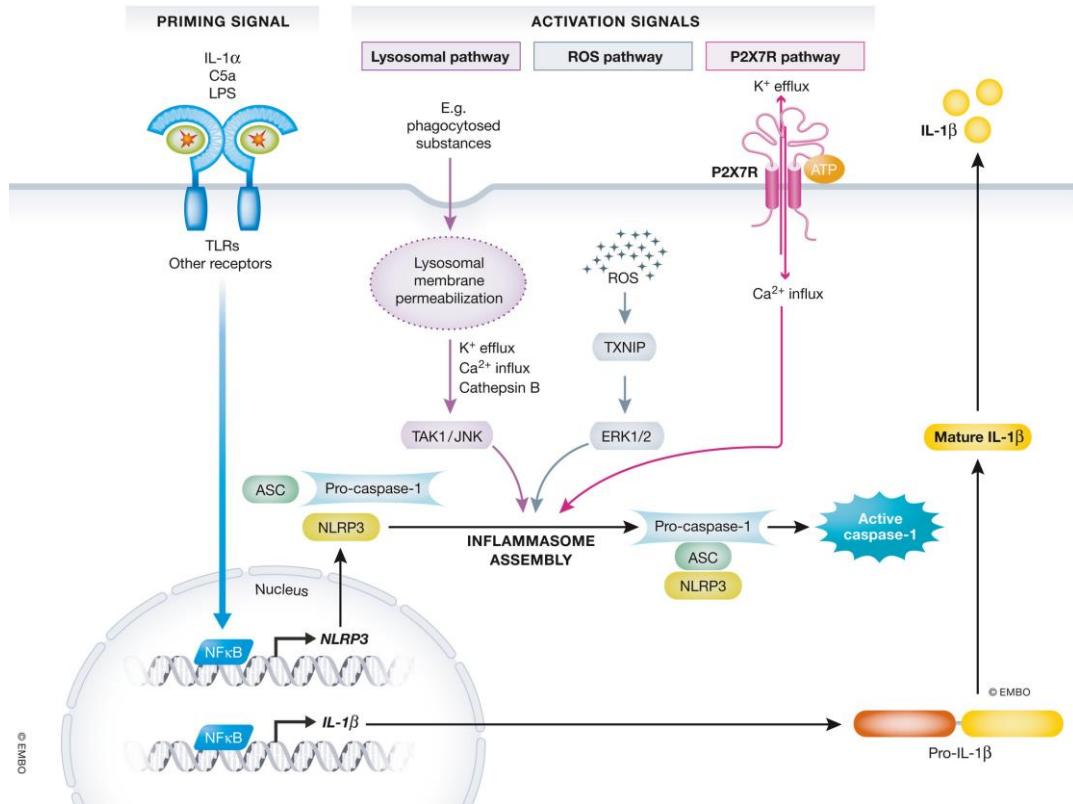


Abb. 6: Die drei Aktivierungswege des NLRP3-Inflammasoms (Akhtar-Schäfer et al., 2018)

1.5.3 Der P2X7-Rezeptor

Der P2X7-Rezeptor zählt zu der Klasse der purinergen Rezeptoren. Diese wurden erstmals 1978 durch Burnstock beschrieben. Bei den purinergen Rezeptoren handelt es sich um Zelloberflächenrezeptoren, die extrazelluläre Purin- und Pyrimidinnukleotide sowie das Purinnukleosid Adenosin erkennen (Burnstock, 1978). Aufgrund ihrer unterschiedlichen Aktivierungsmechanismen werden die purinergen Rezeptoren in zwei Gruppen unterteilt, die P1- und P2-Rezeptoren. Diese werden wiederum in verschiedene Subtypen gegliedert. Bei den P1-Rezeptoren unterscheidet man die vier Subtypen A1, A2a, A2b und A3, während die P2-Rezeptoren im Wesentlichen in die beiden Subgruppen P2X und P2Y unterteilt werden (Seyffert, 2005). Insgesamt sind in der Literatur bislang sieben P2X-Rezeptoren (P2X1-7) und acht P2Y-Rezeptoren (P2Y1,2,4,6,11-14) beschrieben. Bei den P1- und P2Y-Rezeptoren handelt es sich jeweils um metabotrope oder G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die aus sieben Transmembrandomänen, einem intrazellulären C-Terminus und einem extrazellulären N-Terminus bestehen (Hitzel,

2009). Dabei werden die P1-Rezeptoren durch das Purinnukleosid Adenosin, die P2Y-Rezeptoren durch die Purin- bzw. Pyrimidinnukleotide ATP, ADP, UTP und UDP aktiviert (Rappich, 2016). Die P2X-Rezeptoren zählen dagegen zu den ionotropen oder ligandenaktivierten Rezeptoren. Jede Untereinheit besteht aus zwei Transmembrandomänen, die den Ionenkanal auskleiden, einer langen extrazellulären, hydrophilen Schleife, die die ATP-Bindungsstelle und eine Bindungsstelle für Kationen aufweist, sowie einem intrazellulären N- und C-Terminus. Bei Aktivierung des Rezeptors durch extrazelluläres ATP setzen sich je drei oder sechs Untereinheiten je nach Gewebetypus zu einem homomeren Trimer oder einem heteromeren Hexamer aus zwei zusammenhängenden Trimeren zusammen. Aktuell sind sechs heteromere (P2X1/2, P2X1/4, P2X1/5, P2X2/3, P2X2/6 und P2X4/6) und sechs homomere (P2X1, P2X2, P2X3, P2X4, P2X5 und P2X7) P2X-Rezeptoren bekannt. Zu letzteren zählt auch der P2X7-Rezeptor. Dieser nimmt innerhalb der Gruppe der ionotropen P2X-Rezeptoren eine Sonderrolle ein (Yang und Chen, 2014).

Zum einen unterscheidet er sich strukturell von den anderen P2X-Rezeptoren. In Bezug auf die Aminosäuresequenz weist er eine nur 35-40 % Homologie zu den anderen Rezeptoren auf (Mehta et al., 2014). Darüber hinaus ist er mit 595 Aminosäuren das längste Polypeptid und verfügt über ein besonders langes carboxyterminales Ende, das 120-200 Aminosäuren länger ist als bei den anderen Rezeptoren. Diesem C-Terminus werden wichtige Funktionen in Hinblick auf Protein-Protein-Interaktionen, posttranskriptionale Modifikationen, Signalwegaktivierung sowie zelluläre Lokalisation zugeschrieben. Zum anderen sind bei diesem Rezeptor zwei verschiedenen Transduktionsmechanismen beschrieben. Bei kurzer Exposition mit dem Agonisten ATP kommt es zu der Öffnung eines Kationenkanals, sodass es zu einem Einstrom von Calcium und Natrium sowie einem Ausstrom von Kalium kommt. Höhere ATP-Dosen, eine längere Expositionszeit oder wiederholte Stimulation des P2X7-Rezeptors führen dagegen zu der Ausbildung einer unselektiven Membranpore, die Moleküle bis zu einer Größe von 900 Dalton passieren lässt und Zelltod induziert (Yang und Chen, 2014).

Frühere Annahmen gingen davon aus, dass der P2X7-Rezeptor ausschließlich von immunkompetenten Zellen wie Makrophagen, dendritischen Zellen oder Lymphozyten exprimiert wird. Neuere Studien weisen jedoch darauf hin, dass sich der P2X7-Rezeptor

in einer Vielzahl humaner Zellen einschließlich epithelialer und neuronaler Zellen findet (Mehta et al., 2014). So konnten mehrere voneinander unabhängige Forschungsgruppen nachweisen, dass der P2X7-Rezeptor auch von retinalen Pigmentepithelzellen exprimiert wird. Sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene ließ sich der P2X7-Rezeptor in humanen und murinen RPE-Zellen nachweisen (Dutot et al., 2008; Guha et al., 2013; Yang et al., 2011; Yang, 2017).

Tab. 2: Expression von P2X7 in RPE-Zellen (Yang, 2017)

	mRNA	Protein	Zellen	Spezies
(Dutot et al., 2008)	n.d. (not determined)	+	ARPE-19	Human
(Yang et al., 2011)	+	n.d.	ARPE-19	Human
	+	+	Primäre RPE	Human
	+	n.d.	Frisch isolierte RPE	Human
(Guha et al., 2013)	+	n.d.	ARPE-19	Human
	+	n.d.	Frisch isolierte RPE	Murin

Dem P2X7-Rezeptor wird eine wichtige Rolle im Rahmen von oxidativem Stress, Inflammation und Zelltod nachgesagt, zelluläre Prozesse, die auch entscheidend in der Pathogenese der AMD beteiligt sind (Di Virgilio et al., 2017; Yang und Chen, 2014). Studien konnten zeigen, dass der P2X7-Rezeptor sowohl in Tiermodellen der geographischen Atrophie als auch der neovaskulären AMD aktiviert ist. In Glaskörperproben von AMD-Patienten mit subretinaler Hämorrhagie ließen sich im Vergleich zu Kontrollgruppen deutlich erhöhte ATP-Level nachweisen. Extravaskuläres Blut durch Gefäßleckagen im Rahmen der neovaskulären AMD führte zu einer massiven Freisetzung von ATP und induzierte den Zelluntergang von Photorezeptorzellen. Der selektive P2X7-Rezeptor-Antagonist Brilliant Blue G (BBG) konnte zudem die Rate an Zelltod deutlich reduzieren, was ebenfalls eine Beteiligung des P2X7-Rezeptors am Zelluntergang der Photorezeptorzellen nahelegt (Notomi et al., 2013). Auch in Zellkulturmodellen der geographischen Atrophie zeigte sich eine Beteiligung des P2X7-Rezeptors. So konnte durch die Applikation von P2X7-Antagonisten die Alu-RNA-

induzierte Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms und RPE-Degeneration verhindert werden (Kerur et al., 2013).

1.5.4 Direkte NLRP3-Inhibitoren

Bislang werden in der Therapie NLRP3-assozierter Erkrankungen vor allem Medikamente eingesetzt, die sich gegen das Zytokin IL-1 β richten. So sind zur Behandlung der seltenen genetischen Cytopyrin-associated periodic syndromes (CAPS), bei denen es durch eine gain-of-function-Mutation zu einer verstärkten Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms kommt, der rekombinante IL-1-Rezeptor-Antagonist Anakinra (Kineret; Amgen, 1993), der lösliche IL-1-Decoy-Rezeptor Rilonacept (Arcalyst; Regeneron, 2008) und der neutralisierende IL-1 β -Antikörper Canakinumab (Ilaris; Novartis, 2009) zugelassen (Baldwin et al., 2016; Dinarello et al., 2012).

Ein Nachteil der IL-1 β -Inhibitoren besteht allerdings darin, dass die Hemmung des Zytokins IL-1 β unselektiv erfolgt, unabhängig davon, ob die Ausschüttung auf eine NLRP3-Aktivierung zurückgeht oder durch einen anderen Immunprozess ausgelöst wird. Damit wird auch die physiologische Funktion des Zytokins beispielsweise in der Abwehr bakterieller Erreger eingeschränkt, sodass es unter den IL-1 β -basierten Therapieformen zu dem vermehrten Auftreten immunsuppressiver Nebenwirkungen kommt (Hill et al., 2017).

Neuere Therapieansätze konzentrieren sich daher auf die Entwicklung von Substanzen, die direkt in die Signalkaskade des NLRP3-Inflammasoms eingreifen (Baldwin et al., 2016; Cross, 2020). Im Jahr 2001 wurde erstmalig von Perregaux et al. (2001) eine Klasse von NLRP3-Inhibitoren auf Diaryl-Sulfonylharnstoff-Basis identifiziert, die zunächst als cytokine-release inhibitory drugs (CRIDs) bezeichnet wurden (Perregaux et al., 2001). Als besonders potenter Vertreter dieser Klasse gilt die Substanz MCC950 (CP-456,773 oder CRID3), die sich bereits bei Konzentrationen im nanomolaren Bereich als wirksam erweist ($IC_{50} = 8 \text{ nM}$) (Hill et al., 2017; Primiano et al., 2016). MCC950 blockiert dabei das NLRP3-Inflammasom spezifisch, während andere Inflammasome wie NLRP1, NLRC4 und AIM2 nicht gehemmt werden (Coll et al., 2015). Bislang wurde der genaue Wirkort von MCC950 nicht eindeutig identifiziert. Neuere Studien lege jedoch nahe, dass MCC950

mit hoher Affinität im Bereich des Walker B Motivs bindet, das sich innerhalb der NACHT-Domäne des NLRP3-Inflammasoms befindet. Auf diese Weise könnte MCC950 die ATP-Hydrolyse und damit die Oligomerisierung und Zusammensetzung des NLRP3-Inflammasoms hemmen (Coll et al., 2019).

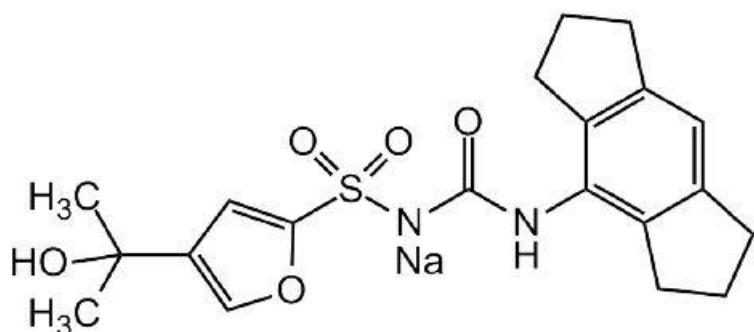


Abb. 7: Strukturformel des NLRP3-Inhibitoren MCC950

Anders als die IL1 β -Inhibitoren blockieren die direkten NLRP3-Inhibitoren dadurch, dass sie am Inflammasom selbst angreifen, neben der Freisetzung von IL-1 β auch die Ausschüttung von IL-18 sowie den pyroptotischen Zelltod (Baldwin et al., 2016). Darüber hinaus sind sie spezifisch für NLRP3 und hemmen nicht die Funktion weiterer Inflammasome wie NLRC4 und NLRP1, die eine entscheidende Rolle in der Abwehr pathogener Mikroorganismen spielen. Dies könnte das Risiko immunsuppressiver Nebenwirkungen wie Infektionen reduzieren (Coll et al., 2015). Darüber hinaus gelten sie im Vergleich zu Antikörper-basierten Therapieverfahren als kostengünstiger. Ebenfalls von Vorteil sind ihre pharmakokinetischen Eigenschaften. Im Gegensatz zu Antikörper-basierten Therapieverfahren müssen sie nicht parenteral in Form subkutaner Injektionen oder am Auge als intravitreale Injektion appliziert werden, sondern sind nach aktuellem Kenntnisstand auch nach oraler Gabe im Auge in ausreichender Konzentration verfügbar. Dies würde die Patientenbelastung bei einem langfristigen Therapieregime reduzieren und könnte zu einer besseren Therapieadhärenz beitragen (Baldwin et al., 2016). Damit stellen direkte NLRP3-Inhibitoren aussichtsreiche Wirkstoffkandidaten zur Therapie der AMD dar.

1.6 Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zwei verschiedene Mechanismen der NLRP3-Inflammasomhemmung in humanen RPE-Zellen zu untersuchen, um mögliche pharmakologische Ansatzpunkte in der Behandlung der AMD zu identifizieren.

Dazu wurden ARPE-19-Zellen nach einem Priming-Schritt entsprechend der drei Aktivierungswege des NLRP3-Inflammasoms mit den Substanzen Leu-Leu-O-Me (lysosomal rupture-Modell), H₂O₂ (ROS-Modell) und BzATP (P2X7-Modell) behandelt. Die Inflammasomaktivierung wurde anschließend anhand der pyroptotischen Zelltlyse und Ausschüttung des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β gemessen.

Im ersten Teil der Arbeit wurde untersucht, ob deuterierte mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie D2-Lin und D4- α -Lnn einen protektiven Effekt auf die H₂O₂-induzierte oxidative Zellschädigung mit lysosomaler Membranpermeabilisation und sekundärer Inflammasomaktivierung in RPE-Zellen haben.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Wirksamkeit des direkten NLRP3-Inhibitors IFM-632 im P2X7-Modell untersucht und mit der Effektivität des bereits etablierten NLRP3-Inhibitors MCC950 verglichen. Zusätzlich wurde durch Westernblotanalysen des Zytokins pro-IL-1 β ermittelt, ob BzATP neben seiner Funktion als Aktivierungssignal auch einen primenden Einfluss auf das NLRP3-Inflammasom ausübt

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

Tab. 3: Zelllinien

Zelllinie	Bezugsquelle	Artikelnummer
ARPE-19	ATCC	CRL-2302
THP-1	Prof. Dr. med. Eicke Latz (Institut für Angeborene Immunität, Universitätsklinikum Bonn)	

2.1.2 Medien

Tab. 4: Medien

Medium	Bezugsquelle	Artikelnummer
DMEM/Ham's F12 (1:1) w. L-Glutamine, w. 1,2 g/L NaHCO ₃	PanBiotech	P04-41500
DMEM/Ham's F12 (1:1) w. L-Glutamine, w/o: Phenol red, w. 1,2 g/L NaHCO ₃	PanBiotech	P04-41650
DPBS w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺	PanBiotech	P04-36500
DPBS w Ca ²⁺ , Mg ²⁺	PanBiotech	P04-35500
Trypsin-EDTA	Gibco, Thermo Fisher Scientific	25300054
Fetales Rinderserum (FBS)	Gibco, Thermo Fisher Scientific	A4766801
Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml)	Gibco, Thermo Fisher Scientific	15140-122
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich	C6295-50ML
RPMI-1640	Gibco	31870-025

2.1.3 Reagenzien

Tab. 5: Reagenzien

Chemikalie	Bezugsquelle	Artikelnummer
11,11,14,14-D4- α -Linolensäure (D4- α -Lnn)	Mikhail S. Shchepinov, PhD (Retrotope Inc., Los Altos Hills, California, USA)	
11,11-D2-Linolsäure (D2-Lin, RT001)	Mikhail S. Shchepinov, PhD (Retrotope Inc., Los Altos Hills, California, USA)	
2' (3') -O-(4-Benzoylbenzoyl) -ATP (BzATP)	Sigma-Aldrich	B6396-25MG
Aqua dest.	Braun	88992
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich	P0914
Bradford-Reagenz	Sigma-Aldrich	B6916
Deoxycholic acid (DOC)	Sigma-Aldrich	30960-25G
Dinatriumhydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	AppliChem	A4732,0500
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem	APA1101.0025
Ethanol 70 % (V/V)	Otto Fischar	27667
Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich	EDS-100G
Glycin	AppliChem	A31067,0500
IFM-632	IFM Therapeutics GmbH Bonn	
Kaliumchlorid (KCl)	AppliChem	A4280,0250
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	AppliChem	A2946,0250
KODAK GBX Developer and Replenisher	Sigma-Aldrich	P7042-1GA
KODAK GBX Fixer and Replenisher	Sigma-Aldrich	P7167-1GA
Ladepuffer IX	AppliChem	A3484,0005
L-leucyl-L-leucyl-Methylester (Leu-Leu-OMe)	Bachem	G2550.0001

Chemikalie	Bezugsquelle	Artikelnummer
Linolsäure (Lin)	Mikhail S. Shchepinov, PhD (Retrotope Inc., Los Altos Hills, California, USA)	
Lipopolsaccharid (LPS)	Sigma-Aldrich	L2630
Magermilchpulver	AppliChem	A0830,0500
MCC950	Adipogen	AG-CR1-3615
Methanol	AppliChem	A0688,1000PE
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem	A4256,0500
Natriumhydroxid (NaOH)	AppliChem	A1306,1000
Nonylphenoxypolyethoxylethanol (NP-40)	Sigma-Aldrich	74385
Paraformaldehyd (PFA)	Merck	30525-89-4
Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	Sigma-Aldrich	P8139
Ponceau S	AppliChem	A2935,0100
Precision Plus Protein™ Standards Kaleidoscope	Bio-RAD	1761-0375
Proteinase und Phosphatase-Inhibitor	Thermo Scientific	78441
Recombinantes Human IL-1 alpha/IL-1F1 Protein	R&D Systems	200-LA-010
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) (10 %)	Sigma-Aldrich	71736-100ML
Thermo Scientific Shandon™ Immuno-Mount™	Thermo Scientific	99-904-02
Thermo Scientific™ SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific	34077
Tris pH 8	AppliChem	A2264,0250
Triton-X(20 %)	AppliChem	A4975,0100
Tween-20	AppliChem	A4974,0100
Wasserstoffperoxid (30 %)	Roth	7722-84-1
α-Linolensäure (α-Lnn)	Mikhail S. Shchepinov, PhD (Retrotope Inc., Los Altos Hills, California, USA)	

2.1.4 Antikörper

Tab. 6: Antikörper

Antikörper	Bezugsquelle	Artikelnummer
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (1:1000)	AppliChem	A4099,0005
Alexa Fluor 488 Goat Anti-rabbit IgG-Antikörper (1:200)	Invitrogen	A-11008
Human IL 1 β /IL 1F2 Antibody (polyclonal Goat IgG) (1:250)	R&D Systems	AF-201-NA
Rabbit-anti goat IgG HRP-conjugated antibody (1:1000)	R&D Systems	HAF017
ZO-1-Antikörper (1:1000)	Invitrogen	40-2200

2.1.5 Kit-Systeme

Tab. 7: Kit-Systeme

Kit-System	Bezugsquelle	Artikelnummer
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche	11644793001
Human IL-1 β ELISA Kit II	BD OptEIA	557966

2.1.6 Verbrauchsmaterial

Tab. 8: Verbrauchsmaterial

Material	Bezugsquelle	Artikelnummer
Carestream® BioMax® light film	Sigma-Aldrich	Z370398-50EA
Einfrierröhrchen Cryo-Vials	Greiner	
Eppendorff Tubes (1 ml, 2 ml)	Eppendorff	
Glaspipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Cellstar	
Halb-Mikro-Küvetten	Greiner	
Immobilon-P Blotting Sandwich	Millipore	IPSN07852
Mr. Frosty Gefrierbehälter	Thermo Fisher Scientific	5100-0001
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld	
PAGER Gold Precast Gels, 4-12 % Tris-Glycine gels	Lonza	58520
Pipetten (5 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf research	
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Axygen	
Tubes (15 ml, 25 ml)	Cellstar	
Whatman-Papier	Sigma-Aldrich	
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ²)	Falcon	
Zellkulturplatten (6-, 12-, 24-, 96-well-plates) (steril)	Falcon	
Zellkulturplatten (96-well-plates) (unsteril)	Falcon	
Zellkulturschalen (35 mm, 60 mm, 100 mm)	Cellstar	

2.1.7 Geräte

Tab. 9: Geräte

Material	Bezugsquelle	Artikelnummer
CO ₂ - Brutschrank Heracell 150i	Thermo Scientific	
Sterilwerkbank Antair ZKB	Antos	
Wasserbad W350	Memmert	
Laborzentrifuge Multifuge 1S- R	Heraues	
Zentrifuge 524R	Eppendorf	
Freezer Forma 906	Thermo	
Varioklav 250 T	H + P	
SmartSpec™ Plus Spectrophotometer	BIO-RAD	170-2525
Spektrophotometer DU650	Beckmann	
Horizontalschüttler Sea Star	Heathrow Scientific	HD4010A
Lichtmikroskop + Kamera	Leica	
Wasseraufbereitungssystem Direct Q	Millipore	
Fluoreszenzmikroskop DM RXE	Leica	
Analysenwaage AE160	Mettler	
PAGEr Minigel Chamber	Lonza	59905
PowerPac Basic Power Supply	Bio-Rad	164-5050

2.1.8 Software

Tab. 10: Software

Software	Entwickler
Excel 365	Microsoft Corporation
Image J	National Institute of Health (NIH)
Leica application suite V3.8	Leica Microsystems
SPSS Statistics 27.0	International Business Machines Corporation (IBM)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Zelllinien verwendet. Die ARPE-19-Zellen dienten dabei als Standardzelllinie zur Untersuchung des NLRP3-Inflammasoms, während die THP-1-Zellen als Vergleichszelllinie bei der Etablierung des P2X7-Modells verwendet wurden.

