

Aus dem Department für Augenheilkunde Tübingen
Universitäts-Augenklinik

**Isolierung von retinalen Ganglienzellen über retrograd
transportierte *Beads* – eine neuartige Methode in der
Glaukomforschung**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät der
Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

Vorgelegt von

Halbmann, Jan

2019

Dekan:	Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter:	Professor Dr. S. Thaler
2. Berichterstatter:	Privatdozentin Dr. L. Danielyan
Tag der Disputation	15.10.2019

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungen	V
Tabellen	VI
Abkürzungen	VI
1. Einleitung.....	1
1.1 Verlust von retinalen Ganglienzellen	1
1.1.1 Sehnervtrauma.....	1
1.1.2 Ischämie	2
1.1.3 Glaukom	3
1.2 Neue Therapieansätze.....	6
1.3 Probleme der Forschungsmodelle	7
1.3.1 Problematik der RGC-5-Zelllinie	7
1.3.2 Problematik von Mischkulturen bzw. ganzen Retinae	8
1.3.3 Problematik der RGZ-Isolierung	8
1.4 Axonaler Transport.....	10
1.5 Beads	10
1.6 Forschungsansatz	11
1.7 Das Ziel dieser Arbeit	12
2. Material.....	13
2.1 Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur	13
2.2 Assays & Kits.....	13
2.3 Beads	13
2.4 Antikörper	17
2.5 Primer	18
2.6 Geräte.....	18
2.7 Zelllinien	19
3. Methoden.....	19
3.1 Das Kultivieren der RGC-5- , 661W-, und ARPE19-Zellen.....	19
3.2 Die Behandlung mit den <i>Beads</i>	20
3.3 Elektronenmikroskopie	20
3.4 Isolation.....	21
3.5 Toxikologie	24
3.5.1 MTS Assay.....	24

3.5.2	Kristallviolett-färbung.....	25
3.5.3	Caspase 3/7-Assay.....	26
3.6	Quantitative real-time PCR	26
3.6.1	cDNA Synthese	27
3.6.2	Quantifizierung.....	28
3.6.3	qrt-PCR	28
3.7	Western Blot	29
3.8	<i>In Vivo</i> -Versuche.....	33
3.9	Kryoschnitte	37
3.10	Färbungen	37
3.11	Statistische Analyse.....	38
4.	Ergebnisse	39
4.1	Etablierung der <i>Beads</i>	39
4.1.1	Toxikologie	42
4.2	<i>In vivo</i> -Versuche	54
5.	Diskussion.....	57
5.1	Zellisolation unter Verwendung magnetischer <i>Beads</i>	57
5.2	Toxikologische Untersuchungen der <i>Beads</i>	58
5.3	<i>In vivo</i>	66
5.4	Aktueller Stand der Forschung.....	67
5.4.1	Isolationsmethoden	67
5.5	Limitationen des Verfahrens	69
6.	Zusammenfassung.....	70
7.	Literaturverzeichnis.....	71
8.	Erklärung zum Eigenanteil.....	76

Abbildungen

Abbildung 1: Pathomechanismus des POWG und Winkelblockglaukom.....	4
Abbildung 2: Pathophysiologie der glaukomatösen Sehnervschädigung	6
Abbildung 3: Fluoreszenzmikroskopie von Retinaschnitten nach Cy3-ODN Injektion	11
Abbildung 4: Verwendete Isolationsverfahren	22
Abbildung 5: Schematische Zeichnung der Isolationsverfahren.....	23
Abbildung 6: SDS Wirkungsmechanismus.....	30
Abbildung 7: Das Prinzip der Proteindetektion mittels fluoreszierenden Antikörpern.....	31
Abbildung 8: Schematische Darstellung des retrograden Transports nach Injektion.....	34
Abbildung 9: Elektronenmikroskopie von RGC5-Zellen nach Behandlung mit Lipid-Beads	39
Abbildung 10: Isolation der mit 50.000 Beads/Zelle inkubierten RGC-5, 661W und ARPE19 Zellen über magnetische Säulchen	41
Abbildung 11: Phasenmikroskopie von RGC-5-Zellen vor bzw. nach Isolation.....	41
Abbildung 12: Toxikologische Untersuchungen an RGC-5 Zellen nach Behandlung mit den Beads.....	43
Abbildung 13: Toxikologische Untersuchungen an 661W Zellen nach Behandlung mit den Beads 44	
Abbildung 14: Toxikologische Untersuchungen an ARPE19 Zellen nach Behandlung mit den Beads.....	45
Abbildung 15: Bax/Bcl2 Ratio in den Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Beads.....	47
Abbildung 16: TNF α -mRNA Expression in den Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Beads 48	
Abbildung 17: IL12 mRNA Expression in den Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Beads	49
Abbildung 18: TLR9-mRNA Expression von RGC5 mittels PCR nach Behandlung mit den Beads	50
Abbildung 19: HSP70 Expression in RGC-5 und 661W nach Behandlung mit verschiedenen Beads.....	51
Abbildung 20: Caspase 3 Expression in RGC-5 und 661W nach Behandlung mit verschiedenen Beads.....	52
Abbildung 21: cleav. Caspase 3 Expression in 661W nach Behandlung mit verschiedenen Beads 53	
Abbildung 22: Beads in vivo	56
Abbildung 23: Schemazeichnung der Apoptose-Signalkaskaden	65

Tabellen

Tabelle 1: Eigenschaften der verwendeten Beads.....	16
Tabelle 2: Im Western Blot verwendete Antikörper	17
Tabelle 3: Sequenzen der verwendeten Primer.....	18
Tabelle 4: Kultivieren der Zellen in verschiedenen Platten.....	20
Tabelle 5: Zusammensetzung des PCR Reaktionsmix	28
Tabelle 6: Zielproteine der verwendeten Erstantikörper	33
Tabelle 7: Protokoll der in vivo-Experimente:.....	36
Tabelle 8: Verlauf der Tierversuche	55
Tabelle 9: Vergleich gängiger Isolationsmethoden	69

Abkürzungen

RGZ	Retinale Ganglienzellen
ZNS	Zentrales Nervensystem
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
ZAV	Zentralarterienverschluss
IOD	Intraokulärer Druck
EWG	Akutes Winkelblockglaukom
POWG	Primäres Offenwinkelglaukom
FACS	<i>Fluorescence-activated Cell Sorting</i>
CNTF	<i>Ciliary neurotrophic factor</i>
FKS	Fetales Kälberserum
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
rtPCR	<i>real-time Polymerase Chain Reaction</i>
TLR9	<i>Toll like receptor 9</i>
IL12	Interleukin 12
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
LPS	Lipopolysacharid

1. Einleitung

1.1 Verlust von retinalen Ganglienzellen

Retinale Ganglienzellen (RGZ) sind im *Stratum ganglionare* der Retina lokalisiert und nehmen über ihre Dendriten Signale der Amakrin- und Bipolarzellen ab. Sie integrieren diese Informationen und leiten sie über ihre Axone weiter. Diese ziehen zunächst radiär zur *Papilla nervi optici* um anschließend gebündelt als *N. opticus* das Auge zu verlassen. Daher stellen RGZ die einzige neuronale Verbindung zwischen der Retina und dem Gehirn dar. Demgemäß bringt der Verlust von RGZ gravierende Folgen mit sich und stellt einen zentralen Aspekt der Entstehung verschiedener akuter und chronischer Krankheitsentitäten dar, welche mit irreversiblen Sehverlust einhergehen [1]. Durch die fehlende Regenerationsfähigkeit postnataler Zellen des zentralen Nervensystems (ZNS) können Schädigungen nicht kompensiert werden. So führen Verletzungen der Axone, wie auch bei anderen Zellen des ZNS, zum Absterben und somit zum Verlust von RGZ [2-5]. Die drei wichtigsten Ursachen für den Verlust von RGZ sind:

1.1.1 Sehnervtrauma

Die knöchernen Einfassung des *Nervus opticus* suggeriert einen besonderen Schutz des Nerven in diesem Bereich. Doch gerade diese unnachgiebige Ummantelung, sowie der gemeinsame Verlauf mit der *Arteria ophthalmica*, stellt ein potenzielles Risiko dar, denn jede Raumforderung (Ödem, Blutung) birgt eine, durch die unnachgiebige Einfassung bedingte, Gefahr der Nervenkompression. Die Ursachen für Traumata des Sehnervs beim Menschen sind vielseitig und schließen direkte oder indirekte Ereignisse wie Schädelverletzungen, Blutungen, chirurgische Eingriffe, Tumore (z.B. das Gliom) ein [6-14].

Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass die traumatische Schädigung des Sehnervs einen Verlust von RGZ nach sich zieht. Während nach Transsektion des Sehnervs in adulten Ratten ein 80-90%-iger Verlust der RGZ nach zwei Wochen verzeichnet wurde [2, 15], war der Prozess nach Quetschung zwar

verlangsamt, führte aber zu vergleichbaren Resultaten [16]. Unabhängig von der Ursache des Traumas führen zwei Pathomechanismen beziehungsweise deren Kombination zum RGZ-Untergang. Zum einen der, durch den Funktionsverlust des Axons entstehende, Mangel an trophischen Faktoren, wie beispielsweise *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), als auch die, durch den Verlust der Zellintegrität resultierende, Störung der Homöostase [13]. Die Therapieoptionen beschränken sich auf die chirurgische Dekompression und die Gabe von Megadosen Cortison. Die Wirksamkeit dieser Methoden wird kontrovers diskutiert [17, 18].

1.1.2 Ischämie

Auch Gefäßverschlüsse der Netzhaut gehören zu den möglichen Ursachen einer Sehminderung [19]. Sowohl ihre Erscheinungsformen, als auch ihre Ursachen sind dabei sehr vielseitig. Häufig liegt eine systemische Ursache wie beispielsweise ein ungünstiges kardiovaskuläres Risikoprofil oder eine Vaskulitis zugrunde. Die nicht arterielle Form des retinalen Arterienverschlusses entsteht am häufigsten durch ein embolisches Ereignis [20]. Während eine Ischämie der inneren Netzhaut eine Vielzahl an unterschiedlichen Zellen betrifft, stellen die RGZ die sensibelste Population dar. Das führt dazu, dass die RGZ normalerweise auch als Erstes absterben.

Bereits eine vierstündige Unterbindung der retinalen Blutzufuhr im Rahmen eines Zentralarterienverschlusses (ZAV) kann den Untergang aller RGZ herbeiführen [21, 22] und somit eine irreversible, hochgradige Sehminderung oder Erblindung zur Folge haben [23]. Dieser akute Verlauf und seine weitreichenden Folgen stellen einen ophthalmologischen Notfall dar, für den jedoch keine konventionellen, evidenzbasierten Therapiemaßnahmen bekannt sind. Neben der Erhöhung des retinalen Perfusionsdruck, durch Senkung des intraokularen Drucks (IOD), stellt die Dislokation des Embolus eine weitere therapeutische Möglichkeit dar, die Durchblutung der retinalen Gefäße wiederherzustellen [24].

Aufgrund der thromboembolischen Genese des ZAV wird auch die Thrombolyse als Therapieoption erforscht, wie sie bereits bei anderen thromboembolischen

Verschlüssen wie der Lungenembolie oder dem Myokardinfarkt eingesetzt wird. Besonders die frühzeitige, arterielle Thrombolyse zeigt hierbei einen Benefit gegenüber dem unbehandelten Krankheitsverlauf [24].

1.1.3 Glaukom

Das Glaukom ist die weltweit häufigste nicht reversible Erblindungsursache [25]. Nur die Katarakt stellt einen noch häufigeren, jedoch reversiblen, Auslöser einer Erblindung dar [26, 27]. Weltweit leiden ca. 65 Millionen an einem, durch das Glaukom verursachten, Sehkraftverlust. 8,4 Millionen dieser Menschen sind auf beiden Augen erblindet [28, 29]. Da das Glaukom lange Zeit asymptomatisch und somit in vielen Fällen lange unentdeckt bleibt, wird angenommen, dass die tatsächliche Zahl der Betroffenen noch höher anzusetzen ist [30, 31]. In Deutschland lassen sich etwa 15 % aller Erblindungen auf Glaukome zurückführen. Es erblinden also allein in Deutschland jährlich 1500 bis 2000 Menschen als Folge des grünen Stars [26]. Aufgrund der demografischen Entwicklung ist damit zu rechnen, dass das Glaukom in Zukunft noch mehr an Bedeutung gewinnt. Schätzungen gehen davon aus, dass die Zahl der Erkrankten weiter steigen und 2040 auf über 110 Millionen weltweit angewachsen sein wird [29].

Prinzipiell unterscheidet man das primäre Glaukom vom Sekundärglaukom, welches durch Trauma, vorbestehende Augenerkrankungen oder aber als Nebenwirkung von Medikamenten entstehen kann. Ein Sonderfall ist das angeborene Glaukom. Die verschiedenen Glaukomformen unterscheiden sich zum Teil in ihrer Ätiologie und Therapie [32, 33].

Wird der Kammerwinkel, zum Beispiel durch ein Vorwölben der Iris, verlegt, so wird der Abfluss des Kammerwassers behindert und der intraokulare Druck (IOD) steigt schnell auf Werte über 60mmHg an (*Abbildung 1 c*). Neben starken Augen- bzw. Kopfschmerzen und Übelkeit lässt sich palpatorisch ein steinhardter *Bulbus oculi* feststellen. Man spricht hier von einem akuten Winkelblockglaukom (EWG), welches als ophthalmologischer Notfall auch als Glaukomanfall bezeichnet wird [25, 32].

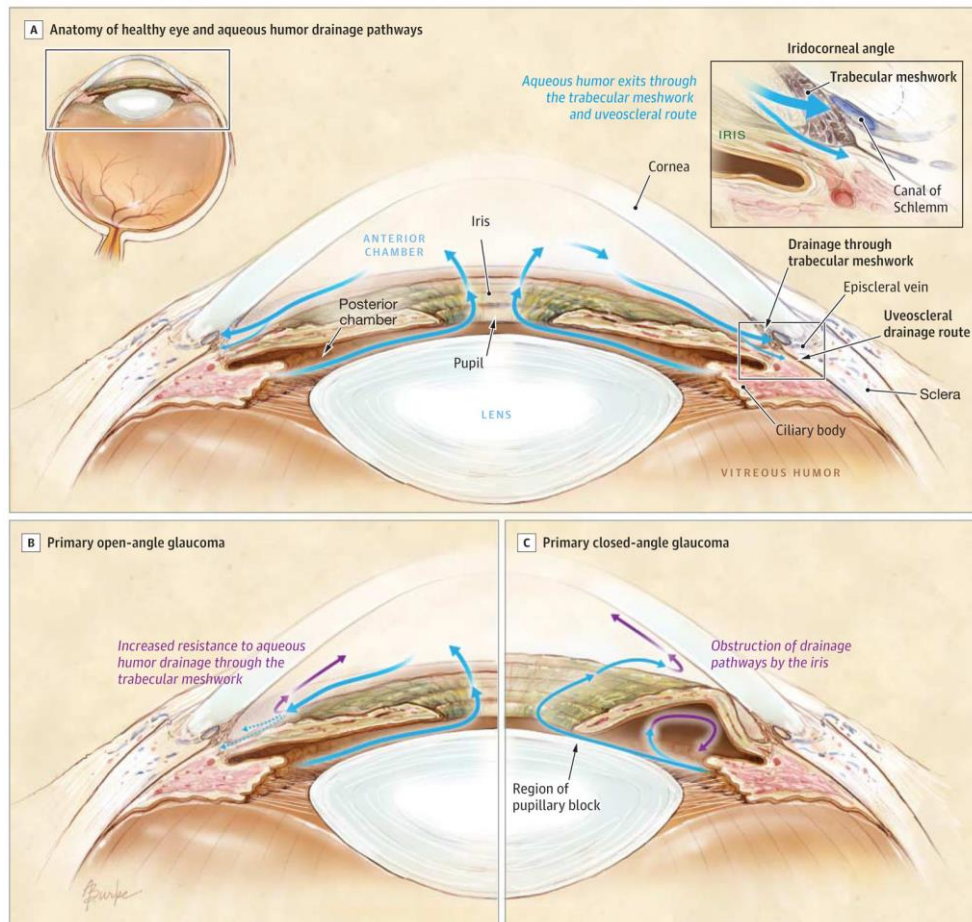


Abbildung 1: Pathomechanismus des POWG und Winkelblockglaukom

Gezeigt ist sowohl die physiologische Zirkulation, als auch der Drainageweg über den Kammerwinkel (a). Bei erhöhtem Flusswiderstand im Trabekelwerk kommt es auch bei offenem Kammerwinkel zur Glaukomentwicklung (b). Verlegt die Iris den Kammerwinkel, wird die Drainage des Kammerwassers verhindert und es kommt zum rapiden Anstieg des IOD (c) [25].

Ohne Vorliegen eines akuten Winkelblocks spricht man vom primären Offenwinkelglaukom (POWG) (Abbildung 1 b). Die IOD-Erhöhung kommt durch ein Ungleichgewicht zwischen Kammerwasserproduktion und -abfluss zustande. Im Gegensatz zum EWG bleibt das POWG lange symptomfrei und wird deswegen von den Patienten häufig erst dann bemerkt, wenn bereits größere Gesichtsfeldausfälle bestehen [32, 34].

Innerhalb des POWG kann das Normaldruckglaukom vom Hochdruckglaukom abgegrenzt werden, welches neben den typischen glaukomatösen

Veränderungen der Papille und des Sehnervs einen normwertigen IOD aufweist [32, 35].

Beim Hochdruckglaukom ist ein erhöhter IOD nachweisbar und gilt folgerichtig als wichtigster Risikofaktor für die Glaukomentstehung. Neben einem erhöhten IOD gelten auch positive Familienanamnese, höheres Alter, Einnahme systemischer oder topischer Corticosteroide, sowie ethnische Abstammung als relevante Risikofaktoren [25].

Wie der Risikofaktor „erhöhter IOD“ zur Entwicklung einer typischen Optikusatrophie beitragen kann, wird heute im Allgemeinen etwa folgendermaßen erklärt: Durch den erhöhten IOD kommt es besonders im Bereich der *Lamina cribrosa*, dem Durchtrittspunkt des Sehnervs durch die Sklera, zu gesteigerten mechanischer Belastung [36]. Dies führt einerseits zu einer Verlagerung und Ausdünnung der *Lamina cribrosa*, andererseits zur Quetschung und schließlich zum chronischen Verlust von RGZ-Axonon. Das zeigt sich auch durch das typische klinische Bild einer exkavierten und abgeblassten Papille (*Abbildung 2*). Auch das umgebende Gewebe (z.B. Astrozyten und Mikroglia) reagiert durch Umbau auf die geänderten Verhältnisse. Außerdem werden durch den gesteigerten IOD auch die Sehnerven- und Netzhautgefäße komprimiert und es resultiert eine Ischämie. Der Verlust von Axonen führt durch den resultierenden Mangel an neurotrophen Faktoren zusammen mit der Ischämie und weiteren resultierenden Faktoren schließlich zur Apoptose der RGZ [37].

Die aktuelle Therapie besteht darin, den IOD medikamentös oder chirurgisch zu senken. Oft lassen sich jedoch selbst nach einer Senkung des IOD der Verlust von RGZ und der damit einhergehende Verlust des Gesichtsfeldes nicht aufhalten.

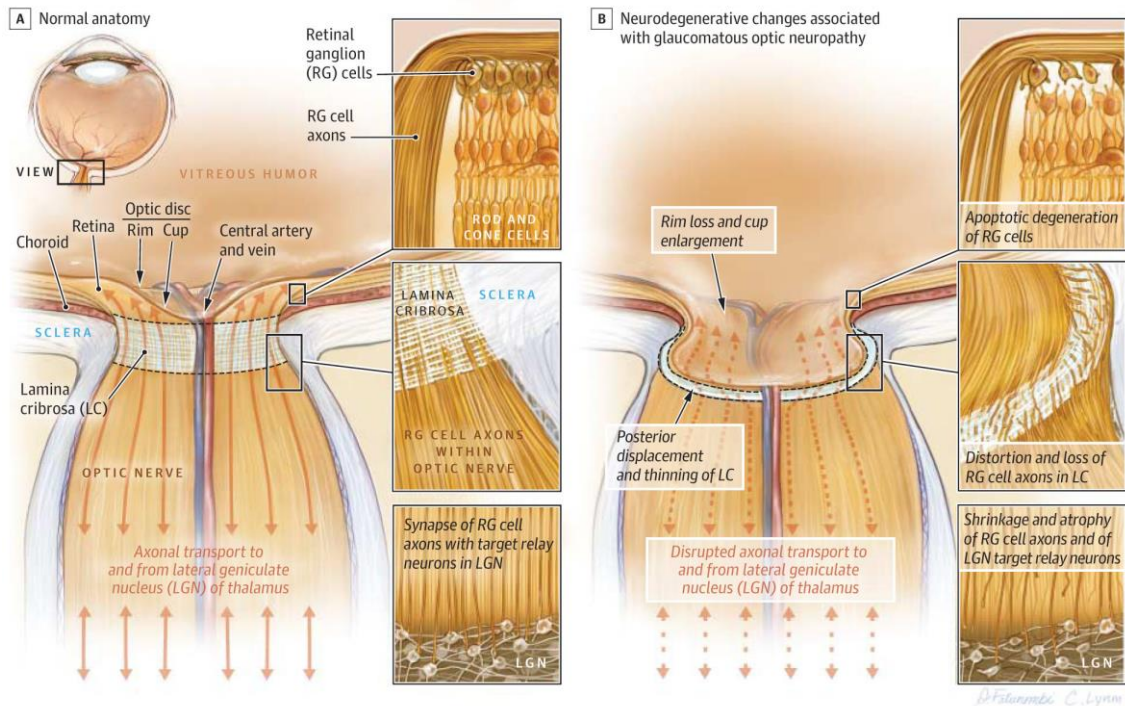


Abbildung 2: Pathophysiologie der glaukomatösen Sehnervschädigung

(a) zeigt die physiologische Anatomie der Papille mit vergrößerter Darstellung der Retina (oben), der *Lamina Cribrosa* (mitte) und der Umschaltung auf zentrale Neurone (unten).

(b) veranschaulicht die Folgen glaukomatöser Sehnervschädigung. Die Degeneration von RGZ (oben), Verzerrung und Verlust von Axonen in der *Lamina Cribrosa* (mitte) und schließlich den Verlust neuronaler Verbindungen im Thalamus (unten). [25]

1.2 Neue Therapieansätze

Unabhängig von der Ursache (Glaukom, Trauma oder Ischämie) resultieren alle Optikus-Neuropathien im Verlust von RGZ. Die Mechanismen über welche oben genannte Schädigungen schließlich zum Untergang der RGZ führen sind Bestandteil aktueller Forschung. Es konnte gezeigt werden, dass neben dem Zelluntergang durch Nekrose auch apoptotische Signalkaskaden beteiligt sind [5, 13, 37].

Ein komplexes System aus pro- und antiapoptotischen Faktoren reguliert das Überleben beziehungsweise den apoptotischen Untergang der betroffenen Zellpopulation. Mit wachsendem Verständnis der involvierten Prozesse und der Etablierung zahlreicher Möglichkeiten in dieses Gleichgewicht einzugreifen, entstehen neue Therapieansätze mit dem Ziel, den RGZ-Untergang nicht nur zu

verzögern, sondern aufzuhalten. Während die Möglichkeiten, in ebendiese Prozesse einzuschreiten immer vielfältiger werden, so ist doch noch einige Arbeit von Nöten um eine mögliche Kombination an Wirkstoffen zu finden, welche nicht nur den Prozess der Apoptose unterbricht, sondern auch unerwünschte Nebenwirkungen, wie beispielsweise den vermehrten Übergang in nekrotische Prozesse [38, 39], minimiert. Um diese Ziele zu erreichen sind verlässliche Modelle unabdinglich.

1.3 Probleme der Forschungsmodelle

Zur näheren Erforschung der pathophysiologischen Prozesse, welche mit dem Untergang von RGZ einhergehen, stehen verschiedene Modelle zur Verfügung. Prinzipiell können *in vitro*-Experimente sowohl an Primärkulturen, als auch an Zelllinien durchgeführt werden. In Primärkultur gezogene Zellen müssen aus dem Organ extrahiert und isoliert werden, bevor sie für Versuche zur Verfügung stehen. Der Vorteil der Primärkultur liegt darin, dass die Zellen nicht verändert wurden und somit physiologischen Begebenheiten im Organismus recht nah kommen. Allerdings können differenzierte Zellen wie die RGZ nur über sehr begrenzte Zeit in Primärkultur gehalten werden, bevor sie absterben. Dieses Problem stellt sich bei transformierten Zelllinien nicht, denn durch verschiedene Veränderungen am Genom der Zellen sind diese unsterblich und stehen also unbefristet zur Verfügung. Genau diese Transformation verändert jedoch auch die Eigenschaften der Zelle immer in gewissem Maße, was die Aussagekraft einschränken kann.

1.3.1 Problematik der RGC-5-Zelllinie

Da auch nach gelungener Isolation die Kultivierung vitaler Zellen schwierig ist und oftmals nur für wenige Tage gelingt [40], war die Etablierung der RGC-5-Ganglienzelllinie durch Krishnamoorthy *et al.* [41] ein immenser Erfolg. Hierzu wurden RGZ postnataler Ratten mit dem ψ 2E1A-Virus transformiert. Nachdem eindeutige neuronale Merkmale und Merkmale retinaler Ganglienzellen nachgewiesen werden konnten, stellte die RGC-5-Zelllinie die Grundlage etlicher Publikationen in der Augenheilkunde und besonders auf dem Gebiet der

Glaukumforschung dar. Die RGC-5-Zelllinie ist die erste und bis heute auch einzige ihrer Art.