2.2.1.1 ARPE-19-Zellen

Subkultivierung der Zellen

Bei der Zelllinie ARPE-19 handelt es sich um humane, spontan stabile und nicht transformierte RPE-Zellen (Dunn et al., 1996). Die verwendeten ARPE-19-Zellen wurden von American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) bezogen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter Standardbedingungen, d.h. bei einer Temperatur von 37 °C und einer feuchten Atmosphäre mit 5 % CO₂ im Brutschrank. Als Nährmedium wurde eine 1:1 Mischung aus Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) und Ham's F-12 Medium mit 2.5 mM L-Glutamin und 1.2 g/l NaHCO₃ verwendet. Zugesetzt wurden 1 % Penicillin/Streptomycin und 10 % hitzeinaktiviertes fetales Rinderserum (FBS). Die Subkultivierung der Zellen erfolgte in der Regel alle 7 Tage, sobald die Zellen eine fast 90%ige Konfluenz erreicht hatten. Dabei wurde eine Subkultivierungsrate von 1:3 gewählt. Ein Medienwechsel wurde alle 2 Tage durchgeführt und die Zellen wurden insgesamt für bis zu 30 Passagen verwendet.

Reagenzien

- Standardmedium
 - 500 ml DMEM/Ham's F12 1:1 Mix (1:1)
 - 5,5 ml Penicillin/Streptomycin (1 %)

- 55 ml hitzeinaktiviertes FBS (10 %)
- Trypsin-EDTA
- DPBS w/o Ca^{2+} , Mg^{2+}

Arbeitsschritte

- Medium und DPBS für 20 Minuten im Wasserbad auf 37° C erwärmen, Trypsin-EDTA für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- Medium mit Glaspipette aus 75 cm² Zellkulturflasche absaugen
- Zellen mit 10 ml DPBS w/o Ca^{2+} , Mg^{2+} waschen
- 3 ml Trypsin-EDTA auf die Zellen geben
- Zellen für 3 Minuten im Brutschrank bei 37° inkubieren
- Unter dem Mikroskop kontrollieren, ob sich die Zellen gut vom Untergrund abgelöst haben, ggf. Inkubationszeit im Brutschrank verlängern oder noch haftende Zellen durch leichtes Klopfen auf den Flaschenrand unter Sicht ablösen
- 6 ml Medium auf die Zellen geben, um die Trypsinierung zu stoppen, gut auf- und abpipettieren und die 9 ml Zellsuspension in ein 25 ml Tube überführen
- Zellsuspension für 5 Minuten bei 4 °C und 125 G zentrifugieren, Überstand mit Glaspipette absaugen
- Zellpellet mit 9 ml frischem Medium resuspendieren
- Je 10 ml Medium in eine neue 75 cm² Zellkulturflasche vorlegen
- Je 3 ml der Zellsuspension unter vorsichtigem Schwenken auf die Flaschen verteilen

Zählen der Zellen

Arbeitsschritte

- Ein Aliquot der Zellsuspension (10 µl) in eine Neubauer-Zählkammer pipettieren
- Unter dem Lichtmikroskop bei 10er Vergrößerung je 4 große Quadrate mäanderförmig auszählen; dabei werden Zellen, die auf dem oberen und linken Rand liegen nicht mitgezählt, um eine Doppeltzählung zu vermeiden

- Berechnung der Zellzahl:

$$Z/4 \times V \times 10^4 = \text{Zellzahl}$$

Z: Anzahl der gezählten Zellen in den vier Quadranten

V: Volumen, in dem das Zellpellet resuspendiert wurde

10^4 : Kammerfaktor [0,1 µl Volumen pro großes Quadrat bei einer Fläche von 1 mm² und einer Tiefe von 0,1 mm]

- Berechnung der benötigten Zellzahl pro ml für die Aussaat: Zellzahl/ml = Zelldichte x Fläche/Volumen

Kryokonservieren

Zur langfristigen Aufbewahrung wurden die ARPE-19-Zellen kryokonserviert und bei Temperaturen von -150 °C im Stickstofftank gelagert. Das Einfriermedium setzte sich aus den Komponenten Kulturmedium, Serum und dem Gefrierschutzmittel DMSO im Verhältnis 7:2:1 zusammen.

Reagenzien

- Standardmedium für ARPE-19-Zellen
- DPBS w/o Ca²⁺, Mg²⁺
- Trypsin-EDTA
- DMSO

Arbeitsschritte

- Einfrierröhrchen vorkühlen
- Zellen aus einer 75 cm² Zellkulturflasche abtrypsinieren

- Zellsuspension für 5 Minuten bei 4 °C und 125 G zentrifugieren, Überstand absaugen
- Zellpellet in 1 ml Volumen mit 700 µl DMEM, 200 µl FBS, 100 µl DMSO resuspendieren
- Zellen in eine Isopropanol-Kammer platzieren und bei - 80 °C über Nacht lagern
- Zellen am nächsten Tag in den Stickstofftank überführen

Auftauen der Zellen

Nach 30 Passagen wurden frische ARPE-19-Zellen aus dem Stickstofftank aufgetaut und in Kultur gebracht.

Reagenzien

- DMEM

Arbeitsschritte

- Einfrierröhrchen aus dem Stickstofftank nehmen und unter vorsichtigem Schwenken innerhalb von 1 Minute im Wasserbad auftauen, bis alle Eiskristalle verschwunden sind
- 9 ml warmes Medium in ein 25 ml-Tube vorlegen
- Zellen mit 1 ml Medium vorsichtig mixen und die Zellsuspension tropfchenweise in das Tube überführen
- Zellen für 5 Minuten bei 4 °C und 125 G zentrifugieren, Überstand abpipettieren
- Zellpellet mit 2 ml Medium resuspendieren
- 3 ml Medium in eine 25 cm² Zellkulturflasche vorlegen
- Zellsuspension in 25 cm² Zellkulturflasche überführen
- Nach 24 Stunden Mediumwechsel durchführen
- Bei Konfluenz nach 2-3 Tagen Inhalt der 25 cm² Zellkulturflasche in drei 75 cm² Flaschen überführen

2.2.1.2 THP-1-Zellen

Bei der Zelllinie THP-1 handelt es sich um eine spontan immortalisierte humane Monozytenzelllinie, die aus dem peripheren Blut eines Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) gewonnen wurde (Chanput et al., 2014; Tsuchiya et al., 1980). Die THP-1-Zellen wurden als kryokonserviertes Aliquot von 10×10^6 Zellen pro ml aus dem Labor von Prof. Eicke Latz (Institut für Angeborene Immunität, Universitätsklinikum Bonn) zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung der THP-1-Zellen erfolgte ebenfalls bei einer Temperatur von 37 °C und einer feuchten Atmosphäre mit 5 % CO₂. Bei dem verwendeten Nährmedium handelte es sich um RPMI-1640, das mit 10 % hitzeinaktiviertem FBS und 1 % Penicillin/Streptomycin versetzt wurde. Die Zellen wurden in einer Zelldichte von 0,3- 1×10^6 Zellen kultiviert.

Auftauen der Zellen

Reagenzien

- Standardmedium
- 500 ml RPMI-1640
- 5,5 ml Penicillin/Streptomycin (1 %)
- 55 ml hitzeinaktiviertes FBS (10 %)
- PMA
- DPBS w/o Ca²⁺, Mg⁺
- EDTA

Arbeitsschritte

- Zellen auftauen
- 10 ml warmes RPMI-1640-Medium in ein Tube vorlegen
- Zellen schnell auftauen und mit 1 ml Medium vorsichtig mixen
- Zellsuspension in ein Tube überführen
- Tube für 10 Minuten bei 350 G und 4 °C zentrifugieren

- Überstand abpipettieren
- Zellpellet in 15-18 ml Medium resuspendieren und in eine Flasche überführen

Subkultivierung der Zellen

Arbeitsschritte

- Zellsuspension aus 75 cm² Zellkulturflasche in ein 25 ml-Tube überführen
- Tube für 10 Minuten bei 350 G und 4 °C zentrifugieren
- Überstand absaugen
- Zellpellet in 15 ml Medium resuspendieren
- Je 10 ml Medium in 3 neue Flaschen vorlegen
- Je 5 ml Zellsuspension in die 3 neuen Flaschen geben

Differenzierung

Da es sich bei THP-1-Zellen um eine Suspensionskultur handelt, müssen die Zellen vor Durchführung der Versuche mit PMA differenziert werden. Dazu werden 35×10^6 Zellen in 20 ml in 15 cm Zellkulturschalen ausgesät. Es ist damit zu rechnen, dass während des Differenzierungsschrittes etwa 25-50 % der Zellen zugrunde gehen.

Arbeitsschritte

- Zellen mit 100 nM PMA über Nacht (16 Stunden) inkubieren
- Zellen mit 10 ml DPBS w/o Ca²⁺, Mg²⁺ waschen
- 20 ml frisches Medium zugeben
- Differenzierte Zellen mit 10 ml DPBS waschen
- 5 ml 5 mM EDTA (in DPBS) hinzufügen und Zellen für einige Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- Zellen anschließend in 96-well-plates aussäen

4.2 Immunfluoreszenzfärbung

Zur Darstellung der Zellmorphologie wurden neben lichtmikroskopischen Bildern auch Immunfluoreszenz-Aufnahmen der ARPE-19-Zellen angefertigt.

Reagenzien

- Fixierlösung: Paraformaldehyd (PFA) 4 % (100 ml)
 - 25 ml Aqua dest. auf 60°C erhitzen
 - 4 g PFA
 - 1 Tropfen NaOH (Rühren bis gelöst)
 - 65 ml Aqua dest.
 - 10 ml DPBS (10x)
 - pH einstellen auf 7,3
- DPBS w Ca²⁺, Mg²⁺
- Blocking-Lösung: DPBS + 1 % BSA
- Primärantikörper: ZO-1-Antikörper (1:1000)
- Sekundärantikörper: Goat-Anti-Rabbit Alexa 488-Antikörper (1:200)
- DAPI-Lösung:
 - 80 µl in 80 ml Methanol für 5 Minuten im Kühlschrank inkubieren (1:1000)

Arbeitsschritte

- Medium absaugen
- Zellen mit DPBS waschen
- Zellen für 20 Minuten mit 4 % PFA bei Raumtemperatur fixieren, nach den ersten 5 Minuten die Fixierlösung wechseln
- Zellen anschließend zweimal mit DPBS gründlich waschen
- Zellen für 30 Minuten mit Blocking-Lösung bei Raumtemperatur inkubieren
- Primärantikörper bei 4° C über Nacht inkubieren
- Zellen dreimal für jeweils 5 Minuten mit DPBS waschen
- Sekundärantikörper 60 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtschutz inkubieren

- Zellen dreimal für jeweils 5 Minuten mit DPBS waschen
- Zellen unter Lichtschutz mit DAPI-Lösung färben
- Zellen über Nacht eindeckeln
- Zellen am nächsten Tag unter dem Fluoreszenzmikroskop untersuchen

2.2.3 Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms

Um die Aktivität des NLRP3-Inflammasoms messen zu können, wurde zum einen mittels LDH-Assay die Zelltodrate gemessen und zum anderen mittels ELISA die IL-1 β -Konzentration im Zellkulturüberstand ermittelt.

Zum Priming wurden die ARPE-19-Zellen für 48 Stunden mit 4 ng/ml IL-1 α vorbehandelt, während die THP-1-Zellen 2 Stunden mit 200 ng/ml LPS inkubiert wurden. Anschließend erfolgte die Zugabe einer Aktivierungssubstanz. Hier wurden entsprechend der drei Aktivierungswege des NLRP3-Inflammasoms die Substanzen Leu-Leu-OMe (lysosomale Rupture-Modell), H₂O₂ (ROS-Modell) und BzATP (P2X7-Modell) eingesetzt (Akhtar-Schäfer et al., 2018).

2.2.4 Inhibierung des NLRP3-Inflammasoms

Im Folgenden wurden zwei verschiedene Substanzklassen als mögliche Inhibitoren des NLRP3-Inflammasoms getestet. Im H₂O₂-Modell wurde das Wirkprinzip deuterierter mehrfach ungesättigter Fettsäuren (D-PUFAs) untersucht, während im BzATP-Modell die direkten NLRP3-Inhibitoren MCC950 und IFM-632 eingesetzt wurden, die zu der Substanzklasse der small molecule inhibitors zählen.

2.2.4.1 Ansetzen der D-PUFAs

Die deuterierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren D2-Lin und D4- α -Lnn und ihre nicht-deuterierten Analoga Lin und α -Lnn wurden freundlicherweise von unserem Kooperationspartner Mikhail S. Shchepinov (Retrotope Inc., Los Altos Hills, California, USA) zur Verfügung gestellt. Für die Versuchsreihen wurde das Trockenpulver jeweils in

Ethanol und serumfreiem Medium gelöst und anschließend in einer Konzentration von 200 µM in den Versuchen eingesetzt.

Arbeitsschritte

- 200 mg Trockenpulver mit eiskaltem reinem Ethanol auf je eine 1 M Stock solution verdünnen
- 200 mg D2-Lin (=708 µmol) in 708 µl Ethanol
- 200 mg D4- α -Lnn (=1782,5 µmol) in 718,4 µl Ethanol
- 200 mg Lin (=1782,5 µmol) in 1782,5 µl Ethanol
- 200 mg α -Lnn (=1796 µmol) in 1796 µl Ethanol
- 50 µl der Stock solution (1M) mit 2450 µl kaltem serumfreien Medium auf Eis mischen (20 mM)
- Das PUFA-Medium in 50 Aliquots à 50 µl aufteilen und bei - 80 °C einfrieren
- Das restliche PUFA-Ethanol in 13 Aliquots à 50 µl aufteilen und bei - 80 °C einfrieren
- Als Vehikelkontrolle wurde 10 µl Ethanol in 500 µl Medium ohne PUFA gegeben und ebenfalls bei -80 °C eingefroren

2.2.4.2 Small molecule inhibitors

Als small molecule inhibitors wurden die Substanzen MCC950 und IFM-632 eingesetzt. Beide wurden als gebrauchsfertige Lösungen bezogen und mit DPBS ohne Calcium und Magnesium auf die entsprechenden Konzentrationen (0,001 µM, 0,01 µM, 0,1 µM) verdünnt.

2.2.5 LDH-Zytotoxizitätsassay

Um den Zelltod, der durch die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms induziert wird, quantifizieren zu können, wurde der LDH-Zytotoxizitätsassay nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden jeweils Triplets pro Reaktionsgruppe angesetzt.

Bei dem LDH-Zytotoxizitätsassay handelt es sich um einen kalorimetrischen Assay, der auf der Messung des Enzyms Lactat-Dehydrogenase (LDH) basiert. Unter normalen Umständen befindet sich LDH im Zytoplasma der RPE-Zellen. Geht jedoch die Integrität der Zellmembran beispielsweise durch NLRP3-induzierte Pyroptose zugrunde, wird LDH in den Extrazellulärraum freigesetzt und lässt sich im Überstand der Zellkulturplatten nachweisen. Das aus den Zellen freigesetzte LDH katalysiert die Umsetzung von Lactat zu Pyruvat unter Reduktion von NAD^+ zu NADH/H^+ . In einer zweiten Reaktion katalysiert das beigefügte Enzym Diaphorase unter Oxidation von NADH/H^+ zu NAD^+ die Umwandlung von gelbem Tetrazoliniumsalz zu rotem Formazansalz. Dieser Farbumschlag von Gelb zu Rot wird photometrisch gemessen und erlaubt eine Quantifizierung der Zahl lysierter Zellen pro Probe (Roche, 2016).

Reagenzien

- Cytotoxicity Detection Kit (LDH)
- Katalysatorlösung (Diaphorase/ NAD^+ -Mischung)
- Färbelösung (Iodotetrazoliumchlorid und Sodiumlactat)
- Zellfreies Probenmedium

Arbeitsschritte

- Die Katalysatorlösung vor dem ersten Gebrauch mit 1 ml Aqua dest. rekonstituieren und für 10 Minuten auf dem Horizontalschüttler mixen
- Reaktionslösung aus der Katalysatorlösung und der Färbelösung frisch ansetzen; dabei werden 2,5 μl Katalysatorlösung und 0,1125 ml Färbelösung pro well verwendet.
- 96-well-Platte mit 100 μl Proben-Medium pro well befüllen
- 100 μl der frisch angesetzten Reaktionslösung pro well hinzugeben
- Platte für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtschutz inkubieren
- Absorptionswerte bei 492 nm und 650 nm (Referenzwellenlänge) messen

- Berechnung der relativen Zytotoxizität:

$$\text{Zytotoxizität [%]} = \frac{\text{Gemessener Absorptionswert} - \text{Negativkontrolle}}{\text{Positivkontrolle} - \text{Negativkontrolle}} \times 100$$

2.2.6 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Neben dem Zelltod wurde die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms auch anhand der Ausschüttung des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β gemessen. Dazu wurde ein Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) eingesetzt, der reifes humanes IL-1 β im Zellüberstand detektiert.

Bei dem verwendeten ELISA handelt es sich um einen sogenannten Sandwich-ELISA. Dazu wird eine Mikrotiterplatte verwendet, die mit einem monoklonalen Antikörper, der sich gegen humanes IL-1 β richtet, beschichtet ist. Nach Zugabe der Proben bindet das im Überstand der Zellkulturplatten enthaltene IL-1 β an den spezifischen Antikörper. Nach einem Waschschnitt wird ein zweiter biotinylierter Antikörper gegen humanes IL-1 β hinzugefügt, der an den Antikörper-Antigen-Komplex bindet und somit ein Sandwich ausbildet. Nach einem zweiten Waschschnitt wird das Enzym Streptavidin-Horseradish-Peroxidase hinzugefügt und nach einem dritten Waschschnitt das Substrat TMB, das eine blaue Farbreaktion vermittelt. Durch Zugabe der Stopp-Lösung erfolgt ein Farbumschlag von Blau zu Gelb, der bei einem Absorptionsmaximum von 450nm gemessen wird (BD OptEIA, 2014).

Reagenzien

- Human IL-1 β ELISA Kit II
- 96-well-Platte, beschichtet mit monoklonalem Antikörper gegen humanes IL-1 β
- Polyklonaler Detektionsantikörper gegen humanes IL-1 β mit 0,015 % Pro-Clin-150 als Konservierungsmittel
- Standard aus lyophilisiertem rekombinantern humanem IL-1 β

- Enzymkonzentrat (250x) aus Streptavidin-Horseradish-Peroxidase-Konjugat mit BSA und Pro-Clin-150 als Konservierungsmittel
- Enzym-Verdünnungslösung aus gepufferter Proteinbase mit Pro-Clin-150 als Konservierungsmittel
- ELISA-Verdünnungslösung aus gepufferter Proteinbase mit FBS und 0,09 % Sodiumazid als Konservierungsmittel
- Waschkonzentrat (20x) aus konzentrierter Detergenzlösung mit ProClin-150 als Konservierungsmittel
- TMB One-Step Substratlösung aus 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) in Pufferlösung
- Stopplösung aus 1 M Phosphorsäure
- Abdeckfolien
- Aqua dest.

Vorbereitung der Reagenzien

- Alle Reagenzien auf Raumtemperatur (18-25 °C) bringen
- Standards:
 - Lyophilisierten Standard mit ELISA-Verdünnungspuffer rekonstituieren (125 pg/ml), vortexen und für 15 Minuten bei Raumtemperatur äquilibrieren lassen
 - 300 µl ELISA-Verdünnungspuffer in 6 Tubes geben und mit 62,5 pg/ml, 31,3 pg/ml, 15,6 pg/ml, 7,8 pg/ml, 3,9 pg/ml und 1,95 pg/ml beschriften
 - Entsprechend einer Verdünnungsreihe 300 µl jeden Standards zum nächsten Tube überführen, vor jedem Transfer vortexen
- Waschpuffer
- TBM One-Step Substratlösung

Arbeitsschritte

- Alle Reagenzien auf Raumtemperatur (18-25 °C) bringen

- 100 µl von jedem Standard und jeder Probe in die wells pipettieren, Platte mit Abdeckfolie verschließen und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubieren
- Platte 5x mit Waschpuffer spülen und nach dem letzten Waschvorgang mit Papier trocknen, um zurückgebliebenen Waschpuffer zu entfernen
- 100 µl Detektions-Antikörper pro well hinzufügen, Platte mit Abdeckfolie verschließen und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubieren
- Platte 5x nach oben genannten Schema waschen
- 100 µl Enzym-Reaktionslösung pro well hinzufügen, Platte mit Abdeckfolie verschließen und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- Platte 7x nach oben genannten Schema waschen
- 100 µl TBM-One-Substratlösung pro well hinzufügen, Platte ohne Abdeckfolie für 30 Minuten bei Raumtemperatur (unter Lichtschutz) inkubieren
- 50 µl Stopp-Lösung pro well hinzufügen
- Absorptionswerte innerhalb von 30 Minuten bei 450 nm messen

Anhand der Absorptionswerte der Standardkurve wurde abschließend bei Excel eine Eichgerade erstellt, anhand derer die IL-1 β -Konzentration der einzelnen Proben berechnet wurde.

2.2.7 Westernblot

Zum Nachweis von IL-1 β auf Proteinebene wurde darüber hinaus ein Westernblot durchgeführt. Ziel dieser Versuchsreihe war es, zu untersuchen, ob BzATP auch über primende Eigenschaften verfügt und unabhängig von einer Vorinkubation mit IL-1 α zu einer vermehrten Expression von IL-1 β beiträgt. Für den Versuch wurden ARPE-19-Zellen in 12-well-plates ausgesät.

Beim Westernblot handelt es sich um ein molekularbiologisches Verfahren zum Nachweis von Proteinen. Dazu werden die Zellen zunächst mit einem Lysepuffer behandelt, sodass es zu einer Freisetzung von Proteinen aus dem Zytosol kommt. Durch Zentrifugation werden die Proteine von den restlichen festen Zellbestandteilen getrennt. Die

Konzentration der so entstandenen Proteinlösung wird schließlich mit Hilfe des Bradford-Protein-Assays photometrisch bestimmt und die Proben durch Verdünnung auf dieselbe Proteinmenge gebracht. Im nächsten Schritt werden die Proteine durch Gelelektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Diese wird zunächst mit einem Primärantikörper inkubiert, der sich spezifisch gegen das gesuchte Protein richtet. Anschließend erfolgt die Inkubation mit einem Sekundärantikörper, der zum einen an den Primärantikörper bindet und zum anderen mit einem Enzym gekoppelt ist. Dieses Enzym vermittelt nach Zugabe des entsprechenden Substrats eine Chemilumineszenz-Reaktion, die auf einen Röntgenfilm übertragen werden kann, sodass das zu untersuchende Protein als Bandenmuster sichtbar wird (Krohne, 2001).

Um sicherzugehen, dass die Geltaschen mit derselben Proteinmenge beladen wurden, sollte üblicherweise bei einem Westernblot ein weiteres Protein als Ladekontrolle mitlaufen. Darauf wurde jedoch im Folgenden verzichtet, da die üblichen Ladekontrollen β -Actin (43 kD), α -Tubulin (55 kD) und GAPDH (30-40 kD) über ein ähnliches Molekulargewicht wie IL-1 β verfügen (37 kD) und daher eine Interferenz der Bandenmuster nicht ausgeschlossen werden konnte.

Vorbereitung der Reagenzien

- RIPA-Puffer (50 ml):
 - 1 % NP-40 (0,5 ml)
 - 0,5 % DOC (0,25 g)
 - 1 % SDS (0,5 ml SDS 10 %)
 - 150 mM NaCl (1,5 ml NaCl 5 M)
 - 50 mM Tris pH 8,0 (2,5 ml Tris 1 M)
 - in Aqua dest. (auffüllen auf 50 ml)
- Laupuffer (5x)
 - 7,55 g Tris (Applichem, entspricht 25 ml Endkonzentration)
 - 36,0 g Glycin (Applichem)
 - 25 ml SDS 10 % (Applichem)

- auf 500 ml mit Aqua dest. Auffüllen
- PBS 0,01 M (10x)
 - 40 g NaCl (1,37 M)
 - 1,0 g KCl (27 mM)
 - 5,75 g Dinatriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 43 mM)
 - 1,0 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4 , 14 mM)
 - auf 500 ml mit Aqua dest. auffüllen
- PBS-Tween (PBST) (1x)
 - 5 ml Tween-20 (Applichem) in 20 ml PBS (= 20%iges Tween-20)
 - davon 1,0 ml 20%iges Tween-20
 - 100 ml PBS 0,01 M (10x)
 - 900 ml Aqua dest.
- Transferpuffer (5x)
 - 15,1 g Tris (Applichem, entspricht 25 mM Endkonzentration)
 - 72,0 g Glycin (Applichem)
 - auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen
- Blockingpuffer:
 - 0,5 g BSA
 - 1,5 g Magermilchpulver
 - in 50 ml PBST 1x
- Entwickler/Fixierer
 - 109 ml in 500 ml Aqua dest.

Zelllyse

Arbeitsschritte

- Zellen trypsinieren
- Zellsuspension bei 1000 G und 4 °C für 5 Minuten zentrifugieren
- Proteinase-Inhibitor und RIPA-Puffer im Verhältnis 1:10 mischen (pro Probe je 30-200 µl je nach Pelletgröße ansetzen)
- Überstand absaugen

- Proteinase-Inhibitor-RIPA-Gemisch auf die Zellsuspension geben, resuspendieren und für 10 Minuten bei 4°C im Kühlschrank inkubieren
- Zellsuspension anschließend bei 10.000 G und 4 °C für 10 Minuten zentrifugieren
- Überstand in vorgekühlte Eppendorff Tubes überführen und Zellpellets verwerfen

Bestimmung der Proteinkonzentration

Arbeitsschritte

- Bradford-Reagenz auf Raumtemperatur bringen
- Für die Standardproben (Proteinkonzentration 0-10 µg/ml) je 1 ml PBS mit 0, 2, 4, 6, 8 und 10 µl BSA-Proteinstandard mischen, zusätzlich je 2 µl RIPA-Puffer als Negativkontrolle hinzufügen
- Für die Zelllysat-Proben je 2 µl der zu untersuchenden Proteinlösung mit 1 ml PBS mischen
- Je 1 ml Bradford-Reagenz zu den Standardproben bzw. Zelllysat-Proben hinzufügen
- Gemisch aus Proteinstandard bzw. Zelllysat-Probe und Bradford-Reagenz für 5-45 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren lassen
- Proben in Küvetten umfüllen und Absorption bei 595 nm messen
- Bestimmung der Proteinkonzentration der verschiedenen Zelllysat-Proben
- Berechnung des Volumens der jeweiligen Probe bei einer gewünschten Proteinmenge von 100 µg pro Geltasche

$$\text{Probenmenge } [\mu\text{l}] = (B \times P)/(K \times 1\text{ml})$$

B: im Bradford eingesetztes Volumen der Proteinlösung [µl] [hier: 2 µl]

P: gewünschte Proteinmenge je Bahn des Westernblots [µg] [100 µg]

K: Proteinkonzentration der Bradford-Probe [µg/ml] (Volumen der Bradford-Probe: 1 ml)

Gelelektrophorese

Arbeitsschritte

- Laufpuffer ansetzen: 100 ml Laufpuffer (5x) + 400 ml Aqua dest.
- Ladepuffer IX mit 200 mM Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT) versetzen
- Probe und Ladepuffer im Verhältnis 1:1 mischen (i.d.R. 15 µl Probe + 15 µl Ladepuffer IX)
- Gel in die Elektrophoresekammer einsetzen und Kammer mit Laufpuffer füllen
- 10 µl Proteinmarker in die erste Geltasche und je 15 µl Probe-Ladepuffer-Gemisch in die weiteren Geltaschen pipettieren
- Gelelektrophorese bei 120 V für 60-90 Minuten laufen lassen

Protein-Transfer

Arbeitsschritte

- Transferpuffer ansetzen:
 - 200 ml Transferpuffer (5x)
 - 600 ml Aqua dest.
 - 200 ml Methanol (zum Schluss)
 - Transfermembran in Methanol einweichen lassen
 - Whatman-Papier in Transferpuffer einweichen lassen
- Transferkammer luftblasenfrei zusammenbauen:
 - Schwamm
 - Whatman-Papier
 - Trenngel
 - Transfermembran
 - Whatman-Papier
 - Schwamm
- Transferkammer in den Transferbehälter stellen und mit Transferpuffer füllen
- Blotting bei 100 V und 400 mA für 90 Minuten

Immunodetektion

Arbeitsschritte

- Transfermembran mit Ponceau-S-Lösung färben, um den Erfolg des Blottens zu überprüfen
- Färbung mit PBST auswaschen
- Membran mit Blockingpuffer bedecken und bei 4°C über Nacht auf einem Schüttler inkubieren
- Transfermembran mit Primärantikörper (in 10 ml Blockingpuffer) für mindestens 60 Minuten auf einem Schüttler inkubieren
- 3x kurz mit Aqua dest. waschen, 3x mit PBST für jeweils 10 Minuten auf dem Schüttler waschen
- Transfermembran mit Sekundärantikörper (in 10 ml Blockingpuffer) für mindestens 60 Minuten auf einem Schüttler inkubieren
- 3x kurz mit Wasser waschen, 3x mit PBST für jeweils 10 Minuten auf dem Schüttler waschen
- Transfermembran mit 10 ml SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate 1+1 bedecken und unter Lichtschutz für 5 Minuten inkubieren
- Röntgenfilme für 10 Sekunden bis 10 Minuten belichten und entwickeln

2.2.8 Statistische Auswertung

Die Daten aus LDH-Assay und ELISA wurden mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS ausgewertet. Dazu wurden die Werte zunächst auf Normalverteilung überprüft und anschließend eine ANOVA-Analyse durchgeführt. Als Post-Hoc-Test kam der Bonferroni-Test zum Einsatz. Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert +/- Standardabweichung angegeben. Als statistisch signifikant wurden die Ergebnisse bei p-Werten <0,05 gewertet. In allen Graphen wurden die Signifikanzlevel folgendermaßen gekennzeichnet: p<0,05 (*), p<0,01 (**) und p<0,001 (***)**.** Die graphische Auswertung des Westernblots wurde mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogramms ImageJ vorgenommen und die gemessenen Werte anschließend mittels Excel ausgewertet.

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung des ARPE-19-Zellkulturmodells

3.1.1 Charakterisierung der verwendeten humanen RPE-Zelllinie

Die Fotos zeigen die typische Morphologie der verwendeten humanen RPE-Zelllinie ARPE-19 (Abb. 8, Abb. 9). Analog zu humanen RPE-Zellen in vivo bilden ARPE-19-Zellen epitheliale Monolayer mit interzellulären Tight Junctions aus. Für die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurde zum einen ein ZO-1-Antikörper (blau) verwendet, der sich gegen das membranständige Tight Junctions-Protein Zonula occludens 1 (ZO-1) richtet, zum anderen der Fluoreszenzfarbstoff DAPI (grün), der an die DNA im Zellkern bindet (Abb. 9).

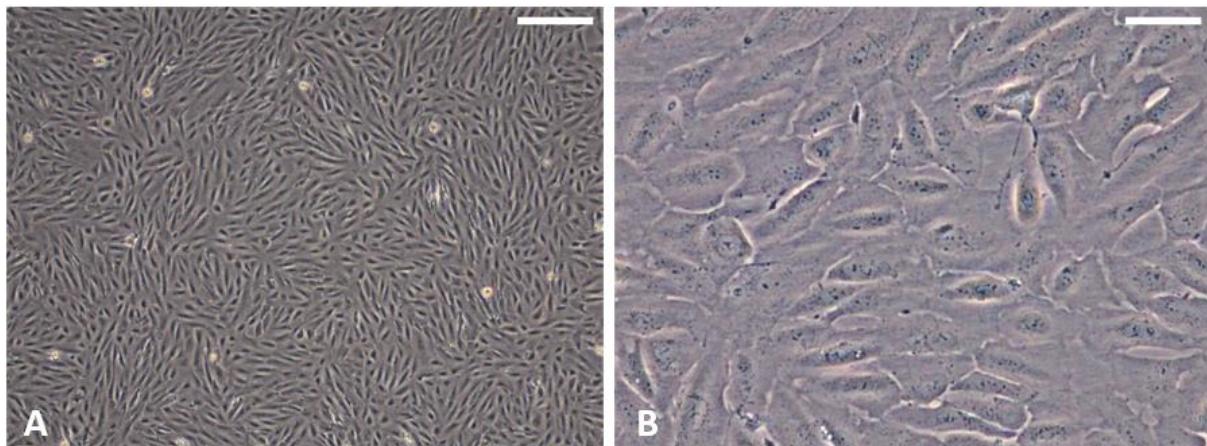


Abb. 8: Lichtmikroskopische Darstellung von ARPE-19-Zellen. A: Vergrößerung: 40-fach, Maßstabsleiste: 200 µm. B: Vergrößerung: 400-fach, Maßstabsleiste: 20 µm.

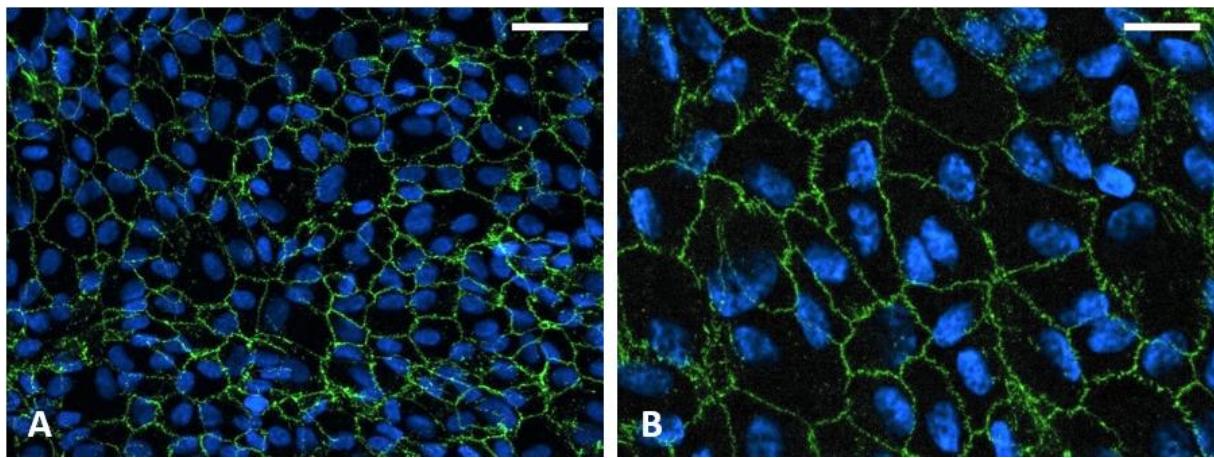


Abb. 9: Fluoreszenzmikroskopische morphologische Charakterisierung von ARPE-19-Zellen. A: Vergrößerung: 100-fach, Maßstabsleiste: 80 μM . B: Vergrößerung: 400-fach, Maßstabsleiste: 20 μm . Grün gefärbt ist das interzelluläre Tight-junctions-Protein ZO-1. Die im Zellkern lokalisierte DNA erscheint durch den Fluoreszenzfarbstoff DAPI blau.

3.2 Zellkulturmodell 1: Inflammasomaktivierung durch lysosomale Membranpermeabilisation

Zunächst wurde die NLRP3-Inflammasomaktivierung in dem Modell der lysosomalen Membranpermeabilisation untersucht. Dazu wurde die lysosomotrope Substanz L-leucyl-L-leucyl-Methylester (Leu-Leu-OMe) eingesetzt, die zu einer chemisch-induzierten Destabilisierung der lysosomalen Membran führt.

3.2.1 Effekt von Konzentration und Priming auf die Leu-Leu-OMe-induzierte Inflammasomaktivierung

In einem ersten Schritt wurden ARPE-19-Zellen nach einem 48-stündigen Priming-Schritt mit IL-1 α für drei Stunden mit steigenden Konzentrationen Leu-Leu-OMe (0 mM, 0,25 mM, 0,5 mM, 0,75 mM, 1 mM) behandelt. Hierbei zeigte sich eine dosisabhängige Wirkung und ab einer Konzentration von 0,25 mM eine statistisch signifikante Erhöhung sowohl der Zytotoxizität als auch der IL-1 β -Ausschüttung als Zeichen der NLRP3-Inflammasomaktivierung. Für alle Konzentrationsschritte wurde zusätzlich der Effekt des Inflammasom-Primings auf die Leu-Leu-OMe induzierte Inflammasomaktivierung untersucht. Hierbei ließ sich über alle Konzentrationen hinweg eine signifikante

Steigerung der Inflammasomaktivierung durch den Priming-Schritt nachweisen (Abb. 10, Abb. 11).

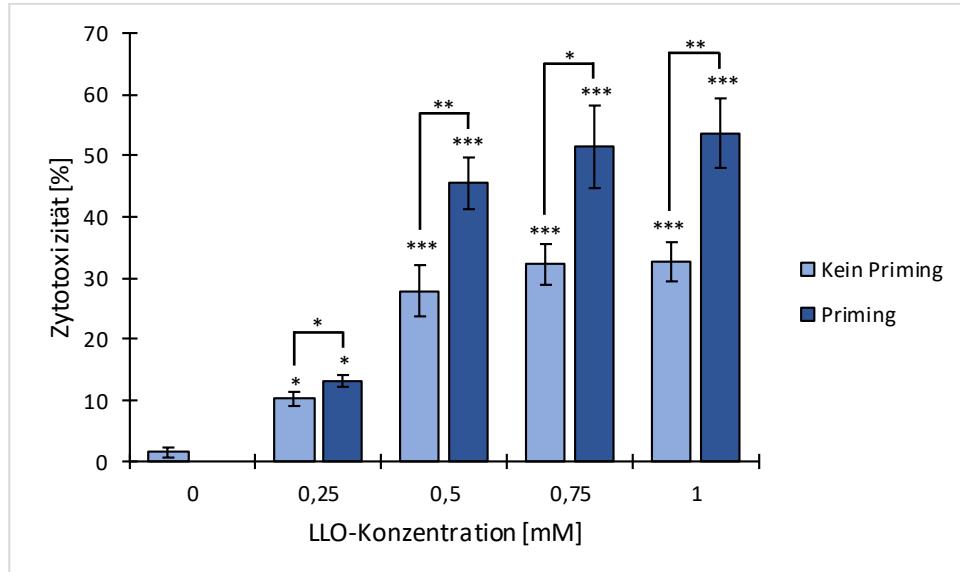


Abb. 10: Effekt von Konzentration und Priming auf die Leu-Leu-OMe-induzierte Zytotoxizität (n=3). ARPE-19-Zellen wurden für 3 Stunden mit aufsteigenden Konzentrationen Leu-Leu-OMe behandelt. Ein Teil der Zellen wurde zudem für 48 Stunden mit dem Priming-Faktor IL-1 α präinkubiert. Es zeigte sich sowohl für den Faktor Konzentration als auch für den Faktor Priming eine signifikante Steigerung der Zytotoxizität als Zeichen der Inflammasomaktivierung. Nicht signifikant (n.s.), p<0,05 (*), p<0,01 (** und p<0,001 (***)).

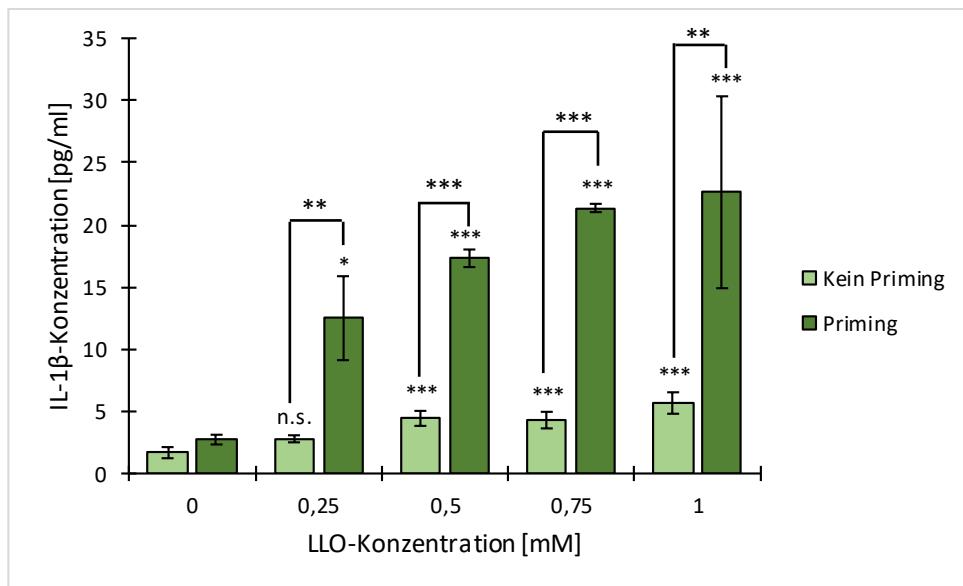


Abb. 11: Effekt von Konzentration und Priming auf die Leu-Leu-OMe-induzierte IL-1 β -Ausschüttung (n=4). ARPE-19-Zellen wurden für 3 Stunden mit aufsteigenden Konzentrationen Leu-Leu-OMe behandelt. Ein Teil der Zellen wurde zudem für 48 Stunden mit dem Priming-Faktor IL-1 α präinkubiert. Es zeigte sich sowohl für den Faktor Konzentration als auch für den Faktor Priming eine signifikante Steigerung der IL-1 β -Ausschüttung als Zeichen der Inflammasomaktivierung. Nicht signifikant (n.s.), p<0,05 (*), p<0,01 (** und p<0,001 (***)).

3.3 Zellkulturmodell 2: Inflammasomaktivierung durch oxidativen Stress

In einem zweiten Modell der NLRP3-Inflammasomaktivierung wurde H₂O₂ als Aktivierungssignal eingesetzt. H₂O₂ bildet beim Zerfall reaktive Sauerstoffspezies wie Hydroxylradikale (OH-Radikale) und Peroxyradikale (OOH-Radikale), die über den ROS-Aktivierungsweg das NLRP3-Inflammasom stimulieren können.