Allerdings häuften sich in den letzten Jahren Zweifel an der Identität und Funktionalität der RGC-5 Zellen. Es zeigte sich eine neuronale, aber nicht RGZ-spezifische Differenzierung, zudem kann eine Kontamination mit der 661W-Zelllinie, einer Zelllinie aus Zapfen-Zellen der Maus, nicht ausgeschlossen werden [42, 43].

Auch Versuche durch verschiedene Differenzierungsprotokolle die ursprünglichen Eigenschaften der RGZ zu reaktivieren führten nicht zum erwünschten Erfolg, unter Differenzierungsbedingungen eine adäquate Ganglienzellreihe zu erhalten [44, 45].

Schließlich wurde auch die zugrundeliegende Veröffentlichung von Krishnamoorthy *et al.* [41] zurückgezogen und somit steigerte sich die Notwendigkeit einer schonenden und schnellen Isolierungsmethode weiter. Für die RGZ-Forschung und die Suche nach Therapieoptionen, welche potentiell Millionen von Menschen vor der Erblindung bewahren können, ist dieser Schritt von höchster Bedeutung.

1.3.2 Problematik von Mischkulturen bzw. ganzen Retinae

Ein weiterer Ansatz ist die Forschung unter Verwendung der ganzen Retina aus *in vivo*-Versuchen, beziehungsweise organotypischen Kulturen [46]. Diese *ex vivo*-Methode hat den Vorteil, dass sie durch die bestehende Vernetzung und Interaktion der RGZ mit ihrer natürlichen Umgebung die gesamten Krankheitsprozesse möglicherweise treffender widerspiegeln. Allerdings ist die Beschaffenheit der Retina sehr komplex und mit dem geringen Anteil an RGZ von gerade einmal 5-10% erlauben Untersuchungen an ganzen Retinae nur sehr beschränkte Aussagen über Effekte auf einzelne Zelltypen wie die RGZ.

1.3.3 Problematik der RGZ-Isolierung

Zur näheren Erforschung der oben genannten Krankheitsentitäten an reinen RGZ stehen uns nach dem Verlust der RGC-5 Zelllinie grundsätzlich zwei

Vorgehensweisen zur Verfügung: Neben der Isolierung von RGZ und anschließenden Zellkulturversuchen an den erhaltenen Primärkulturen können auch direkt Tierversuche durchgeführt werden. Die Auswertung der *in vivo*-Versuche erfordert allerdings auch eine Isolation der RGZ aus den Explantaten zur Beurteilung auf Zellebene. Eine Vielzahl an unterschiedlichsten Methoden steht für diesen Schritt zur Verfügung, jedoch zeigen die Methoden auch verschiedene Schwächen, welche die Suche nach optimierten Verfahren erfordert.

Ein einschränkender Faktor stellt dabei die Zeit dar, denn die unterschiedlichen Verfahren gehen teilweise mit ausgeprägten Ischämiezeiten einher, was dazu führen kann, dass allein durch die Isolierungsmethode ein Zelluntergang und relevanter Verlust an vitalen RGZ stattfindet. Ein weiterer problematischer Aspekt findet sich in der Struktur der Retina. Die verhältnismäßig geringe Anzahl RGZ in der Retina, sowie die Beschaffenheit der umgebenden Zellen, erschwert die Isolation. So sind die RGZ beispielsweise von den äußerst immunoreaktiven Gliazellen umgeben, welche mit Isolierungsverfahren über Antikörper interferieren können.

Es wurde in den letzten Jahren eine Vielzahl verschiedener Methoden untersucht, welche die RGZ-Isolation vereinfachen und effizienter gestalten sollten. Neben dem Ausschneiden der RGZ mittels Laser unter lichtmikroskopischer Kontrolle (*Laser capture microdissection*), konnte auch die Isolierung über Färbung mit fluoreszierenden Antikörpern und anschließende durchflusszytometrische Messung (*Fluorescence-activated Cell Sorting* – FACS) nicht überzeugen. Auch die Kombination der Antikörperisolierung mit einem Verfahren, bei dem die Antikörper an magnetische Partikel binden und die Zellen über magnetische Säulen isoliert werden zeigte nicht die erhofften Resultate [47-50].

Zentraler Punkt der Problematik der Isolierung von RGZ ist die enorme Diskrepanz zwischen Zeitaufwand und erhaltenem Ertrag. Verändert man die Protokolle bestehender Methoden zu Gunsten der Qualität, so fällt die Quantität und es können keine ausreichenden Zellzahlen mehr gewonnen werden.

Fokussiert man die Verfahren auf einen adäquaten Ertrag, so entstehen oft unreine Mischkulturen, welche die Aussagekraft der folgenden Untersuchungen beeinflussen.

Letztendlich resultieren diese Vorgehensweisen also in unreinen Kulturen, Mischkulturen oder vielen zeitaufwendigen Isolierungsschritten.

1.4 Axonaler Transport

Aufgrund des Mangels an synthese- und phagozytosefähigen Zellorganellen im Axon findet ein steter Transportprozess zwischen Perikaryon und Axon statt. Zum einen werden beispielsweise im Perikaryon synthetisierte Membranproteine und Neurotransmitter anterograd in Richtung der Synapse transportiert. Zum anderen findet aber auch ein umgekehrter, retrograder Transport statt. Dieser befördert einerseits peripher entstandene Abbauprodukte zu den im Perikaryon gelegenen Lysosomen, andererseits gelangen über diesen Mechanismus auch im Gehirn produzierte Wachstumsfaktoren (z.B. CNTF, BDNF) in das Perikaryon der Nervenzelle [51-53]. Diese Prozesse beinhalten sowohl aktiven Transport, als auch passive Diffusion.

Dieser Transportweg wird seit Jahren in der Forschung verwendet, um verschiedenste Farbstoffe ins Auge bzw. Gehirn zu transportieren und verursacht keine bekannten Beeinträchtigungen [54-57].

1.5 Beads

Unter *Beads* versteht man Mikropartikel, welche auf verschiedenste Weise modifiziert und somit hochspezialisierten Anwendungsgebieten zugeführt werden können. Neben ihrer Größe und Ladung spielt auch ihre Beschichtung eine wichtige Rolle bei der Interaktion mit ihrer Umgebung. Nutzung magnetischer *Beads* in der Forschung stellt insofern keine Neuerung dar, als dass sie bereits in vielen Bereichen der medizinischen Forschung genutzt werden. Beispiele dafür stellen die Aufreinigung von DNA Proben oder die Verwendung zur Transfektion von Zellen dar. Dazu werden bestimmte DNA oder RNA Sequenzen an die *Beads* gekoppelt und mittels magnetischer Kräfte mitsamt der *Beads* in

die Zellen gezogen [58]. Weitere Anwendungsgebiete finden sich in der Isolation unterschiedlichster Zellsorten und erstrecken sich über biologische Grundlagenforschung, Tissue Engineering und personalisierte Medizin [59]. Auch *in vivo* finden magnetische *Beads* Anwendung, so beispielsweise in der Ermittlung der Permeabilität des Liquorraums in Ratten [60], aber auch als MRT-Kontrastmittel [61, 62]

1.6 Forschungsansatz

Thaler et al. zeigten, dass der retrograde axonale Transport genutzt werden kann um RGZ selektiv mit fluoreszenzmarkierten antisense-Oligonukleotide (Cy3-ODN) zu transfizieren [54]. Dazu wurden Cy3-ODN in den *Colliculus superior* des Rattenhirns injiziert und gelangten über retrograden Transport in die RGZ. Hierbei wurden verschiedene Beobachtungszeiträume von 1-14 Tagen gewählt und jeweils mittels Fluoreszenzmikroskopie der retinalen Präparate die Transfektion überprüft.

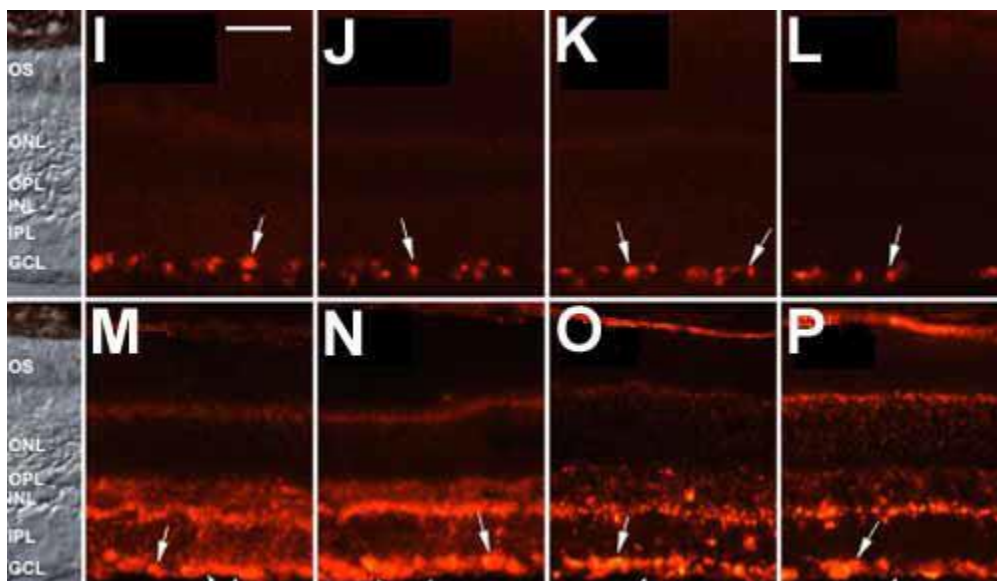


Abbildung 3: Fluoreszenzmikroskopie von Retinaschnitten nach Cy3-ODN Injektion

Oben: Retinaschnitte nach Cy3-ODN Injektion in den *Colliculus Superior* von Ratten nach verschiedenen Beobachtungszeiträumen (I-L) I: 1 Tag. J: 3 Tage. K: 7 Tage. L: 2 Wochen. Es lässt sich zu allen Zeitpunkten eine deutliche Signalanreicherung in der RGZ-Schicht erkennen (weiße Pfeile), während in den anderen Schichten keine Fluoreszenz detektiert werden konnte.

Unten: Retinaschnitte nach intravitrealer Cy3-ODN Injektion nach verschiedenen Beobachtungszeiträumen (**M-P**) **M**: 1 Tag. **N**: 3 Tage. **O**: 7 Tage. **P**: 2 Wochen. Es zeigt sich zu allen Zeitpunkten eine deutliche Signalanreicherung (weiße Pfeile) in der RGZ-Schicht, aber auch in der inneren Körnerschicht (INL) und diffus im Bereich der äußeren plexiformen Schicht. [54].

Es konnte gezeigt werden, dass sie sich im Gegensatz zur intravitrealen Injektion selektiv in RGZ anreichern [54]. Ziel dieser Arbeit war es über die *antisense-Oligonukleotide* die Expression von Enzymen der RGZ selektiv zu kontrollieren.

Die Idee ebensolche Oligonukleotide an fluoreszenzmarkierte *Beads* zu koppeln und über dasselbe Verfahren RGZ zu markieren stellt die Grundlage dieser Arbeit dar. Hierbei soll die Fluoreszenz als Kontrolle der spezifischen Lage dienen, während die magnetischen Eigenschaften der *Beads* eine einfache und effektive Isolation ermöglichen sollen.

1.7 Das Ziel dieser Arbeit

Die Erforschung des RGZ-Untergangs, wie er u.a. beim Glaukom eintritt, erfordert eine rasche, einfache und selektive Isolationsmethode, um pathophysiologische Prozesse genauer zu verstehen und mögliche Therapieoptionen zu untersuchen. Besonders die Minimierung der schädlichen Ischämiezeit, welche moderne Untersuchungsmethoden von Signalkaskaden verhindert, und die Reinheit der Zellkultur stehen im Zentrum des Anforderungsprofils. Die Isolation über retrograden Transport magnetischer *Beads* könnte diese Anforderungen erfüllen, da über die magnetische Ladung ein neuer Selektionsmechanismus ermöglicht wird. Diese Isolationsmethode verspricht einen hochgradig selektiven und gleichzeitig raschen Prozess, welcher die Ischämiezeit weiter minimiert.

In der vorliegenden Arbeit soll zunächst *in vitro* erarbeitet werden, ob die magnetischen *Beads* von RGZ aufgenommen werden und etwaige toxische Wirkungen ausgeschlossen werden. Es werden verschiedene *Beads* und Isolationsmethoden getestet um eine optimale Aufreinigung zu erreichen. Anschließend soll *in vivo* eine Testung der Methodik erfolgen, mit dem Ziel eine effektivere RGZ-Isolationsmethode zu etablieren.

2. Material

2.1 Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur

- Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (D-MEM), GIBCO, # 31885-023
- Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (D-MEM) Low Glucose Without L-Glutamin, PAA, # E15-005
- Fetal Bovine Calf Serum (FCS), GIBCO, # 10270
- Penicillin/Streptomycin, PAA, # P11-010
- Dulbecco`s PBS, PAA, # H15-002
- Trypsin-EDTA 25 %, GIBCO, # 25200
- Zellkulturflaschen Cellstar (250 ml), Greiner bio-one, # 658 170
- 6-, 24- u. 96-Well-Platten, Costar
- *Cell-Scraper*, Corning 3010

2.2 Assays & Kits

- CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, # G3580
- Crystal Violet Solution, Sigma, # HT901-8FOZ
- Caspase-Glo® 3/7 Assay-Kit, Promega, # G8091
- DAPI, Applichem, # A4099
- BSA: (bovines Serum albumin) Albumin bovin Fraction V, Serva, # 11930
- MultiMACS™ cDNA Synthesis Kit (12×8) 130-094-410
- Multi-8 Columns (# 130-092-444)
- Multi-8 Filter and Frame (# 130-092-548)
- Deep Well Block (DWB, 2.5 mL, # 130-092-549)

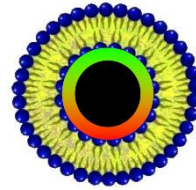
2.3 Beads

Es wurden verschiedene Mikropartikel, sogenannte *Beads*, verwendet, die sich jedoch einen gemeinsamen Grundaufbau teilen. Der Kern besteht aus Magnetit und verleiht den *Beads* ihre ferrimagnetischen Eigenschaften. Sie weisen also nur in starken magnetischen Feldern auch selbst magnetische Eigenschaften auf. Der Magnetitkern ist mit einer inneren Schicht aus lipophilem

Fluoreszenzfarbstoff und einer äußeren hydrophilen Polysaccharidmatrix überzogen. Letztere verhindert Aggregation mit anderen Ionen, ermöglicht eine wässrige Dispersion und erlaubt die Anheftung weiterer funktioneller Gruppen. Die verwendeten *Beads* waren unterschiedlich beschichtet. Neben *Beads* mit einer Lipid-Ummantelung (Lipid), angeheftetem Casein (Casein) und Polyaspartinsäuren (PAA), wurden auch *Beads* verwendet, die Polyethylenimin (PEI), Poly-Thymidin-Stränge (Oligo dT) oder Glukuronsäure (ARA) tragen (*Tabelle 1*). Die Beschichtung mit Glukuronsäure ermöglicht eine Anheftung von DNA-Molekülen, wie es in der zugrundeliegenden Arbeit durchgeführt worden war [54].

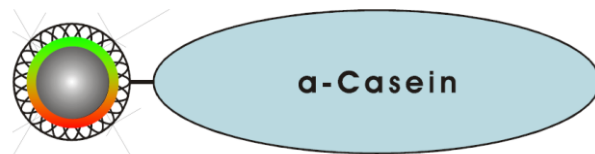
LIPID

Durchmesser	100 nm
Gewicht/Volumen	25 mg/ml
Anzahl an Beads	$1,8 \times 10^{15}/g$
Dichte	$1,25 \text{ g/cm}^3$
Fluoreszenzfarbe	Rot
Exzitation	578 nm
Emission	613 nm
Article #	4419-1



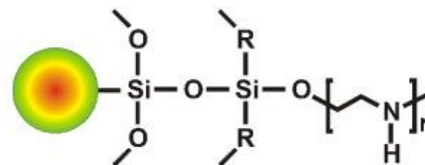
CASEIN

Durchmesser	100 nm
Gewicht/Volumen	10 mg/ml
Anzahl an Beads	$1,8 \times 10^{15}/g$
Dichte	$1,25 \text{ g/cm}^3$
Fluoreszenzfarbe	Rot
Exzitation	578 nm
Emission	613 nm
Article #	4506-1

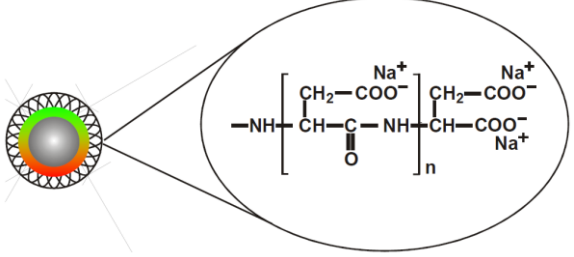


PEI

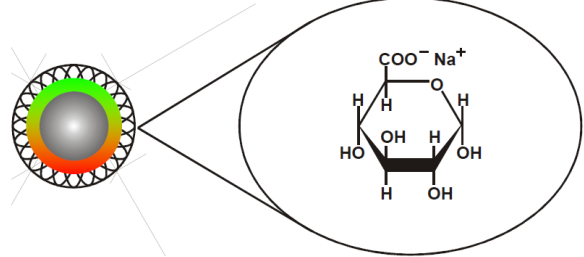
Durchmesser	500 nm
Gewicht/Volumen	50 mg/ml
Anzahl an Beads	$1,5 \times 10^{13}/g$
Dichte	$2,25 \text{ g/cm}^3$
Fluoreszenzfarbe	Rot
Exzitation	540 nm
Emission	625 nm
Article #	2106-1



PAA	
Durchmesser	100 nm
Gewicht/Volumen	25 mg/ml
Anzahl an Beads	$1,8 \times 10^{15}/g$
Dichte	$1,25 \text{ g/cm}^3$
Fluoreszenzfarbe	Grün
Exzitation	476 nm
Emission	490 nm
Article #	4408-1



ARA	
Durchmesser	100 nm
Gewicht/Volumen	25 mg/ml
Anzahl an Beads	$1,8 \times 10^{15}/g$
Dichte	$1,25 \text{ g/cm}^3$
Fluoreszenzfarbe	Grün
Exzitation	476 nm
Emission	490 nm
Article #	4415-1



Oligo(dT)	
Durchmesser	50nm
Gewicht/Volumen	
Anzahl an Beads	
Dichte	
Fluoreszenzfarbe	-
Exzitation	-
Emission	-
Article #	

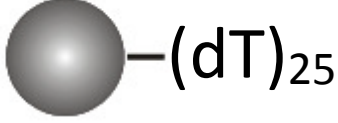


Table 1: Eigenschaften der verwendeten Beads

Aus betrieblichen Gründen konnte der Hersteller Miltenyi keine näheren Angaben zu den Oligo(dT) Beads machen. Diese werden in einem mRNA/cDNA Synthese Kit vertrieben.

2.4 Antikörper

Primärantikörper

HSP 70	Rabbit, Santa Cruz sc-33575 Lot #D1913
β Actin	Mouse, Cell signaling 3700S Lot #10
Caspase 3	Rabbit, Invitrogen 700182 Lot #1493621A
Cleaved Caspase 3	Rabbit, Cell signaling #9661L

Sekundärantikörper

Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor 488 (Grün), Thermo Fisher A-11008
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Alexa Fluor 555 (Rot), Thermo Fisher A-21422

Tabelle 2: Im Western Blot verwendete Antikörper

2.5 Primer

Gen	Vorwärts	Rückwärts
GAPDH	5' GGCATTGCTCTCAATGACAA 3'	3' TGTGAGGGAGATGCTCAGTG 5'
L32	5' TTCCTGGTCCACAATGTCAA 3'	3' AGGACACATTGTGAGCAATC 5'
IL12	5' ACCCTCACCTGTGACAGTCC 3'	3' TTCTTGTGGAGCAGCAGATG 5'
TLR9	5' TGCAGGAGCTGAACATGAAC 3'	3' ATTGGACAGGTCCACAAAGC 5'
TNF α	5' ACTCCCAGAAAAGCAAGCAA 3'	3' CGAGCAGGAATGAGAAGAGG 5'
Bax	5' AAGCGCATTGGAGATGAACT 3'	3' AAAGTAGAAAAGCGCGACCA 5'
Bcl-2	5' AATTACCATCGGCGTAGTGC 3'	3' CGTTTCAGCCACCGTAAAAT 5'

Tabelle 3: Sequenzen der verwendeten Primer

2.6 Geräte

- Zellkulturschrank/ CO₂-Inkubator, Heraeus
- Mikroskope:
 - o Zeiss inverses Mikroskop Axiovert 135 (Zeiss, Göttingen)
- ELISA-Reader, SLT 400 ATX u.
- MultiMACS M96thermo Separator (# 130-094-534)
- Chemicell MagnetoFACTOR96-Plate (# 9007)
- Miltenyi MACSiMAG™ Separator (#130-092-168)
- Miltenyi OctoMACS™ Separator (#130-042-109)
- Miltenyi MACS MultiStand (#130-042-303)
- Tecan Infinite® m200 NanoQuant
- *NanoQuant Plate*, Tecan No. 30035094
- Kabelloser Micro Bohrer, Stölting Co. 58610
- Micro Spritze 700er Serie, Stölting Co. 51107

2.7 Zelllinien

Die RGC-5-Zelllinie wurde von Prof. Neeraj Agarwal (UNT Health Science Center Fort Worth, TX, USA) zur Verfügung gestellt, die murine Photorezeptor-Zelllinie 661W stammt von Prof. Dr. Muayyad Al-Ubaidi (Department of Cell Biology, University of Oklahoma, OK, USA). ARPE-19 Zelllinie wurde von American Type Culture Collection (Manassas, Virginia, USA) käuflich erworben.

3. Methoden

3.1 Das Kultivieren der RGC-5-, 661W-, und ARPE19-Zellen

Um die *Beads* auf mögliche Toxizität hin zu prüfen wurden zunächst Versuche in der Zellkultur durchgeführt. Hierzu wurde mangels Alternativen auch die umstrittene RGC-5 Zelllinie, sowie neben der Photorezeptoren-Zelllinie 661W, die murine Pigmentepithel-Zelllinie ARPE19 herangezogen.

Die Zellen wurden zunächst in Zellkulturflaschen mit Dulbecco's Modified Eagle's Medium, mit Zusatz von 1% Penicillin/Streptomycin und fetalem Kälberserum (FKS) im Zellkulturschrank bei 37° C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Dabei enthielt das Medium für die RGC-5- und 661W-Zellen Medium 5% FKS, während das Medium der ARPE19-Zelllinie 10% FKS enthielt.

Zur Passagierung der Zellen wurde zunächst das Medium abgesaugt bevor ein einmaliger Waschschrift mit 5 ml PBS und schließlich das Absaugen des Puffers folgte. Mittels 2 ml 0,25% Trypsin + EDTA konnten die adhärennten Zellen unter stetem vorsichtigem Klopfen vom Flaschenboden gelöst werden. Nach lichtmikroskopischer Kontrolle der vollständigen Lösung der Zellen erfolgte anschließend die Resuspension der Zellen in 8 ml frischem Medium.

Die Bestimmung der Zellkonzentration der Suspension mithilfe einer Neubauerzählkammer ermöglichte im nächsten Schritt die Suspension durch

Zugabe von weiterem Medium auf die für die Aussaat erforderliche Konzentration zu verdünnen.

Platte	Zellkonzentration	Medium / Well
6-Well	2×10^5 Zellen/ml	2 ml/Well
12-Well	1×10^5 Zellen/ml	1 ml/Well
24-Well	$0,5 \times 10^5$ Zellen/ml	0,5 ml/Well
96-Well	1×10^4 Zellen/ml	100 μ l/Well

Tabelle 4: Kultivieren der Zellen in verschiedenen Platten

3.2 Die Behandlung mit den *Beads*

Nachdem die Zellen für die verschiedenen Versuchsansätze ausgesät wurden und 24 h anwachsen konnten, erfolgte anschließend die Behandlung mit den unterschiedlichen *Beads* in verschiedenen Konzentrationen. Man kann davon ausgehen, dass sich in jedem Well ungefähr dieselbe Anzahl Zellen befinden. Daher wurde nur von einem Well die Zellzahl bestimmt und die *Beads* der Zellzahl angemessen in dem der Zelllinie angepassten Nährmedium verdünnt. Das Medium der übrigen Proben wurde nun ebenfalls vorsichtig abgesaugt, die Proben mit 10.000 beziehungsweise 50.000 *Beads*/Zelle behandelt, mit neuem Medium aufgefüllt und darauffolgend für 24h inkubiert. Für Versuchsansätze in 96-Well Platten wurden die *Beads* im Verhältnis 1:50 bzw. 1:500 im adäquaten Medium verdünnt und die Proben in dieser Lösung resuspendiert.

3.3 Elektronenmikroskopie

Die Aufnahme der *Beads* in die Zellen stellt die Grundlage aller weiteren Versuche dar. Deshalb wurde mittels Elektronenmikroskopie die Aufnahme der *Beads* in die Zellen wie in [63] von einer Mitarbeiterin der AG Schnichels durchgeführt.

3.4 Isolation

Zur Optimierung des Isolationsverfahrens der mit *Beads* markierten Zellen sollte das Vorgehen zunächst *in vitro* an bestehenden Zelllinien optimiert werden. Zur Isolation der Zellen, welche die *Beads* aufgenommen hatten, wurden mehrere Isolationsverfahren getestet.