3.3.1 Effekt von Konzentration und Priming auf die H₂O₂-induzierte Inflammasomaktivierung

Zur Etablierung des H₂O₂-Modells wurden die ARPE-19-Zellen zunächst für 48 Stunden mit der Priming-Substanz IL-1 α inkubiert und anschließend mit aufsteigenden Konzentrationen H₂O₂ (0 mM, 2,5 mM, 5 mM, 7,5 mM, 10 mM) für drei Stunden behandelt. Hierbei zeigte sich ein konzentrationsabhängiger Effekt. Je höher die H₂O₂-Konzentration gewählt wurde, desto höher fiel auch die Zytotoxizität aus (Abb. 12). Dieselbe Beobachtung konnte auch für die IL-1 β -Freisetzung gemacht werden (Abb. 13). Dabei trat

eine signifikante Erhöhung der Zytotoxizität bzw. IL-1 β -Freisetzung ab einer Konzentration von 5 mM H₂O₂ auf (Abb. 12, Abb. 13). Im nächsten Schritt wurde zudem der Effekt des Priming-Signals auf die NLRP3-Aktivierung untersucht. Die Versuchsergebnisse zeigten, dass der Faktor Priming über alle Konzentrationen hinweg statistisch signifikant sowohl die Rate an Zelltod als auch die Ausschüttung von IL-1 β erhöht. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden in den weiteren Versuchen ARPE-19-Zellen nach einem Priming-Schritt mit einer H₂O₂-Konzentration von 5 mM behandelt.

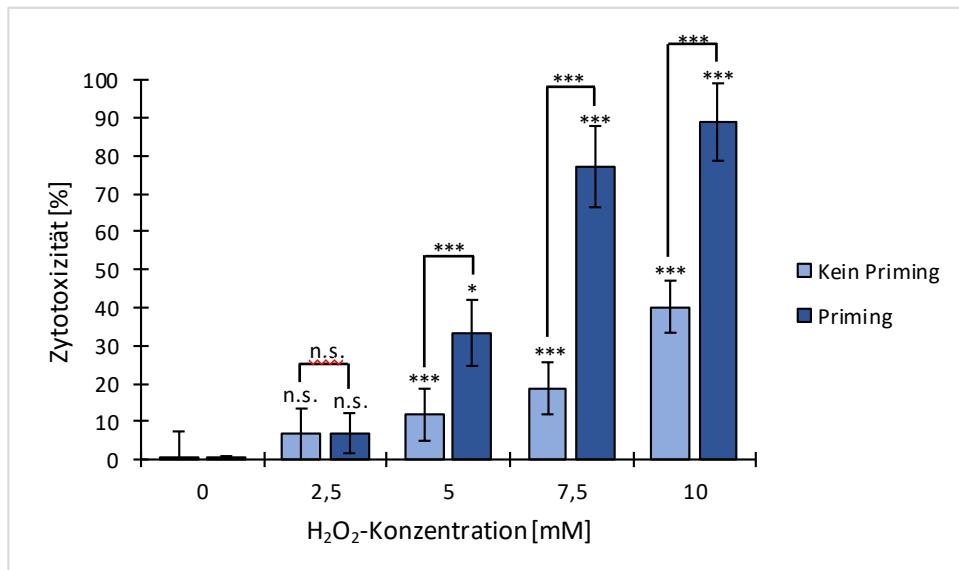


Abb. 12: Effekt von Konzentration und Priming auf die H₂O₂-induzierte Zytotoxizität (n=12). ARPE-19-Zellen wurden für 3 Stunden mit aufsteigenden Konzentrationen H₂O₂ behandelt. Ein Teil der Zellen wurde für 48 Stunden mit dem Priming-Faktor IL-1 α präinkubiert. Es zeigte sich sowohl für den Faktor Konzentration als auch für den Faktor Priming (ab 5 mM H₂O₂) eine signifikante Steigerung der Zytotoxizität als Zeichen der Inflammasomaktivierung. Nicht signifikant (n.s.), p<0,05 (*), p<0,01 (**) und p<0,001 (***).

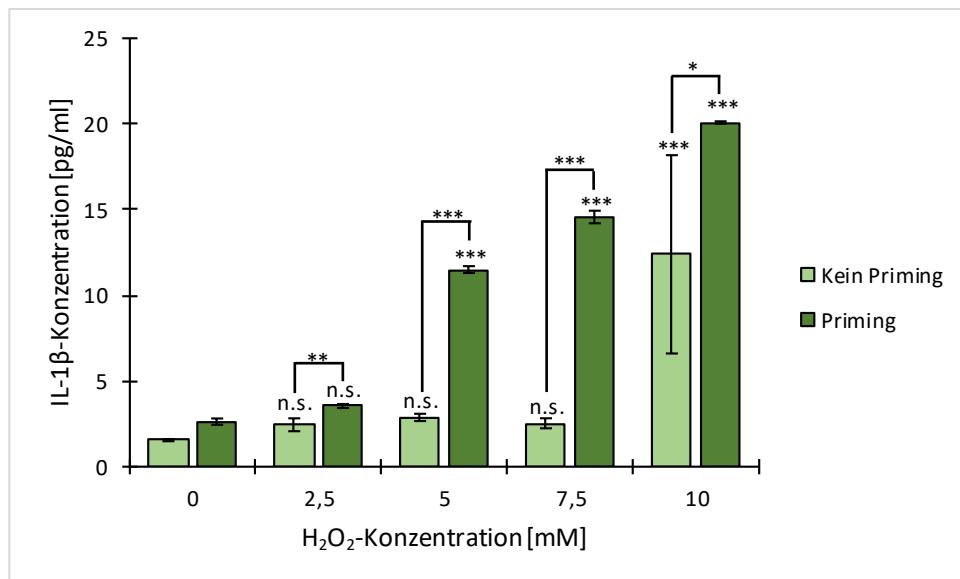


Abb. 13: Effekt von Konzentration und Priming auf die H_2O_2 -induzierte IL-1 β -Ausschüttung (n=4). ARPE-19-Zellen wurden für 3 Stunden mit aufsteigenden Konzentrationen H_2O_2 behandelt. Ein Teil der Zellen wurde für 48 Stunden mit dem Priming-Faktor IL-1 α präinkubiert. Es zeigte sich sowohl für den Faktor Konzentration (ab 5 mM H_2O_2) als auch für den Faktor Priming eine signifikante Steigerung der IL-1 β -Ausschüttung als Zeichen der Inflammasomaktivierung. Nicht signifikant (n.s.), p<0,05 (*), p<0,01 (**) und p<0,001 (***)

3.3.2 Effekt deuterierter mehrfach ungesättigter Fettsäuren auf die H_2O_2 -induzierte Inflammasomaktivierung

Die deuterierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren 11,11-D2-Linolsäure (D2-Lin) und 11,11,14,14- α -Linolensäure (D4- α -Lnn) wurden ebenso wie die nativen, nicht deuterierten Fettsäuren Linolsäure (Lin) und α -Linolensäure (α -Lnn) in einer Konzentration von 200 μ M eingesetzt. Um ihren Effekt auf die H_2O_2 -induzierte NLRP3-Aktivierung messen zu können, wurden ARPE-19-Zellen zunächst für unterschiedliche Zeitintervalle (24 h, 48 h, 72 h, 96 h) mit den Fettsäuren präinkubiert. Parallel dazu erfolgte ein 48-stündiger Priming-Schritt mit IL-1 α und eine dreistündige Behandlung mit 5 mM H_2O_2 . Während der Priming- und Aktivierungsbehandlung enthielt das Medium ebenfalls die jeweiligen Fettsäuren. Entgegen unserer Hypothese, dass die deuterierten Fettsäuren die H_2O_2 -induzierte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und die dadurch ausgelöste Lipidperoxidation mit anschließender lysosomaler Membranpermeabilisation unterbinden, konnte in keinem der Versuche, unabhängig von der Inkubationszeit, eine signifikante

Reduktion der H₂O₂-induzierten Zytotoxizität nachgewiesen werden (Abb. 14). Auf eine zusätzliche Untersuchung der IL-1 β -Ausschüttung mittels ELISA wurde verzichtet.

Die untersuchten deuterierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren sind somit basierend auf diesen Ergebnissen nicht in der Lage, die NLRP3-Inflammasomaktivierung durch H₂O₂ signifikant zu reduzieren.

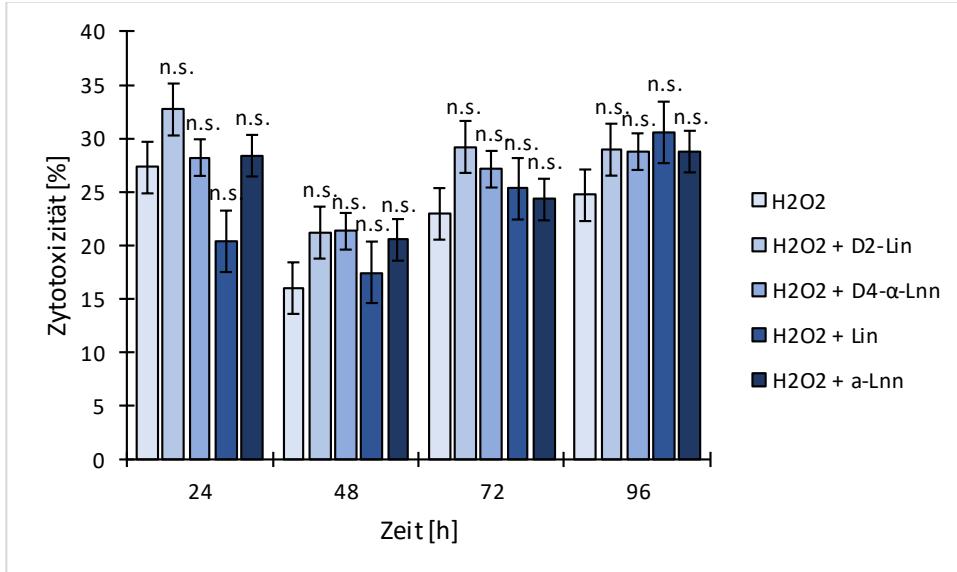


Abb. 14: Kein signifikanter Effekt der Fettsäuren D2-Lin, D4- α -Lnn, Lin und α -Lnn auf die H₂O₂-induzierte Inflammasomaktivierung nach 24, 48, 72 und 96 Stunden Inkubationszeit (n=6). ARPE-19-Zellen wurden für 48 Stunden mit IL-1 α behandelt und zeitgleich für verschiedene Zeitintervalle mit den Fettsäuren D2-Lin, D4- α -Lnn, Lin und α -Lnn inkubiert. Es zeigte sich unabhängig von der Inkubationsdauer keine signifikante Reduktion der H₂O₂-induzierten Zytotoxizität. Die angegebenen Signifikanzstufen beziehen sich innerhalb einer Zeitspanne jeweils auf die mit H₂O₂-behandelte Versuchsgruppe. Nicht signifikant (n.s.), p<0,05 (*), p<0,01 (**) und p<0,001 (***)

3.4 Zellkulturmodell 3: Inflammasomaktivierung über den P2X7-Rezeptor

Um einen weiteren Aktivierungsweg des NLRP3-Inflammasoms in vitro abbilden zu können, wurde im Folgenden die P2X7-induzierte Inflammasomaktivierung als drittes Zellkulturmodell in ARPE-19-Zellen etabliert. Als Aktivierungssubstanz wurde der ATP-Abkömmling BzATP verwendet, der im Vergleich zu ATP mit einer 10-30-fach höheren Potenz an den P2X7-Kanal bindet (North, 2002).

3.4.1. THP-1-Zellen

Da es bezüglich des P2X7-Modells in RPE-Zellen bisher kaum veröffentlichte Daten gibt, dieses aber in Makrophagen bereits vielfach eingesetzt wird (Buell et al., 1998), wurden die ersten Versuchsreihen an THP-1-Zellen durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine humane Monozytenzelllinie, die 1978 aus dem peripheren Blut eines Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) gewonnen wurde. THP-1-Zellen ähneln humanen Monozyten und Makrophagen in Morphologie und Differenzierungsverhalten und stellen damit ein weit verbreitetes Zellkulturmodell zur Untersuchung der Eigenschaften humaner Monozyten dar (Chanput et al., 2014; Tsuchiya et al., 1980).

Die Untersuchung der NLRP3-Inflammasomaktivierung in THP1- Zellen erfolgte mit dem Ziel, eine geeignete BzATP-Konzentration zu ermitteln sowie den Einfluss von Priming und Inkubationszeit einschätzen zu können. Dabei wurde die Zelltodrate mittels LDH-Assay bestimmt. Auf die Messung der IL-1 β -Konzentration mittels ELISA wurde verzichtet, da trotz mehrfacher Verdünnung die Absorptionswerte den Messbereich des Microplate-Readers überstiegen und daher nicht auswertbar waren.

3.4.1.1 Effekt von Konzentration und Priming auf die BzATP-induzierte Inflammasomaktivierung

Die THP-1-Zellen wurden für die Versuchsreihen für zwei Stunden mit der Priming-Substanz LPS (200 ng/ml) und anschließend mit steigenden BzATP-Konzentrationen (0 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 400 μ M) behandelt. Hierbei zeigte sich ein konzentrationsabhängiger Effekt. Je höher die eingesetzte BzATP-Konzentration war, desto höher fiel die Zytotoxizität aus. Dabei ließ sich eine signifikante Erhöhung der Zytotoxizität ab einer Konzentration von 100 μ M BzATP nachweisen. Darüber hinaus wurde der Einfluss des Faktors Priming auf die BzATP-induzierte Zytotoxizität überprüft. Hierbei zeigte sich, dass der Priming-Schritt die Zelltodrate über alle Konzentrationsstufen hinweg signifikant steigern konnte (Abb. 15).

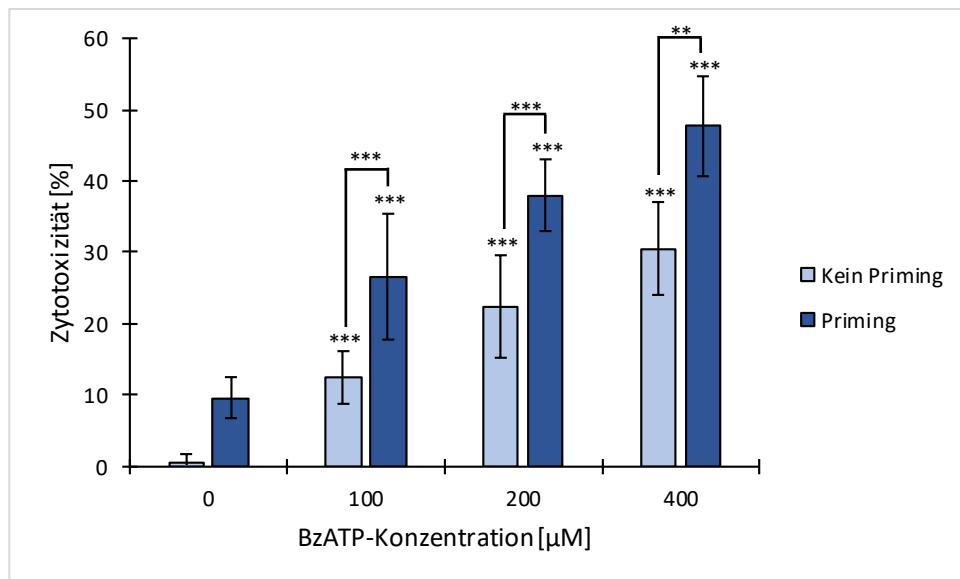


Abb. 15: Effekt von Konzentration und Priming auf die BzATP-induzierte Inflammasomaktivierung in THP-1-Zellen ($n=9$). THP-1 Zellen wurden für 24 Stunden mit aufsteigenden Konzentrationen BzATP behandelt. Ein Teil der Zellen wurde zudem für 2 Stunden mit dem Priming-Faktor LPS präinkubiert. Es zeigte sich sowohl für den Faktor Konzentration als auch für den Faktor Priming eine signifikante Steigerung der Zytotoxizität als Zeichen der Inflammasomaktivierung. Nicht signifikant (n.s.), $p<0,05$ (*), $p<0,01$ (** und $p<0,001$ (***)).

3.4.1.2 Effekt der Inkubationszeit auf die BzATP-induzierte Inflammasomaktivierung

Zudem wurde auch der Einfluss der Inkubationszeit auf die BzATP-induzierte Inflammasomaktivierung ermittelt. Hierzu wurden THP-1-Zellen nach einem zweistündigen Priming-Schritt mit LPS für unterschiedliche Zeitintervalle (3 h, 6 h, 24 h) mit BzATP behandelt. Die Versuche zeigten, dass die Zytotoxizität mit steigender Inkubationsdauer zunimmt. Ein signifikanter Anstieg der Zelltodrate konnte für alle BzATP-Konzentrationen (100 μ M, 200 μ M, 400 μ M) ab einer Inkubationszeit von 24 h erzielt werden (Abb. 16).

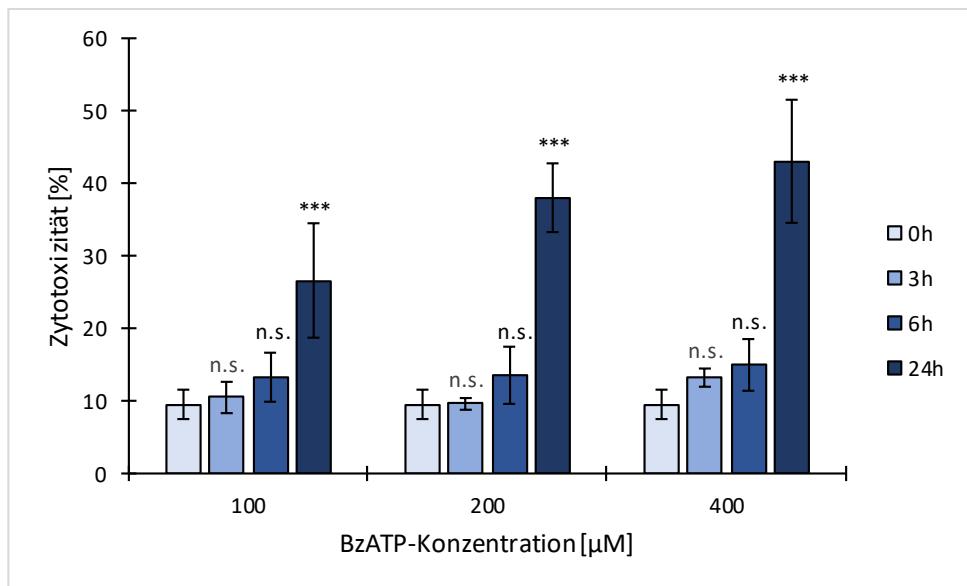


Abb. 16: Effekt der Inkubationszeit auf die BzATP-induzierte Inflammasomaktivierung in THP-1-Zellen (n=3). THP-1-Zellen wurden zunächst für 2 Stunden mit dem Priming-Faktor LPS präinkubiert und anschließend für verschiedene Zeitintervalle mit den BzATP-Konzentrationen 100, 200 und 400 μM behandelt. Erst ab einer Inkubationsdauer von 24 Stunden zeigte sich eine signifikante Steigerung der Zytotoxizität. Die angegebenen Signifikanzstufen beziehen sich innerhalb einer Konzentrations-Untergruppe jeweils auf die ohne BzATP (0 h) behandelte Versuchsgruppe. Nicht signifikant (n.s.), $p<0,05$ (*), $p<0,01$ (** und $p<0,001$ (***)).

3.4.2 ARPE-19-Zellen

Nach der Etablierung des Zellkulturmodells in THP-1-Zellen wurden dieselben Einflussgrößen im Folgenden an ARPE-19-Zellen untersucht. Zusätzlich wurde der Einfluss divalerter Kationen auf die BzATP-induzierte Inflammasomaktivierung bestimmt.

3.4.2.1 Effekt von Konzentration und divalenten Kationen auf die BzATP-induzierte Inflammasomaktivierung

Mehrere Studien weisen darauf hin, dass divaleute Kationen wie Calcium und Magnesium einen hemmenden Einfluss auf den P2X7-Kanal und damit die NLRP3-Aktivierung haben (Dutot et al., 2008; Michel et al., 1999; North, 2002; Virginio et al., 1997). Daher wurde neben den Einflussgrößen Konzentration, Priming und Inkubationszeit auch der Faktor Medium untersucht. Hierzu wurden ARPE-19-Zellen für 48 Stunden mit der Priming-

Substanz IL-1 α und anschließend mit aufsteigenden Konzentrationen BzATP behandelt. Dabei wurden die Versuche sowohl in dem Standard-Zellkulturmedium DMEM als auch in der Waschlösung DPBS, jeweils mit und ohne Calcium und Magnesium, durchgeführt. Die Versuche zeigten, dass eine statistisch signifikante Steigerung der Zelltodrate und IL-1 β -Freisetzung als Zeichen der NLRP3-Inflammasomaktivierung nur in Calcium- und Magnesium-freiem DPBS erzielt werden konnte (Abb. 17, Abb. 18). Dies bestätigt den hemmenden Einfluss divalerter Kationen auf die P2X7-induzierte Inflammasomaktivierung.

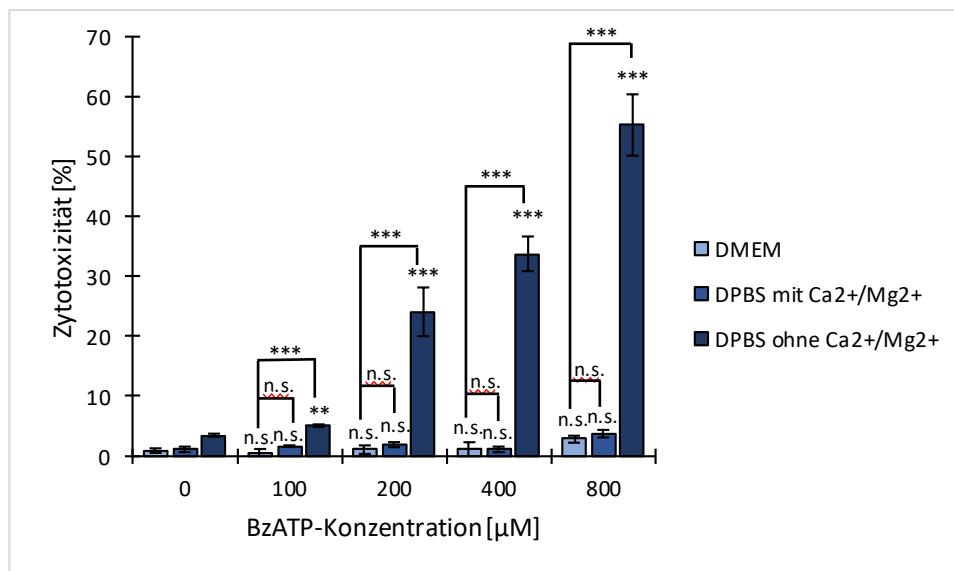


Abb. 17: Effekt von Konzentration und divalenten Kationen auf die BzATP-induzierte Zytotoxizität in ARPE-19-Zellen ($n=3$). ARPE-19-Zellen wurden für 48 Stunden mit dem Priming-Faktor IL-1 α präinkubiert und für weitere 24 Stunden mit aufsteigenden Konzentrationen BzATP behandelt. Die Versuche wurden in drei verschiedenen Medien (DMEM, PBS mit Calcium/Magnesium und PBS ohne Calcium/Magnesium) durchgeführt. Eine signifikante Steigerung der BzATP-induzierten Zytotoxizität als Zeichen der Inflammasomaktivierung zeigte sich nur in Calcium-/Magnesium freiem Medium. Nicht signifikant (n.s.), $p<0,05$ (*), $p<0,01$ (**) und $p<0,001$ (***)).