Zunächst wurde ein Verfahren unter Verwendung einer magnetischen Platte (*Chemically MagnetoFACTOR96-Plate*) getestet (*Abbildung 4 (a)*). Hierbei wurden die Zellen in einer 96-Well Platte ausgesät und am Folgetag mit *Beads* behandelt. Nach 24 stündiger Inkubationszeit konnten die adhärennten Zellen mittels Trypsin-EDTA gelöst und in eine neue Platte überführt werden. Anschließend wurde die Ausgangszellzahl durch auszählen von 6 Wells bestimmt und die 96-Well Platte auf die magnetische Grundplatte gestellt. Die Zellen, welche magnetische *Beads* aufgenommen hatten, wurden durch die magnetischen Anziehungskräfte auf dem Boden der Wells fixiert. Nach 20 min konnte der Überstand abgenommen und verworfen werden. Es folgten drei Waschschriffe mit PBS. Nach Entfernung der magnetischen Grundplatte und Resuspension der Zellen folgte die Ermittlung der Zellzahl mithilfe der Neubauerzählkammer.

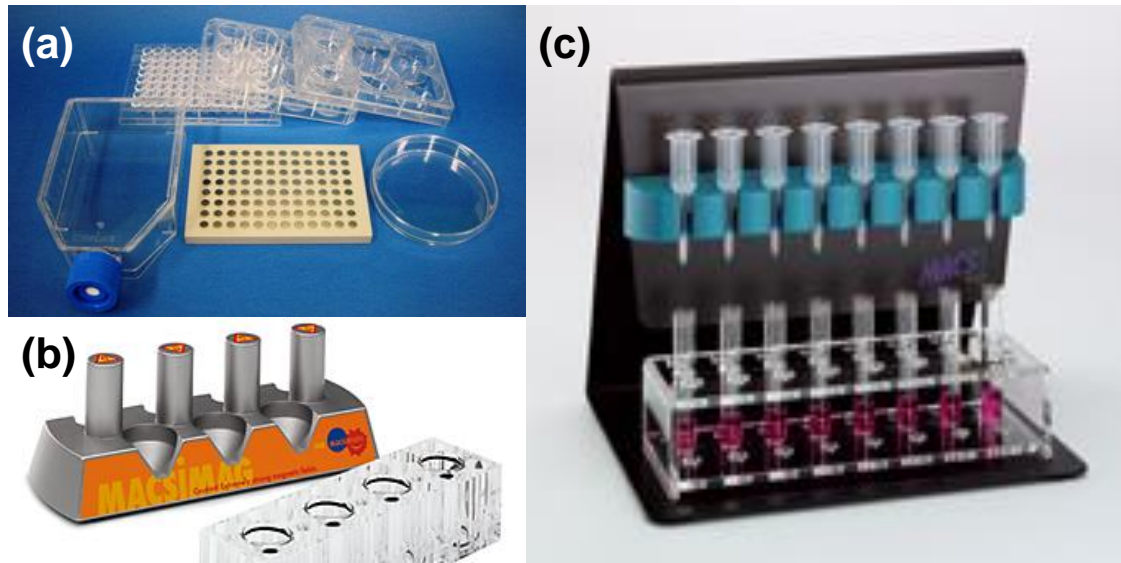


Abbildung 4: Verwendete Isolationsverfahren

Neben der Isolation über die magnetische *Chemicell Magneto Factor 96 Plate* (a) wurde auch der *Miltenyi MACSiMAG™ Separator* (b) und die magnetischen Säulchen *Miltenyi OctoMACS™ Separator* (c) getestet. [a-c] Chemicell, Miltenyi, Miltenyi.

Außerdem erfolgte die Erprobung der Aufreinigung mittels *Miltenyi MACSiMAG™ Separator* (Abbildung 4 (b)). Hierzu wurden die Zellen in 6-Well Platten ausgesät und wie oben beschrieben behandelt. Im Anschluss konnten die Zellen in einem Well abtrypsinisiert und die Ausgangszellzahl bestimmt werden, welche als Grundlage der Berechnung der Aufreinigung dienen sollte. Als nächster Schritt wurde der Überstand der übrigen Wells abpipettiert, in 2ml Eppendorf Gefäße überführt und mittels *Miltenyi MACSiMAG™ Separator* die *Beads* bestimmt, welche nicht von den Zellen aufgenommen worden waren. Bei dieser Methode liegt das Magnetfeld seitlich an (Abbildung 4). Nach Einbringung der Gefäße mittels einer Halterung in die unmittelbare Nähe des Magneten führten die entstehenden Anziehungskräfte schließlich dazu, dass die magnetischen *Beads* an der Gefäßwand hefteten. Danach wurden die Zellen gelöst, in Eppendorf Gefäße überführt und in das Magnetfeld eingebracht. Innerhalb einer viertel Stunde bildete sich ein Pellet aus Zellen, die erfolgreich *Beads* aufgenommen hatten an der Wand der Gefäße, während die Zellen, welche keine *Beads* aufgenommen hatten zum Boden des Gefäßes sedimentierten.

Als weiteres Verfahren zur Aufreinigung der Zellen dienten die magnetischen Säulchen des *Miltenyi OctoMACS™ Separator* (Abbildung 4 (c)).

Dies erforderte zunächst, eine Spülung der Säulen mit 500 µl PBS, bevor die, wie oben beschrieben behandelten, und anschließend gelösten Zellen in das System eingebracht werden konnten. Die ferromagnetischen Kügelchen im Inneren der Säulen sind so gepackt, dass Zellen, die nicht magnetisch markiert sind, frei hindurch sedimentieren können. Das, durch die ferromagnetischen Säulen 10.000-fach verstärkte, Magnetfeld des *Miltenyi OctoMACS™ Separator* (Abbildung 4 (c)) hingegen hält magnetisch markierte Zellen gegenüber der Schwerkraft zurück. Der Durchfluss wurde aufgefangen und unter dem Mikroskop mithilfe einer Neubauer Zählkammer die Zellzahl bestimmt. Nach Spülung der Säulen mit 1 ml DPBS mit 5% BSA, wurde im letzten Schritt mit demselben Puffer eluiert. Auch die Zellzahl des Eluats konnte bestimmt und schließlich zur Ausgangszellzahl in Bezug gesetzt werden um die Effizienz der Aufreinigung zu ermitteln.

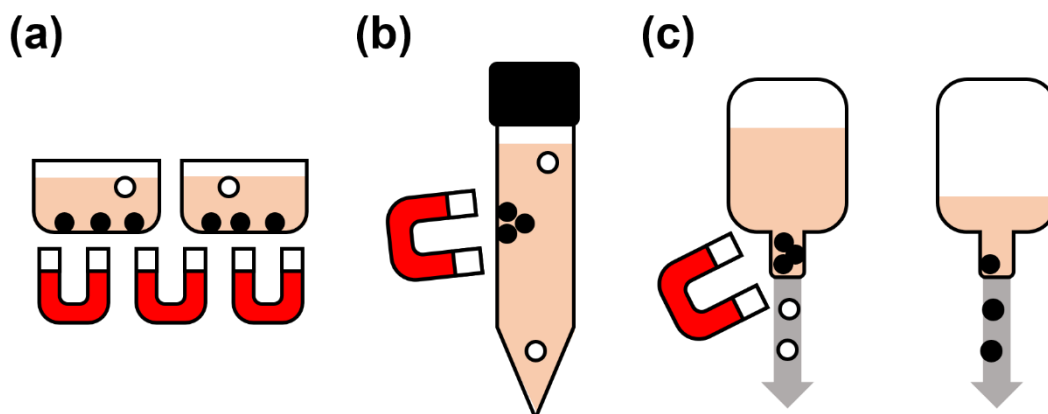


Abbildung 5: Schematische Zeichnung der Isolationsverfahren

(a) Die Zellkultur Platte wurde auf der magnetischen Platte (*Chemicell Magneto Factor 96 Plate*) in das Magnetfeld eingebracht. Die Zellen, welche *Beads* aufgenommen hatten (schwarze Kreise) wurden durch das Magnetfeld am Plattengrund fixiert, während Zellen ohne *Beads* (weiße Kreise) durch Absaugen des Mediums entfernt werden konnten. (b) Mittels *Miltenyi MACSIMAG™ Separator* wurde ein seitliches Magnetfeld angelegt, wodurch sich die mit *Beads* markierten Zellen als Pellet an der Gefäßwand sammelten. (c) Solange die magnetischen Säulchen des *Miltenyi OctoMACS™ Separator* in das Magnetfeld eingebracht waren, konnten nur Zellen, die keine *Beads* aufgenommen hatten, abfließen (links). Nachdem Entfernen der Säulchen aus dem Magnetfeld konnten nun die markierten Zellen eluiert werden (rechts).

Im Anschluss an die Isolation erfolgte die Aussaat der Zellen und Kultivierung über mehrere Tage um sicherzustellen, dass die Aufreinigung nicht mit irreparablen Schäden der Zellen einhergeht.

3.5 Toxikologie

Vor der Durchführung der *in vivo*-Versuche erfolgte die Überprüfung möglicher toxischer Eigenschaften der *Beads* in der Zellkultur. Dazu wurde die Vitalität der Zellen mittels MTS Assay, die Zellzahl durch Kristallviolett-Färbung und abschließend die Caspaseaktivität mittels Caspase 3/7-Assay untersucht.

3.5.1 MTS Assay

Der MTS-Assay erlaubt Rückschlüsse auf die Quantität vitaler Zellen und ermöglicht es somit, die Toxizität einer Substanz auf die Zellpopulation zu erfassen.

Das verwendete Kit (*The CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega*) enthält neben dem Elektronenakzeptor Phenazinethosulfat (PES) auch 3-(4,5-Dimethyl-2-yl)-5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-Tetrazol (MTS). Vitale Zellen reduzieren, durch die Reduktionsäquivalente NADH oder NADPH, über eine Kette an Redoxreaktionen schließlich MTS zum blau-violetten Formazan. Dieses ist im Zellmedium löslich und weist ein Absorptionsmaximum bei 490nm auf. Da NADH bzw. NADPH nur von vitalen Zellen regeneriert werden können, gestattet das Ausmaß des Farbumschlags Rückschlüsse auf die Menge an vitalen Zellen.

Den mit *Beads* behandelten und über 24 h inkubierten Zellen wurden 20µl/Well der MTS-Reagenz hinzugefügt und die Platten anschließend für 90 min bei 37°C im Zellkulturschrank inkubiert. Vor der Messung wurden die 96-Well-Platten anschließend 5min bei 3.000RPM zentrifugiert und nur der Überstand in eine neue 96-Well-Platte überführt, um mögliche Interaktionen durch die Eigenfarbe der *Beads* zu minimieren.

Anschließend wurde mithilfe des ELISA-Readers die Absorption bei 490nm und 690nm gemessen. Hierbei erfolgte die Messung jeweils in fünffacher Ausführung und anschließend die Ermittlung von Mittelwert und Standardabweichung. Der Mittelwert der Kontrolle wurde als 100% festgelegt und die Messwerte der Proben dazu in Bezug gesetzt.

3.5.2 Kristallviolettffärbung

Die verbliebenen Zellen wurden direkt mit 4%igem Paraformaldehyd (PFA) in PBS fixiert und somit für die Kristallviolettffärbung vorbereitet

Als weitere Toxizitätsuntersuchung folgte eine Kristallviolettffärbung. In diesem Verfahren werden zunächst alle Zellen angefärbt und anschließend die Tatsache genutzt, dass nur gesunde adhärent wachsende Zellen am Boden haften bleiben, während die abgestorbenen Schritt für Schritt ausgewaschen werden. Misst man nun die Absorption der Proben, so kann man auf ihren Gehalt an vitalen Zellen zurückschließen [64, 65].

Die Kristallviolettffärbung konnte direkt im Anschluss an den MTS-Assay durchgeführt werden.

Dazu wuschen wir die mit 4%igem PFA 15min bei Raumtemperatur (RT) fixierten Zellen zweimal mit 200 µl/Well destilliertem H₂O. Anschließend folgte die Zugabe von 100 µl Crystal Violet Solution (Firma: Sigma Aldrich) pro Well und Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur. Nach vergangener Inkubation schlossen sich drei Waschschriffe mit jeweils 200 µl destilliertem Wasser pro Well an. Schließlich wurden die Zellen durch einstündige Inkubation mit 100 µl 1%igem Sodiumdodecylsulfat (SDS) pro Well lysiert und abschließende die Absorption bei 595nm mithilfe des ELISA-Readers gemessen. Auch hier erfolgte die Messung der Proben in 5facher Ausführung, Mittelwerte und Standardabweichungen wurden gebildet und mit der, auf 100% gesetzten Kontrolle verglichen.

3.5.3 Caspase 3/7-Assay

Mithilfe des Caspase-Glo® 3/7 Assay-Kit (Promega, Madison, USA) kann die Aktivität der Effektor Caspasen 3 und 7 ermittelt werden. Diese spielen bei der Apoptose eine zentrale Rolle und erlauben somit Rückschlüsse auf eine mögliche Apoptoseinduktion durch die *Beads* [66].

Das Reagenz lysiert die Zellen und setzt die enthaltenen Caspasen frei. Diese spalten die in dem Reagenz enthaltenen Substrate und setzen letztendlich Aminoluziferin frei. Dieses wird von der, ebenfalls enthaltenen, Luziferase unter Entstehung von Licht umgesetzt. Durch die Messung der Lumineszenz kann also die Aktivität der Caspasen bestimmt werden.

Die mit *Beads* behandelten Zellen wurden mit 100 µl der Reagenz pro Well für eine Stunde bei Raumtemperatur abgedunkelt inkubiert. Es folgte die Zentrifugation der Platten 5min bei 3000rpm und die Überführung des Überstandes in eine neue 96-Well-Platte, vor der Messung der Lumineszenz mithilfe des ELISA-Readers bei mehreren Sensitivitäten (100, 125, 150, 175, 200). Die Auswertung erfolgte bei der Sensitivität, welche die Messwerte aller Proben erfassen konnte. Die Proben wurden in 5facher Ausführung gemessen, Mittelwerte und Standardabweichungen gebildet und mit den auf 100% gesetzten Kontrollen verglichen.

3.6 Quantitative real-time PCR

Als weitere Untersuchung der Toxizität der *Beads* wurde die Messung der Expression verschiedener Gene mittels *real-time Polymerase Chain Reaction* (rtPCR) durchgeführt. Da die *Beads* noch keinen Einsatz in neuronalem Gewebe fanden, führten wir zunächst eine *in vitro*-Testung anhand bekannter Stressmarker durch. Hierzu wurden *Toll-like-Receptor 9* (TLR9), Interleukin 12 (IL12), Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) und das Verhältnis des proapoptotischen Bax zum anti-apoptotischen Bcl2 (Bax/Bcl2) ausgewählt und mit den Housekeeping Genen L32 bzw. GAPDH verglichen. Als Positivkontrolle wurde Lipopolysaccharid (LPS) verwendet.

3.6.1 cDNA Synthese

Um die, für die rtPCR notwendige cDNA zu gewinnen wurde das *MultiMACS cDNA Synthese Kit*, sowie ein *MultiMACS™ M96thermo Separator* verwendet. Dieses Kit nutzt magnetische *μMACS Oligo(dT) MicroBeads* um die mRNA zu markieren und so über magnetisch geladenen *Multi-8 Säulen* zu isolieren, bevor mittels reverser Transkriptase cDNA generiert wird. Bei den *μMACS Oligo(dT) MicroBeads* handelt es sich um 50nm große, magnetische *Beads* mit einem Oligo(dT) Schwanz, welcher die Hybridisierung mit dem Poly(A)Schwanz der mRNA ermöglicht. Multi-8 Säulen enthalten eine Vielzahl kleiner Eisenkugeln, welche zulassen, dass Pufferlösungen hindurch sedimentieren, aber die magnetisch markierte mRNA zurückhalten, wenn sie in das Dauermagnetfeld des *MultiMACS™ M96thermo Separator* eingesetzt sind. Wird nun mittels reverser Transkriptase die mRNA in cDNA umgeschrieben, so wird diese zunächst über die gebundenen mRNA Stränge magnetisch von den Säulen zurückgehalten. Trennt man anschließend die Wasserstoffbrücken zwischen mRNA und cDNA und spült die Säulen, so kann die reine cDNA eluiert werden.

Zur Durchführung des Versuchs wurden die behandelten Zellen mithilfe eines *Cell-Scrapers* vom Boden der Wells gelöst, in 2 ml Eppendorf-Gefäße überführt und drei Minuten bei 2000rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abpipetiert und die gewonnenen Zellpellets bei -20°C gelagert. Zur Synthese der cDNA wurden die Zellpellets zunächst in 800 μl *Lysis Binding Buffer* lysiert und kamen bei 1400rpm für drei Minuten auf den Schüttler, um die das Gewebe vollständig zu lysieren und die mRNA frei zu setzen. Im nächsten Schritt folgte die magnetische Markierung der mRNA mithilfe der *μMACS Oligo(dT) MicroBeads*. Dazu erfolgte die Zugabe von 10 μl der *Beads* zum Lysat. Die folgenden Schritte fanden unter Verwendung eines *MultiMACS™ M96thermo Separators* statt. Es wurden Multi-8 Columns und Filter eingesetzt, welche mit 100 μl *Lysis Binding Buffer* äquilibriert wurden, bevor die Proben eingebracht und anschließend zweimal mit je 200 μl *Lysis Binding Buffer* gewaschen wurden. Anschließend wurden die Filter entfernt und viermal mit je 100 μl *Wash Buffer* und zweimal mit 100 μl *Equilibration/Wash Buffer* gewaschen. Nach Zugabe von

20 µl des reversen Transkriptase Mixes folgte die Inkubation für eine Stunde bei 42°C. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit 100 µl Wash Buffer konnten 20 µl *cDNA Release Solution* hinzugegeben und die Proben 10 Minuten bei 42°C inkubiert werden, bevor schließlich mit 60 µl Elution Buffer die cDNA gewonnen und in 1,5 ml Eppendorf Gefäße überführt bei -20°C gelagert werden konnte.

3.6.2 Quantifizierung

Die so gewonnene cDNA ließ sich am *NanoQuant* auf ihre Reinheit und Konzentration hin quantifiziert. Nach der Leerwertmessung mit 2 µl *Elution Buffer* wurde auf die 16er-*TecanPlatte* je 2 µl der Probe aufgetragen und die Absorbtion der Wellenlängen bei 260nm und 280nm gemessen.

3.6.3 qrt-PCR

Für die Durchführung der eigentlichen rt-PCR wurde für jeden nachzuweisenden Marker /Gen ein Reaktionsmix mit einem spezifischen Primerpaar angesetzt:

15 µl	Reaktionsmix
1 µl	Destilliertes Wasser
2 µl	Forward Primer 1µM
2 µl	Reverse Primer 1µM
10 µl	SYBR® Green Master Mix

Tabelle 5: Zusammensetzung des PCR Reaktionsmix

Der SYBR® Green Master Mix beinhaltet neben einem Puffer, den notwendigen Desoxyribonucleosidtriphosphaten (dNTPs), MgCl₂ und der DNA-Polymerase, auch einen Doppelstrang-DNA (dsDNA) bindenden Fluoreszenzfarbstoff (SYBR FGreen). Dieser Farbstoff fluoresziert nur im an dsDNA gebundenen Zustand Licht einer speziellen Wellenlänge. Da sich nach jedem Zyklus der dsDNA Gehalt der Probe vergrößert, steigt auch die gemessene Fluoreszenz proportional an. Den 15 µl Reaktionsmix wurden 5 µl verdünnter cDNA hinzugefügt. Die cDNA war entsprechen ihrer ermittelten Konzentration auf 1 ng/µl verdünnt worden. Die Probenzahl betrug pro Ansatz 4 (n=4). Jede dieser Proben wurde im Doppelansatz getestet.

Es wurden 40 Zyklen gemessen, wobei jeder Zyklus nach demselben Schema abläuft. Als erstes erfolgt die Denaturierung der dsDNA bei 95°C. Bei dieser Temperatur werden die Wasserstoffbrückenbindungen aufgebrochen, welche die DNA-Stränge verbinden, sodass für den zweiten Schritt nun Einzelstränge vorliegen. Dieser zweite Schritt, die Primerhybridisierung, erfolgt nach raschem Abkühlen bei 60-65°C gefolgt von der Polymerisation der DNA durch die hitzebeständige DNA-Polymerase, welche ausgehend von den Primern dNTPs zum neuen DNAstrang polymerisiert. Als letzter Schritt folgt nun die Messung der Fluoreszenz. Da alle, auch die im vorigen Zyklus entstandenen, DNA-Doppelstränge für den jeweils folgenden Schritt als Vorlage zur Verfügung stehen, ergibt sich eine exponentielle Vervielfältigung der Zielsequenz. Überschreitet das Fluoreszenzsignal einen bestimmten Schwellenwert, wird dieser Punkt als Ct- Wert annotiert.

Der Zeitpunkt des Überschreitens des Schwellenwerts hing dabei von dem ursprünglichen Gehalt an DNA der Zielsequenz ab. Somit lassen sich Rückschlüsse auf die mRNA Expression ziehen. Die ermittelten Werte wurden anhand der delta-delta-Ct Methode von Pfaffl [67] in Bezug zu den Housekeeping Genen und den unbehandelten Kontrollen gesetzt.

3.7 Western Blot

Um mögliche toxische Eigenschaften der *Beads* auf die Zellen auch auf Proteinebene zu untersuchen wurde eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (*engl.: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*; SDS-PAGE) mit anschließendem Western Blot durchgeführt. Ziel der SDS-PAGE ist die Auftrennung der einzelnen Proteine eines Proteingemisches nach ihrer Molekülmasse. Die so aufgetrennten Proteine können anschließend mittels Western Blot auf Nitrozellulosemembranen transferiert und über Antikörper detektiert werden.

SDS-PAGE nutzt zur Auftrennung des Proteingemisches ein elektrisches Feld, entlang dessen die geladenen Proteine durch ein Polyacrylamidgel wandern. Die Geschwindigkeit, in der die Proteine die gitterartige Struktur des

Polyacrylamidgels durchwandern, hängt dabei von ihrer Größe und Struktur ab. Da Proteine neben unterschiedlichen Molekülmassen auch verschiedene Ladungen und Strukturen besitzen, welche ebenfalls Einfluss auf die Flussgeschwindigkeit im elektrischen Feld haben, benötigt es Schritte um die Proteine zu normieren. Dies erfolgt mittels Natriumdodecylsulfat (*engl.: sodium dodecyl sulfate*; SDS). SDS ist als Sulfatester des Dodekanols ein stark negativ geladenes Detergens. Mit seinem hydrophoben Anteil lagert sich SDS in einem festen Verhältnis von 1,4g SDS pro 1g Protein [68] an Proteine an und sorgt somit durch seine stark negative Ladung für eine konstante Ladungsverteilung. SDS hat auch einen stabilisierenden Effekt auf die Struktur der Proteine, da die Abstoßung der negativen Ladungen zu einer linearen Ausrichtung von denaturierten Proteinen führt. Um diesen Effekt nutzen zu können werden die Proteine auf 95° C erhitzt und zusätzlich mittels β -Mercaptoethanol auch über Disulfidbrücken stabilisierte Konformationen zerstört. So vorbehandelte Proteine werden bei der Durchwanderung des Gels einzig nach ihrer Molekülmasse aufgetrennt. In einer festgelegten Zeit wandern hierbei kleinere Proteine weiter in Richtung der Anode als größere Moleküle, welche durch die Gitterstruktur des Gels gebremst werden.

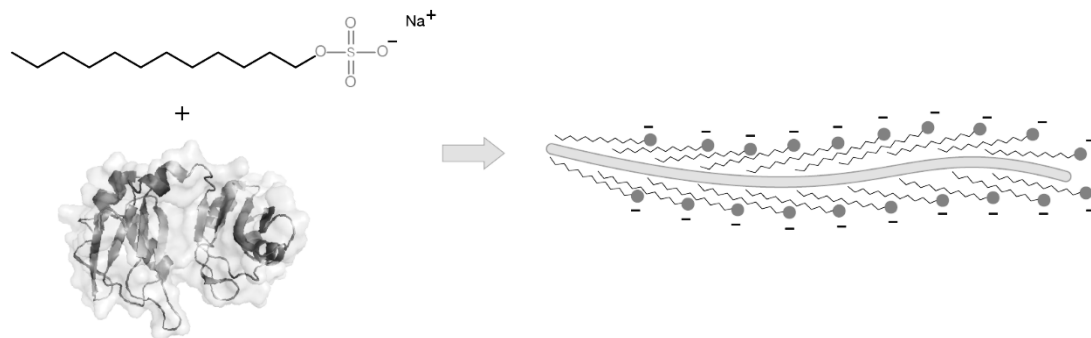


Abbildung 6: SDS Wirkungsmechanismus

Denaturierung eines Proteins (unten-links) mittels SDS (links oben). SDS lagert sich an das entfaltete Protein an (rechts) und stabilisiert durch elektrostatische Abstoßung eine lineare Struktur. Die durch die regelmäßige Anlagerung entstehende konstante negative Ladungsdichte stellt die treibende Kraft in der Elektrophorese. Übernommen von Fdardel[69].

Im Anschluss können die Proteinbanden mittels Western Blot auf eine Trägermembran übertragen werden um sie für weitere Untersuchungen

zugänglich zu machen. Beim Western Blot werden sowohl das Polyacrylamidgel, als auch die Nitrozellulosemembran in ein elektrisches Feld einer Nasskammer eingebracht. Entlang des elektrischen Feldes wandern die Proteine nun senkrecht zur ehemaligen Laufrichtung auf die anliegende Nitrozellulosemembran. Der so entstandene Abklatsch kann im Folgenden verwendet werden, um nähere Bestimmungen der einzelnen Proteinbanden mittels spezifischer Antikörpern durchzuführen.