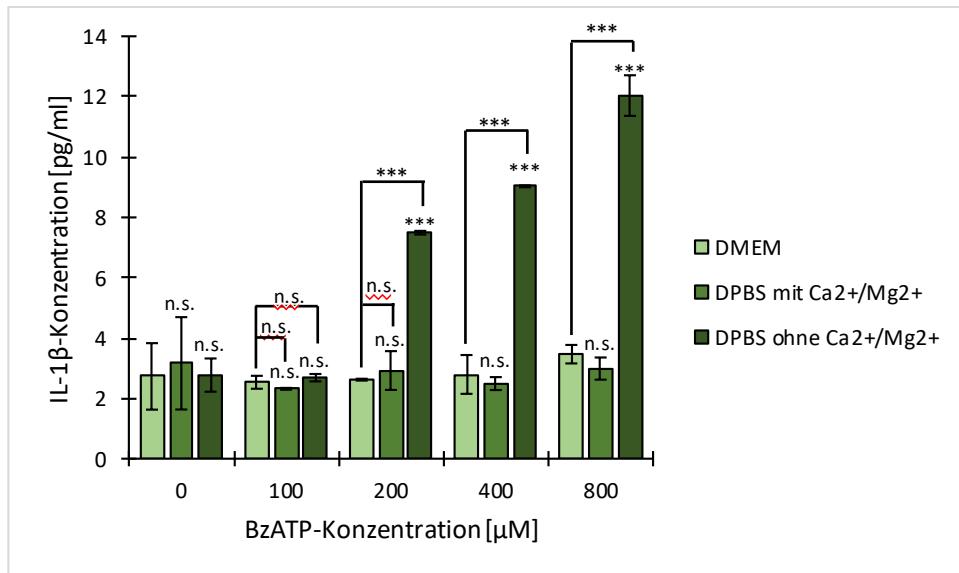


Abb. 18: Effekt von Konzentration und divalenten Kationen auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Ausschüttung in ARPE-19-Zellen (n=2). ARPE-19-Zellen wurden für 48 Stunden mit dem Priming-Faktor IL-1 α präinkubiert und für weitere 24 Stunden mit aufsteigenden Konzentrationen BzATP behandelt. Die Versuche wurden in drei verschiedenen Medien (DMEM, DPBS mit Calcium/Magnesium und DPBS ohne Calcium/Magnesium) durchgeführt. Eine signifikante Steigerung der BzATP-induzierten IL-1 β -Ausschüttung als Zeichen der Inflamasomaktivierung zeigte sich nur in Calcium-/Magnesium freiem Medium. Nicht signifikant (n.s.), p<0,05 (*), p<0,01 (**) und p<0,001 (***)

3.4.2.2 Effekt verschiedener Medien auf die Zytotoxizität nach 24-stündiger Inkubation

Da den beiden verwendeten Pufferlösungen DPBS mit bzw. ohne Calcium und Magnesium typische Bestandteile eines Zellkulturmediums fehlen, wurde die Zellmorphologie unbehandelter ARPE-19-Zellen nach 24 Stunden Inkubationszeit lichtmikroskopisch untersucht und die Zytotoxizität zusätzlich anhand der LDH-Freisetzung gemessen, um auszuschließen, dass die Pufferlösungen selbst ein vermehrtes Zellsterben provozieren. Die Morphologie der Zellen erschien auf den lichtmikroskopischen Aufnahmen in Calcium-/Magnesium-freiem Medium zwar leicht verändert, aber es zeigte sich kein klarer Hinweis auf eine erhöhte Zelltodrate (Abb. 19). Auch die LDH-Messungen weisen darauf hin, dass die Zytotoxizität nach einer 24-stündigen Inkubationszeit bei allen drei Medien vergleichbar gering ist (Abb. 20).

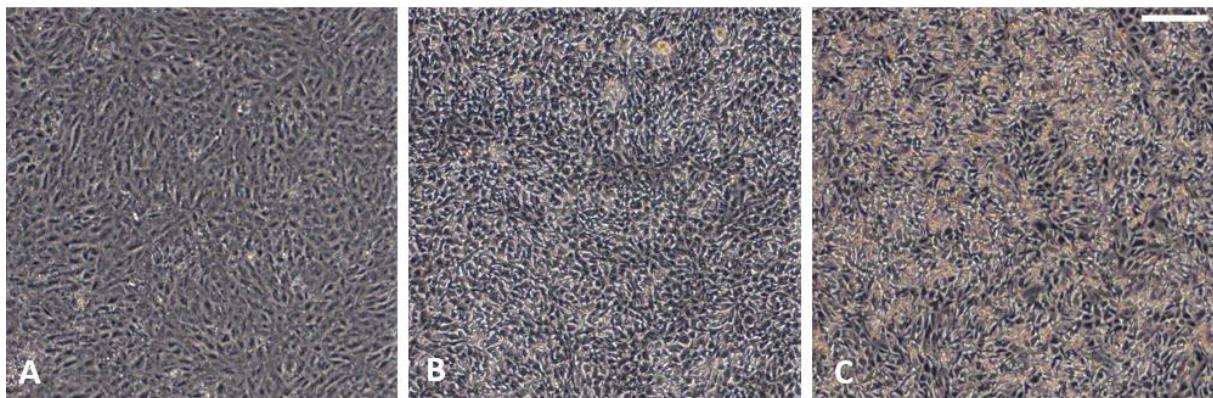


Abb. 19: Lichtmikroskopische Aufnahmen unbehandelter ARPE-19-Zellen ohne Priming-Schritt nach 24-stündiger Inkubation in DMEM (A), DPBS mit Calcium und Magnesium (B) und Calcium-/Magnesium-freiem DPBS (C). Vergrößerung: 40-fach, Maßstabsleiste: 200 µm. Die Morphologie der ARPE-19-Zellen in der Pufferlösung DPBS (B, C) zeigt sich im Vergleich zu den Zellen im Zellkulturmedium DMEM (A) leicht verändert.

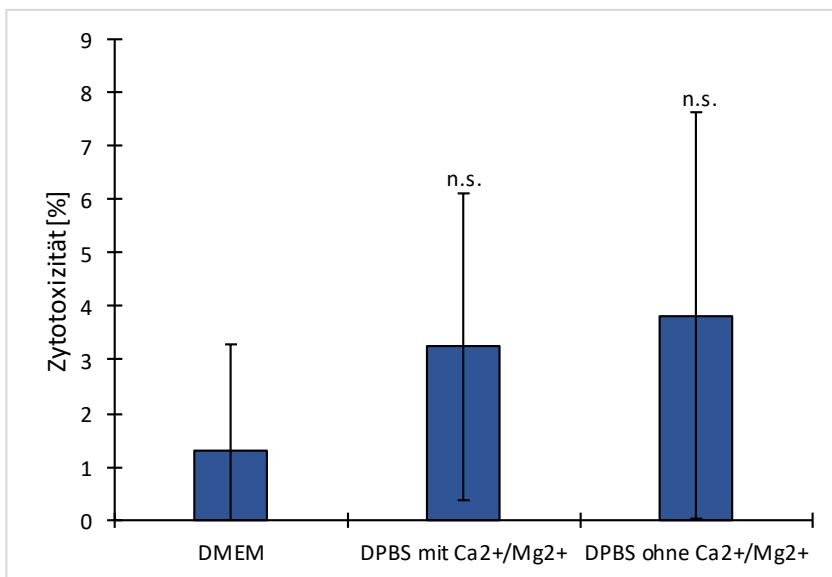


Abb. 20: Zytotoxizität unbehandelter ARPE-19-Zellen ohne Priming-Schritt nach 24-stündiger Inkubation in DMEM, DPBS mit Calcium und Magnesium und Calcium-/Magnesium-freiem DPBS (n=9). Unbehandelte ARPE-19-Zellen wurden für 24 Stunden in drei verschiedenen Medien (DMEM, DPBS mit Calcium/Magnesium, DPBS ohne Calcium/Magnesium) inkubiert. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Zytotoxizität zwischen den drei Medien. Nicht signifikant (n.s.), p<0,05 (*), p<0,01 (**) und p<0,001 (***)

3.4.2.3 Effekt von Priming auf die BzATP-induzierte Inflammasomaktivierung

Um den Einfluss des Faktors Priming auf die BzATP-induzierte Inflammasomaktivierung zu untersuchen, wurden ARPE-19-Zellen für 24 Stunden mit aufsteigenden

Konzentrationen BzATP ($0 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$, $200 \mu\text{M}$, $400 \mu\text{M}$, $800 \mu\text{M}$) in Calcium- und Magnesium-freiem DPBS behandelt. Die eine Hälfte der Versuchsgruppe wurde zuvor für 48 Stunden mit IL-1 α inkubiert, während bei der anderen Hälfte auf einen Priming-Schritt verzichtet wurde.

Ebenso wie bei den THP-1-Zellen zeigte sich auch bei den ARPE-19-Zellen konzentrationsabhängig eine signifikante Steigerung sowohl der Zytotoxizität als auch der IL-1 β -Konzentration durch BzATP (Abb. 21, Abb. 22). Darüber hinaus führte der Priming-Schritt ab einer BzATP-Konzentration von $200 \mu\text{M}$ zu einer signifikanten Steigerung der Inflammasomaktivierung. Der stärkste Effekt konnte dabei bei einer BzATP-Konzentration von $400 \mu\text{M}$ festgestellt werden. Daher wurde diese Konzentration in den nachfolgenden Versuchen eingesetzt.

Damit stellt BzATP neben Leu-Leu-OMe und H₂O₂ eine weitere geeignete Aktivierungssubstanz zur Stimulation des NLRP3-Inflammasoms in ARPE-19-Zellen dar.

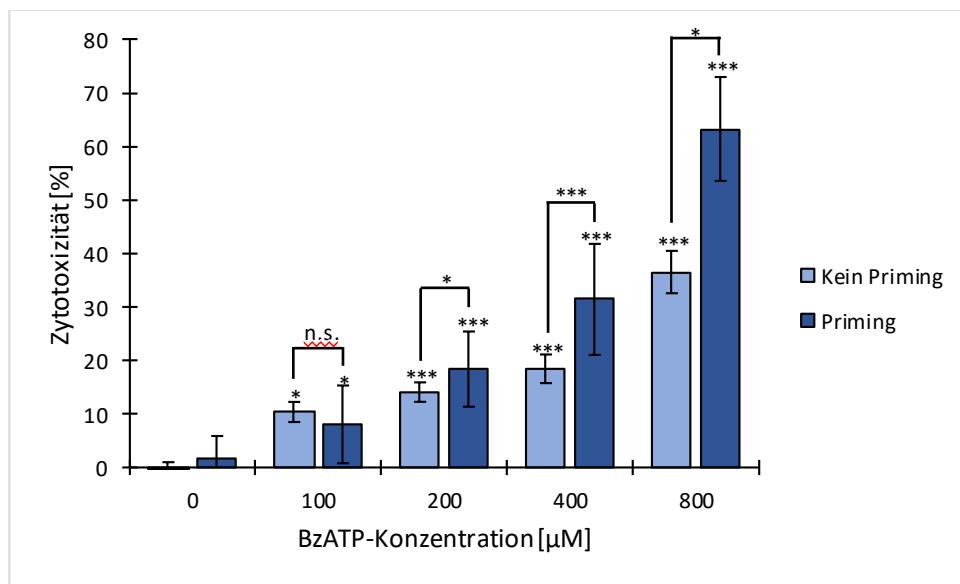


Abb. 21: Effekt von Konzentration und Priming auf die BzATP-induzierte Zytotoxizität in ARPE-19-Zellen ($n=12$ aus 4 unabhängigen Experimenten mit jeweils $n=3$). ARPE-19-Zellen wurden für 24 Stunden mit aufsteigenden Konzentrationen BzATP behandelt. Ein Teil der Zellen wurde zudem für 48 Stunden mit dem Priming-Faktor IL-1 α präinkubiert. Es zeigte sich sowohl für den Faktor Konzentration als auch für den Faktor Priming (ab $200 \mu\text{M}$ BzATP) eine signifikante Steigerung der Zytotoxizität als Zeichen der Inflammasomaktivierung. Nicht signifikant (n.s.), $p<0,05$ (*), $p<0,01$ (** und $p<0,001$ (***)).

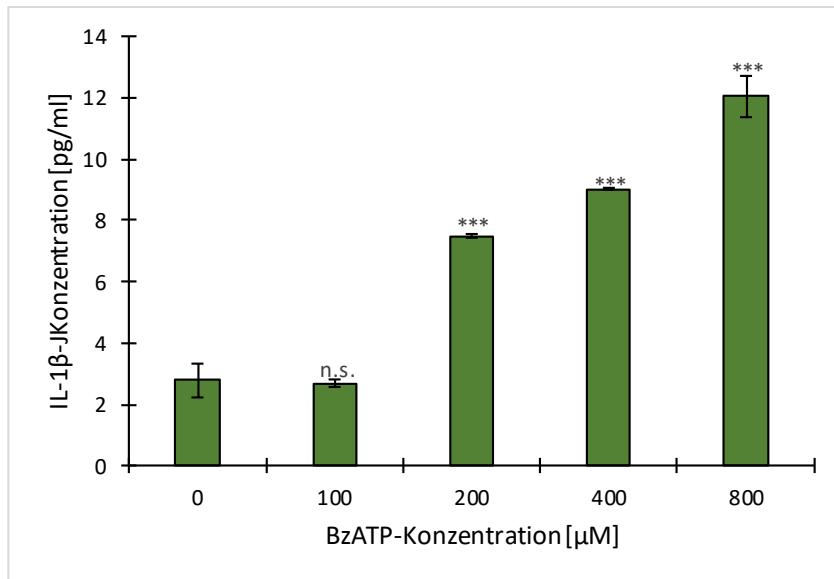


Abb. 22: Effekt der BzATP-Konzentration auf die IL-1 β -Freisetzung in ARPE-19-Zellen (n=2). ARPE-19-Zellen wurden für 48 Stunden mit dem Priming-Faktor IL-1 α präinkubiert und für 24 Stunden mit aufsteigenden Konzentrationen BzATP behandelt. Es zeigte sich ab einer Konzentration von 200 μM BzATP eine signifikante Steigerung der IL-1 β -Ausschüttung als Zeichen der Inflamasomaktivierung. Nicht signifikant (n.s.), $p<0,05$ (*), $p<0,01$ (**) und $p<0,001$ (***)

3.4.2.4 Effekt der Inkubationszeit auf die BzATP-induzierte Inflamasomaktivierung

Ebenso wie bei den THP-1-Zellen zeigte sich auch bei den ARPE-19-Zellen erst nach einer Inkubationsdauer von 24 Stunden mit 400 μM BzATP eine signifikante Inflamasomaktivierung (Abb. 23).

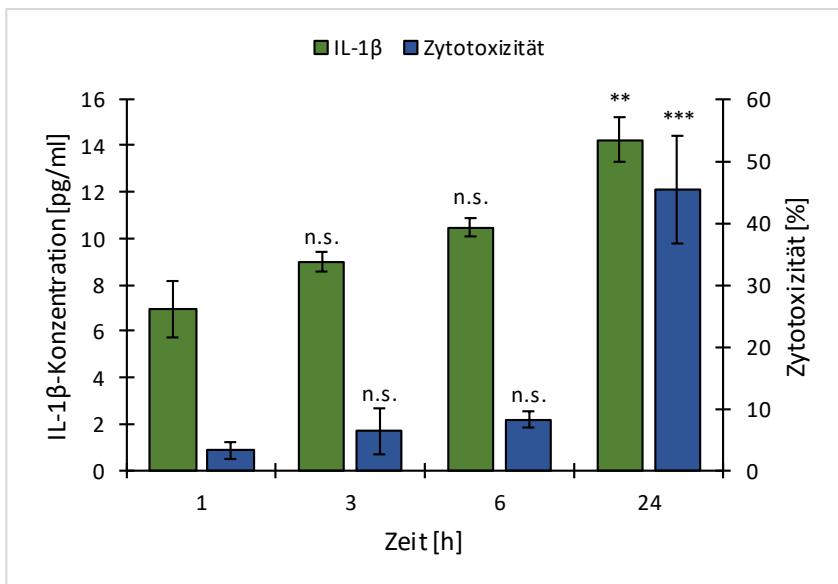


Abb. 23: Effekt der Inkubationszeit auf die BzATP-induzierte Zytotoxizität ($n=6$) und IL-1 β -Ausschüttung in ARPE-19-Zellen ($n=2$). ARPE-19-Zellen wurden für 48 Stunden mit dem Priming-Faktor IL-1 α präinkubiert und anschließend für verschiedene Zeitintervalle mit 400 μ M BzATP behandelt. Erst ab einer Inkubationsdauer von 24 Stunden zeigte sich eine signifikante Steigerung der BzATP-induzierten LDH- und IL-1 β -Ausschüttung als Zeichen der Inflammasomaktivierung. Nicht signifikant (n.s.), $p<0,05$ (*), $p<0,01$ (***) und $p<0,001$ (****).

Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurden die ARPE-19-Zellen in allen folgenden Versuchen für 48 Stunden mit IL-1 α präinkubiert und anschließend für weitere 24 Stunden mit 400 μ M BzATP behandelt. Als Medium wurde DPBS ohne Calcium und Magnesium verwendet.

3.4.2.5 Effekt von MCC950 auf die BzATP-induzierte Inflammasomaktivierung

MCC950 (CRID3) ist ein in der Literatur vorbeschriebener Inhibitor des NLRP3-Inflammasoms aus der Klasse der small molecule inhibitors (Primiano et al., 2016; Hill et al., 2017). Um den Effekt auf die P2X7-induzierte Inflammasomaktivierung in vitro testen zu können, wurden ARPE-19-Zellen nach einem Priming-Schritt mit IL-1 α für 24 Stunden mit 400 μ M BzATP vorbehandelt. Zeitgleich erfolgte in den Kontrollgruppen die Applikation von MCC950 in drei verschiedenen Konzentrationen (0,001 μ M, 0,01 μ M und 0,1 μ M). Während bei einer Konzentration von 0,001 μ M bzw. 0,01 μ M kein Effekt auf die

Zytotoxizität nachgewiesen werden konnte, kam es bei einer MCC950-Konzentration von 0,1 µM zu einer statistisch signifikanten Reduktion der Zelltodrate (Abb. 24).

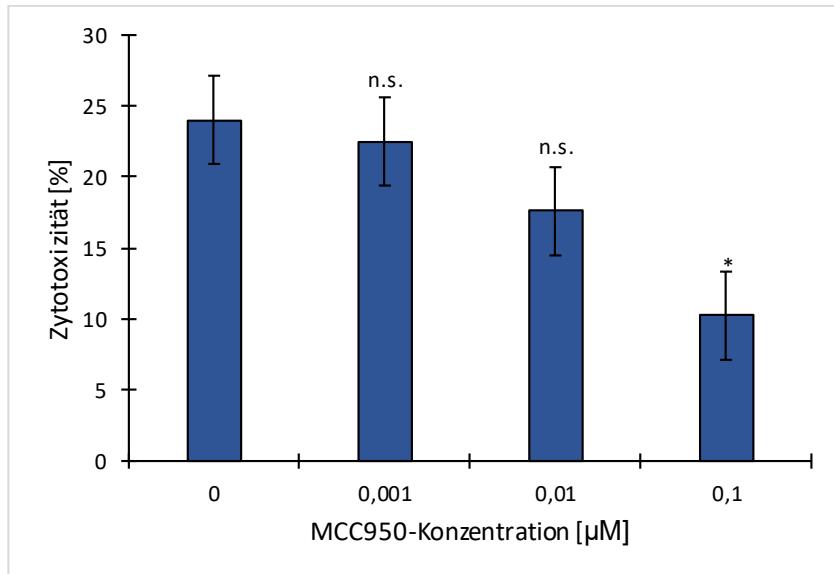


Abb. 24: Effekt verschiedener MCC950-Konzentrationen auf die BzATP-induzierte Inflammasomaktivierung in ARPE-19-Zellen (n=3). ARPE-19-Zellen wurden nach einem 48-stündigen Priming-Schritt mit IL-1 α und einer 24-stündigen Behandlung mit 400 µM BzATP mit aufsteigenden Konzentrationen MCC950 versetzt. Es zeigte sich ab einer Konzentration von 0,1 µM MCC950 eine signifikante Reduktion der BzATP-induzierten Zytotoxizität. Nicht signifikant (n.s.), p<0,05 (*), p<0,01 (**) und p<0,001 (***)

3.4.2.6 Effekt von IFM-632 auf die BzATP-induzierte Inflammasomaktivierung

Bei IFM-632 handelt es sich um einen neu entwickelten NLRP3-Inhibitor, der von der Firma IFM Therapeutics zur Verfügung gestellt und bislang noch nicht auf seine Wirksamkeit in RPE-Zellen getestet wurde. Wir haben den Effekt verschiedener IFM-632-Konzentrationen (0,001 µM, 0,01 µM und 0,1 µM) auf die BzATP-induzierte NLRP3-Inflammasomaktivierung untersucht. Die Versuchsergebnisse zeigten, dass IFM-632 in der Lage ist, die BzATP-induzierte Inflammasomaktivierung in ARPE-19-Zellen signifikant zu reduzieren. Ähnlich wie bei der Versuchsreihe mit MCC950 konnte ein statistisch signifikanter Effekt auf die Zelltodrate ab einer Konzentration von 0,1 µM IFM-632 festgestellt werden. Gleichzeitig reduzierte IFM-632 in einer Konzentration von 0,1 µM auch die NLRP3-assoziierte Ausschüttung von IL-1 β signifikant (Abb. 25).

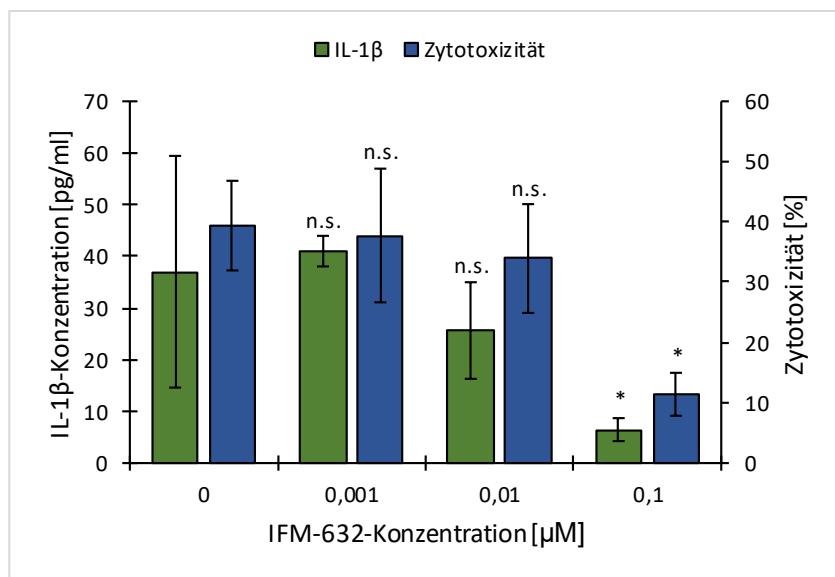


Abb. 25: Effekt verschiedener IFM-632-Konzentrationen auf die BzATP-induzierte Zytotoxizität ($n=9$) und IL-1 β -Ausschüttung ($n=4$) in ARPE-19-Zellen. ARPE-19-Zellen wurden nach einem 48-stündigen Priming-Schritt mit IL-1 α und einer 24-stündigen Behandlung mit 400 μM BzATP mit aufsteigenden Konzentrationen IFM-632 versetzt. Es zeigte sich ab einer Konzentration von 0,1 μM eine signifikante Reduktion der BzATP-induzierten LDH- und IL-1 β -Ausschüttung. Nicht signifikant (n.s.), $p<0,05$ (*), $p<0,01$ (** und $p<0,001$ (***)).

3.4.2.7 Vergleich der Inhibitoren IFM-632 und MCC950

Um die Stärke des hemmenden Effekts von IFM-632 auf die Inflammasomaktivierung im Vergleich zu MCC950 besser einordnen zu können, wurde eine Versuchsreihe durchgeführt, bei der IFM-632 und MCC950 in einer Konzentration von 0,1 μM direkt miteinander verglichen wurden. Hierbei zeigte sich eine Tendenz zu einer stärkeren Wirkung von IFM-632, aber kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen (Abb. 26).

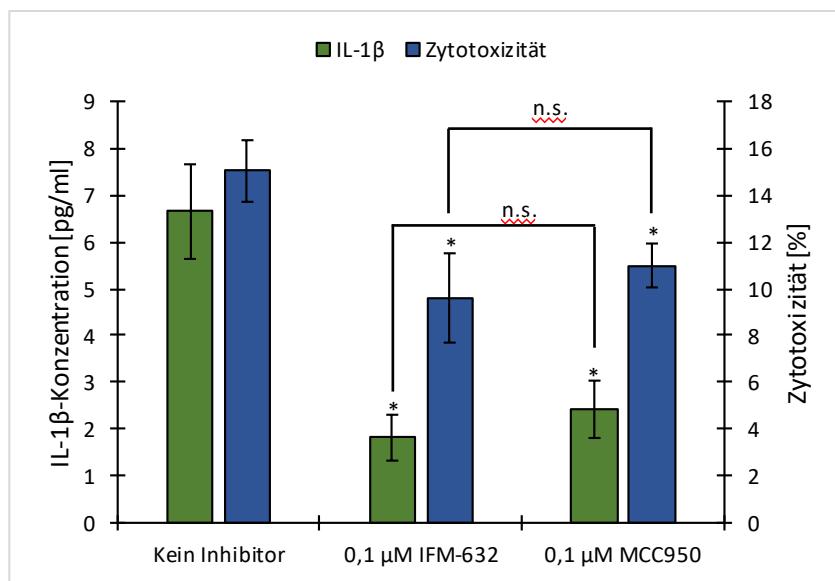


Abb. 26: Effekt von IFM-632 und MCC950 auf die BzATP-induzierte Zytotoxizität (n=3) und IL-1 β -Ausschüttung (n=2) in ARPE-19-Zellen. ARPE-19-Zellen wurden nach einem 48-stündigen Priming-Schritt mit IL-1 α und einer 24-stündigen Behandlung mit 400 μ M BzATP mit den NLRP3-Inhibitoren IFM-632 und MCC950 behandelt. Beide Inhibitoren konnten die BzATP-induzierte LDH- und IL-1 β -Ausschüttung in einer Konzentration von 0,1 μ M signifikant hemmen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Substanzen. Nicht signifikant (n.s.), p<0,05 (*), p<0,01 (**) und p<0,001 (***)

3.5 BzATP als Priming-Faktor des NLRP3-Inflammasoms

Studienergebnisse legen nahe, dass BzATP neben seiner Funktion als Aktivierungssignal möglicherweise auch einen primenden Einfluss auf das NLRP3-Inflammasom ausübt (Albalawi et al., 2017; Rapprich, 2016). Um dies zu überprüfen, wurden ARPE-19-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen BzATP behandelt (0 μ M, 200 μ M, 400 μ M). Dabei wurde eine Gruppe für 48 Stunden mit der Priming-Substanz IL-1 α behandelt, während bei der anderen Gruppe auf den Priming-Schritt verzichtet wurde. Anschließend wurden Westernblotanalysen des Zytokins pro-IL-1 β durchgeführt und der Proteingehalt der Zellen in den einzelnen Versuchsgruppen mit Hilfe der Software ImageJ quantifiziert. Hierbei zeigte sich, dass pro-IL-1 β in geringer Menge bereits ohne einen Priming-Schritt vorliegt. Der pro-IL-1 β -Proteingehalt wurde bereits durch die alleinige Applikation von BzATP signifikant gesteigert. Die zusätzliche Anwesenheit des Priming-Signals IL-1 α führte zu einem noch deutlich höheren pro-IL-1 β -Gehalt verglichen mit BzATP allein (Abb. 27, Abb. 28).

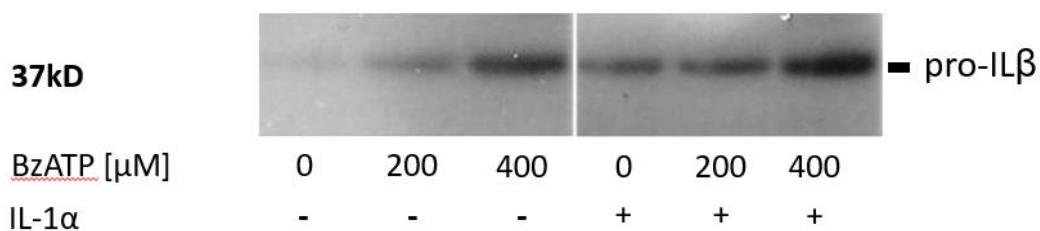


Abb. 27: Westernblotanalyse von pro-IL-1 β (37kD) nach Applikation von BzATP und IL-1 α (n=4). ARPE-19-Zellen wurden für 24 Stunden ohne bzw. mit 200 μ M und 400 μ M BzATP inkubiert. Ein Teil der Zellen wurde für 48 Stunden zusätzlich mit dem Priming-Faktor IL-1 α behandelt. Proben gleichen Gesamtproteingehalts wurden mittels Westernblotanalyse verglichen. In den analysierten Zelllysaten zeigte sich eine Steigerung der pro-IL-1 β -Expression durch BzATP im Sinne eines Inflammasom-Primings. Die Applikation von IL-1 α führte zu einer zusätzlichen Erhöhung der pro-IL-1 β -Expression.

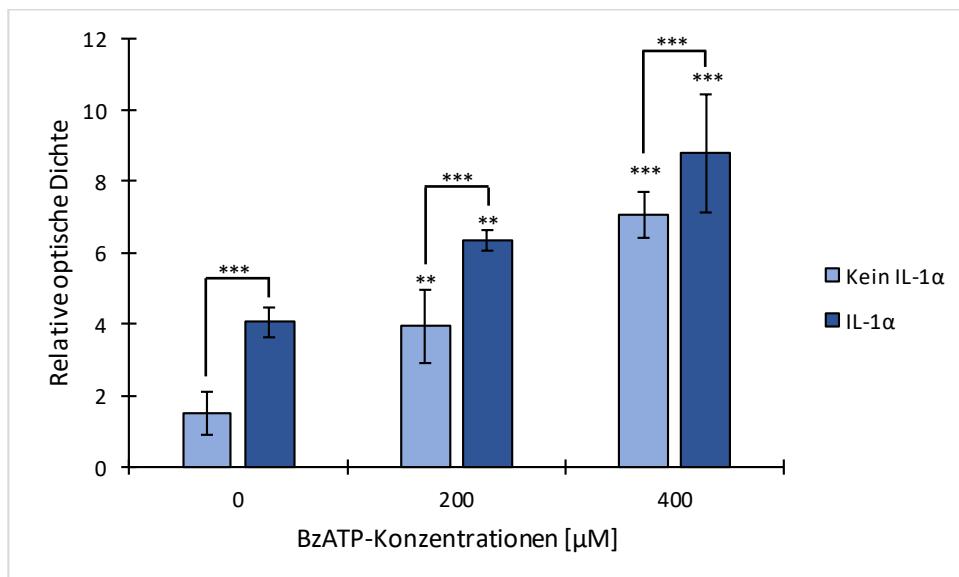


Abb. 28: Quantitative densitometrische Auswertung des Westernblotergebnisses aus Abbildung 29. Es zeigte sich eine signifikante Steigerung der pro-IL-1 β -Expression durch BzATP im Sinne eines Inflammasom-Primings. Zudem konnte die pro-IL-1 β -Expression durch die Applikation von IL-1 α zusätzlich signifikant erhöht werden. Nicht signifikant (n.s.), $p<0,05$ (*), $p<0,01$ (**) und $p<0,001$ (***)

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Mechanismen der NLRP3-Inflammasom-Hemmung im Zellkulturmodell untersucht, um mögliche pharmakologische Ansatzpunkte in der Therapie der altersabhängigen Makuladegeneration zu identifizieren.

Neuere Studien weisen darauf hin, dass die Aktivierung des angeborenen Immunsystems eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der AMD einnimmt (Ambati et al., 2013; Anderson et al., 2002; Bok, 2005; Kauppinen et al., 2016). Neben einer Beteiligung des Komplementsystems wird dabei insbesondere eine Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms diskutiert (Anderson et al., 2002; Anderson et al., 2010; Johnson et al., 2001). Studien konnten nachweisen, dass sowohl in Patienten mit neovaskulärer AMD als auch mit geographischer Atrophie das NLRP3-Inflammasom aktiv ist (Cao et al., 2016; Smith et al., 2001; Tarallo et al., 2012; Wang et al., 2016; Zhao et al., 2015). Als primärer Ausgangspunkt der Erkrankung gilt dabei das retinale Pigmentepithel, das wichtige Stoffwechselfunktionen in der Versorgung der Photorezeptoren übernimmt und damit für die Funktionsfähigkeit der Retina unerlässlich ist (Sparrow et al., 2010; Strauss, 2005; Young, 1987).

4.1 ARPE-19-Zellen als Zellkulturmodell

Um die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms *in vitro* untersuchen zu können, wurden daher ARPE-19-Zellen als Zellkulturmodell gewählt. Dabei handelt es sich um eine immortalisierte humane Zelllinie, die 1986 bei der Kultivierung primärer RPE-Zellen aus den Augen eines 19-jährigen Spenders entstanden ist (Dunn et al., 1996). Studien haben nachgewiesen, dass ARPE-19-Zellen sowohl morphologisch als auch funktionell große Ähnlichkeiten zu primären RPE-Zellen aufweisen. So bilden sie die typische Pflastersteinform der RPE-Zellen aus, formen Tight junctions und Microvilli, und exprimieren RPE-spezifische Gene wie RPE65 und CRALBP. Aus diesem Grund eignen sie sich sehr gut als Zellkulturmodell zur Untersuchung von Pathologien des RPE (Ahmado et al., 2011; Dunn et al., 1996). Anders als primäre Zellen lassen sie sich zudem

einfacher kultivieren und bieten aufgrund ihrer konstanten Teilungseigenschaften eine besonders hohe Reprozierbarkeit der Ergebnisse (Rapprich, 2016).

4.2 Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms in ARPE-19-Zellen

In der Literatur sind eine Vielzahl von Aktivatoren des NLRP3-Inflammasoms beschrieben (Abderrazak et al., 2015; Horvath et al., 2011; Latz et al., 2013). Sie scheinen jedoch im Wesentlichen über drei gemeinsame Signalwege das NLRP3-Inflammasom zu stimulieren: lysosomale Membranpermeabilisation, reaktive Sauerstoffspezies sowie die Aktivierung des membrangebundenen ATP-Kanals P2X7 (Akhtar-Schäfer et al., 2018; Schroder und Tschopp, 2010; Tschopp und Schroder, 2010). In der Literatur werden zahlreiche Wechselwirkungen zwischen den drei Signalwegen postuliert (Akhtar-Schäfer et al., 2018; Tschopp und Schroder, 2010). So konnte unsere Arbeitsgruppe eine Verbindung zwischen (photo)oxidativem Stress und lysosomaler Membranpermeabilisation mit konsekutiver Inflammasomaktivierung herstellen und damit das ROS-Modell und das lysosomale rupture modell miteinander verknüpfen (Brandstetter et al., 2015).

Um die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms möglichst umfassend zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit alle drei Aktivierungswege des Inflammasoms nachgestellt. Zur Induktion der lysosomalen Membranpermeabilisation wurde Leu-Leu-OMe eingesetzt, der oxidative Stress wurde durch die Applikation von H₂O₂ nachgeahmt und die Stimulierung des P2X7-Kanals erfolgte über den ATP-Abkömmling BzATP.

Während die NLRP3-Aktivierung in ARPE-19-Zellen durch Leu-Leu-OMe bzw. H₂O₂ in unserer Arbeitsgruppe bereits etabliert war, wurde im Rahmen dieser Arbeit das Zellkulturmodell der P2X7-induzierten Inflammasomaktivierung neu entwickelt.

4.3 Etablierung des P2X7-Modells in ARPE-19-Zellen

Vorversuche unserer Arbeitsgruppe ergaben, dass durch die Zugabe verschiedener Konzentrationen von ATP keine NLRP3-Aktivierung erzielt werden konnte (Patt, 2021). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit auf die Applikation von ATP verzichtet und

stattdessen der P2X7-Agonist BzATP eingesetzt. BzATP wird eine im Vergleich zu ATP 10-30-fach höhere Potenz zugeschrieben. Dies spiegelt sich auch in der mittleren effektiven Konzentration (EC50) wider. Während ATP in einer Konzentration von 1 µM eingesetzt werden muss, um einen effektiven Ionenstrom über den P2X7-Kanal zu erreichen, sind bei BzATP Konzentrationen im nanomolaren Bereich ausreichend (North, 2002).

Um einen ersten Eindruck von der notwendigen Konzentration und Inkubationsdauer von BzATP zu erhalten, wurden die ersten Versuche in der humanen Monozytenzelllinie THP-1 durchgeführt (Chanput et al., 2014; Tsuchiya et al., 1980), da hier die BzATP-induzierte Inflammasomaktivierung als Zellkulturmodell bereits fest etabliert ist (Buell et al., 1998; Gicquel et al., 2014). Für humane RPE-Zellen dagegen fehlte ein vergleichbares Modell bislang. In der Literatur vorbeschrieben waren BzATP-Konzentrationen von 100 µM bzw. 1000 µM, die für eine Inkubationsdauer von 1 Stunde bzw. 24 Stunden in humanen RPE-Zellen eingesetzt wurden (Guha et al., 2013; Yang et al., 2011). Daher wurden zur Etablierung des P2X7-Modells in ARPE-19-Zellen sowohl unterschiedliche BzATP-Konzentrationen (0-800 µM) als auch unterschiedliche Inkubationszeiten (1-24 Stunden) untersucht. Dabei zeigte sich, dass BzATP das NLRP3-Inflammasom am effektivsten in einer Konzentration von 400 µM nach einer Inkubationsdauer von 24 Stunden stimuliert.

Darüber hinaus wurde bei der Etablierung des P2X7-Modells der Einfluss divalerter Kationen auf die NLRP3-Aktivierung berücksichtigt. Da die handelsüblichen Kulturmedien nicht ohne Calcium und Magnesium angeboten werden, wurde neben dem Standard-Kulturmedium DMEM die Pufferlösung DPBS verwendet, die sowohl mit als auch ohne Calcium und Magnesium verfügbar ist. Um auszuschließen, dass allein die Inkubation in der Pufferlösung für 24 Stunden negative Effekte auf die Zellviabilität ausübt, wurden die Zellen lichtmikroskopisch beobachtet und die Zelltoxizität nach 24 Stunden gemessen. Untersuchungen der LDH-Ausschüttung zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen allen drei Medien, sodass der Einsatz von DPBS als Medienerersatz für eine Inkubationsdauer von maximal 24 Stunden für die Zwecke unseres Experiments möglich erscheint.

Tatsächlich konnte eine statistisch signifikante Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms nur in Calcium- und Magnesium-freiem DPBS erzielt werden, während in normalem

Kulturmedium und DPBS mit Calcium und Magnesium eine signifikante Inflammasom-Aktivierung weder anhand von Zelltodrate noch von IL-1 β -Ausschüttung nachweisbar war. Diese Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen, die einen hemmenden Einfluss divalerter Kationen auf den P2X7-Kanal beschrieben haben (Dutot et al., 2008; Michel et al., 1999; North, 2002; Virginio et al., 1997). Die halbmaximale inhibitorische Konzentration (IC₅₀) wird von Virginio et al. (1997) mit 2,9 mM für Calcium bzw. 0,5 mM für Magnesium angegeben (Virginio et al., 1997). Das Standardkulturmedium DMEM/F12 (1:1), das im Rahmen der Versuche für ARPE-19-Zellen eingesetzt wurde, enthält Calcium und Magnesium in einer Konzentration von 1,1 mM bzw. 0,7 mM, während die Pufferlösung DPBS eine Calcium- bzw. Magnesium-Konzentration von 0,9 mM bzw. 0,5 mM aufweist (Pan Biotech, 2021a, 2021b). Damit liegt zumindest die Magnesium-Konzentration in beiden Medien oberhalb des IC₅₀-Wertes. Zudem geht man davon aus, dass sich Calcium und Magnesium in ihrer hemmenden Wirkung verstärken (Dutot et al., 2008). Dieser synergistische Effekt der divalenten Kationen könnte die ausbleibende NLRP3-Aktivierung in den verwendeten Medien erklären. In welcher Art und Weise die Ionen den P2X7-Kanal inhibieren, ist bislang noch unzureichend verstanden. Die Kationen könnten mit dem negativ geladenen ATP interagieren und damit eine Aktivierung des P2X7-Kanals verhindern. Es gibt allerdings auch Vermutungen, dass Calcium und Magnesium die Bindungsstelle für ATP am P2X7-Rezeptor direkt beeinflussen, indem sie die Bindungsaffinität für Agonisten herabsetzen bzw. eine Konformationsänderung des Rezeptors mit Porenbildung hemmen (Dutot et al., 2008).

Basierend auf diesen Ergebnissen lässt sich festhalten, dass bei Berücksichtigung der oben genannten Besonderheiten die Stimulation des P2X7-Kanals mit BzATP ein weiteres zuverlässiges Zellkulturmodell zur Untersuchung der Eigenschaften des NLRP3-Inflammasoms in ARPE-19-Zellen darstellt.

In BzATP-stimulierten BV2-Mikroglia führte die alleinige Applikation von BzATP ohne Vorhandensein eines weiteren Priming-Signals zu einem signifikanten Anstieg im mRNA-Level von IL-1 β . Dieselbe Beobachtung konnte auch für ARPE-19-Zellen gemacht werden (Rapprich, 2016). Diese Ergebnisse legen nahe, dass BzATP nicht nur als Aktivierungssignal, sondern auch als Priming-Signal für das NLRP3-Inflammasom

funktionieren und somit die Transkriptionsrate von pro-IL-1 β hochregulieren kann (Albalawi et al., 2017). Um diese Hypothese näher zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit Westernblotanalysen des Proteins pro-IL-1 β durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass BzATP auch ohne die zusätzliche Verwendung von IL-1 α als Priming-Signal zu einer verstärkten Expression von pro-IL-1 β führt.

Diese primenden Eigenschaften von BzATP auf das NLRP3-Inflammasom sind insbesondere deswegen relevant, weil sie ein besseres Verständnis für die Rolle von extrazellulärem ATP in der Krankheitsentstehung der AMD schaffen. ATP gilt als ein wichtiger Neurotransmitter, der an verschiedenen zellulären Prozessen wie beispielsweise Zelltod beteiligt ist (Notomi et al., 2011). In einer Vielzahl neurologischer und entzündlicher Erkrankungen lassen sich erhöhte ATP-Level nahe des Entzündungsherdes nachweisen (Di Virgilio et al., 2017). So ist beispielsweise auch bei Patienten mit neovaskulärer AMD die ATP-Konzentration in Glaskörperproben im Vergleich zu gesunden Probanden deutlich erhöht (Notomi et al., 2011; Notomi et al., 2013). Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, induziert der ATP-Abkömmling BzATP zeit- und konzentrationsabhängig durch Bindung an den P2X7-Kanal die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms und führt damit zum Untergang von RPE-Zellen. ATP übt dabei sowohl autokrine als auch parakrine Funktionen auf RPE-Zellen und benachbarte retinale Zellen aus (Notomi et al., 2011). Zum einen wird durch das Priming pro-IL-1 β vermehrt transkribiert, sodass bei der anschließenden Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms eine deutlich größere Menge des Zytokins freigesetzt werden kann. Zum anderen wirkt das freigesetzte ATP auch auf benachbarte RPE- und Photorezeptorzellen und induziert dort durch P2X7-abhängige NLRP3-Inflammasomaktivierung den Untergang von RPE und Photorezeptoren, was die Progression der Erkrankung erklären könnte (Notomi et al., 2011).