Im Folgenden können bestimmte Proteine mit entsprechenden Erstantikörpern markiert werden. Daraufhin wird die Membran geblockt, um im nächsten Schritt ein unspezifisches Binden der Zweitantikörper zu verhindern. Diese sind fluoreszenzmarkiert, erlauben somit eine semi-quantitative Auswertung.

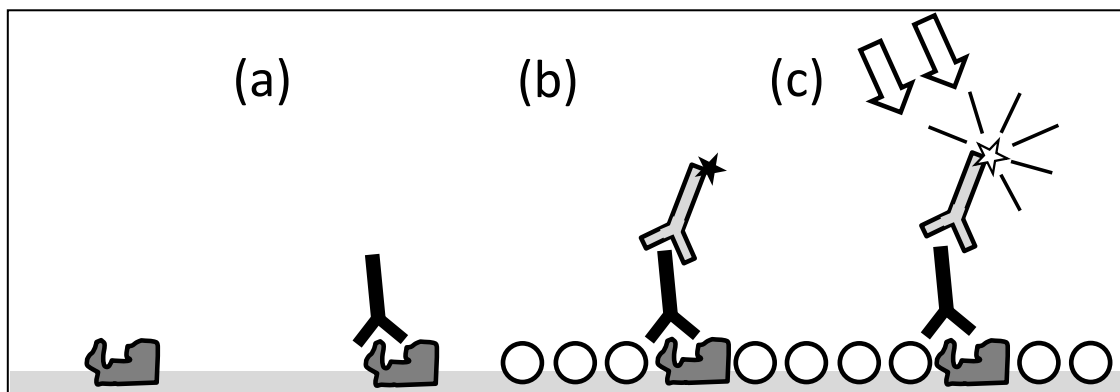


Abbildung 7: Das Prinzip der Proteindetektion mittels fluoreszierender Antikörpern

Die auf der Membran sitzenden Proteine (dunkelgrau) werden von Erstantikörpern gebunden (a). Nachdem unspezifische Bindungen durch Blocken der Membran (Weiße Kreise) verhindert wurden binden Zweitantikörper die Erstantikörper (b) und fluoreszieren bei Anregung in entsprechender Wellenlänge (c).

Zur Probengewinnung wurden die Zellen in 6-Well-Platten ausgesät und jeweils 4 Wells pro Versuchsansatz (n=4) verwendet. Neben einer Kontrolle, Lipid-, Casein-, und ARA-Beads, wurde auch ein Ansatz mit Staurosporin als Positivkontrolle für die Apoptose angesetzt. Nach 24 h wurden sie mit 1:100 verdünnten Beads, beziehungsweise 1:1000 verdünntem 1µM Staurosporin versetzt oder als Kontrolle belassen. Nach einer eintägigen Inkubationszeit wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von 100 µl Cell Extraction Buffer (Invitrogen, Germany) konnten die Zellen lysiert,

mittels *Cell Scraper* vom Boden gelöst und in Eppendorfgefäße überführt werden. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte die 10-minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4°C. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und bei -20°C bis zum weiteren Gebrauch eingefroren.

Der Proteingehalt des Lysates wurde anschließend mittels BCA Protein Assay Kit (Pierce, Deutschland) ermittelt. Alle Proben wurden auf eine Konzentration von 15 µg/µL verdünnt, im Anschluss bei 95°C über 5 Minuten denaturiert und daraufhin auf Eis abgekühlt.

Für die folgende Gelelektrophorese wurden *Mini-PROTEAN TGX Precast Gele* (Biorad, Deutschland) verwendet. Die Gele wurden in die Kammer gestellt, welche mit Running Buffer gefüllt wurde. Neben den Proben wurde *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific, USA) als Marker in eine Tasche pipettiert. Die Gelelektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 200 Volt über 60 min.

Anschließend fand im mit Towbin-Puffer gefüllten *Wet/Tank Blotting System* (Biorad, Deutschland) bei 350mA, 60 min unter Kühlung der Transfer der Proteinbanden auf die Nitrozellulosemembran statt. Die Membranen wurden zunächst für eine Stunde mittels 5% BSA in TBS-T geblockt, bevor sie mit Antikörpern gegen β-Tubulin (1:3000), HSP70 (1:1000) und Caspase 3 (1:500) über Nacht bei 4°C inkubiert wurden. Nach drei 10-minütigen Waschschritten in TBS-T erfolgte die Inkubation mit den entsprechenden Zweitantikörpern für 60 min bei Raumtemperatur.

Protein	Beschreibung	Molekülgröße
HSP70	Chaperon welches unter schädlichen Bedingung zum Schutz zellulärer Proteine vermehrt ausgeschüttet wird	70 kDa
β-Actin	Haushaltsgen	45 kDa
Caspase 3	Zählt zu den Effektor-Caspasen des programmierten Zelltods.	35 kDa
Cleaved Caspase 3	Aktivierte Form der Caspase 3 in apoptotischen Zellen	19 kDa 17 kDa

Tabelle 6: Zielproteine der verwendeten Erstantikörper

Um die Proteinbanden zu Visualisieren und einer Auswertung zugänglich zu machen wurde mittels *Licor Odyssey FC* (Li-cor, USA) die Fluoreszenz grafisch dargestellt und die einzelnen Banden anhand ihrer Molekülmasse und des verwendeten Markers identifiziert. Anschließend konnte die Fluoreszenz der einzelnen Banden gemessen und die Messwerte der Proben zum Referenzprotein relativiert werden. Die Kontrolle wurde als 100% definiert, die Proben zur entsprechenden Kontrolle in Relation gesetzt und der Mittelwert sowie die Standardabweichung berechnet.

3.8 *In Vivo*-Versuche

Nach ausgiebiger Testung der Isolationsmethoden und der Toxizität der *Beads* wurden die Versuche am Tiermodell begonnen. Diese Versuche erfolgten im Rahmen der Tierversuchsgenehmigung mit der Nummer AK7/13.

Hierzu wurden die 8 Wochen alten Lister Hooded-Ratten zunächst gewogen und anschließend durch intraperitoneale Verabreichung der 3-Komponenten-Narkose bestehend aus Fentanyl (0,005 mg/kg), Midazolam (2,0 mg/kg) und Medetomidin (0,15 mg/kg) narkotisiert. Die narkotisierten Tiere wurden auf einer Wärmematte gelagert, das Operationsgebiet des Schädels rasiert und die Augen zum Hornhautschutz mit einer Augencreme (Artelac, Bausch&Lomb, USA) benetzt. Nach Beendigung der Vorbereitungen folgte eine subkutane Analgesie

mit Carprofen (5 mg/kg KG). Das Operationsgebiet wurde mit Jod desinfiziert und mit Lidocain betäubt. Mittels Einmalskalpell wurde sowohl der sagittale Hautschnitt entlang der Mittellinie, als auch die Präparation des Schädelknochens durchgeführt. Die Kopfhaut wurde, zur besseren Übersicht des Operationsfeldes, seitlich aufgespannt.

Die Injektion der *Beads* erfolgte 3 mm tief in den Colliculus superior (*Abbildung 8*). Hierzu wurden mittels Präzisionsbohrer die Schädeldenne beidseits über den *Colliculi superiores* aufgebohrt und unter Verwendung einer Hamilton Mikroliterspritze 7 µl der Versuchslösung pro Bohrloch appliziert. Es folgte der Wundverschluss durch fortlaufende Naht mit 5er Seiden Fäden. Nach sorgfältiger Säuberung der Wunde schloss sich die topische Applikation von Lidocain und Gentamycin, sowie eine 15-minütigen postoperativen Ruhephase auf der Wärmematte an. Abschließend erfolgte die subkutane Antidot-Injektion mit Naloxon (0,12mg/kg), Flumazenil (0,2mg/kg) und Atipamezol (0,75mg/kg).

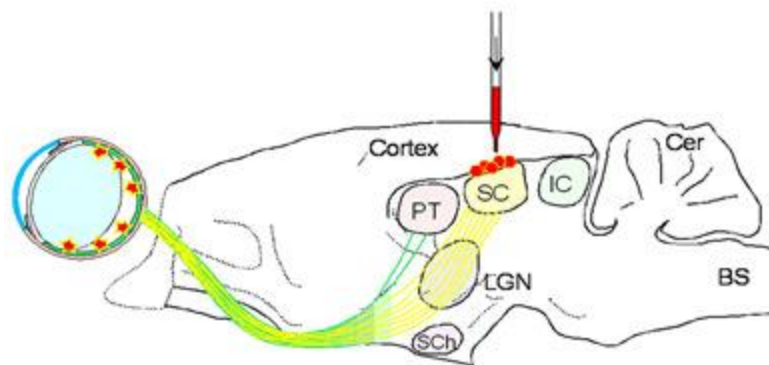


Abbildung 8: Schematische Darstellung des retrograden Transports nach Injektion

Nach Injektion der *Beads* (rote Punkte) in den *Colliculus superior* (SC) gelangen sie über retrograden Transport entlang der Sehbahn bis in die RGZ. Abbildung modifiziert nach Thaler et al[54].Heiduschka et al 2010

Während des Versuchszeitraums standen die Versuchstiere unter regelmäßigen Allgemeinzustands- und Wundkontrollen. Neben starken Entzündungsreaktionen an der Injektionsstelle oder den Augen wurden Infektionen im Operationsgebiet, neurologische Störungen und Verhaltensauffälligkeiten, sowie starker Gewichtsverlust als Abbruchkriterien definiert. Wunddehiszenzen durch Aufkratzen der OP-Narbe sollten durch Sekundärnaht verschlossen werden.

Zur Isolation der Augen und des Gehirns wurden die Tiere einzeln mit CO₂ eingeschläfert und nach erfolgter Dekapitation wurden die Gehirne und Augen entfernt. Das Gewebe wurde in Tissue Tek (Sakura) eingebettet und in flüssigen Stickstoff gefroren. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -28°C gelagert.

Zunächst wurde durch mikroskopische Analysen überprüft, wie die *Beads* in Gehirn und Auge aufgenommen und transportiert wurden. In folgenden Ansätzen wurde jeweils nur ein Auge kryokonserviert, während das andere für die Isolation verwendet wurde.

Versuchstag	Versuchstier	Verwendete <i>Beads</i>
1. OP Tag	Ratte 1	Lipid Beads 1:100
	Ratte 2	Lipid Beads 1:1
	Ratte 3	ARA Beads 1:100
	Ratte 4	ARA Beads 1:1
2. OP Tag	Ratte 5	Lipid Beads 1:10
3. OP Tag	Ratte 6	ARA Beads 1:10
	Ratte 7	Lipid Beads 1:10
4. OP Tag	Ratte 8	Casein Beads 1:3
	Ratte 9	Nur DNA 100 μ M
	Ratte 10	Lipid Beads 1:3
	Ratte 11	Casein Beads 1:10
	Ratte 12	Lipid Beads 1:10
5. OP Tag	Ratte 13	DNA 100 μ M
	Ratte 14	PAA Beads 1:1
	Ratte 15	Casein Beads 1:1
	Ratte 16	Lipid Beads 1:1
6. OP Tag	Ratte 17	Nur DNA 100 μ M
	Ratte 18	PAA Beads 1:1
	Ratte 19	Casein Beads 1:1
	Ratte 20	Lipid Beads 1:1

Tabelle 7: Protokoll der *in vivo*-Experimente:

Den Ratten wurden unterschiedliche *Beads* in verschiedenen Konzentrationen injiziert. Hierzu wurden sie in den angegebenen Verhältnissen in PBS verdünnt. Nach 7, beziehungsweise 14 Tagen unter täglichen Wund- und Allgemeinzustandskontrollen wurden die Versuchstiere euthanasiert.

3.9 Kryoschnitte

Die Anfertigung der Gewebeschnitte der entnommenen Gehirne erfolgte in der Sagittalebene. Zunächst wurde schichtweise so viel Gewebe entfernt, bis die Schnittebene in der Nähe der Einstichkanäle im Hirngewebe, beziehungsweise des maximalen Augeninnendurchmessers und des Sehnervens lag. Von nun an wurden die Schnitte mit einer Dicke von 12 μm durchgeführt und auf 10 beschriftete Objektträger übertragen. Anschließend wurde erneut geschnitten und 10 Schnitte in Folge auf dieselben Objektträger aufgenommen. Diese Schritte wurden solange wiederholt, bis drei Gehirn-, beziehungsweise vier Augenschnitte auf jedem Objektträger aufgetragen waren. Daraufhin erfolgte die Lagerung sowohl der Schnitte, als auch der übrigen Gewebeproben im Gefrierschrank bei -28°C .

3.10 Färbungen

Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) kann die, durch das Fixieren zerstörte Zellmembran durchdringen und an AT-reiche Regionen in der kleinen Furche doppelsträngiger DNA binden. DAPI besitzt bei Anregung mit UV-Licht ein Emissionsmaximum mit einer Wellenlänge von 461 nm und wird zur Färbung von Zellkernen genutzt [70].

Hierzu wurden die Schnitte mit Aceton/Methanol (1:1) über 15 Minuten fixiert und anschließend dreimal 10 Minuten mit TBS auf dem Rüttelbrett gewaschen. Es folgte die Färbung mit DAPI (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in TBS) für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Daraufhin folgte zweimaliges Waschen mit TBS sowie einmal mit destilliertem Wasser. Abschließend erfolgte nach kurzem Lufttrocknen der Objektträger unter Verwendung von Fluorsafe die Auflage der Deckgläschen.

3.11 Statistische Analyse

Um die Ergebnisse aus den Assays und Western Blots statistisch zu überprüfen, folgte die Analyse mittels ANOVA und anschließender post Hoc Analyse mittels Tukey-Kramer- bzw. Dunnett-Test (Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$) mit der Statistiksoftware GraphPad PRISM. So konnte eine Aussage darüber getroffen werden, inwieweit die Differenzen zwischen den einzelnen Gruppen (Tukey Kramer) und im Bezug zur Kontrolle (Dunnett) als zufällig oder signifikant unterschiedlich gewertet werden können. Dabei wurde von folgender gängiger Einteilung Gebrauch gemacht: $p \leq 0,05$ = signifikant (Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 5 %), $p \leq 0,01$ = sehr signifikant (Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 1 %), $p \leq 0,001$ = höchst signifikant (Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 1 ‰).

4. Ergebnisse

4.1 Etablierung der *Beads*

Bevor die *Beads* wie vorgesehen *in vivo* eingesetzt werden konnten erfolgte eine sorgfältige Einführung mittels *in vitro*-Experimenten. Als erster Schritt in der Etablierung der *Beads* sollte gezeigt werden, dass diese von den Zellen aufgenommen werden, denn erst die Aufnahme in die Zellen erlaubt eine sichere Isolation der Zellen über magnetische Sortierungsverfahren. Um diesen Nachweis zu erbringen wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. In der elektronenmikroskopischen Untersuchung konnten Lipid-*Beads* bereits nach 18h Inkubationszeit im Zytosol der RGC-5 Zellen nachgewiesen werden.

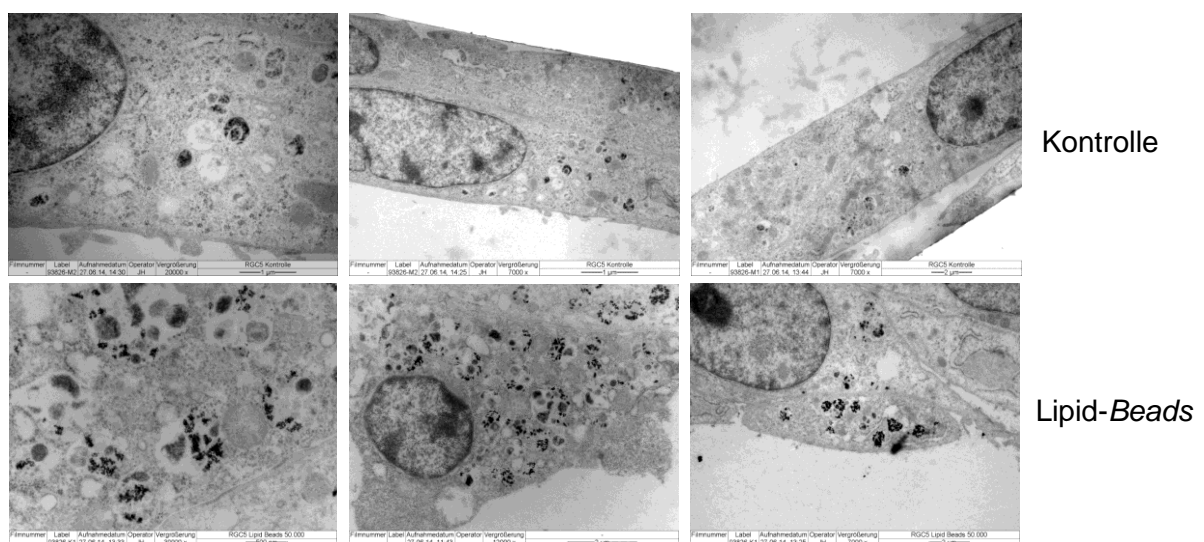


Abbildung 9: Elektronenmikroskopie von RGC5-Zellen nach Behandlung mit Lipid-Beads

18h nach der Behandlung mit den Lipid-*Beads* sind diese deutlich im Zytosol der RGC5-Zellen nachweisbar.

Anschließend folgte die Optimierung des Isolationsverfahrens *in vitro*, bevor es bei Tierexperimenten zum Einsatz kommen sollte. Hierzu wurden drei mögliche Isolationsmethoden untersucht. Sie alle nutzen die ferromagnetischen Eigenschaften der *Beads* unterscheiden sich aber in der Stärke der magnetischen Felder, und der Art und Weise wie die mit Zellen beladenen *Beads* diese durchwandern. Es zeigte sich, dass die Isolation über die magnetische 96-

Well Platte aufgrund der kleinen Zellzahlen und vielen Wells sowohl mit einem geringen Ertrag, als auch mit einem unverhältnismäßig hohen Aufwand einherging. Die Aufreinigung über *Miltenyi MACSiMAG™ Separator* stellte zwar einen einfacheren Prozess dar, konnte allerdings nicht konstant verlässliche Erträge produzieren (Daten nicht gezeigt). Die Aufreinigung mittels der magnetischen Säulchen des *Miltenyi OctoMACS™ Separator* zeigte sich hingegen als verlässliche Methode. Eine Konzentration von 50.000 *Beads*/Zelle erbrachte die besten Isolationsergebnisse. Sowohl Ansätze mit höheren als auch geringeren Konzentration führten nicht zu einer adäquaten Isolation (Daten nicht gezeigt). Je nach untersuchter Variante der *Beads* und Zellreihen konnten Aufreinigungen von bis zu 96% erzielt werden (*Abbildung 10*). Die an Oligo(dT) gekoppelten *Beads* zeigten in allen Zelllinien eine Aufreinigung von <5% und erwiesen sich somit als ungeeignet für dieses Forschungsprojekt. Auch die mit ARA verbundenen *Beads* wurden entweder nicht in ausreichender Menge von den Zellen aufgenommen oder ihre magnetischen Kräfte waren zu gering. Es konnten 20% der RGC-5, 9% der 661W und 0% der eingesetzten ARPE19-Zellen mittels ARA-*Beads* isoliert werden (*Abbildung 10*). Für die Lipid-*Beads* konnte eine hohe Aufnahme und resultierende Aufreinigung in allen drei Zelllinien gezeigt werden (RGC-5: 64%; 661W: 69%; ARPE19: 74%) (*Abbildung 10*). Auch PAA- (RGC-5: 71%; 661W: 71%; ARPE19: 96%) und PEI-*Beads* (RGC-5: 48%; 661W: 80%; ARPE19: 56%) erwiesen sich in allen getesteten Zelllinien als zuverlässig. Im Gegensatz zu den anderen *Beads*, welche in allen Zelllinien vergleichbare Ergebnisse erbrachten, konnte bei Casein gekoppelten *Beads* gezeigt werden, dass die Isolation in der 661W- (12%) deutlich geringer ausfiel, als in der RGC-5 (61%) und ARPE19-Zelllinie (66%) (*Abbildung 10*).

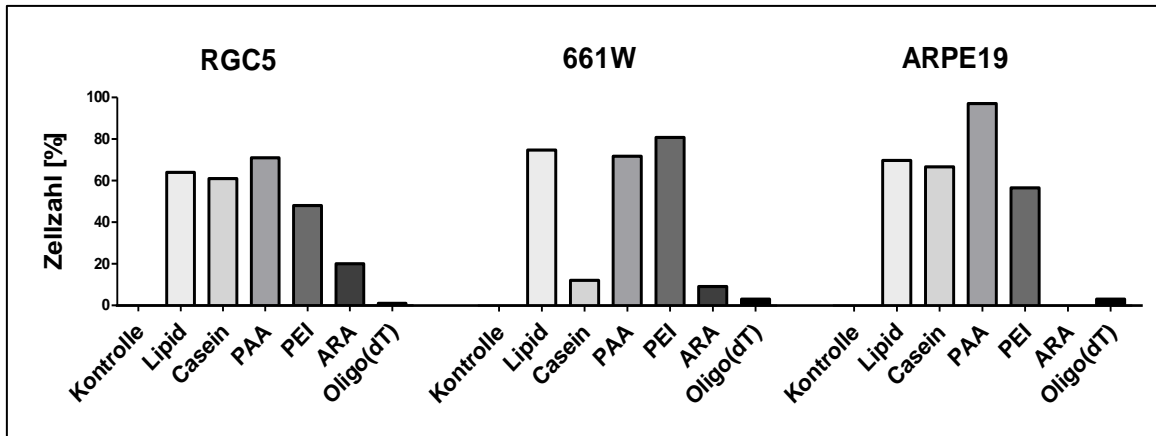


Abbildung 10: Isolation der mit 50.000 Beads/Zelle inkubierten RGC-5, 661W und ARPE19 Zellen über magnetische Säulchen

Gezeigt ist der prozentuale Anteil der isolierten Zellen im Bezug zur jeweiligen Ausgangszellzahl. Für die meisten *Beads* waren die Ergebnisse konstant über alle verwendeten Zellreihen, während sich mit Casein-*Beads* nur eine Isolation von 9% der 661W Zellen erzielen lies. An Oligo(dT) bzw. ARA gekoppelte *Beads* zeigten für 661W bzw. ARPE19 eine ungenügende Isolation. Die mit ARA beschichteten *Beads* erbrachten zumindest bei den RGC-5 Zellen einen höheren Ertrag, während *Beads* mit Oligo(dT)-Beschichtung auch hier nur eine ungenügende Isolation erzielten. N=3.

Die anschließend ausgesäten Zellen zeigten phasenmikroskopisch keine Anzeichen für verstärkten Zelluntergang oder aufgetretene Zellschäden im Vergleich zu Zellen, die weder behandelt worden waren, noch die Isolationsschritte durch die magnetischen Säulchen durchlaufen hatten (Abbildung 11).

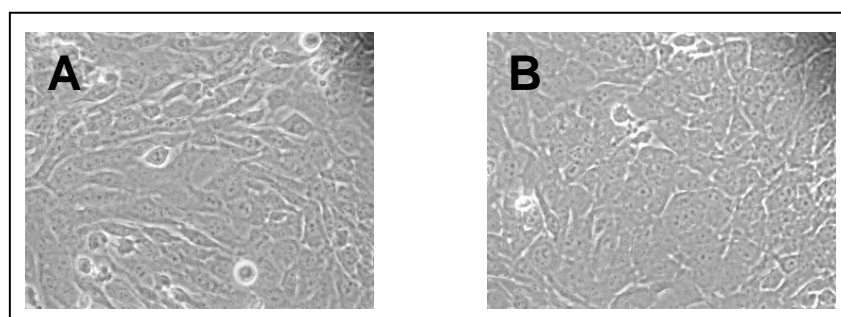


Abbildung 11: Phasenmikroskopie von RGC-5-Zellen vor bzw. nach Isolation

RGC-5 Zellen zeigen mikroskopisch keine morphologischen Unterschiede vor (A) und 24h nach Isolation über *Miltenyi OctoMACS™ Separator* und vorrausgehender Behandlung mit 50.000 *Beads*/Zelle.

4.1.1 Toxikologie

Da die *Beads* bisher nicht in neuronalem Gewebe eingesetzt worden waren, erfolgte zunächst eine *in vitro*-Untersuchung möglicher toxischer Wirkungen auf die Zellen. Hierzu wurden wiederum die RGC-5, 661W und ARPE19 Zelllinien verwendet. In einem ersten Schritt erfolgte die Untersuchung mit Hilfe von drei Assays. Mit dem MTS Assay kann über einen, durch vitale Zellen vermittelten, Farbumschlag und anschließende Messung der Absorption, der Anteil der vitalen Zellen bestimmt werden. Die Kristallviolettffärbung färbt zunächst alle Zellen an, bevor in mehreren Waschschrinen alle geschädigten, also nicht mehr adhärenen, Zellen ausgewaschen werden und über Messung der Absorption der Anteil der vitalen Zellzahl bestimmt werden kann. Mit Hilfe des Caspase Assay lässt sich die Aktivität der Caspasen 3 und 7 als Marker für Apoptoseaktivität nachweisen.