4.4 Messung der NLRP3-Inflammasomaktivierung anhand der LDH- und IL-1 β -Freisetzung

Die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms wurde indirekt über die Zytotoxizität mittels LDH-Assay sowie über die Freisetzung von IL-1 β mittels ELISA gemessen. Anders als

andere Proteine wird IL-1 β nicht über den konventionellen Weg, d.h. über das Endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat sezerniert, da ihm die dafür notwendige Signalsequenz fehlt (Rubartelli et al., 1990). Wie Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigen konnten, erfolgt die Freisetzung stattdessen im Rahmen der pyroptotischen Zelllyse als sogenannter terminal release (Kaarniranta und Salminen, 2009; Patt, 2021). Dies erklärt die enge Korrelation zwischen Zytotoxizität und IL-1 β -Ausschüttung. Der Vollständigkeit halber wurden trotzdem in allen Versuchen beide Parameter bestimmt, um den Zusammenhang zwischen Zytotoxizität und NLRP3-induzierter Pyroptose herzustellen und andere Ursachen für den Zelltod wie Apoptose auszuschließen.

4.5 Therapeutische Ansätze zur Behandlung der AMD

Die AMD ist eine komplexe multifaktorielle Erkrankung, deren Pathophysiologie nach wie vor unzureichend verstanden ist (Lim et al., 2012). Trotz intensiver Forschungsbemühungen sind die therapeutischen Möglichkeiten immer noch begrenzt. Während für die Behandlung der neovaskulären AMD VEGF-Inhibitoren zur Verfügung stehen, die den Verlauf der Erkrankung positiv beeinflussen können, steht für die geographische Atrophie bislang immer noch kein wirksames Mittel zur Verfügung (Age-Related Eye Disease Study Research Group, 2001; Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft (DOG) et al., 2014, 2020; Holz et al., 2011; Smith et al., 2001). Das unterstreicht die Notwendigkeit, die Pathophysiologie der Erkrankung näher zu verstehen, um mögliche Ansatzpunkte für eine therapeutische Intervention zu identifizieren. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb therapeutische Ansätze im Zusammenhang mit dem NLRP3-Inflammasom untersucht.

Zugelassen im Rahmen anderer NLRP3-induzierter Erkrankungen sind bereits Medikamente, die sich gegen das Zytokin IL-1 β richten. So wird beispielsweise zur Therapie der seltenen genetischen Cytopyrin-associated periodic syndromes (CAPS), bei denen es durch eine gain-of-function-Mutation zu einer verstärkten Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms kommt, der IL-1-Rezeptor-Antagonist Anakinra verwendet (Baldwin et al., 2016; Dinarello et al., 2012). Nachteile dieser Antikörper-basierten

Therapien sind jedoch neben den hohen Therapiekosten und der subkutanen Injektion vor allem das Auftreten immunsuppressiver Nebenwirkungen. Diese kommen insbesondere dadurch zustande, dass durch die unselektive Hemmung des Zytokins IL-1 β nicht nur der Entzündungsprozess selbst bekämpft wird, sondern auch die physiologische Funktion des Zytokins im Rahmen der Abwehr bakterieller Erreger unterdrückt wird (Hill et al., 2017).

Neuere Therapieansätze konzentrieren sich daher vor allem darauf, direkt auf das NLRP3-Inflammasom bzw. seine Aktivierungswege einzuwirken (Baldwin et al., 2016; Cross, 2020).

4.6 Fehlende Wirksamkeit von D-PUFAs im H₂O₂-Modell

Ein möglicher therapeutischer Ansatz, der im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde, ist die Hemmung der Lipidperoxidation durch deuterierte mehrfach ungesättigte Fettsäuren (D-PUFAs), wie sie von der Firma Retrotope (Los Altos, USA) entwickelt werden. Die Konjugation der Fettsäuren mit dem schwereren Isotop Deuterium statt Wasserstoff macht die Fettsäuren aufgrund des kinetischen Isotopeneffekts weniger anfällig gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies. Auf diese Weise können sie die Kettenreaktion, die durch oxidativen Stress ausgelöst wird, unterbrechen und Lipidmembranen vor oxidativen Schäden schützen (Andreyev et al., 2015; Cotticelli et al., 2013; Hill et al., 2011; Hill et al., 2012).

In Zellkulturmodellen der neurodegenerativen Erkrankung Friedreich-Ataxie konnten D-PUFAs die durch oxidativen Stress ausgelöste Lipidperoxidation signifikant reduzieren (Cotticelli et al., 2013). Dabei zeigte sich, dass bereits ein geringer Anteil von 20-50 % der deuterierten Fettsäuren ausreichend ist, um den Prozess der Lipidperoxidation wirksam zu unterbrechen (Hill et al., 2012). Zudem konnten D-PUFAs den oxidativen Stress und damit den Untergang dopaminerger Neuronen in einem Mausmodell von Morbus Parkinson effektiv hemmen (Shchepinov et al., 2011).

Vorversuche unserer Arbeitsgruppe legen nahe, dass die Inflammasomaktivierung durch H₂O₂ nicht allein auf die Anwesenheit reaktiver Sauerstoffspezies zurückzuführen ist, sondern auch durch die ROS-induzierte Zerstörung der lysosomalen Membran mit

Freisetzung von Cathepsin B ausgelöst wird (Patt, 2021). Daher wurde der Einfluss der D-PUFAs auf die lysosomale Membranpermeabilisation im H₂O₂-Zellkulturmodell untersucht.

Die vorliegende Arbeit konnte jedoch den vermuteten protektiven Effekt durch die D-PUFAs nicht bestätigen. Die durch H₂O₂-induzierte Pyroptose wurde durch den Einsatz der deuterierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren D2-Lin und D4- α -Lnn nicht signifikant verringert. Eine mögliche Erklärung für das beobachtete Phänomen könnte sein, dass H₂O₂ doch in einem größeren Ausmaß als angenommen direkt das NLRP3-Inflammasom aktiviert. Die durch ROS-induzierte Lipidperoxidation und konsekutive lysosomale Membranpermeabilisation könnte also nur einen geringen Einfluss auf die NLRP3-Aktivierung haben, sodass der Schutz der lysosomalen Membran durch die D-PUFAs keinen ausreichenden inhibitorischen Effekt erzielt. Eine andere mögliche Erklärung könnte sein, dass D-PUFAs nicht ausreichend in die lysosomale Lipidmembran eingebaut wurden und damit ihren Effekt am Wirkort nicht ausüben konnten. Hierzu wären weitere Analysen der Verteilung der D-PUFAs in den verschiedenen Zellkompartimenten notwendig. Inzwischen haben sich die D-PUFAs der Firma Retrotope in Tiermodellen der AMD als wirksam in Bezug auf die Hemmung Lipidperoxidation-vermittelter Zellschädigung erwiesen, sodass die mehrfach deuterierte Docosahexaensäure nun als orales Medikament (RT011) für die Behandlung der atrophischen AMD erprobt wird (Retrotope, 2021b).

4.7 Signifikante Reduktion der Inflammasomaktivierung durch die direkten NLRP3-Inhibitoren IFM-632 und MCC950

Ein weiterer pharmakologischer Ansatzpunkt ist das NLRP3-Inflammasom selbst. In den letzten Jahren wurde eine Reihe von Substanzen entwickelt, die selektiv die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms inhibieren. Sie greifen im Vergleich zu den deuterierten Fettsäuren weiter downstream in der Signalkaskade an und sind damit potentiell in der Lage, RPE-Zellen vor allen drei Aktivierungsmechanismen des NLRP3-Inflammasoms zu schützen (Baldwin et al., 2016; Cross, 2020). 2001 wurde eine neue Klasse direkter NLRP3-Inhibitoren auf Diarylsulfonylbasis identifiziert, die auch cytokine release inhibitory

drugs genannt werden (Perregaux et al., 2001) . Dazu zählt auch MCC950, ein so genannter small molecule inhibitor, der besonders effektiv die Inflammasomaktivierung hemmt (Hill et al., 2017; Primiano et al., 2016). MCC950 blockiert dabei spezifisch das NLRP3-Inflammasom, ohne die Funktionsfähigkeit anderer Inflammasome wie NLRLP1, NLRC4 und AIM2, die essentiell für die Abwehr pathogener Erreger sind, einzuschränken (Coll et al., 2015). Der genaue Wirkmechanismus am NLRP3-Inflammasom ist bislang noch nicht hinreichend verstanden. Während Tapia-Abellán et al. (2019) konstatierten, dass MCC950 die aktive Konformation des NLRP3-Inflammasoms in einen inaktiven Zustand überführt, konnten Coll et al. (2019) zeigen, dass MCC950 direkt mit dem Walker B-Motif der NACHT-Domäne des NLRP3-Inflammasoms interagiert. Auf diese Weise könnte MCC950 die ATP-Hydrolyse blockieren und die Zusammensetzung des aktiven NLRP3-Inflammasoms hemmen (Coll et al., 2019; Tapia-Abellán et al., 2019).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde neben der Wirksamkeit von MCC950 auch erstmalig die Effektivität des von der Firma IFM Therapeutics (Bonn/Cambridge, MA) neu entwickelten small molecule inhibitors IFM-632 untersucht. IFM-632 verfügt ebenso wie MCC950 über eine Diarylsulfonylgruppe und ist ein direkter Inhibitor des NLRP3-Inflammasoms. Zur Durchführung der Versuche wurde als Zellkulturmodell das P2X7-Modell in ARPE-19-Zellen verwendet.

Die Versuche konnten zeigen, dass sowohl MCC950 als auch IFM-632 die P2X7-induzierte Inflammasomaktivierung statistisch signifikant hemmen. Dabei zeigte IFM-632 eine ebenso gute Wirksamkeit wie MCC950, das bislang in der Literatur als der potenteste direkte NLRP3-Inhibitor galt. In parallel durchgeführten Versuchen unserer Arbeitsgruppe konnte zudem nachgewiesen werden, dass IFM-632 auch die NLRP3-Inflammasomaktivierung in den beiden anderen Zellkulturmodellen der NLRP3-Aktivierung (Leu-Leu-OMe, H₂O₂) wirksam reduziert. Darüber hinaus konnte IFM-632 die durch Leu-Leu-OMe- bzw. Blaulicht induzierte Inflammasomaktivierung im RPE von ABC4-Knockout-Mäusen, einem Tiermodell der AMD, vermindern (Wang et al., 2019).

Damit stellt IFM-632 neben MCC950 einen vielsprechenden Wirkstoffkandidaten zur Hemmung des NLRP3-Inflammasoms und somit einen möglichen therapeutischen Ansatzpunkt zur Therapie der AMD dar, dessen Effektivität und Verträglichkeit nun im Rahmen weiterer In-vivo-Studien näher evaluiert werden sollen.

5. Zusammenfassung

Die altersabhängige Makuladegeneration stellt die häufigste Erblindungsursache in Industrienationen dar. Für das Spätstadium der geographischen Atrophie stehen trotz intensiver Forschungsbemühungen bislang keine wirksame Therapieoptionen zur Verfügung. Studien legen nahe, dass chronische Entzündungsprozesse im Bereich des retinalen Pigmentepithels wie die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Erkrankung spielen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Mechanismen der NLRP3-Inflammasom-Hemmung als therapeutischer Ansatzpunkt evaluiert.

Das NLRP3-Inflammasom wurde in humanen retinalen Pigmentepithelzellen nach einem Priming-Schritt mit Interleukin-1 α über drei verschiedene Mechanismen aktiviert: lysosomale Membranpermeabilisation, oxidative Schädigung und P2X7-Rezeptoraktivierung. Die Inflammasom-Aktivierung wurde anschließend anhand der Ausschüttung des proinflammatorischen Zytokins Interleukin-1 β und des pyroptotischen Zelltodes gemessen. In diesen In-vitro-Modellen wurde die therapeutische Wirksamkeit der deuterierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren D2-Lin und D4- α -Lnn und der selektiven NLRP3-Inhibitoren MCC950 und IFM-632 getestet. Während die beiden deuterierten Fettsäuren im Modell der oxidativen Schädigung keine Hemmung der Inflammasomaktivierung zeigten, ließ sich für beide NLRP3-Inhibitoren im P2X7-Rezeptor-Modell ein signifikanter inhibitorischer Effekt nachweisen. Damit stellen sie vielversprechende Wirkstoffkandidaten zur Therapie der altersabhängigen Makuladegeneration dar, die in weiterführenden Studien näher evaluiert werden sollen.

Als relevanter Nebenbefund des Projekts zeigte sich, dass eine signifikante Steigerung der NLRP3-Aktivierung durch den P2X7-Rezeptor-Agonisten BzATP nur in Calcium- und Magnesium-freiem Medium erzielt werden konnte, was einen hemmenden Einfluss divalenter Kationen auf den P2X7-Kanal nahelegt. Zudem ließ sich eine Steigerung der pro-Interleukin-1 β -Expression nachweisen, wodurch BzATP als ein Priming-Faktor des NLRP3-Inflammasoms identifiziert wird. Dies könnte eine Rolle bei der Progression der geographischen Atrophie im Sinne eines sich selbst verstärkenden Mechanismus aus ATP-Freisetzung und P2X7-abhängiger Inflammasomaktivierung spielen.

6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Die häufigsten Ursachen für Erblindung weltweit (Robert Koch-Institut (RKI), 2017)	12
Abb. 2:	Die häufigsten Ursachen für Erblindung in Deutschland (Robert Koch-Institut (RKI), 2017)	13
Abb. 3:	Lipidperoxidation mit autokatalytischer Kettenreaktion (Hill et al., 2011)	18
Abb. 4:	Die mehrfach ungesättigten Fettsäuren Linolsäure (Lin) und α -Linolensäure (α -Lnn) sowie ihre deuterierten Vertreter 11,11-D2-Linolsäure (D2-Lin) und 11,11,14,14-D4-Linolensäure (D4- α -Lnn) (Cotticelli et al., 2013)	20
Abb. 5:	Bestandteile und Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms (Abderrazak et al., 2015)	23
Abb. 6:	Die drei Aktivierungswege des NLRP3-Inflammasoms (Akhtar-Schäfer et al., 2018)	25
Abb. 7:	Strukturformel des NLRP3-Inhibitors MCC950	29
Abb. 8:	Lichtmikroskopische Darstellung von ARPE-19-Zellen	55
Abb. 9:	Fluoreszenzmikroskopische morphologische Charakterisierung von ARPE-19-Zellen	56
Abb. 10:	Effekt von Konzentration und Priming auf die Leu-Leu-OMe-induzierte Zytotoxizität	57
Abb. 11:	Effekt von Konzentration und Priming auf die Leu-Leu-OMe-induzierte IL-1 β -Ausschüttung	58
Abb. 12:	Effekt von Konzentration und Priming auf die H ₂ O ₂ -induzierte Zytotoxizität	59
Abb. 13:	Effekt von Konzentration und Priming auf die H ₂ O ₂ -induzierte IL-1 β -Ausschüttung	60
Abb. 14:	Kein signifikanter Effekt der Fettsäuren D2-Lin, D4- α -Lnn, Lin und α -Lnn auf die H ₂ O ₂ -induzierte	61

Inflammasomaktivierung nach 24, 48, 72 und 96 Stunden Inkubationszeit	
Abb. 15: Effekt von Konzentration und Priming auf die BzATP-induzierte Inflammasomaktivierung in THP-1-Zellen	63
Abb. 16: Effekt der Inkubationszeit auf die BzATP-induzierte Inflammasomaktivierung in THP-1-Zellen	64
Abb. 17: Effekt von Konzentration und divalenten Kationen auf die BzATP-induzierte Zytotoxizität in ARPE-19-Zellen	65
Abb. 18: Effekt von Konzentration und divalenten Kationen auf die BzATP-induzierte IL-1 β -Ausschüttung in ARPE-19-Zellen	66
Abb. 19: Lichtmikroskopische Aufnahmen unbehandelter ARPE-19-Zellen ohne Priming-Schritt nach 24-stündiger Inkubation in DMEM, DPBS mit Calcium und Magnesium und Calcium-/Magnesium-freiem DPBS	67
Abb. 20: Zytotoxizität unbehandelter ARPE-19-Zellen ohne Priming-Schritt nach 24-stündiger Inkubation in DMEM, DPBS mit Calcium und Magnesium und Calcium-/Magnesium-freiem DPBS	67
Abb. 21: Effekt von Konzentration und Priming auf die BzATP-induzierte Zytotoxizität in ARPE-19-Zellen	68
Abb. 22: Effekt der BzATP-Konzentration auf die IL-1 β -Freisetzung in ARPE-19-Zellen	69
Abb. 23: Effekt der Inkubationszeit auf die BzATP-induzierte und IL-1 β -Ausschüttung in ARPE-19-Zellen	70
Abb. 24: Effekt verschiedener MCC950-Konzentrationen auf die BzATP-induzierte Inflammasomaktivierung in ARPE-19-Zellen	71
Abb. 25: Effekt verschiedener IFM-632-Konzentrationen auf die BzATP-induzierte Zytotoxizität und IL-1 β -Ausschüttung in ARPE-19-Zellen	72
Abb. 26: Effekt von IFM-632 und MCC950 auf die BzATP-induzierte Zytotoxizität und IL-1 β -Ausschüttung in ARPE-19-Zellen	73

- Abb. 27:** Westernblotanalyse von pro-IL-1 β (37kD) nach Applikation von BzATP und IL-1 α 74
- Abb. 28:** Quantitative densitometrische Auswertung des Westernblotergebnisses aus Abbildung 29 74

7. Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Stadieneinteilung der AMD (Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft (DOG) et al., 2014; Ferris et al., 2013)	14
Tab. 2:	Expression von P2X7 in RPE-Zellen (Yang, 2017)	27
Tab. 3:	Zelllinien	31
Tab. 4:	Medien	31
Tab. 5:	Reagenzien	32
Tab. 6:	Antikörper	34
Tab. 7:	Kit-Systeme	34
Tab. 8:	Verbrauchsmaterial	35
Tab. 9:	Geräte	36
Tab. 10:	Software	36

8. Literaturverzeichnis

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2015

Abderrazak A, Syrovets T, Couchie D, El Hadri K, Friguet B, Simmet T, Rouis M. NLRP3 inflammasome: from a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases. *Redox. Biol.* 2015; 4: 296–307

Age-Related Eye Disease Study Research Group. 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.* 2001; 1417–1436

Ahmado A, Carr A-J, Vugler AA, Semo M, Gias C, Lawrence JM, Chen LL, Chen FK, Turowski P, Da Cruz L, Coffey PJ. Induction of differentiation by pyruvate and DMEM in the human retinal pigment epithelium cell line ARPE-19. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2011; 52: 7148–7159

Akhtar-Schäfer I, Wang L, Krohne TU, Xu H, Langmann T. Modulation of three key innate immune pathways for the most common retinal degenerative diseases. *EMBO Mol. Med.* 2018; 10

Albalawi F, Lu W, Beckel JM, Lim JC, McCaughey SA, Mitchell CH. The P2X7 Receptor Primes IL-1 β and the NLRP3 Inflammasome in Astrocytes Exposed to Mechanical Strain. *Front. Cell. Neurosci.* 2017; 11: 227

Ambati J, Atkinson JP, Gelfand BD. Immunology of age-related macular degeneration. *Nat. Rev. Immunol.* 2013; 13: 438–451

Anderson DH, Mullins RF, Hageman GS, Johnson LV. A role for local inflammation in the formation of drusen in the aging eye. *Am. J. Ophthalmol.* 2002; 134: 411–431

Anderson DH, Radeke MJ, Gallo NB, Chapin EA, Johnson PT, Curletti CR, Hancox LS, Hu J, Ebright JN, Malek G, Hauser MA, Rickman CB, Bok D, Hageman GS, Johnson LV.