RGC-5 Zellen zeigten nach 24 stündiger Inkubation mit *ARA-Beads* eine reduzierte Zellzahl in der Kristallviolettffärbung auf. Dies fand sich sowohl bei Verdünnung im Verhältnis 1:500, als auch bei der höheren Konzentration von 1:50. Die Zellzahl fiel hierbei auf 56% ($p \leq 0,05$), beziehungsweise in der höheren Konzentration auf 49% ($p \leq 0,001$) der Kontrollzellzahl ab. Des Weiteren resultierte die Inkubation mit 1:50 konzentrierten *PEI-Beads* in einem 65%igen Anstieg ($p \leq 0,05$) der Caspaseaktivität (*Abbildung 12*). Für die übrigen *Beads* konnten keine toxischen Effekte auf RGC-5 Zellen nachgewiesen werden.

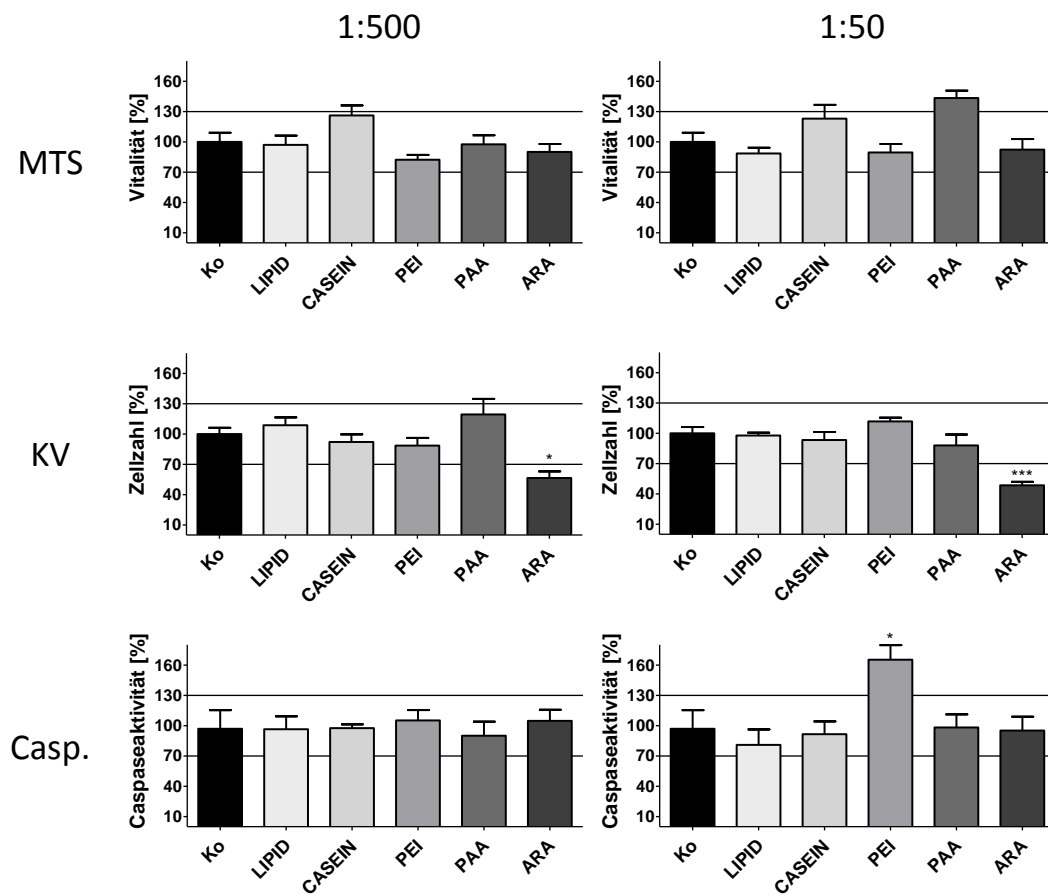


Abbildung 12: Toxikologische Untersuchungen an RGC-5 Zellen nach Behandlung mit den Beads

Die RGC-5 Zellen zeigten nach Behandlung mit ARA-Beads eine deutlich reduzierte Zellzahl. Nach Inkubation mit PEI-Beads der Konzentration 1:50 stieg die Caspaseaktivität auf 165%. Für die anderen Beads konnten keine toxischen Reaktionen gezeigt werden. $n=5$; One-way-ANOVA Test; Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,05$ *** = $p \leq 0,001$, signifikant unterschiedlich zur Kontrolle

Die Untersuchungen an der 661W Zelllinie erbrachten für keine der untersuchten *Beads* Anhaltspunkte auf mögliche schädliche Wirkungen (*Abbildung 13*). Nach Inkubation mit Lipid- (1:500) und Casein-*Beads* (1:50) zeigte sich eine um 23% bzw. 28% ($p \leq 0,01$) gesteigerte Viabilität.

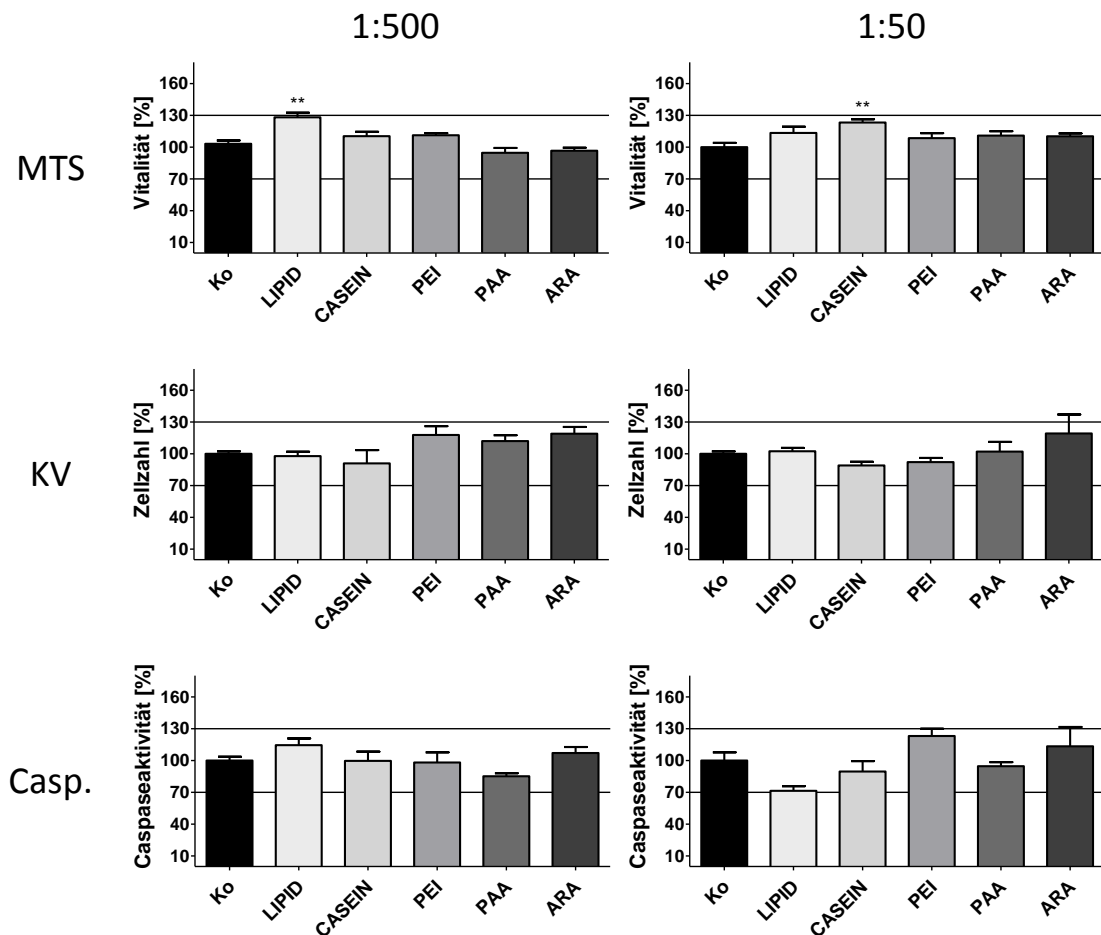


Abbildung 13: Toxikologische Untersuchungen an 661W Zellen nach Behandlung mit den *Beads*

Nach Behandlung der 661W Zellen mit den *Beads* konnten keine toxischen Effekte gezeigt werden. Es zeigte sich sogar ein signifikanter Anstieg der Viabilität nach Inkubation mit Lipid- (1:500) und Casein-*Beads* (1:50). $n=5$; One-way-ANOVA Test; Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$, signifikant unterschiedlich zur Kontrolle.

Die Applikation von PEI-*Beads* resultierte in einer reduzierten Vitalität der ARPE19 Zellen. Diese fiel unter der Konzentration 1:500 auf 72% und unter 1:50 verdünnten *Beads* auf 69% der Kontrolle. Nach Behandlung mit Casein- und PEI-*Beads* der Konzentration 1:50 zeigte sich eine um 78% bzw. 80% ($p \leq 0,001$) erhöhte Zellzahl. Des Weiteren zeigten sich keine toxischen Auswirkungen (Abbildung 14).

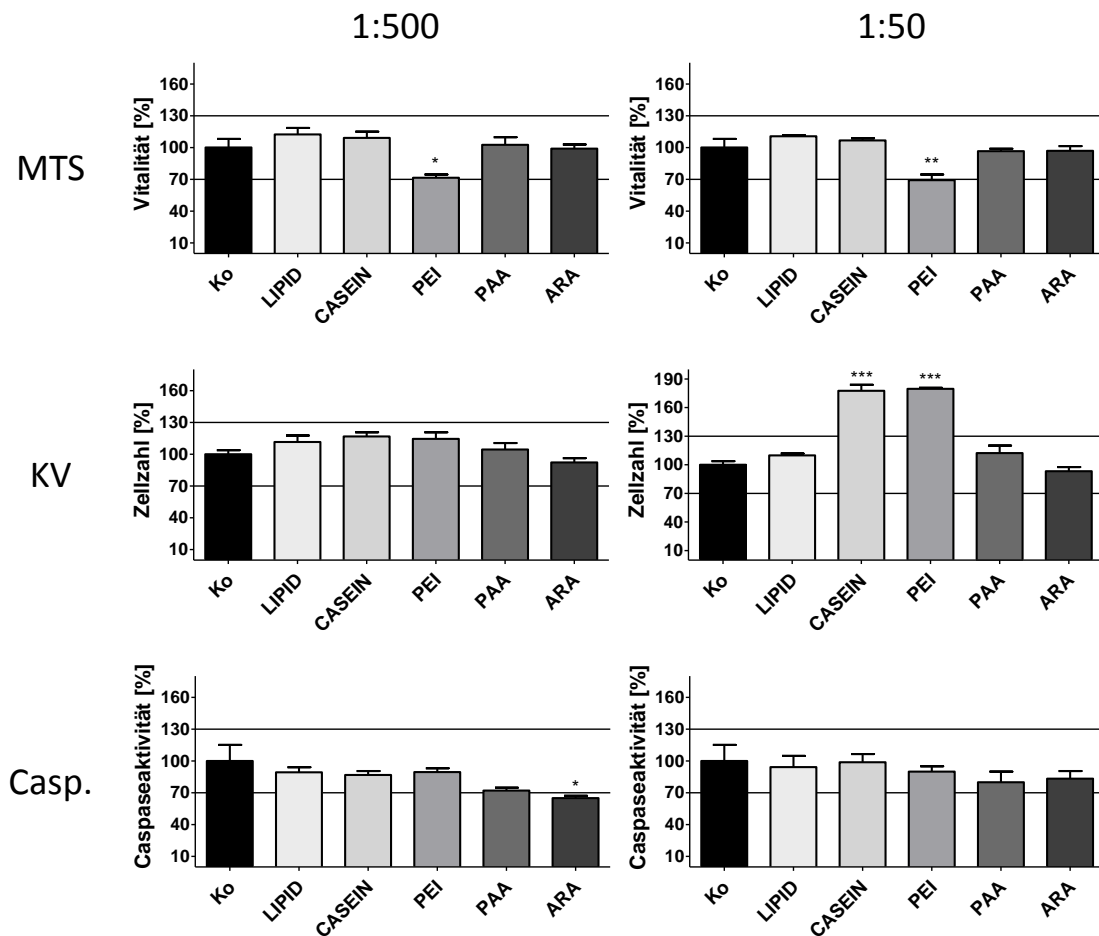


Abbildung 14: Toxikologische Untersuchungen an ARPE19 Zellen nach Behandlung mit den Beads

ARPE19 Zellen wiesen eine erniedrigte Vitalität nach der Behandlung mit PEI-*Beads* auf. Die Zellzahl der ARPE19 Zellen war nach Behandlung mit 1:50 verdünnten Casein-, sowie PEI-*Beads* erhöht. Für die anderen *Beads* konnten keine toxischen Effekte nachgewiesen werden. Die Inkubation mit Casein- und PEI-*Beads* der Konzentration 1:50 resultierte in einer gesteigerten Zellzahl. $n=5$; *One-way*-ANOVA Test; Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,05$ *** = $p \leq 0,001$, signifikant unterschiedlich zur Kontrolle.

Weitere Untersuchungen möglicher toxischer Wirkungen erfolgten durch Kontrolle verschiedener Stressmarker mittels PCR. Die hierbei verwendeten Marker TNF α , IL-12 und TLR9 sind Bestandteil des angeborenen Immunsystems und werden bei zellulärem Stress auch in neuronalem Gewebe hochreguliert. Außerdem wurde das Verhältnis von Bax/Bcl2 verwendet. Bax und Bcl2 haben antagonistische Wirkungen auf die Caspaseaktivität der Zellen und ihre Ratio stellt einen guten Marker für apoptotische Aktivität dar. Als Positivkontrolle wurde der Bakterienwandbestandteil LPS verwendet.

Während für RGC-5 Zellen keine Veränderung im Bax/Bcl-2-Verhältnis gezeigt werden konnte (*Abbildung 15 a*), steigerte sich die Ratio von Bax/Bcl-2 in den 661W-Zellen nach Inkubation mit PEI-*Beads* auf das 30-fache ($p \leq 0,001$) (*Abbildung 15 b*) und die der ARPE19-Zellen auf das 16-fache ($p \leq 0,001$) (*Abbildung 15 c*) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen.

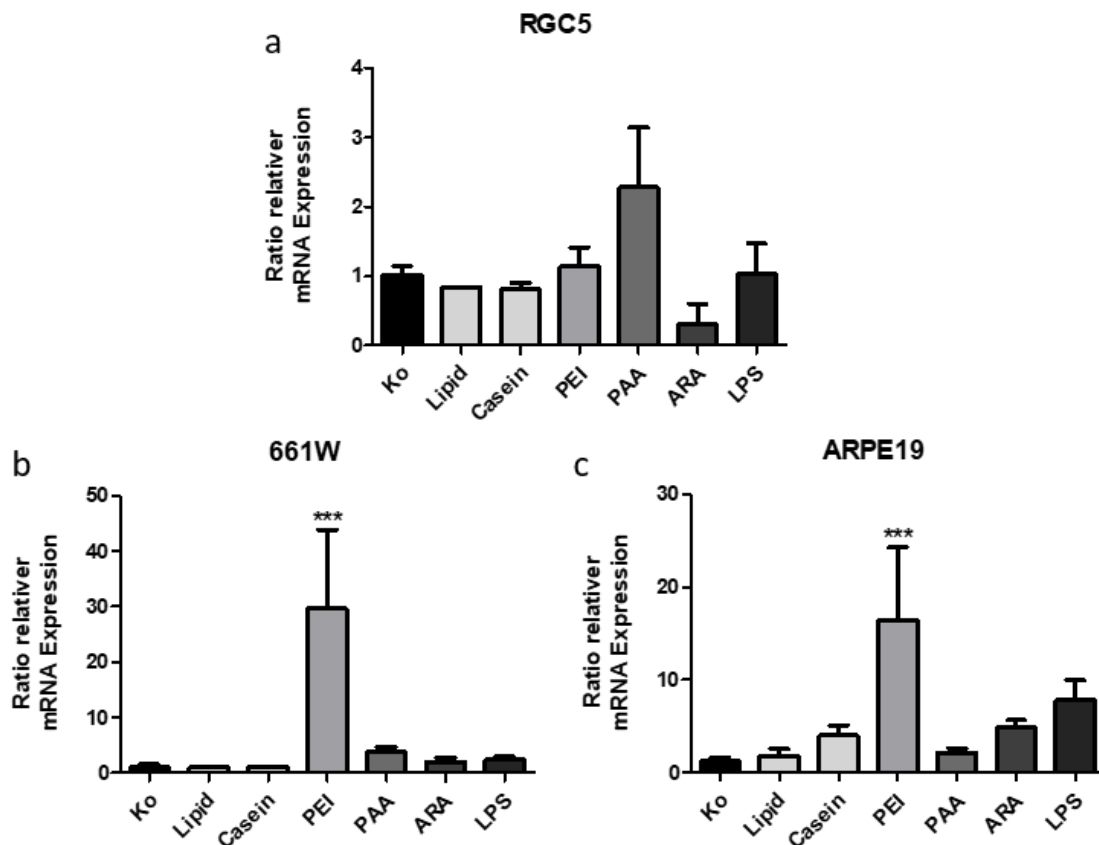


Abbildung 15: Bax/Bcl2 Ratio in den Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Beads

RGC5 Zellen zeigten nach Behandlung mit den *Beads* kein signifikant gesteigertes Bax/Bcl2 Verhältnis gegenüber der Kontrolle (a). In 661W Zellen stieg das Bax/Bcl2 Verhältnis nach 24-stündiger Inkubation mit PEI-*Beads* auf das 30-fache der Kontrolle (b). Eine 16-fache Anstieg zeigte sich in ARPE19 Zellen nach Inkubation mit PEI-*Beads* (c). $n=4$; *One-way*-ANOVA Test; Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. *** = $p \leq 0,001$, signifikant unterschiedlich zur Kontrolle.

Auch die Expression der TNF α mRNA in den RGC-5 Zellen wies nach Behandlung keine Veränderung im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle auf (*Abbildung 16 a*). Die Inkubation der 661W-Zellen mit den unterschiedlichen *Beads*, sowie LPS führte zu einer signifikanten verminderten Expression der TNF α mRNA auf jeweils weniger als das 0,04-fache ($p \leq 0,001$) im Vergleich zu der Kontrolle (*Abbildung 16 b*). Auch in den ARPE19-Zellen wurde eine reduzierte Expression der TNF α mRNA nach Behandlung mit Lipid-*Beads* (5,5-fach, $p \leq 0,05$), Casein-*Beads* (12,5-fach, $p \leq 0,01$), ARA-*Beads* (10-fach, $p \leq 0,05$) und LPS (5,3-fach, $p \leq 0,01$) ermittelt (*Abbildung 16 c*).

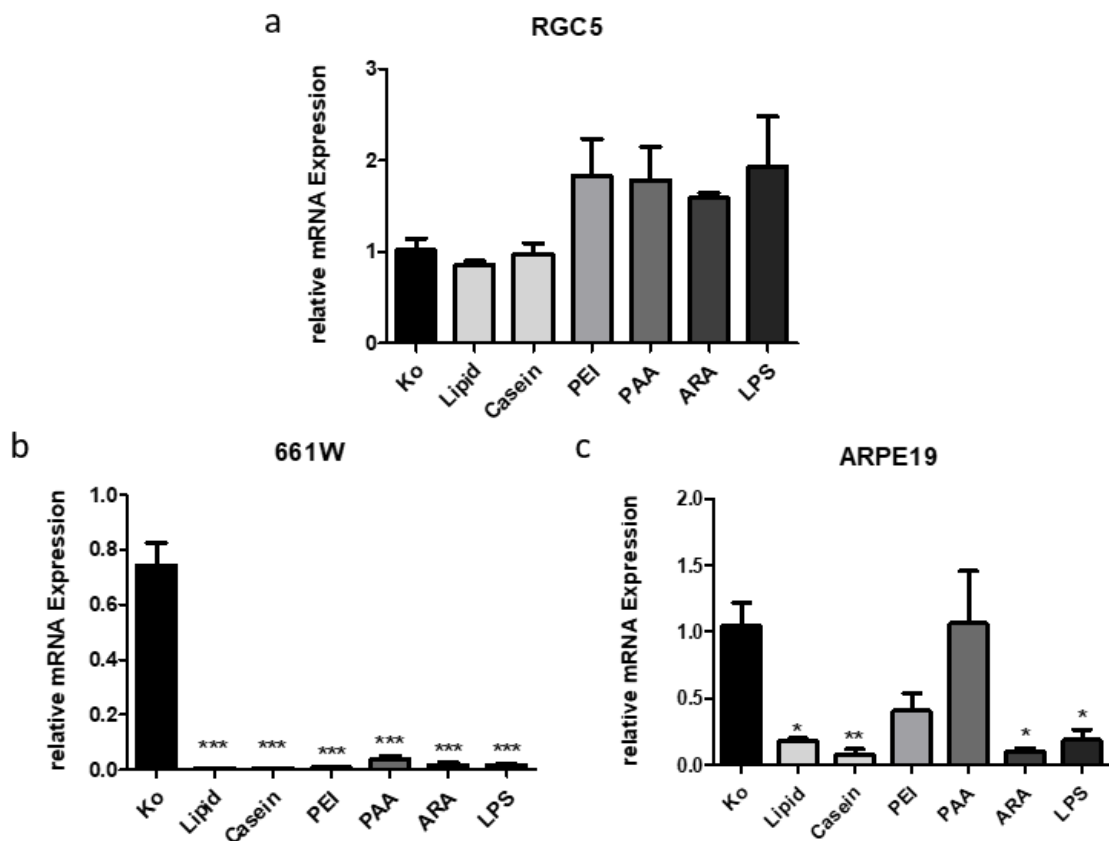


Abbildung 16: TNF α -mRNA Expression in den Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Beads

Es konnte kein signifikanter Einfluss der *Beads* auf die TNF α -mRNA Expression der RGC5 Zellen gefunden werden (a). Sowohl alle getesteten *Beads*, als auch LPS führten zu einem signifikantem ($p \leq 0,001$), 25-fachen Abfall der TNF α -mRNA Expression in 661W Zellen im Vergleich zu der Kontrolle (b). In ARPE19-Zellen zeigte sich eine Reduktion der TNF α -mRNA Expression nach Behandlung mit Lipid-*Beads* (5,5-fach), Casein-*Beads* (12,5-fach), ARA-*Beads* (10-fach) und LPS (5,3-fach) (c). $n=4$; One-way-ANOVA Test; Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$ *** = $p \leq 0,001$, signifikant unterschiedlich zur Kontrolle.

Die IL12-Expression wies keine Veränderung bei RGC-5-Zellen auf (Abbildung 17 a). 661W-Zellen zeigten eine signifikant ($p \leq 0,001$) geringere IL12 mRNA Expression auf die Behandlung mit den *Beads* und LPS (alle $>4,5$ -fache Reduktion im Vergleich zu der Kontrolle) (Abbildung 17 b). Auch konnte in den ARPE19-Zellen eine reduzierte IL12 mRNA Expressionen nach Behandlung mit Lipid-*Beads* (3,3-fach, $p \leq 0,01$), Casein-, sowie PEI- und ARA-*Beads* (alle 10-fach, $p \leq 0,001$), LPS (3,3-fach, $p \leq 0,001$) und PAA-*Beads* (2,5-fache Reduktion im Vergleich zu der Kontrolle, $p \leq 0,01$) ermittelt werden (Abbildung 17 c).

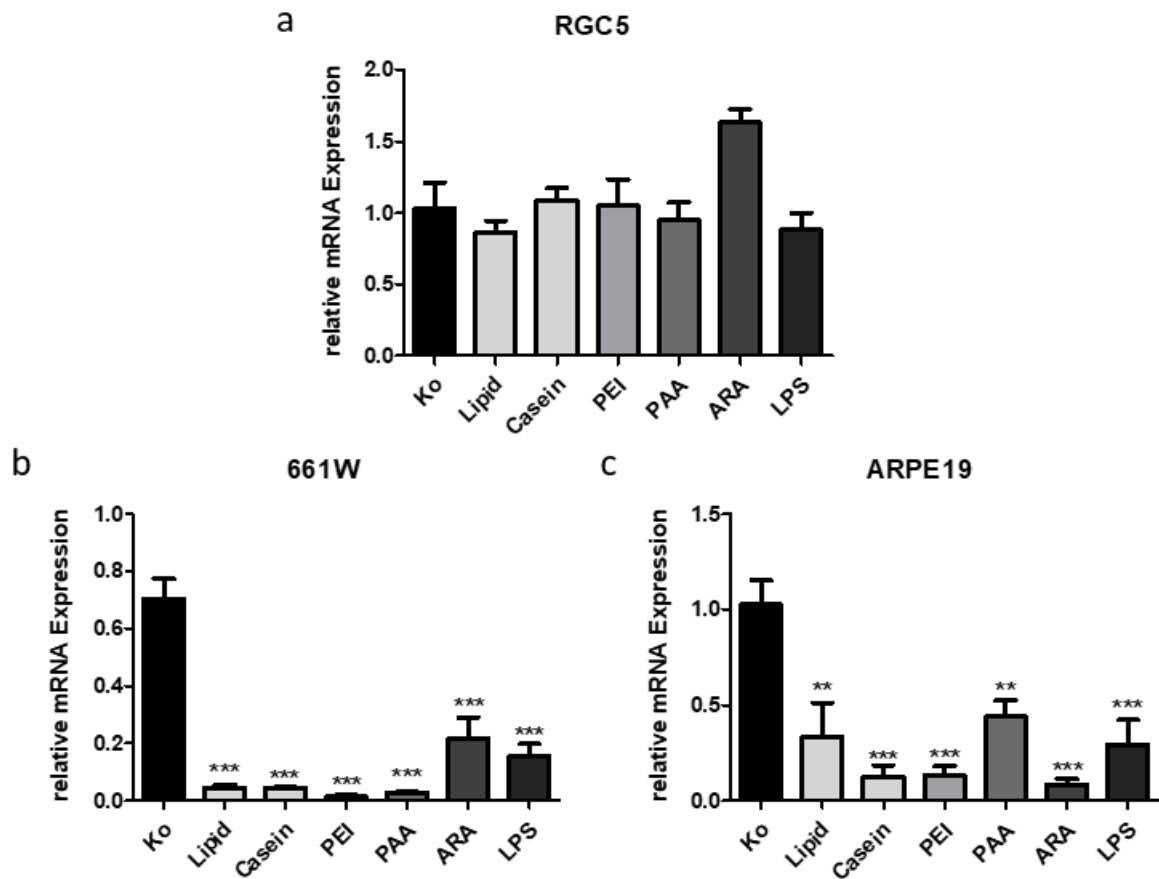


Abbildung 17: IL12 mRNA Expression in den Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Beads

Die Expression von IL12 mRNA in RGC5-Zellen wurde weder durch die Inkubation mit den *Beads*, noch durch LPS beeinflusst (a). Sowohl die Behandlung mit den *Beads*, als auch mit LPS resultierte in einer signifikanten ($p \leq 0,05$) Reduktion der IL12-Expression in 661W- und ARPE19 Zellen (b,c). $n=4$; One-way-ANOVA Test; Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$, signifikant unterschiedlich zur Kontrolle.

Die TLR9 mRNA Expression der RGC5-Zellen stieg unter Behandlung mit PAA-*Beads* auf das 3,6-fache ($p \leq 0,01$) und durch die ARA-*Beads* ($p \leq 0,05$) Inkubation auf das 3,5-fache der Kontrolle an (Abbildung 18). Untersuchungen an RGC-5 und ARPE19 Zellen nicht gezeigt.

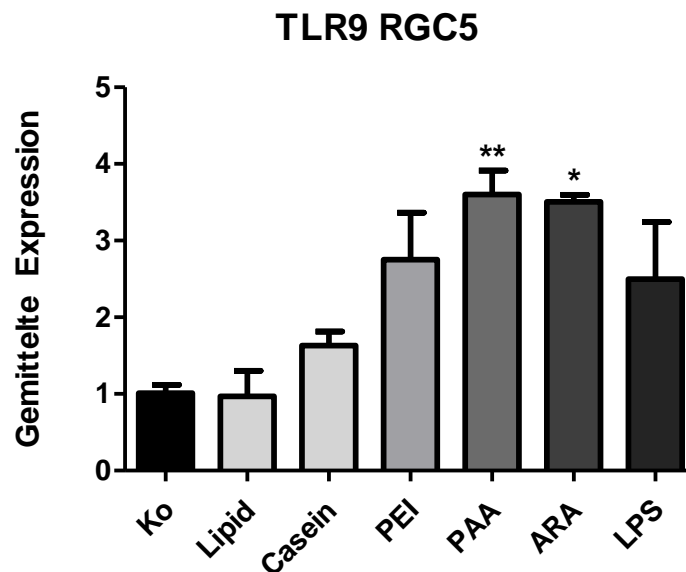


Abbildung 18: TLR9-mRNA Expression von RGC5 mittels PCR nach Behandlung mit den Beads

RGC5-Zellen reagierten mit einer gesteigerten Expression von TLR9 auf die Inkubation mit PAA- und ARA-Beads. $n=4$; One-way-ANOVA Test; Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$, signifikant unterschiedlich zur Kontrolle.

Zum Abschluss folgte die Untersuchung möglicher toxischer Wirkungen auf Proteinebene mittels Western Blot. HSP70, welches als Chaperon unter anderem bei Zellschädigungen hochreguliert wird um entstandene Fehlfaltungen zu korrigieren, diente hier als Stressmarker. Zusätzlich wurde Caspase 3 und ihre aktivierte Form als gespaltene Caspase 3, welche einen wichtigen Bestandteil bei der Regulation der Apoptose spielt als Marker für zellulären Stress herangezogen. Als Referenzprotein wurde β -Actin genutzt.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl RGC-5- (2,4-fach, $p \leq 0,001$), als auch 661W-Zellen (2,2-fach, $p \leq 0,01$) auf die Inkubation mit Staurosporin mit einer Steigerung der relativen Expression von HSP70 auf über das Doppelte der Kontrollen reagierten. Nach Exposition zu Lipid-Beads konnte ein Anstieg der Proteinexpression in RGC-5-Zellen auf das 1,5-fache ($p \leq 0,01$) verzeichnet werden. Casein- und ARA-Beads Exposition führten jeweils ungefähr zur Reduktion bis auf die Hälfte der ($p \leq 0,05$) der HSP70 Expression in RGC-5-Zellen (Abbildung 19).

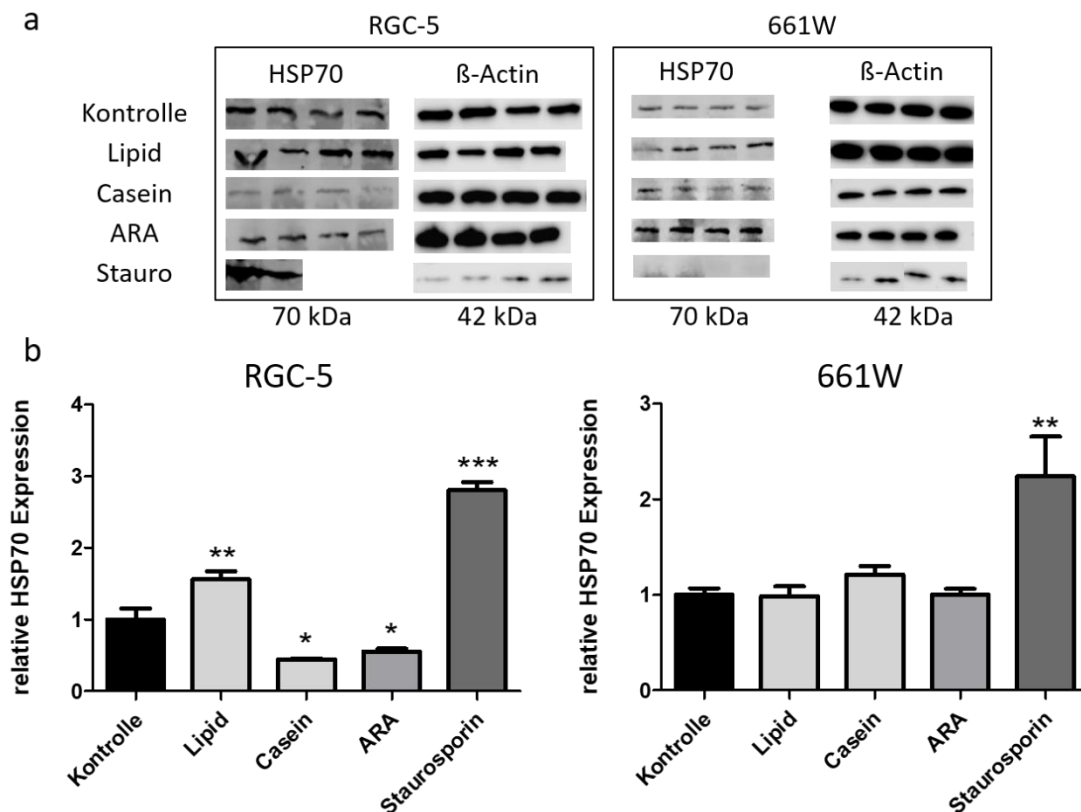


Abbildung 19: HSP70 Expression in RGC-5 und 661W nach Behandlung mit verschiedenen Beads

a: Nachweis HSP70 und β -Actin Expression in RGC-5 und 661W Zellen durch Immunoblot. Proteine wurden mit spezifischen Primärantikörpern und fluoreszenzgekoppelte Sekundärantikörpern nachgewiesen.

b: Beide Zelllinien reagierten mit einer deutlich gesteigerten Expression von HSP70 auf die Staurosporin Exposition. Auch die Inkubation mit Lipid-Beads führte zu einer erhöhten Expression in RC5 Zellen, während unter Inkubation mit Casein- und ARA-Beads die HSP70 Proteinexpression absank.

c: 661W-Zellen zeigten keine Veränderung der HSP70 Expression nach der Behandlung mit den Beads. $n=4$; One-way-ANOVA Test; Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$, signifikant unterschiedlich zur Kontrolle.

Während die Behandlung mit Lipid-Beads in RGC-5-Zellen einen Anstieg der Caspase 3 Expression auf das 1,5-fache ($p \leq 0,01$) verursachte sank diese nach Inkubation mit Casein-Beads um die Hälfte ($p \leq 0,05$) im Vergleich zur Kontrolle. Für ARA-Beads und Staurosporin konnte kein Effekt nachgewiesen werden (Abbildung 20 a). 661W-Zellen reagierten sowohl auf Casein-, als auch auf ARA-Beads mit einer Erhöhung der relativen Caspase 3 Expression auf das Doppelte

($p \leq 0,01$) der Kontrollen. Für die Inkubation mit Lipid-*Beads* oder Staurosporin konnte keine Veränderung der Caspase 3 Expression gezeigt werden (Abbildung 20 b).

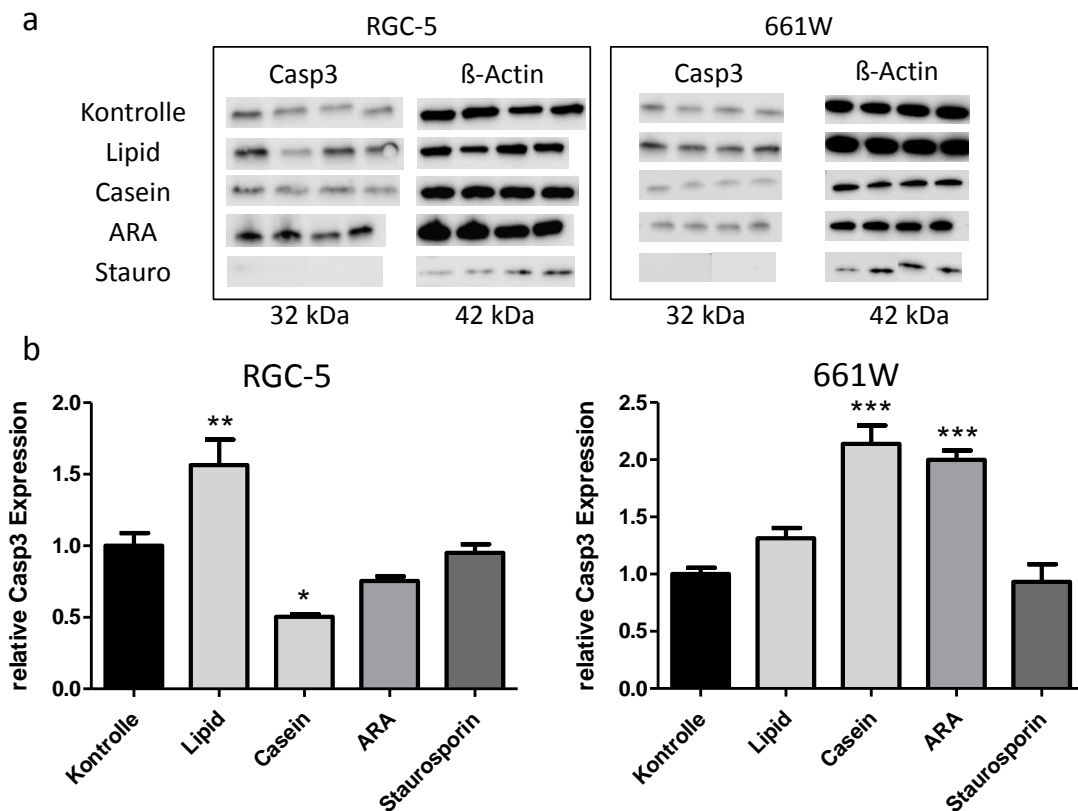


Abbildung 20: Caspase 3 Expression in RGC-5 und 661W nach Behandlung mit verschiedenen Beads

a: Nachweis Caspase 3 und β -Actin Expression in RGC-5 und 661W Zellen durch Immunoblot. Proteine wurden mit spezifischen Primärantikörpern und fluoreszenzgekoppelte Sekundärantikörpern nachgewiesen.

b: Caspase 3 Expression in RGC-5 ist erhöht nach Lipid- und reduziert nach Casein-*Beads* Exposition.

c: 661W Zellen zeigen eine gesteigerte Expression der Caspase 3 nach Inkubation mit Casein- und ARA-*Beads*. Für die übrigen *Beads* und Staurosporin konnte kein Effekt gezeigt werden. $n=4$; One-way-ANOVA Test; Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$, signifikant unterschiedlich zur Kontrolle.

Die Untersuchung der Expression der gespaltenen Caspase 3 in 661W-Zellen zeigte einen deutlichen Anstieg auf das 7,7-fache ($p \leq 0,001$) der Kontrollen nach Staurosporin Exposition. Die Inkubation mit Casein-, beziehungsweise ARA-

Beads resultierte in einer Erhöhung auf das 3-fache ($p \leq 0,001$), beziehungsweise 2,4-fache ($p \leq 0,01$) der Kontrollen.

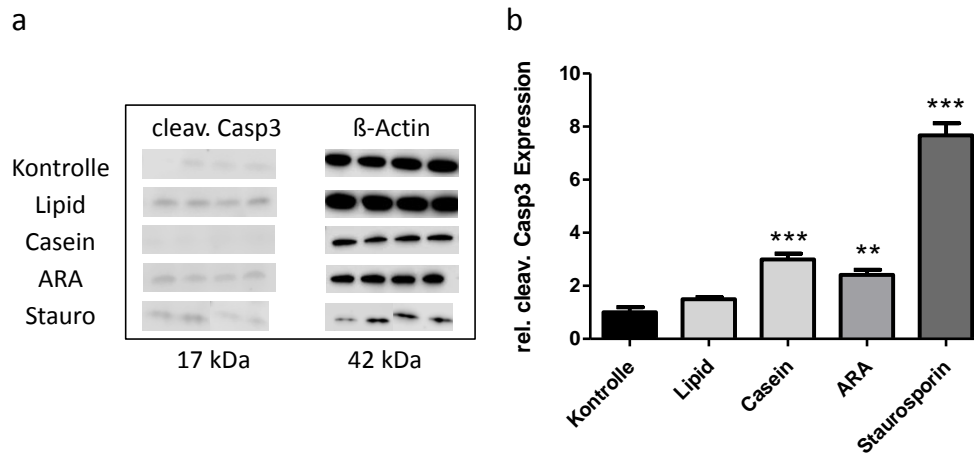


Abbildung 21: cleav. Caspase 3 Expression in 661W nach Behandlung mit verschiedenen Beads

a: Nachweis der gespaltenen Caspase 3 und β -Actin Expression in 661W Zellen durch Immunoblot. Proteine wurden mit spezifischen Primärantikörpern und fluoreszenzgekoppelte Sekundärantikörpern nachgewiesen.

b: Relative Expression der gespaltenen Caspase 3 in 661W Zellen stieg nach Inkubation mit Casein- und ARA-*Beads*. Der deutlichste Anstieg (7,7-fache der Kontrolle, $p \leq 0,001$) wurde nach Exposition zu Staurosporin verzeichnet. $n=4$; *One-way-ANOVA* Test; Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$, signifikant unterschiedlich zur Kontrolle.

4.2 *In vivo*-Versuche

Nach Abschluss der Vorversuche, Optimierung des Isolationsverfahrens, Selektion der *Beads* und Ausschluss toxischer Wirkungen *in vitro* konnte mit den Tierversuchen begonnen werden. Im Anschluss an den operativen Eingriff wurde bei den täglichen postoperativen Kontrollen der Wundverhältnisse und des Allgemeinzustands der Versuchstiere beim Großteil der Tiere ein regelrechter Verlauf festgestellt. Ratte 4 wurde am ersten Tag nach der Operation tot aufgefunden. Gemäß dem Versuchsprotokoll wurde anschließend das Gehirn entnommen und untersucht. Hierbei zeigte sich eine ausgeprägte, intrazerebrale Blutung, welche als wahrscheinlichste Todesursache anzunehmen ist. Außerdem zeigte Ratte 13 einen so drastisch geminderten Allgemeinzustand, dass eine vorzeitige Euthanasierung durchgeführt wurde (*Tabelle 8*). Post-mortem konnte keine Ursache des abfallenden Allgemeinzustands ermittelt werden. Die übrigen Versuchstiere (n=18) konnten das Protokoll wie geplant durchlaufen.

Versuchstier	Bead-Injektion	Allgemeinzustand	Euthanasiezeitpunkt
Ratte 1	Lipid Beads 1:100	schlechte Verfassung	7 Tage post-OP
Ratte 2	Lipid Beads 1:1	schlechte Verfassung	
Ratte 3	ARA Beads 1:100	gute Verfassung	
Ratte 4	ARA Beads 1:1	verstarb, Hirnblutung Gehirn wurde entnommen	1. Tag post-OP verstorben
Ratte 5	Lipid Beads 1:10	gute Verfassung	2 Wochen
Ratte 6	ARA Beads 1:10	gute Verfassung	7 Tage post-op
Ratte 7	Lipid Beads 1:10	gute Verfassung	
Ratte 8	Casein Beads 1:3	gute Verfassung	
Ratte 9	Nur DNA 100µM	gute Verfassung	
Ratte 10	Lipid Beads 1:3	gute Verfassung	
Ratte 11	Casein Beads 1:10	gute Verfassung	
Ratte 12	Lipid Beads 1:10	gute Verfassung	
Ratte 13	DNA 100µM	sehr schlecht, euthanasiert	1. Tag post-OP
Ratte 14	PAA Beads 1:1	schlechte Verfassung	7 Tage post-op
Ratte 15	Casein Beads 1:1	gute Verfassung	
Ratte 16	Lipid Beads 1:1	gute Verfassung	
Ratte 17	Nur DNA 100µM	mittlere Verfassung	
Ratte 18	PAA Beads 1:1	gute Verfassung	
Ratte 19	Casein Beads 1:1	gute Verfassung	
Ratte 20	Lipid Beads 1:1	gute Verfassung	

Table 8: Verlauf der Tierversuche

Ratte 4 verstarb vorzeitig. Ratte 13 wurde aufgrund ihres sehr schlechten Allgemeinzustands nach einem Tag vorzeitig euthanasiert. Die übrigen Tiere durchliefen den Versuchsaufbau wie geplant und wurden nach 7 Tagen euthanasiert. Die Wundverhältnisse zeigten sich stets reizlos und trocken.

Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen der Gewebeschnitte konnten Lipid-*Beads* an der Einstichstelle im *Colliculus superior*, in der Sehbahn, und im Sehnerv bis hin zur Papille nachweisen (*Abbildung 22*). Es konnte allerdings kein Nachweis von *Beads* in der Retina erfolgen. Durchgeführte Isolierungsversuche aus den entnommenen Retinas führten zu keiner erfolgreichen Aufreinigung, da keine *Beads* die Retina erreichten (Daten nicht gezeigt).

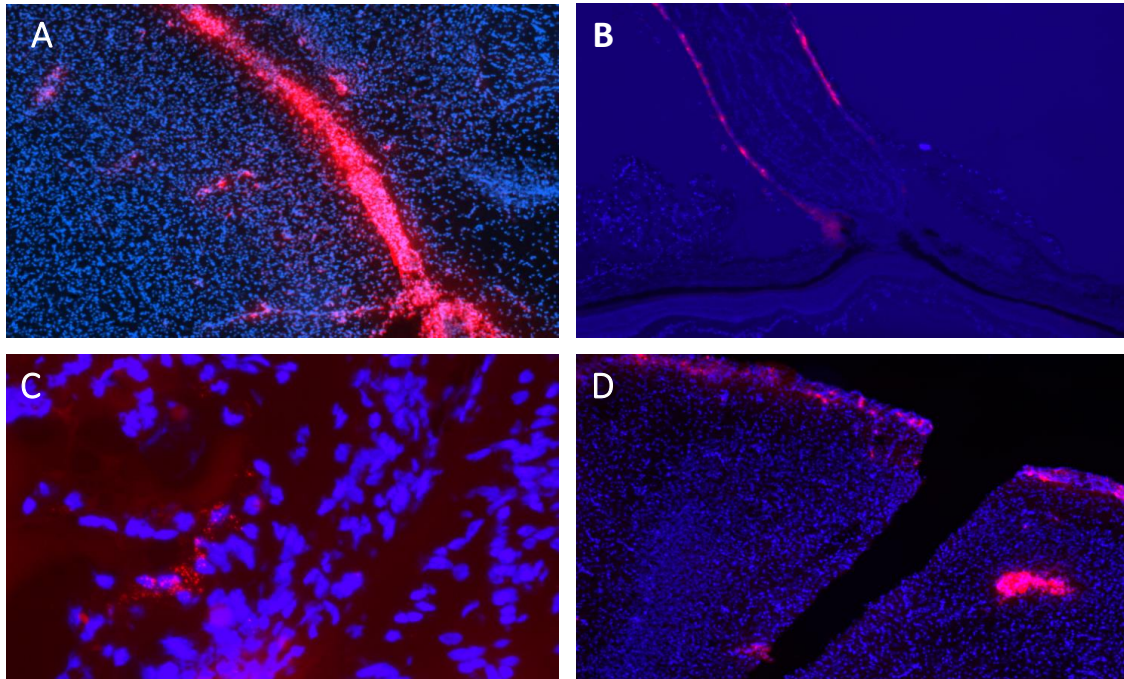


Abbildung 22: Beads in vivo

Nachweis der rot fluoreszierenden Lipid-*Beads* im *Tractus opticus* (a), der Papille (b), des Sehnervs, sowie an der Einstichstelle am *Colliculus superior* (c,d). Die Bilder entstanden jeweils 7 Tage nach Injektion. Vergrößerung 50x-200x.

5. Diskussion

5.1 Zellisolation unter Verwendung magnetischer *Beads*

Magnetische *Beads* finden in vielen verschiedenen Feldern der Forschung Anwendung. Neben der Verwendung als MRT-Kontrastmittel sowie Versuchen zum gezielten Gen- und Medikamententransport, stellt die Isolation über *Beads* eines dieser Felder dar. Allerdings erfolgt das Markieren der Zellen in den meisten Fällen nicht, wie hier vorgesehen, durch Internalisierung der *Beads*, sondern durch spezifisches Anheften über Antikörper [59]. Die Endozytose von Nanopartikeln ist dabei häufig ein ungewolltes Phänomen [61, 71, 72], welches jedoch für den hier beschriebenen Ansatz eine essentielle Grundlage darstellt. Die Interaktionen zwischen Zellen und Nanopartikeln wie den hier zu untersuchenden *Beads* sind äußerst komplex und hängen neben der Größe, Ladung, Oberflächenbeschaffenheit auch in hohem Maße von der untersuchten Zellpopulation ab. Hier muss nochmals betont werden, dass alle Untersuchungen mangels einer funktionierenden RGZ-Zelllinie an den umstrittenen RGC-5, sowie den verwandten 661W und ARPE19 Zellen durchgeführt wurden. Es ist davon auszugehen, dass RGZ sich in ihrem Verhalten in vielen Aspekten den untersuchten Zellen ähneln, mögliche Unterschiede bleiben jedoch zu beachten. Mittels Elektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, dass Lipid-*Beads* binnen 18h in das Zytoplasma von RGC-5-Zellen aufgenommen wurden (*Abbildung 9*).

Die Isolation über die magnetischen Säulen des *Miltenyi OctoMACS™* Separator (Miltenyi Biotec, Deutschland) zeichnete sich als die verlässlichste und effizienteste Isolationsmethode aus. Außerdem wurde dargelegt, dass Oligo(dT)-*Beads* aufgrund des geringen Ertrags für eine solche Isolation ungeeignet sind (*Abbildung 10*). Als ideale Konzentration konnte 10.000 *Beads*/Zelle ermittelt werden. Höhere Konzentrationen führen vermutlich zu verstärkter Aggregation der *Beads*, welche sowohl die Endozytose, als auch eine verlässliche Zellseparation erschwert. Bei niedrigerer Konzentration werden nicht ausreichend *Beads* internalisiert und somit zu wenige Zellen markiert, um eine ideale Aufreinigung zu gewährleisten.

5.2 Toxikologische Untersuchungen der *Beads*

Inwieweit Nanopartikel, wie die hier verwendeten magnetischen *Beads*, toxisch wirken hängt von vielen Faktoren ab und lässt sich im Einzelfall nicht vorhersagen. Im Allgemeinen lässt sich feststellen, dass *Beads* nach Endozytose in Zellen akkumulieren und dort mit dem Zellstoffwechsel interagieren können [59]. Es lässt sich allerdings nicht generell sagen, ob diese Interaktionen schädlich [62] oder ohne negative Konsequenzen sind [61, 73]. Es konnte auch beobachtet werden, dass *Beads* die nicht durch Endozytose in Zellen aufgenommen werden im Medium Konglomerate bilden und auf die Oberfläche sedimentieren. Auch diese Umstände können beispielsweise Einfluss auf Stoffaustausch der Zellen nehmen. Die teilweise gegensätzlichen Erkenntnisse werden unter anderem auf die verschiedenen verwendeten Zellarten, die große Diskrepanz der verwendeten Konzentrationen und die große Spanne an verwendeten *Beads* zurückgeführt. Bevor die *Beads in vivo* zur Anwendung kommen konnten waren deshalb zunächst umfangreiche toxikologische Untersuchungen *in vitro* nötig, um mögliche schädliche Wirkungen auf die Zellen auszuschließen. Zunächst konnte phasenmikroskopisch gezeigt werden, dass RGC-5-Zellen keine nachhaltige Schädigung durch die Inkubation mit den *Beads* oder den Isolationsvorgang erleiden (*Abbildung 11*).