The pivotal role of the complement system in aging and age-related macular degeneration: hypothesis re-visited. *Prog. Retin. Eye Res.* 2010; 29: 95–112

Andreyev AY, Tsui HS, Milne GL, Shmanai VV, Bekish AV, Fomich MA, Pham MN, Nong Y, Murphy AN, Clarke CF, Shchepinov MS. Isotope-reinforced polyunsaturated fatty acids protect mitochondria from oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 2015; 82: 63–72

Arroyo JG, 2020: Age-related macular degeneration: Clinical presentation, etiology, and diagnosis. Verfügbar unter <https://www.uptodate.com/contents/age-related-macular-degeneration-clinical-presentation-etiology-and-diagnosis#H1> (Zugriffsdatum: 11.06.2021)

Baldwin AG, Brough D, Freeman S. Inhibiting the Inflammasome: A Chemical Perspective. *J. Med. Chem.* 2016; 59: 1691–1710

BD OptEIA, 2014: Human IL-1 β ELISA Kit II Instruction Manual. Verfügbar unter https://www.bdbiosciences.com/content/dam/bdb/products/global/reagents/immunoassay-reagents/elisa/elisa-kits/557966_base/pdf/557966_Book_Website.pdf (Zugriffsdatum: 22.10.2021)

Beatty S, Koh H-H, Phil M, Henson D, Boulton M. The Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Age-Related Macular Degeneration. *Surv. Ophthalmol.* 2000; 45: 115–134

Berufsverband der Augenärzte Deutschlands e.V. (BVA), Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft e.V. (DOG), 2015: Leitlinie Nr. 21 Altersabhängige Makuladegeneration AMD. Verfügbar unter <https://www.dog.org/wp-content/uploads/2009/09/Leitlinie-Nr-21-Altersabh%C3%A4ngige-Makuladegeneration-AMD-Stand-30-10-2015.pdf> (Zugriffsdatum: 11.06.2021)

Bok D. Evidence for an inflammatory process in age-related macular degeneration gains new support. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005; 102: 7053–7054

Brandstetter C, 2016: NLRP3 inflammasome activation by photooxidative damage provides a novel link between hallmark pathogenic features of age-dependent macular degeneration. Verfügbar unter <https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:hbz:5n-45673> (Zugriffsdatum: 11.06.2021)

Brandstetter C, Mohr LKM, Latz E, Holz FG, Krohne TU. Light induces NLRP3 inflammasome activation in retinal pigment epithelial cells via lipofuscin-mediated photooxidative damage. *J. Mol. Med. (Berl)* 2015; 93: 905–916

Brown DM, Kaiser PK, Michels M, Soubrane G, Heier JS, Kim RY, Sy JP, Schneider S. Ranibizumab versus verteporfin for neovascular age-related macular degeneration. *N. Engl. J. Med.* 2006; 355: 1432–1444

Buell G, Chessell IP, Michel AD, Collo G, Salazzo M, Herren S, Gretener D, Grahames C, Kaur R, Kosco-Vilbois MH, Humphrey P. Blockade of Human P2X7 Receptor Function With a Monoclonal Antibody. *Blood* 1998; 92: 3521–3528

Burnstock G. A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In: Straub RW, Bolis L, eds. *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A Multidisciplinary Approach*. New York: Raven Press, 1978: 107–118

Cao S, Wang JCC, Gao J, Wong M, To E, White VA, Cui JZ, Matsubara JA. CFH Y402H polymorphism and the complement activation product C5a: effects on NF-κB activation and inflammasome gene regulation. *Br. J. Ophthalmol.* 2016; 100: 713–718

Chanput W, Mes JJ, Wichers HJ. THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. *Int. Immunopharmacol.* 2014; 23: 37–45

Coll RC, Hill JR, Day CJ, Zamoshnikova A, Boucher D, Massey NL, Chitty JL, Fraser JA, Jennings MP, Robertson AAB, Schroder K. MCC950 directly targets the NLRP3 ATP-hydrolysis motif for inflammasome inhibition. *Nat. Chem. Biol.* 2019; 15: 556–559

Coll RC, Robertson AAB, Chae JJ, Higgins SC, Muñoz-Planillo R, Inserra MC, Vetter I, Dungan LS, Monks BG, Stutz A, Croker DE, Butler MS, Haneklaus M, Sutton CE, Núñez G, Latz E, Kastner DL, Mills KHG, Masters SL, Schroder K, Cooper MA, O'Neill LAJ. A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nat. Med.* 2015; 21: 248–255

Cotticelli MG, Crabbe AM, Wilson RB, Shchepinov MS. Insights into the role of oxidative stress in the pathology of Friedreich ataxia using peroxidation resistant polyunsaturated fatty acids. *Redox. Biol.* 2013; 1: 398–404

Cross R, 2020: Could an NLRP3 inhibitor be the one drug to conquer common diseases? Verfügbar unter <https://cen.acs.org/pharmaceuticals/drug-discovery/Could-an-NLRP3-inhibitor-be-the-one-drug-to-conquer-common-diseases/98/i7> (Zugriffsdatum: 12.06.2021)

Davies S, Elliott MH, Floor E, Truscott T, Zareba M, Sarna T, Shamsi FA, Boulton ME. Photocytotoxicity of lipofuscin in human retinal pigment epithelial cells. Free Radic. Biol. Med. 2001; 31: 256–265

Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft (DOG), Retinologische Gesellschaft e. V. (RG), Berufsverband der Augenärzte Deutschlands e. V. (BVA), 2014: Aktuelle Stellungnahme der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft, der Retinologischen Gesellschaft und des Berufsverbandes der Augenärzte Deutschlands zu Nahrungsergänzungsmitteln bei altersabhängiger Makuladegeneration (AMD). Verfügbar unter <https://www.dog.org/wp-content/uploads/2013/03/zu-Nahrungserg%C3%A4nzungsmitteln-bei-AMD-Oktober-2014.pdf> (Zugriffsdatum: 21.11.2021)

Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft (DOG), Retinologische Gesellschaft e. V. (RG), Berufsverband der Augenärzte Deutschlands e. V. (BVA). Stellungnahme der DOG, der RG und des BVA zur Anti-VEGF-Therapie bei der neovaskulären altersabhängigen Makuladegeneration: Stand Februar 2020. Klin. Monbl. Augenheilkd. 2020; 237: 995–1003

Di Virgilio F, Dal Ben D, Sarti AC, Giuliani AL, Falzoni S. The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. Immunity 2017; 47: 15–31

Dinarello CA, Simon A, van der Meer JWM. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. Nat. Rev. Drug Discov. 2012; 11: 633–652

Dunn KC, Aotaki-Keen AE, Putkey FR, Hjelmeland LM. ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. Exp. Eye Res. 1996; 62: 155–169

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

- Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* 1991; 11: 81–128
- Ferris FL, Wilkinson CP, Bird A, Chakravarthy U, Chew E, Csaky K, Sadda SR. Clinical classification of age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2013; 120: 844–851
- Finger RP, Fimmers R, Holz FG, Scholl HPN. Prevalence and causes of registered blindness in the largest federal state of Germany. *Br. J. Ophthalmol.* 2011; 95: 1061–1067
- Gao J, Liu RT, Cao S, Cui JZ, Wang A, To E, Matsubara JA. NLRP3 inflammasome: activation and regulation in age-related macular degeneration. *Mediators Inflamm.* 2015; 2015: 690243
- Gicquel T, Victoni T, Fautrel A, Robert S, Gleonnec F, Guezingar M, Couillin I, Catros V, Boichot E, Lagente V. Involvement of purinergic receptors and NOD-like receptor-family protein 3-inflammasome pathway in the adenosine triphosphate-induced cytokine release from macrophages. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2014; 41: 279–286
- Guha S, Baltazar GC, Coffey EE, Tu L-A, Lim JC, Beckel JM, Patel S, Eysteinsson T, Lu W, O'Brien-Jenkins A, Laties AM, Mitchell CH. Lysosomal alkalinization, lipid oxidation, and reduced phagosome clearance triggered by activation of the P2X7 receptor. *FASEB J.* 2013; 27: 4500–4509
- Heneka MT, McManus RM, Latz E. Inflammasome signalling in brain function and neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 2018; 19: 610–621
- Hill JR, Coll RC, Sue N, Reid JC, Dou J, Holley CL, Pelington R, Dickinson JB, Biden TJ, Schroder K, Cooper MA, Robertson AAB. Sulfonylureas as Concomitant Insulin Secretagogues and NLRP3 Inflammasome Inhibitors. *ChemMedChem* 2017; 12: 1449–1457
- Hill S, Hirano K, Shmanai VV, Marbois BN, Vidovic D, Bekish AV, Kay B, Tse V, Fine J, Clarke CF, Shchepinov MS. Isotope-reinforced polyunsaturated fatty acids protect yeast cells from oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 2011; 50: 130–138
- Hill S, Lamberson CR, Xu L, To R, Tsui HS, Shmanai VV, Bekish AV, Awad AM, Marbois BN, Cantor CR, Porter NA, Clarke CF, Shchepinov MS. Small amounts of isotope-

reinforced polyunsaturated fatty acids suppress lipid autoxidation. *Free Radic. Biol. Med.* 2012; 53: 893–906

Hitzel N, 2009: Charakterisierung ionotroper purinerger Rezeptoren im Nucleus medianus praeopticus des anterioren Hypothalamus der Ratte. Verfügbar unter http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2009/7120/pdf/HitzelNorma_2009_06_10.pdf (Zugriffsdatum: 24.03.2022)

Holz FG, Pauleikhoff D, Spaide RF, Bird AC. Altersabhängige Makuladegeneration. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011

Horvath GL, Schrum JE, Nardo CM de, Latz E. Intracellular sensing of microbes and danger signals by the inflammasomes. *Immunol. Rev.* 2011; 243: 119–135

Iijima R, Kaneko H, Ye F, Nagasaka Y, Takayama K, Kataoka K, Kachi S, Iwase T, Terasaki H. Interleukin-18 induces retinal pigment epithelium degeneration in mice. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2014; 55: 6673–6678

Johnson LV, Leitner WP, Staples MK, Anderson DH. Complement activation and inflammatory processes in Drusen formation and age related macular degeneration. *Exp. Eye Res.* 2001; 73: 887–896

Joussen AM, Bornfeld N. The treatment of wet age-related macular degeneration. *Dtsch. Arztebl. Int.* 2009; 106: 312–317

Kaarniranta K, Salminen A. Age-related macular degeneration: activation of innate immunity system via pattern recognition receptors. *J. Mol. Med. (Berl.)* 2009; 87: 117–123

Kaemmerer E, Schutt F, Krohne TU, Holz FG, Kopitz J. Effects of lipid peroxidation-related protein modifications on RPE lysosomal functions and POS phagocytosis. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2007; 48: 1342–1347

Kaszubski P, Ben Ami T, Saade C, Smith RT. Geographic Atrophy and Choroidal Neovascularization in the Same Eye: A Review. *Ophthalmic. Res.* 2016; 55: 185–193

Kauppinen A, Paterno JJ, Blasiak J, Salminen A, Kaarniranta K. Inflammation and its role in age-related macular degeneration. *Cell. Mol. Life Sci.* 2016; 73: 1765–1786

Kayagaki N, Stowe IB, Lee BL, O'Rourke K, Anderson K, Warming S, Cuellar T, Haley B, Roose-Girma M, Phung QT, Liu PS, Lill JR, Li H, Wu J, Kummerfeld S, Zhang J, Lee WP, Snipas SJ, Salvesen GS, Morris LX, Fitzgerald L, Zhang Y, Bertram EM, Goodnow CC, Dixit VM. Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature* 2015; 526: 666–671

Kerur N, Hirano Y, Tarallo V, Fowler BJ, Bastos-Carvalho A, Yasuma T, Yasuma R, Kim Y, Hinton DR, Kirschning CJ, Gelfand BD, Ambati J. TLR-independent and P2X7-dependent signaling mediate Alu RNA-induced NLRP3 inflammasome activation in geographic atrophy. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2013; 54: 7395–7401

Krohne TU, 2001: Molekulare Mechanismen des Tumorzelltodes induziert durch die Suizidgene Thymidinkinase und Purinnukleosidphosphorylase. Verfügbar unter <https://freidok.uni-freiburg.de/data/394> (Zugriffsdatum: 22.10.2021)

Krohne TU, Kaemmerer E, Holz FG, Kopitz J. Lipid peroxidation products reduce lysosomal protease activities in human retinal pigment epithelial cells via two different mechanisms of action. *Exp. Eye Res.* 2010a; 90: 261–266

Krohne TU, Stratmann NK, Kopitz J, Holz FG. Effects of lipid peroxidation products on lipofuscinogenesis and autophagy in human retinal pigment epithelial cells. *Exp. Eye Res.* 2010b; 90: 465–471

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

Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nature reviews. Immunology* 2013; 13: 397–411

Leinco Technologies, 2021: Sandwich ELISA Protocol. Verfügbar unter <https://www.leinco.com/sandwich-elisa-protocol/> (Zugriffsdatum: 22.10.2021)

Li J, Welchowsk T, Schmid M, Letow J, Wolpers AC, Holz FG, Finger R, 2017: Retinal Diseases in Europe. Verfügbar unter <https://miloftalmica.it/wp-content/uploads/2021/07/Euretina-Retinal-Diseases.pdf> (Zugriffsdatum: 11.06.2021)

Lim LS, Mitchell P, Seddon JM, Holz FG, Wong TY. Age-related macular degeneration. Lancet 2012; 379: 1728–1738

Maller J, George S, Purcell S, Fagerness J, Altshuler D, Daly MJ, Seddon JM. Common variation in three genes, including a noncoding variant in CFH, strongly influences risk of age-related macular degeneration. Nat. Genet. 2006; 38: 1055–1059

Mehta N, Kaur M, Singh M, Chand S, Vyas B, Silakari P, Bahia MS, Silakari O. Purinergic receptor P2X₇: a novel target for anti-inflammatory therapy. Bioorg. Med. Chem. 2014; 22: 54–88

Michel AD, Chessell IP, Humphrey PP. Ionic effects on human recombinant P2X7 receptor function. Naunyn-Schmiedeb. Arch. Pharmacol. 1999; 359: 102–109

North RA. Molecular physiology of P2X receptors. Physiol. Rev. 2002; 82: 1013–1067

Notomi S, Hisatomi T, Kanemaru T, Takeda A, Ikeda Y, Enaida H, Kroemer G, Ishibashi T. Critical involvement of extracellular ATP acting on P2RX7 purinergic receptors in photoreceptor cell death. Am. J. Pathol. 2011; 179: 2798–2809

Notomi S, Hisatomi T, Murakami Y, Terasaki H, Sonoda S, Asato R, Takeda A, Ikeda Y, Enaida H, Sakamoto T, Ishibashi T. Dynamic increase in extracellular ATP accelerates photoreceptor cell apoptosis via ligation of P2RX7 in subretinal hemorrhage. PloS one 2013; 8: e53338

Nozaki M, Raisler BJ, Sakurai E, Sarma JV, Barnum SR, Lambris JD, Chen Y, Zhang K, Ambati BK, Baffi JZ, Ambati J. Drusen complement components C3a and C5a promote choroidal neovascularization. Am. J. Ophthalmol. 2006; 142: 201

Pan Biotech, 2021a: DMEM/F12 (1:1), w: L-Glutamine, w: 1.2 g/L NaHCO₃. Verfügbar unter <https://www.pan-biotech.de/dmem-f12-1-1-w-l-glutamine-w-1-2-g-l-nahco3.html> (Zugriffsdatum: 22.10.2021)

Pan Biotech, 2021b: DPBS, w: Ca and Mg. Verfügbar unter <https://www.pan-biotech.de/dpbs-w-ca-and-mg.html> (Zugriffsdatum: 22.10.2021)

Patt J, 2021: Mechanismen der Freisetzung von Interleukin-1β nach Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms in retinalen Pigmentepithelzellen. Verfügbar unter

<https://bonndoc.ulb.uni-bonn.de/xmlui/handle/20.500.11811/9006> (Zugriffsdatum: 22.10.2021)

Perregaux DG, McNiff P, Laliberte R, Hawryluk N, Peurano H, Stam E, Egger J, Griffiths R, Dombroski MA, Gabel CA. Identification and characterization of a novel class of interleukin-1 post-translational processing inhibitors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2001; 299: 187–197

Primiano MJ, Lefker BA, Bowman MR, Bree AG, Hubeau C, Bonin PD, Mangan M, Dower K, Monks BG, Cushing L, Wang S, Guzova J, Jiao A, Lin L-L, Latz E, Hepworth D, Hall JP. Efficacy and Pharmacology of the NLRP3 Inflammasome Inhibitor CP-456,773 (CRID3) in Murine Models of Dermal and Pulmonary Inflammation. *J. Immunol.* 2016; 197: 2421–2433

Rapprich F. In-vitro-Untersuchungen zum immunmodulatorischen Effekt nukleosidischer reverse Transkriptase Inhibitoren auf die P2X7-vermittelte Aktivierung von Mikroglia- und RPE-Zellen. Köln, 2016

Resnikoff S, Pascolini D, Etya'ale D, Kocur I, Pararajasegaram R, Pokharel GP, Mariotti SP. Global data on visual impairment in the year 2002. *Bull. World Health Organ.* 2004; 82: 844–851

Retrotope, 2021a: A Randomized, Double-blind, Controlled Study to Assess the Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of RT001 in Patients With Friedreich's Ataxia. Verfügbar unter <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02445794> (Zugriffsdatum: 11.06.2021)

Retrotope, 2021b: Positive Results from Studies of Retrotope's RT011 in Animal Models of Retinal Degeneration to be Featured in Oral Presentations at 2nd Annual Dry AMD Therapeutic Development Summit. Verfügbar unter <https://www.retrotope.com/press-release/positive-results-from-studies-of-retropopes-rt011-in-animal-models-of-retinal-degeneration-to-be-featured-in-oral-presentations-at-2nd-annual-dry-amd-therapeutic-development-summit/> (Zugriffsdatum: 21.11.2021)

Robert Koch-Institut (RKI), 2017: Gesundheitsberichterstattung des Bundes GBE-Themenheft Blindheit und Sehbehinderung. Verfügbar unter

https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsT/blindheit.pdf?__blob=publicationFile (Zugriffsdatum: 23.10.2021)

Roche, 2016: Cytotoxicity Detection Kit (LDH). Verfügbar unter <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/215/534/11644793001bul.pdf> (Zugriffsdatum: 22.10.2021)

Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS, Boyer DS, Kaiser PK, Chung CY, Kim RY. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N. Engl. J. Med.* 2006; 355: 1419–1431

Roth F, Bindewald A, Holz FG. Key pathophysiological pathways in age-related macular disease. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 2004; 242: 710–716

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

Scholl HPN, Fleckenstein M, Charbel Issa P, Keilhauer C, Holz FG, Weber BHF. An update on the genetics of age-related macular degeneration. *Mol. Vis.* 2007; 13: 196–205

Schönfelder U, 1999: Der Einfluß von Cholesterin auf die UV-induzierte Peroxidation der Lipide des menschlichen Stratum corneum. Verfügbar unter <https://sundoc.bibliothek.uni-halle.de/diss-online/99/99H322/prom.pdf> (Zugriffsdatum: 22.10.2021)

Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell* 2010; 140: 821–832

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

Seyffert C, 2005: Charakterisierung koexprimierter humaner purinerger P2X1- und P2X7-Rezeptoren in Oozyten von Xenopus Laevis. Verfügbar unter <https://opendata.uni-halle.de/handle/1981185920/9242> (Zugriffsdatum: 22.10.2021)

Shchepinov MS, Chou VP, Pollock E, Langston JW, Cantor CR, Molinari RJ, Manning-Boğ AB. Isotopic reinforcement of essential polyunsaturated fatty acids diminishes nigrostriatal degeneration in a mouse model of Parkinson's disease. *Toxicol. Lett.* 2011; 207: 97–103

Shi J, Zhao Y, Wang K, Shi X, Wang Y, Huang H, Zhuang Y, Cai T, Wang F, Shao F. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature* 2015; 526: 660–665

Smith W, Assink J, Klein R, Mitchell P, Klaver CC, Klein BE, Hofman A, Jensen S, Wang JJ, Jong PT de. Risk factors for age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2001; 108: 697–704

Sparrow JR, Hicks D, Hamel CP. The retinal pigment epithelium in health and disease. *Curr. Mol. Med.* 2010; 10: 802–823

Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol. Rev.* 2005; 85: 845–881

Stutz A, Golenbock DT, Latz E. Inflammasomes: too big to miss. *J. Clin. Investig.* 2009; 119: 3502–3511

Tapia-Abellán A, Angosto-Bazarrá D, Martínez-Banaclocha H, Torre-Minguela C de, Cerón-Carrasco JP, Pérez-Sánchez H, Arostegui JI, Pelegrin P. MCC950 closes the active conformation of NLRP3 to an inactive state. *Nat. Chem. Biol.* 2019; 15: 560–564

Tarallo V, Hirano Y, Gelfand BD, Dridi S, Kerur N, Kim Y, Cho WG, Kaneko H, Fowler BJ, Bogdanovich S, Albuquerque RJC, Hauswirth WW, Chiodo VA, Kugel JF, Goodrich JA, Ponicsan SL, Chaudhuri G, Murphy MP, Dunaief JL, Ambati BK, Ogura Y, Yoo JW, Lee D, Provost P, Hinton DR, Núñez G, Baffi JZ, Kleinman ME, Ambati J. DICER1 loss and Alu RNA induce age-related macular degeneration via the NLRP3 inflammasome and MyD88. *Cell* 2012; 149: 847–859

Tschopp J, Schroder K. NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nat. Rev. Immunol.* 2010; 10: 210–215

Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int. J. Cancer* 1980; 26: 171–176

Virginio C, Church D, North R, Surprenant A. Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X7 receptor. *Neuropharmacology* 1997; 36: 1285–1294

Wang L, Schmidt S, Larsen PP, Meyer JH, Roush WR, Latz E, Holz FG, Krohne TU. Efficacy of novel selective NLRP3 inhibitors in human and murine retinal pigment epithelial cells. *J. Mol. Med. (Berl.)* 2019; 97: 523–532

Wang Y, Hanus JW, Abu-Asab MS, Shen D, Ogilvy A, Ou J, Chu XK, Shi G, Li W, Wang S, Chan C-C. NLRP3 Upregulation in Retinal Pigment Epithelium in Age-Related Macular Degeneration. *Int. J. Mol. Sci.* 2016; 17

Yang D. Targeting the P2X7 Receptor in Age-Related Macular Degeneration. *Vision (Basel)* 2017; 1

Yang D, Chen J. The P2X7 Receptor in AMD. *Austin J Clin Ophthalmol.* 2014; 1(3): 1012

Yang D, Elner SG, Clark AJ, Hughes BA, Petty HR, Elner VM. Activation of P2X receptors induces apoptosis in human retinal pigment epithelium. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2011; 52: 1522–1530

Young RW. Pathophysiology of age-related macular degeneration. *Surv. Ophthalmol.* 1987; 31: 291–306

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

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich von Herzen bei allen bedanken, die zu diesem Projekt beigetragen und mich durch die verschiedenen Phasen meiner Doktorarbeit begleitet haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Tim U. Krohne für die Überlassung des Themas, die kontinuierlich gute Betreuung und die Begutachtung der Arbeit, auch über Universitätsgrenzen hinweg. Zudem danke ich Prof. Dr. Harald Neumann für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Petra Larsen und Luping Wang danke ich für die herzliche Aufnahme im Labor, die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten und die fortwährende Unterstützung bei der Durchführung der Experimente und Anfertigung der Arbeit.

Außerdem möchte ich mich bei dem ganzen Team des Augenkellers bedanken: Johanna Mayer, Janine Marx, Claudine Strack, Wolf Harmening, Michael Linden, Jenny Reiniger, Niklas Domdei, Petra Larsen, Luping Wang, Joshua Patt und Amit Sharma. Nicht nur für die fachliche Unterstützung, die zahlreichen Anregungen und Gespräche, sondern auch für die vielen schönen Erlebnisse innerhalb und außerhalb des Labors, die maßgeblich zu der angenehmen Arbeitsatmosphäre beigetragen haben und die ich in guter Erinnerung behalten werde.

Ein großes Dankeschön gilt auch der Else-Kröner-Fresenius-Stiftung und dem Bonner Promotionskolleg „Neuroimmunology“ (BonnNI) für die Förderung der Arbeit im Rahmen eines Promotionsstipendiums.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei Marion Haberkamp, Stephan Schmidt, Jürgen Schomakers, Hannah Schmidt, Friedrich Pape, Timo Walter und allen, dir mir nahestehen, bedanken, die mich geduldig unterstützt und mir dabei immer wieder die notwendige Motivation und Kraft gegeben haben, das Ziel fest im Blick zu behalten. Danke.