Mittels MTS-, Caspase 3/7-Assay und Kristallviolett-Färbung erfolgte die Untersuchung der Viabilität, der Caspaseaktivität sowie der Zellzahl. Die toxikologischen Untersuchungen zeigten toxische Wirkungen der PEI-*Beads* auf RGC5- und ARPE19-Zellen. So reagierten die RGC-5-Zellen mit einer gesteigerten Caspaseaktivität (*Abbildung 12*) nach Behandlung mit PEI-*Beads* der Konzentration 1:50, während die Viabilität der ARPE19-Zellen bereits bei der geringeren Konzentration von 1:500 signifikant gesunken war (*Abbildung 14*). In der Kristallviolett-Färbung wiesen auch ARA-*Beads* beider Konzentrationen toxische Eigenschaften auf RGC-5-Zellen auf (*Abbildung 12*). Für die anderen *Beads* konnten keine toxischen Wirkungen gezeigt werden. Mehrere potentielle Einflussfaktoren müssen bei der Interpretation dieser Ergebnisse beachtet werden.

Nanopartikel wie die hier verwendeten magnetischen *Beads* stehen aufgrund der Vielzahl ihrer Anwendungsgebiete seit Jahren im Fokus der Forschung. Allerdings bringen sie durch ihre besondere Struktur und die dadurch entstehenden toxischer Wirkungen eine hohe Anforderung an toxikologische Untersuchungen mit sich. Diese Aufgabe wird dadurch erschwert, dass die *Beads* häufig Interaktionen mit den verwendeten Tests und somit die Erhebung verlässlicher Ergebnisse erschweren. Die Auswahl der Tests muss folglich wohl bedacht und gegebenenfalls angepasst werden.

Die physikalischen Eigenschaften der *Beads* führten zu einigen Problemen bei der Durchführung der geplanten Experimente. Zum einen besitzen die *Beads* eine starke bräunliche Farbe, welche auch bei höheren Verdünnungen bereits mit dem bloßen Auge noch gut zu erkennen ist. Diese Eigenfarbe stellt besonders bei Untersuchungen, welche, wie auch der MTS Assay, auf Messungen der Absorption basieren, eine Fehlerquelle dar. Um diese Fehlerquelle so gering wie möglich zu halten, wurde der Überstand der Proben abpipettiert und nur dieser der Messung zugeführt. Die meisten *Beads* hatten sich im Laufe der Inkubationszeit am Boden der Wells abgesetzt und ihre Interaktion konnten auf diese Weise minimiert werden. Allerdings ist nicht ausgeschlossen, dass weiterhin gelöste *Beads* im Überstand enthalten waren und Einfluss auf die Messungen der Absorption genommen haben. Dies würde sich durch falsch hohe Werte in der Messung der Vitalität mittels MTS Assay zeigen und stellt eine mögliche Erklärung für die gesteigerte Vitalität der RGC-5-Zellen nach Behandlung mit Casein- bzw. ARA-*Beads* dar (*Abbildung 12*).

Ein weiterer Versuch diese Interaktion zu minimieren war die Durchführung der Kristallviolett-Färbung. Zum einen wird hier die Absorption in einem weiter entfernten Farbspektrum gemessen, zum anderen bietet das Verfahren die Möglichkeit störende *Beads* zu entfernen. Die enthaltenen Wachschrötte, welche dazu vorgesehen sind freien Farbstoff, sowie nicht adhärenente Zellen mitsamt enthaltenem Farbstoff zu eliminieren, konnten auch die Anzahl an *Beads* reduzieren. Allerdings sind hiervon nur die *Beads* betroffen, welche frei im Medium gelöst oder von nicht adhärenenten Zellen aufgenommen waren. Die

Beads welche von den vitalen Zellen aufgenommen worden waren, wurden von den Waschschrinen nicht entfernt und sind somit ein möglicher Grund für erhöhte Zellzahlen in der Kristallviolett-Färbung, wie sie beispielsweise in den Versuchen mit ARPE19-Zellen zu beobachten waren (*Abbildung 14*). Möglicherweise spielt die Kombination an besonders dunkler Braunfärbung der Konstrukte und der gezeigten hervorragenden Aufnahme der Casein- und PEI-*Beads* in ARPE19-Zellen (*Abbildung 14*) eine Rolle in der Erklärung der deutlich gesteigerten Zellzahl.

Einen weiteren Versuch die Interaktion durch Absorption der *Beads* zu umgehen stellte die Verwendung des Caspase 3/7-Assays dar. Dieses Verfahren macht sich die Messung der Lumineszenz zunutze. Auch hier kann eine Interaktion durch die *Beads* jedoch nicht ausgeschlossen werden. Es ist möglich, dass die *Beads* durch ihre dunkle Farbe einen Teil der Lumineszenz absorbieren. Um diesen Einfluss möglichst gering zu halten, wurden die Proben zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und anschließend der Messung zugeführt.

Interaktionen mit Verfahren welche auf Absorption beruhen sind trotz durchgeführter Sicherheitsmaßnahmen nicht ausgeschlossen und allgemein bekannt [74, 75]. Auch das MTS Assay kann durch die große Oberfläche und die chemischen Eigenschaften der *Beads* verfälscht werden [59, 76]. Durch die Endozytose der *Beads* kann es zu Steigerungen der mitochondrialen Aktivität kommen, welche zu einer erhöhten gemessenen Viabilität führt [74]. Einer der wichtigsten Mechanismen, über die *Beads* toxische Wirkungen entfalten ist die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) [62]. Eine Überproduktion von ROS wurde sowohl mit DNA Brüchen, Veränderungen der Transkription als auch der Erzeugung von Proteinradikalen, der Schädigung von Zellmembran und Apoptoseinduktion in Verbindung gebracht [77, 78]. ROS entstehen hierbei sowohl direkt an der Oberfläche der *Beads* durch Alteration der mitochondrialen Funktion, als auch durch Induktion von Signalkaskaden [62]. Diese Veränderungen der mitochondrialen Enzymaktivität spiegeln eine weitere Möglichkeit der Interaktion mit dem MTS Assay wieder [59].

Beads neigen wie alle Nanopartikel dazu, an ihrer großen Oberfläche Interaktionen mit dem umgebenden Medium einzugehen. So bildet sich beispielsweise eine Proteinhülle, (sog. Corona) um Nanopartikel aus. Die dazu nötigen Proteine werden dem Medium entzogen, stehen den Zellen nicht mehr zur Verfügung und können so zu suboptimalem Wachstum und verminderter Viabilität führen. Dieser Einfluss ist allerdings nicht als eigentliche Toxizität der *Beads* zu sehen und wäre durch eine Anpassung der Protokolle zu verhindern [79]. Sie empfehlen die Suspensionen der Nanopartikel 24 h vor dem Einsatz in der Zellkultur zu erstellen und anschließend das Medium, welches nun möglicherweise signifikant in seiner Zusammensetzung verändert wurde, durch frisches zu ersetzen. Diese Anpassung würde sich auch auf die hier verwendeten Protokolle anwenden lassen und könnte helfen noch verlässlichere Resultate zu erzielen.

Die Auswahl der richtigen toxikologischen Tests für die Untersuchung neuer Nanopartikel ist schwierig und keine Generallösung bekannt. Einige generelle Aussagen lassen sich jedoch treffen. Wie hier durchgeführt sollten absorptions- oder fluoreszenzbasierte Tests nicht alleinstehend, sondern durch mindestens einen weiteren Test abgesichert werden [76]. Eine Möglichkeit dies zu Umgehen wären Untersuchungen mittels Zellzählung.

Als weitere Untersuchung auf mögliche schädliche Eigenschaften der *Beads* wurde ihr Einfluss auf die Expression verschiedener Stressmarker mittels Real-time PCR überprüft.

Die untersuchten Marker $\text{TNF}\alpha$, IL-12 und TLR9 stellen Bestandteile des angeborenen Immunsystems dar und werden als solche bei möglichen oder bestehenden Zellschäden hochreguliert. Die genauen Kaskaden und Zusammenhänge sind hierbei sehr komplex und noch nicht vollständig erfasst. Sowohl $\text{TNF}\alpha$, als auch IL-12 werden durch bakterielle Bestandteile, wie beispielsweise den Wandbestandteil LPS, aber auch durch Stress hochreguliert [80, 81]. Anders als lange Zeit angenommen, wird $\text{TNF}\alpha$ nicht nur von Zellen des angeborenen Immunsystems ausgeschüttet, sondern in einer Vielzahl von Geweben, wie beispielsweise auch murinen Neuronen produziert [82].

In unseren Experimenten konnten wir keinen Anstieg der TNF α mRNA Expression in den Zellen nach Inkubation mit den verschiedenen *Beads* oder LPS zeigen (*Abbildung 16*).

In 661W- und ARPE19-Zellen war sogar eine Reduktion im Vergleich zu den Kontrollen zu beobachten. Eine mögliche Erklärung dafür liegt in einer zu geringen TNF α Expression in diesen Zellen. Denkbar ist auch, dass der Zeitraum falsch gewählt wurde und deshalb keine Hochregulation beobachtet werden konnte.

Außerdem wurde die mRNA Konzentration von TLR9 untersucht. TLR9 ist ein weiterer Bestandteil der angeborenen Immunabwehr und gehört zur Familie der *toll-like-receptors* welche verschiedene schädliche Liganden erkennen und über Signalkaskaden schließlich NF κ B aktivieren und somit die Expression proinflammatorischer Gene induzieren [83]. TLR9 wurde hier als Marker einer möglichen Reaktion des angeborenen Immunsystems auf die eingebrachten *Beads* verwendet. In unseren Versuchen in RGC-5-Zellen steigerte sich die TLR9 mRNA Expression insbesondere auch nach Inkubation mit PAA- und ARA-*Beads* (*Abbildung 18*). Glucuronsäure (ARA) findet sich *in vivo* auch in Form von Hyaluronsäure. Diese ist Bestandteil der Extrazellulärmatrix und in vielen Geweben vorhanden [84]. Kommt es nun zum Zerfall des Makromoleküls in Oligosacharide, im Folgenden auch fragmentierte Hyaluronsäure genannt, so führt dies zur Aktivierung der Signalkaskaden über TLR4 [85, 86].

Ein weiterer untersuchter Marker war das Verhältnis von Bax zu Bcl-2. Beide gehören zur Bcl2-Genfamilie, welche eine wichtige Rolle bei der Regulation der Apoptose spielen. Bax und Bcl2 nehmen hierbei antagonistische Stellungen ein. Während eine erhöhte Bax-Expression mit einer gesteigerten Caspaseaktivität und Apoptoseinduktion einhergeht, wirkt Bcl-2 antiapoptotisch. Somit stellt insbesondere das Verhältnis von Bax zu Bcl-2 einen guten Marker für die apoptotische Aktivität dar [87-89].

In den Versuchen zeigte sich in 661W- bzw. ARPE19-Zellen nach der Behandlung mit PEI-*Beads* ein 30- bzw 16-facher Anstieg der Bax/Bcl-2 Ratio im

Vergleich zur Kontrolle (*Abbildung 15*). Dies ist, neben der oben gezeigten verminderten Zellviabilität in ARPE19 Zellen und der gestiegenen Caspaseaktivität in RGC-5 als weiterer Nachweis der Toxizität der PEI-*Beads* zu werten.

In Zusammenschau mit dem Toxizitätsnachweis in den vorangegangenen toxikologischen Untersuchungen führte dies dazu, dass PEI-*Beads* nicht in den *in vivo*-Experimenten verwendet wurden.

PEI-*Beads* waren als mögliche Konstrukte in Betracht gekommen, da sich PEI als ein zuverlässiger non-viraler Vektor herauskristallisiert hat [90]. PEI besitzt durch seine stark positive Ladung die Möglichkeit DNA zu binden und zu stabilisieren. Außerdem konnte gezeigt werden, dass an PEI gekoppelte DNA eine deutlich gesteigerte Aufnahme in die Zellen und schließlich auch den Zellkern erfuhr [91]. Diese Eigenschaft sollte nun auch für die *Beads* genutzt werden, welche durch die Beschichtung mit PEI nicht nur leichter von den Zellen aufgenommen werden sollten. Obwohl PEI ein weitläufig verwendeter Vektor ist, so gibt es doch auch viele Berichte über toxische Wirkungen. Diese toxischen Wirkungen werden teilweise auf die Struktur und stark positive Ladung zurückgeführt [92, 93]. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass PEI sowohl apoptotische, als auch nekrotische Prozesse induziert und reaktive Sauerstoffspezies hierbei eine Rolle spielen [92, 94, 95]. Die toxische Wirkung, aber auch die Fähigkeit DNA zu kondensieren und die Transfektionsrate sind hierbei von der Molekülgröße, der kationischen Ladungsdichte und der Dosis abhängig [90, 96]. Eine Möglichkeit die Toxizität durch Verwendung kleinerer PEI Moleküle mit geringerer Ladung zu reduzieren ginge somit stets auch mit einer Reduktion der gewünschten Funktionen einher. Ein weiterer Ansatz die Toxizität zu vermindern stellt die Verwendung von acetylierten PEIs dar [92]. Hier konnte eine reduzierte Toxizität bei erhaltener Transfektions- und Kondensationsfähigkeit gezeigt werden. Somit wäre es möglich, dass auch die gezeigten toxischen Wirkungen der PEI-*Beads* auf diese Weise reduziert werden könnten.

Zusätzlich wurde mittels Western Blot die mögliche Toxizität auch auf Proteinebene untersucht. Hierbei wurde zunächst die Expression des in allen Organismen hochgradig konservierten *Heat Shock Protein 70* (HSP70) untersucht [97]. HSP70 fungiert in der Zelle als Chaperon, es erleichtert also die korrekte Faltung neu synthetisierter Proteine. Neben dieser konstanten Funktion spielt es auch bei Zellschädigungen durch Mechanismen, welche zu Proteinschäden wie Fehlfaltungen führen, eine protektive Rolle [97, 98]. Somit kann eine Hochregulation von HSP70 als zelluläre Antwort auf zytotoxische Stressoren gewertet werden.

Nach Inkubation mit *Lipid-Beads* zeigte sich ein Anstieg der relativen HSP70 Expression in RGC-5-Zellen auf das 1,5-fache der Kontrollen ($p \leq 0,01$). Verglichen mit der Reaktion auf Inkubation mit Staurosporin ist der hier gezeigte Stress für RGC-5-Zellen sicherlich als gering zu werten. Casein- und *ARA-Beads* führten zu einer halbierten Expression in RGC-5-Zellen (*Abbildung 19 a*). Somit konnte kein vermehrter Zellstress durch Casein- und *ARA-Beads* auf RGC-5-Zellen nachgewiesen werden.

Außerdem wurde Caspase 3 als weiterer Marker verwendet. Caspasen spielen eine Schlüsselrolle in der Regulation und Initiation der Apoptose. Caspasen liegen in der inaktiven Form im Zytosol der Zellen vor und werden durch Spaltung und Heterodimerisierung in ihre aktive Form überführt [99]. Die Apoptose kann hierbei sowohl über den extrinsischen, als auch über den intrinsischen Weg induziert werden (*Abbildung 23*). Während der extrinsische Weg über eine Ligandenbindung an einem *Death Receptor* und die Aktivierung der Initiatorcaspase Caspase 8 auf die gemeinsame Endstrecke mündet, liegt dem intrinsischen Weg eine Zellschädigung mit Austritt von Cytochrom C aus der Mitochondrienmembran und Aktivierung der Caspase 9 über Bildung eines Apoptosomes zugrunde. Beide Wege enden mit der Aktivierung der Effektorcaspasen. Neben den Caspasen 6 und 7 stellt auch die Caspase 3 eine solche Effektorcaspase und somit einen zentralen Punkt in der Einleitung der Apoptose dar [66, 100].

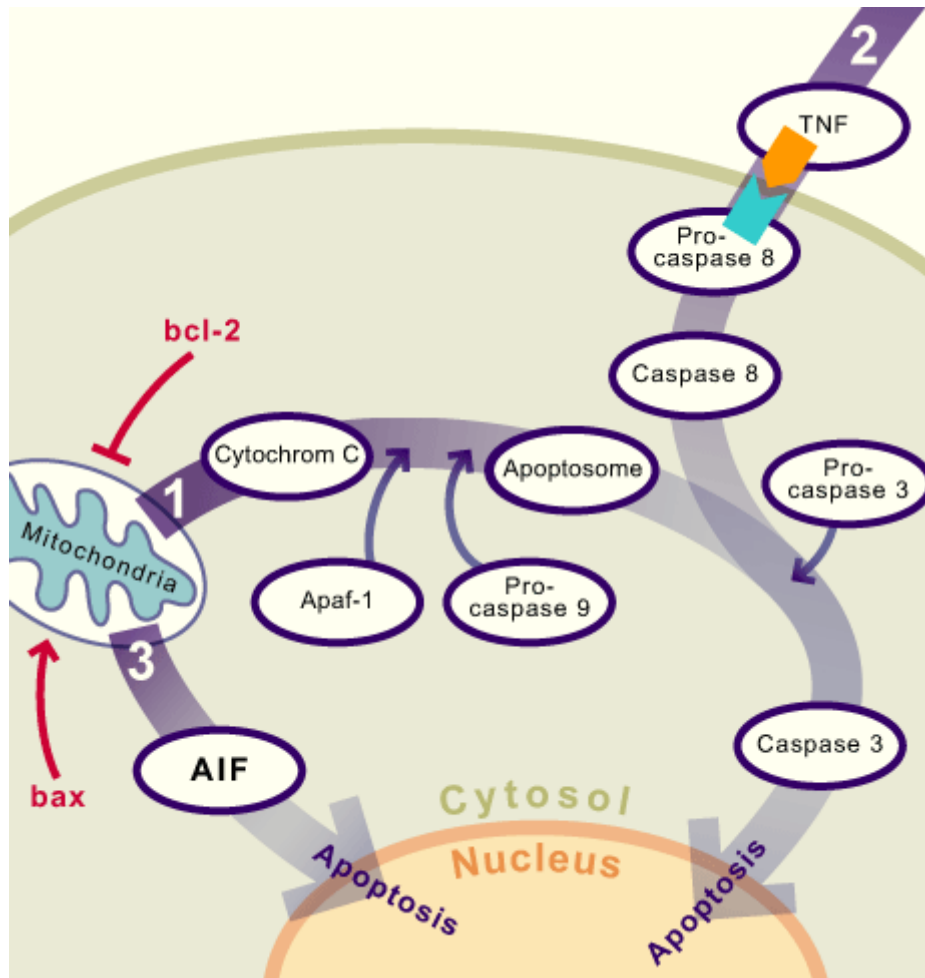


Abbildung 23: Schemazeichnung der Apoptose-Signalkaskaden

1: Intrinsischer Weg - Durch Zellstress kommt es zur Freisetzung von Cytochrom C aus der Mitochondrienmembran. Dieses führt zur Bildung eines Apoptosoms, also zur Aktivierung der Pro-Caspase 9 welche wiederum die Effektorcaspase Pro-Caspase 3 spaltet. 2: Extrinsischer Weg – Durch Bindung von Liganden an Death Receptors wie den TNF α Rezeptor wird Caspase 8 aktiviert. Diese spaltet die Effektorcaspasen und mündet in die gemeinsame Endstrecke 3. Caspasenunabhängige Apoptoseninduktion über Apoptose inducing factor (AIF). Übernommen von Brüscher et al. [101]

Lipid-Beads verursachten einen Anstieg der Caspase 3 Expression in RGC-5-Zellen auf das 1,5-fache der Kontrolle ($p \leq 0,01$). Nach Inkubation mit Casein-Beads sank die Caspase 3 Expression in RGC-5-Zellen auf die Hälfte ($p \leq 0,05$; *Abbildung 20 a*). In 661W-Zellen konnte eine Verdopplung ($p \leq 0,01$) nach Inkubation mit Casein- und ARA-Beads gezeigt werden (*Abbildung 20 b*). Die Inkubation mit Staurosporin führte zu keiner Erhöhung der Caspase 3

Expression, was in der weiter fortgeschrittenen Apoptose begründet liegt, da die Caspase nur noch in ihrer aktiven Form als gespaltene Caspase 3 vorliegt.

Zur näheren Überprüfung wurde auch die gespaltene Caspase 3 untersucht. Die Inkubation mit Casein-, beziehungsweise ARA-Beads resultierte in einer Erhöhung der gespaltenen Caspase 3 Expression auf das 3-fache ($p \leq 0,001$), beziehungsweise 2,4-fache ($p \leq 0,01$) der Kontrollen in 661W-Zellen. Nach Behandlung mit Staurosporin zeigte sich ein Anstieg auf das 7,7-fache der Kontrolle ($p \leq 0,001$; *Abbildung 21*). Somit kann davon ausgegangen werden, dass Inkubation mit Casein- und ARA-Beads zur Induktion apoptotischer Prozesse in 661W-Zellen geführt hat.

5.3 *In vivo*

Unter Verwendung der vorselektierten *Beads* konnten im Anschluss die Tierversuche begonnen werden. Die geplanten Operationen wurden komplikationslos durchgeführt. Im 7 Tage langen Beobachtungsintervall zeigten sich nur bei zwei der 20 operierten Versuchstiere schwere gesundheitliche Beeinträchtigungen welche zum Abbruch, beziehungsweise den Tod des Tieres führten. Mittels Fluoreszenzmikroskopie an Kryoschnitten konnten Lipid-Beads sowohl an der Einstichstelle der Operation, als auch deren Transport im Verlauf des *Tractus-*, bzw. *Nervus opticus* bis hin zur Papille nachgewiesen werden (*Abbildung 22*).

In den *in vivo*-Versuchen konnten keine der eingesetzten *Beads* in der Retina nachgewiesen werden. Dieser Nachweis stellt die Grundlage jeder weiteren Entwicklung des Verfahrens dar. Ein möglicher Grund dafür, dass der bewährte retrograde Transportweg nicht zum Erfolg geführt hat, liegt in dem verwendeten Marker, den *Beads*. Während sich der retrograde axonale Transport über den Colliculus superior in die RGZs für verschiedene fluoreszierende Farbstoffe wie Fast-Blue oder Fluoro-Gold [102-104] und Oligonukleotide [54] bewährt hatte, ist die Verwendung von *Beads* für diese Anwendung bisher nicht etabliert. Da die *Beads* im Sehnerv nachgewiesen werden konnten (*Abbildung 22*), liegt die Vermutung nahe, dass die *Beads* langsamer transportiert werden. In der Arbeit

von Thaler et. al. [54] konnten Cy3-markierten ODN nach erfolgten retrograden Transport bereits nach einem Tag in RGZ nachgewiesen werden. Im gewählten Beobachtungszeitraum von zwei Wochen konnte hierbei eine zunehmende Anreicherung in den RGZ beobachtet werden. In Anlehnung an diese Arbeit welche Inkubationszeiten von 1-14 Tagen gewählt hatte und bereits nach einem Tag eine Transfektion nachweisen konnte, wurde eine Inkubationszeit von 7 Tagen gewählt. Möglicherweise genügt eine Verlängerung dieser Inkubationszeit, um eine erfolgreiche Anreicherung der *Beads* in RGZs zu erreichen. Allerdings konnten die meisten *Beads* weder im Sehnerv noch im *Tractus opticus* nachgewiesen werden. Als Ursache ist hier eine zu geringe Resorption am Injektionsort in Betracht zu ziehen. Hierbei ist zunächst zu beachten, dass die Konzentration *Beads*/Zelle *in vivo* deutlich geringer ist. Außerdem stellen unterschiedliche Ladungen der verwendeten Konstrukte mögliche Resorptionshindernisse dar. Zusätzlich gilt es zu beachten, dass *in vivo* im Gegensatz zur Zellkultur keine Monokultur vorliegt und die Neurone von einer Vielzahl an Gliazellen umgeben sind, welche durch Phagozytose der *Beads* ein Eindringen in die Axone verhindern können. Als weiteres Hindernis der Resorption sind auch die Myelinscheiden zu nennen, welche in vielen Schichten die Axone der RGZ umgeben. Ein möglicher Ansatz wäre somit eine intraoperative chemische Lyse der Myelinscheiden mit dem Ziel die Endozytose der *Beads* zu erleichtern und das Verfahren zu beschleunigen.

5.4 Aktueller Stand der Forschung

5.4.1 Isolationsmethoden

Momentan wird an einer Vielzahl an Isolationsmethoden geforscht, denn auch wenn einzelne Methoden exzellente Ergebnisse in bestimmten Bereichen des Anforderungsprofils erzielen so zeigen sie Schwächen in anderen und sind deshalb nicht für jedes Vorhaben geeignet. Grundsätzlich lässt sich sagen, dass eine wohldurchdachte Methodenauswahl einem jeden Experiment, welches auf RGZ-Isolierung beruht, zugrunde liegen muss. Obwohl reichlich Verfahren Bestandteil der aktuellen Forschung sind, so handelt es sich bei den meisten um eine Abwandlung folgender Methoden:

Das *Two-step-immunopanning* (TIP) beruht auf zwei Schritten zur Selektion der RGZ. Da sowohl RGZ als auch Makrophagen Thy-1 auf ihrer Oberfläche exprimieren müssen diese zunächst der Suspension entzogen werden. Dies erfolgt über Adhäsion an mit Anti-Makrophagen Antikörpern bezogene Oberflächen. Anschließend erfolgt in einem ähnlichen zweiten Schritt die Adhäsion der RGZ an Gefäße, welche mit Anti-Thy-1 Antikörpern überzogen worden waren [105, 106]. Das TIP zeichnet sich durch hohen Ertrag und gute Vitalität der Zellen aus. Allerdings zu Lasten einer geringeren Reinheit.

Die Isolation durch *Two-step-Immuno-magneto-panning* (TIMP) ist eine Abwandlung des TIP, bei der der zweite Schritt durch magnetische *Beads* erfolgt. Diese binden, genauso wie die Antikörper, im zweiten Schritt des TIP an Thy-1. Im Anschluss werden die magnetisch markierten RGZ über magnetische Säulchen selektiert. Im Vergleich zum TIP zeigte sich eine geringer Ertrag, bei höherer Reinheit und reduzierter Vitalität [107].

Desweiteren steht mit der Durchflusszytometrie retrograd markierter RGZs ein Verfahren zur Verfügung, welches eine enorme Reinheit erzielen kann. Hierzu werden zunächst RGZs über denselben retrograden Transport markiert. Anschließend werden die Zellen enzymatisch gelöst und durchlaufen die Durchflusszytometrie [102]. Während diese Methode durch die nötigen Injektionen *in vivo*, sowie der Inkubationszeit einen hohen Zeitaufwand mit sich bringt, erreicht sie Ergebnisse von nahezu 100%iger Reinheit. Allerdings ist der Ertrag sehr gering, sodass biochemische Untersuchungen nur dann möglich wären, wenn mehrere Retinas einem Ansatz zugeführt werden würden. Einen weiteren Aspekt stellt die deutlich reduzierte Vitalität dar. Während es in einer vergleichenden Arbeit gelungen war RGZs nach Isolation durch TIP und TIMP über mehrere Tage in Kultur zu halten, war dies nach Durchflusszytometrie nicht möglich gewesen [107]. Als mögliche Ursache wird die relativ lange Zelltrennung und der geringe Ertrag als zusätzliches Zeichen entstehender Zellschäden genannt. Hier könnte die Isolation über magnetische *Beads* die Vorzüge der verschiedenen Verfahren kombinieren. Zum einen könnten die RGZ über den gleichen retrograden Transport markiert und somit eine ähnliche Reinheit

angestrebt werden. Auf der anderen Seite entsprechen die anschließend angewandten Isolationsschritte in großen Teilen denen der TIMP, sodass nicht mit vergleichbarem Vitalitätsverlust oder dem geringen Ertrag der Durchflusszytometrie gerechnet werden muss.

	<i>DZ</i>	<i>TIP</i>	<i>TIMP</i>
<i>Ertrag</i>	↓ ↓	↑	—
<i>Reinheit</i>	↑ ↑	↓	↑
<i>Vitalität</i>	↓ ↓	↑	—

Tabelle 9: Vergleich gängiger Isolationmethoden

Die Durchflusszytometrie (DZ) zeichnet sich durch eine nahezu 100%ige Reinheit aus, während Ertrag und Vitalität sich als äußerst gering erweisen. *Two-step-Immunopanning* (TIP) ergibt den höchsten Ertrag, bei bester Vitalität, aber geringster Reinheit. *Two-step-Immuno-magneto-panning* (TIMP) weist ordentlichen Ertrag und Vitalität bei hoher Reinheit auf. Tabelle adaptiert nach [107].

5.5 Limitationen des Verfahrens

Selbst bei erfolgreicher Etablierung des Verfahrens bleiben einige Limitationen bestehen. Zum einen müssen zur Isolation über retrograden Transport magnetischer *Beads* weiterhin Tierversuche durchgeführt werden. Zum anderen ist die zu erwartende Lebensdauer in Kultur ohne Immortalisierung als gering anzusehen. Aufgrund dieser kurzen Überlebensdauer stünde vor jedem geplanten Experiment eine erneute Isolation aus Tierversuchen, welche sowohl zeitlichen und materiellen Aufwand, sowie ethische Problemstellungen mit sich bringt. Dieses Problem könnte nur dadurch umgangen werden, dass isolierte RGZ im Anschluss immortalisiert würden. Die Immortalisierung von RGZ ist aktuell Bestandteil verschiedener Forschungsprojekte.

6. Zusammenfassung

Die Forschung an RGZ, die auch in der Glaukomforschung eine zentrale Rolle spielt, steht vor der Herausforderung, ein adäquates Verfahren zur Isolation von RGZ zu finden. Die aktuell verwendeten Ansätze sind vielfältig, können aber der Aufgabe, Kulturen von hohem Reinheitsgrad zu einem geringen Zeit- und Kostenaufwand zu produzieren, nicht gerecht werden.

In dieser Arbeit wird ein neues Verfahren zur Isolation von RGZ über den retrograden axonalen Transport magnetischer *Beads* in RGZ erarbeitet. Dieser Transportweg ist beispielsweise zur selektiven Anfärbung von RGZ bereits etabliert.

Diese Arbeit gliedert sich in zwei Teile. Erster Bestandteil dieser Arbeit ist die Selektion geeigneter magnetischer *Beads*. Hierbei wurde zunächst ihre Aufnahme in RGC-5-Zellen nachgewiesen, sowie eine ausführliche Überprüfung möglicher toxischer Wirkungen auf die RGC-5-, die ARPE19- und die murine 661W-Zelllinie durchgeführt. Hierzu wurden *Beads* mit verschiedenen Beschichtungen verwendet. Neben *Beads* mit einer Lipid-Ummantelung (Lipid), angeheftetem Casein (Casein) und Polyaspartinsäuren (PAA), wurden auch *Beads* verwendet, die Polyethylenimin (PEI), Poly-Thymidin-Stränge (Oligo dT) oder Glukuronsäure (ARA) tragen. Außerdem erfolgte die Etablierung eines Isolationsverfahrens der magnetisch markierten Zellen *in vitro*, welches die Grundlage für die Anwendung *in vivo* darstellte.

Im zweiten Teil erfolgte der Einsatz der selektierten *Beads in vivo* mittels Injektion in den *Colliculus superior* von *Lister-hooded* Ratten. Die Tiere wurden für eine Woche beobachtet und anschließend euthanasiert. Mittels Fluoreszenzmikroskopie konnten *Beads* im *Tractus opticus*, der Papille des Sehnervs, sowie an der Einstichstelle am *Colliculus superior* nachgewiesen werden. Da kein Nachweis magnetischer *Beads* in RGZ erfolgt war, konnte *in vivo* keine Isolation durchgeführt werden. Weitere Optimierungen des retrograden Transports sind daher notwendig.

7. Literaturverzeichnis

1. Mead, B. and S. Tomarev, *Evaluating retinal ganglion cell loss and dysfunction*. Exp Eye Res, 2016. **151**: p. 96-106.
2. Berkelaar, M., et al., *Axotomy results in delayed death and apoptosis of retinal ganglion cells in adult rats*. J Neurosci, 1994. **14**(7): p. 4368-74.
3. Garcia-Valenzuela, E., et al., *Apoptosis in adult retinal ganglion cells after axotomy*. J Neurobiol, 1994. **25**(4): p. 431-8.
4. Quigley, H.A., et al., *Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1995. **36**(5): p. 774-86.
5. Schuettauf, F., et al., *Retinal neurodegeneration in the DBA/2J mouse-a model for ocular hypertension*. Acta Neuropathol, 2004. **107**(4): p. 352-8.
6. Klug, G.L., *Gliomas of the optic nerve and chiasm in children*. Aust N Z J Surg, 1977. **47**(5): p. 596-600.
7. Barbaro, N.M., et al., *Malignant optic glioma presenting radiologically as a "cystic" suprasellar mass: case report and review of the literature*. Neurosurgery, 1982. **11**(6): p. 787-9.
8. Waybright, E.A., et al., *Tumors compressing the optic nerve: diagnosis and surgical results*. Va Med, 1983. **110**(4): p. 230-4.
9. Kline, L.B., R.B. Morawetz, and S.N. Swaid, *Indirect injury of the optic nerve*. Neurosurgery, 1984. **14**(6): p. 756-64.
10. Melen, O., *Neuro-ophthalmologic features of pituitary tumors*. Endocrinol Metab Clin North Am, 1987. **16**(3): p. 585-608.
11. Liu, G.T., et al., *Gangliogliomas involving the optic chiasm*. Neurology, 1996. **46**(6): p. 1669-73.
12. Giroto, J.A., et al., *Blindness after reduction of facial fractures*. Plast Reconstr Surg, 1998. **102**(6): p. 1821-34.
13. Farkas, R.H. and C.L. Grosskreutz, *Apoptosis, neuroprotection, and retinal ganglion cell death: an overview*. Int Ophthalmol Clin, 2001. **41**(1): p. 111-30.
14. Heiduschka, P., D. Fischer, and S. Thanos, *[Neuroprotection and regeneration after traumatic lesion of the optic nerve]*. Klin Monbl Augenheilkd, 2004. **221**(8): p. 684-701.
15. Mey, J. and S. Thanos, *Intravitreal injections of neurotrophic factors support the survival of axotomized retinal ganglion cells in adult rats in vivo*. Brain Res, 1993. **602**(2): p. 304-17.
16. Selles-Navarro, I., et al., *Retinal ganglion cell and nonneuronal cell responses to a microcrush lesion of adult rat optic nerve*. Exp Neurol, 2001. **167**(2): p. 282-9.
17. Cook, M.W., et al., *Traumatic optic neuropathy. A meta-analysis*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 1996. **122**(4): p. 389-92.
18. Steinsapir, K.D. and R.A. Goldberg, *Traumatic optic neuropathy*. Surv Ophthalmol, 1994. **38**(6): p. 487-518.
19. Feltgen, N., D. Schmidt, and L. Hansen, *[Occlusion of the retinal artery]*. Ophthalmologe, 2003. **100**(8): p. 651-65; quiz 666-7.
20. Hayreh, S.S. and M.B. Zimmerman, *Central retinal artery occlusion: visual outcome*. Am J Ophthalmol, 2005. **140**(3): p. 376-91.

21. Hayreh, S.S. and J.B. Jonas, *Optic disk and retinal nerve fiber layer damage after transient central retinal artery occlusion: An experimental study in rhesus monkeys*. American Journal of Ophthalmology, 2000. **129**(6): p. 786-795.
22. Hayreh, S.S., et al., *Central retinal artery occlusion. Retinal survival time*. Experimental Eye Research, 2004. **78**(3): p. 723-736.
23. Beatty, S. and K.G. Au Eong, *Local intra-arterial fibrinolysis for acute occlusion of the central retinal artery: a meta-analysis of the published data*. Br J Ophthalmol, 2000. **84**(8): p. 914-6.
24. Aldrich, E.M., et al., *Local intraarterial fibrinolysis administered in aliquots for the treatment of central retinal artery occlusion: the Johns Hopkins Hospital experience*. Stroke, 2008. **39**(6): p. 1746-50.
25. Weinreb, R.N., T. Aung, and F.A. Medeiros, *The pathophysiology and treatment of glaucoma: a review*. JAMA, 2014. **311**(18): p. 1901-11.
26. Krieglstein, G.K., *[Blindness caused by glaucoma]*. Ophthalmologe, 1993. **90**(6): p. 554-6.
27. Resnikoff, S., et al., *Global data on visual impairment in the year 2002*. Bull World Health Organ, 2004. **82**(11): p. 844-51.
28. Quigley, H.A., *Glaucoma*. Lancet, 2011. **377**(9774): p. 1367-77.
29. Tham, Y.C., et al., *Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis*. Ophthalmology, 2014. **121**(11): p. 2081-90.
30. Leite, M.T., L.M. Sakata, and F.A. Medeiros, *Managing glaucoma in developing countries*. Arq Bras Oftalmol, 2011. **74**(2): p. 83-4.
31. Rotchford, A.P., et al., *Temba glaucoma study: a population-based cross-sectional survey in urban South Africa*. Ophthalmology, 2003. **110**(2): p. 376-82.
32. Gesellschaft, B.d.A.D.D.O., *Leitlinie Nr. 15 a: Primäres chronisches Offenwinkelglaukom, Normaldruckglaukom und okuläre Hypertension Leitlinien der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft und des Bundesverbands für Augenärzte Deutschland*, 2006.
33. Mills, D., *The glaucomas - a review*. Can Fam Physician, 1972. **18**(11): p. 63-6.
34. Kroese, M. and H. Burton, *Primary open angle glaucoma. The need for a consensus case definition*. J Epidemiol Community Health, 2003. **57**(9): p. 752-4.
35. Shields, M.B., *Normal-tension glaucoma: is it different from primary open-angle glaucoma?* Curr Opin Ophthalmol, 2008. **19**(2): p. 85-8.
36. Quigley, H.A., et al., *Optic nerve damage in human glaucoma. II. The site of injury and susceptibility to damage*. Arch Ophthalmol, 1981. **99**(4): p. 635-49.
37. Quigley, H.A., *Neuronal death in glaucoma*. Prog Retin Eye Res, 1999. **18**(1): p. 39-57.
38. Lemaire, C., et al., *Inhibition of caspase activity induces a switch from apoptosis to necrosis*. FEBS Lett, 1998. **425**(2): p. 266-70.
39. Koh, J.Y., et al., *Potentiated necrosis of cultured cortical neurons by neurotrophins*. Science, 1995. **268**(5210): p. 573-5.
40. Grozdanov, V., et al., *A method for preparing primary retinal cell cultures for evaluating the neuroprotective and neuritogenic effect of factors on axotomized mature CNS neurons*. Curr Protoc Neurosci, 2010. **Chapter 3**: p. Unit3 22.
41. Krishnamoorthy, R.R., et al., *Characterization of a transformed rat retinal ganglion cell line*. Brain Res Mol Brain Res, 2001. **86**(1-2): p. 1-12.
42. Wood, J.P., et al., *A comparison of differentiation protocols for RGC-5 cells*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010. **51**(7): p. 3774-83.
43. Krishnamoorthy, R.R., et al., *A forensic path to RGC-5 cell line identification: lessons learned*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013. **54**(8): p. 5712-9.

44. Frassetto, L.J., et al., *Kinase-dependent differentiation of a retinal ganglion cell precursor*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006. **47**(1): p. 427-38.
45. Schwechter, B.R., L.E. Millet, and L.A. Levin, *Histone deacetylase inhibition-mediated differentiation of RGC-5 cells and interaction with survival*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007. **48**(6): p. 2845-57.
46. Moleiro, A.F., et al., *A Critical Analysis of the Available In Vitro and Ex Vivo Methods to Study Retinal Angiogenesis*. J Ophthalmol, 2017. **2017**: p. 3034953.
47. Bauch, H., H. Stier, and B. Schlosshauer, *Axonal versus dendritic outgrowth is differentially affected by radial glia in discrete layers of the retina*. J Neurosci, 1998. **18**(5): p. 1774-85.
48. Otori, Y., J.Y. Wei, and C.J. Barnstable, *Neurotoxic effects of low doses of glutamate on purified rat retinal ganglion cells*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1998. **39**(6): p. 972-81.
49. Grosskreutz, C.L., et al., *FK506 blocks activation of the intrinsic caspase cascade after optic nerve crush*. Exp Eye Res, 2005. **80**(5): p. 681-6.
50. Hong, S., et al., *Isolation of primary mouse retinal ganglion cells using immunopanning-magnetic separation*. Mol Vis, 2012. **18**: p. 2922-30.
51. Schwartz, J.H., *Axonal transport: components, mechanisms, and specificity*. Annu Rev Neurosci, 1979. **2**: p. 467-504.
52. Quigley, H.A., et al., *Retrograde axonal transport of BDNF in retinal ganglion cells is blocked by acute IOP elevation in rats*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000. **41**(11): p. 3460-6.
53. Pelzl, C., et al., *Axonal guidance by surface microstructuring for intracellular transport investigations*. Chemphyschem, 2009. **10**(16): p. 2884-90.
54. Thaler, S., et al., *A selective method for transfection of retinal ganglion cells by retrograde transfer of antisense oligonucleotides against kynurenine aminotransferase II*. Mol Vis, 2006. **12**: p. 100-7.
55. Heiduschka, P., et al., *Loss of retinal function in aged DBA/2J mice - New insights into retinal neurodegeneration*. Exp Eye Res, 2010. **91**(5): p. 779-83.
56. Heiduschka, P., et al., *Electrophysiological and histologic assessment of retinal ganglion cell fate in a mouse model for OPA1-associated autosomal dominant optic atrophy*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010. **51**(3): p. 1424-31.
57. Schofield, B.R., *Retrograde axonal tracing with fluorescent markers*. Curr Protoc Neurosci, 2008. **Chapter 1**: p. Unit 1 17.
58. Isalan, M., et al., *Localized transfection on arrays of magnetic beads coated with PCR products*. Nat Methods, 2005. **2**(2): p. 113-8.
59. Plouffe, B.D., S.K. Murthy, and L.H. Lewis, *Fundamentals and application of magnetic particles in cell isolation and enrichment: a review*. Rep Prog Phys, 2015. **78**(1): p. 016601.
60. Franco-Bourland, R.E., et al., *Superparamagnetic beads for estimation of spinal subarachnoid space permeability in rats*. J Neurosci Methods, 2013. **219**(2): p. 271-5.
61. Frank, J.A., et al., *Clinically applicable labeling of mammalian and stem cells by combining superparamagnetic iron oxides and transfection agents*. Radiology, 2003. **228**(2): p. 480-7.
62. Liu, G., et al., *Applications and potential toxicity of magnetic iron oxide nanoparticles*. Small, 2013. **9**(9-10): p. 1533-45.
63. Yoeruek, E., J. Hofmann, and K.U. Bartz-Schmidt, *Comparison of swollen and dextran deswollen organ-cultured corneas for Descemet membrane dissection preparation: histological and ultrastructural findings*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013. **54**(13): p. 8036-40.

64. Chiba, K., K. Kawakami, and K. Tohyama, *Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells*. *Toxicol In Vitro*, 1998. **12**(3): p. 251-8.
65. Gillies, R.J., N. Didier, and M. Denton, *Determination of cell number in monolayer cultures*. *Anal Biochem*, 1986. **159**(1): p. 109-13.
66. Choudhary, G.S., S. Al-harbi, and A. Almasan, *Caspase-3 Activation Is a Critical Determinant of Genotoxic Stress-Induced Apoptosis*. *Apoptosis and Cancer: Methods and Protocols*, 2nd Edition, 2015. **1219**: p. 1-9.
67. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. *Nucleic Acids Res*, 2001. **29**(9): p. e45.
68. Smith, B.J., *SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins*. *Methods Mol Biol*, 1994. **32**: p. 23-34.
69. Fdardel, *Protein-SDS interaction*. Wikimedia Commons, 2016.
70. Kapuscinski, J., *DAPI: a DNA-specific fluorescent probe*. *Biotech Histochem*, 1995. **70**(5): p. 220-33.
71. Chalmers, J.J., et al., *Quantification of non-specific binding of magnetic micro- and nanoparticles using cell tracking velocimetry: Implication for magnetic cell separation and detection*. *Biotechnol Bioeng*, 2010. **105**(6): p. 1078-93.
72. Bae, Y.M., et al., *Endocytosis, intracellular transport, and exocytosis of lanthanide-doped upconverting nanoparticles in single living cells*. *Biomaterials*, 2012. **33**(35): p. 9080-6.
73. Arbab, A.S., et al., *Characterization of biophysical and metabolic properties of cells labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles and transfection agent for cellular MR imaging*. *Radiology*, 2003. **229**(3): p. 838-46.
74. Gonzales, M., et al., *Cytotoxicity of iron oxide nanoparticles made from the thermal decomposition of organometallics and aqueous phase transfer with Pluronic F127*. *Contrast Media Mol Imaging*, 2010. **5**(5): p. 286-93.
75. Pfaller, T., et al., *The suitability of different cellular in vitro immunotoxicity and genotoxicity methods for the analysis of nanoparticle-induced events*. *Nanotoxicology*, 2010. **4**(1): p. 52-72.
76. Doak, S.H., et al., *Confounding experimental considerations in nanogenotoxicology*. *Mutagenesis*, 2009. **24**(4): p. 285-293.
77. Patil, U.S., et al., *In Vitro/In Vivo Toxicity Evaluation and Quantification of Iron Oxide Nanoparticles*. *Int J Mol Sci*, 2015. **16**(10): p. 24417-50.
78. Sharifi, S., et al., *Toxicity of nanomaterials*. *Chem Soc Rev*, 2012. **41**(6): p. 2323-43.
79. Laurent, S., et al., *Crucial ignored parameters on nanotoxicology: the importance of toxicity assay modifications and "cell vision"*. *PLoS One*, 2012. **7**(1): p. e29997.
80. Rossol, M., et al., *LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages*. *Crit Rev Immunol*, 2011. **31**(5): p. 379-446.
81. Nelson, C.M., et al., *Tumor necrosis factor-alpha is produced by dying retinal neurons and is required for Muller glia proliferation during zebrafish retinal regeneration*. *J Neurosci*, 2013. **33**(15): p. 6524-39.
82. Gahring, L.C., et al., *Neuronal expression of tumor necrosis factor alpha in the murine brain*. *Neuroimmunomodulation*, 1996. **3**(5): p. 289-303.
83. Tsujimura, H., et al., *Toll-like receptor 9 signaling activates NF-kappaB through IFN regulatory factor-8/IFN consensus sequence binding protein in dendritic cells*. *J Immunol*, 2004. **172**(11): p. 6820-7.
84. Nusgens, B.V., *[Hyaluronic acid and extracellular matrix: a primitive molecule?]*. *Ann Dermatol Venereol*, 2010. **137 Suppl 1**: p. S3-8.

85. Jiang, D., J. Liang, and P.W. Noble, *Hyaluronan as an immune regulator in human diseases*. *Physiol Rev*, 2011. **91**(1): p. 221-64.
86. Tesar, B.M., et al., *The role of hyaluronan degradation products as innate alloimmune agonists*. *Am J Transplant*, 2006. **6**(11): p. 2622-35.
87. Chao, D.T. and S.J. Korsmeyer, *BCL-2 family: regulators of cell death*. *Annu Rev Immunol*, 1998. **16**: p. 395-419.
88. Adams, J.M. and S. Cory, *Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family*. *Trends Biochem Sci*, 2001. **26**(1): p. 61-6.
89. Tsujimoto, Y., *Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria?* *Genes Cells*, 1998. **3**(11): p. 697-707.
90. Oh, Y.K., et al., *Polyethylenimine-mediated cellular uptake, nucleus trafficking and expression of cytokine plasmid DNA*. *Gene Ther*, 2002. **9**(23): p. 1627-32.
91. Boussif, O., et al., *A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(16): p. 7297-301.
92. Calarco, A., et al., *The genotoxicity of PEI-based nanoparticles is reduced by acetylation of polyethylenimine amines in human primary cells*. *Toxicol Lett*, 2013. **218**(1): p. 10-7.
93. Cai, H., et al., *Facile hydrothermal synthesis and surface functionalization of polyethyleneimine-coated iron oxide nanoparticles for biomedical applications*. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2013. **5**(5): p. 1722-31.
94. Hunter, A.C., *Molecular hurdles in polyfectin design and mechanistic background to polycation induced cytotoxicity*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2006. **58**(14): p. 1523-31.
95. Fischer, D., et al., *In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis*. *Biomaterials*, 2003. **24**(7): p. 1121-31.
96. Nel, A., et al., *Toxic potential of materials at the nanolevel*. *Science*, 2006. **311**(5761): p. 622-7.
97. Radons, J., *The human HSP70 family of chaperones: where do we stand?* *Cell Stress Chaperones*, 2016. **21**(3): p. 379-404.
98. Mayer, M.P. and B. Bukau, *Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism*. *Cell Mol Life Sci*, 2005. **62**(6): p. 670-84.
99. Shi, Y., *Caspase activation: revisiting the induced proximity model*. *Cell*, 2004. **117**(7): p. 855-8.
100. Porter, A.G. and R.U. Janicke, *Emerging roles of caspase-3 in apoptosis*. *Cell Death Differ*, 1999. **6**(2): p. 99-104.
101. Brüschi, B., *Regulatorische Mechanismen der Apoptose*. embryology.ch, 1999.
102. Chang, Z.Y., et al., *A novel high-content flow cytometric method for assessing the viability and damage of rat retinal ganglion cells*. *PLoS One*, 2012. **7**(3): p. e33983.
103. Simon, P. and S. Thanos, *Combined methods of retrograde staining, layer-separation and viscoelastic cell stabilization to isolate retinal ganglion cells in adult rats*. *J Neurosci Methods*, 1998. **83**(2): p. 113-24.
104. Sarthy, P.V., B.M. Curtis, and W.A. Catterall, *Retrograde labeling, enrichment, and characterization of retinal ganglion cells from the neonatal rat*. *J Neurosci*, 1983. **3**(12): p. 2532-44.
105. Barres, B.A., et al., *Immunological, morphological, and electrophysiological variation among retinal ganglion cells purified by panning*. *Neuron*, 1988. **1**(9): p. 791-803.
106. Zhang, X.M., et al., *Immunopanning purification and long-term culture of human retinal ganglion cells*. *Mol Vis*, 2010. **16**: p. 2867-72.
107. Gao, F., et al., *Comparative analysis of three purification protocols for retinal ganglion cells from rat*. *Mol Vis*, 2016. **22**: p. 387-400.

8. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im Department für Augenheilkunde Tübingen / Universitäts-Augenklinik unter Betreuung von Prof. Dr. med. Sebastian Thaler durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Dr. Sven Schnichels (Laborleitung Neuroprotektion) und Dr. José Hurst (stellvertretende Laborleitung Neuroprotektion).

Die Versuche wurden (nach Einarbeitung durch Dr. José Hurst) von mir eigenständig durchgeführt. Die Elektronenmikroskopie wurde durch Dipl. Ing. Johanna Hofmann durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Dr. José Hurst durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Stuttgart, den

.....

(Unterschrift)