

Forschungsbericht über das Projekt „Einfluss der TLR3-Aktivierung des retinalen Pigmentepithels auf das Verhalten von Makrophagen“, gefördert durch die DOG im Rahmen der Forschungsförderung innovativer wissenschaftlicher Projekte in der Augenheilkunde

Antragstellerin: Dr. Alexa Klettner
Dienststellung: Wissenschaftliche Angestellte, Laborleitung
Geburtsdatum, Nationalität: 28.04.1973, deutsch
Dienstadresse: UK S-H, Campus Kiel
Klinik für Ophthalmologie
Arnold-Heller-Str. 3, 24105 Kiel
Telefon/Telefax: 0431 597 2401/ 0431 597 2428
Emailadresse: aklettner@auge.uni-kiel.de

Zusammenfassung:

Die Aktivierung des *toll-like receptors 3* (TLR3) vermindert im Mausmodell die Ausbildung von Neovaskularisationen [Kleinmann et al]. Die darunter liegenden Mechanismen sind nicht bekannt. In der ersten Förderperiode haben wir den Einfluss der Aktivierung des TLR3 Rezeptors auf das retinale Pigmentepithel untersucht. Dabei fanden wir überraschend, dass die Aktivierung des TLR3 Rezeptors mit *polyriboinosinic: polyribocytidylic acid* (Poly I:C) einen dosisabhängigen Zelltod auslöst. Der Zelltod wird zum Teil durch die Mitogen-activated protein kinase (MAPK) JNK vermittelt. Ebenfalls überraschender Weise vermindert die Aktivierung des TLR3 Rezeptors die VEGF Sekretion nicht, sondern induziert sogar einen leichten Anstieg der VEGF Sekretion. Dieser Anstieg der Sekretion ist nicht abhängig von den MAPK JNK, p38 oder Erk. Eine durch andere Gruppen bereits beschriebenen Anstieg der IFN-beta Sekretion [Kumar 2004] konnten wir ebenfalls feststellen. Die Aktivierung von TLR3 induziert außerdem eine Phosphorylierung von ERK1/2. Die Monozytenkultur wurde etabliert und erste Experimente zur Interaktion von Monozyten mit RPE-Organokulturen in der 2-Photonenmikroskopie wurden durchgeführt.

Ausführlicher Forschungsbericht:

Poly I:C induziert einen konzentrationsabhängigen Zelltod

Der Zelltod wurde mittels MTT-Assay, Trypanblau-Exklusions-Assay und Cell-Death-ELISA untersucht. Während im MTT-Assay keine Abnahme der Zellzahl festzustellen war, zeigte der (sensiblere) Trypanblau-Exklusions-Assay und der Cell-Death Detection ELISA einen signifikanten Zelltod bei 1 µg/ml, 10 µg/ml und 100 µg/ml (Abbildung 1).

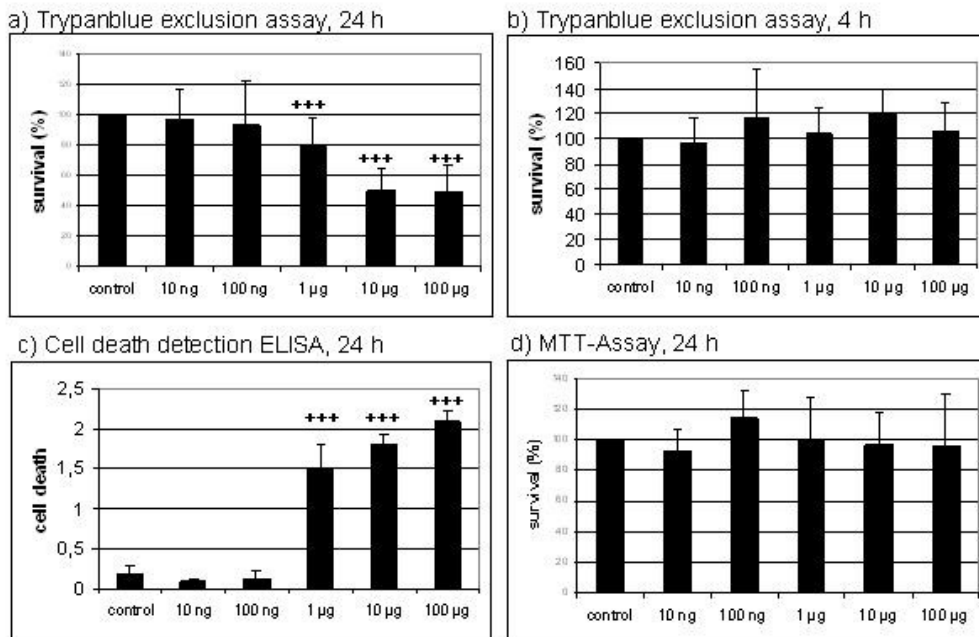


Abbildung 1 :Zelltod induziert durch Poly I:C, untersucht im a) Trypanblau Exclusion Assay nach 24 h, b) Trypanblau Exclusion Assay nach 4 h, c) Cell death detection ELISA nach 24 h, d) MTT-Assay nach 24 h.

Einfluss von MAPK auf den Poly I:C induzierten Zelltod

Die Inhibition der MAPK p38 und ERK1/2 konnten diesen Zelltod nicht verhindern, während die Inhibition der MAPK JNK einen leicht protektiven Effekt zeigte. Die Inhibition von ERK1/2 führte dagegen zu einem signifikanten Ansteigen des Zelltodes, was auf einen protektiven Effekt von ERK1/2 hindeutet (Abbildung 2).

VEGF-Sekretion

Die Aktivierung von TLR3 zeigt einen leichten, konzentrationsabhängigen Anstieg der VEGF-Sekretion (Abbildung 3).

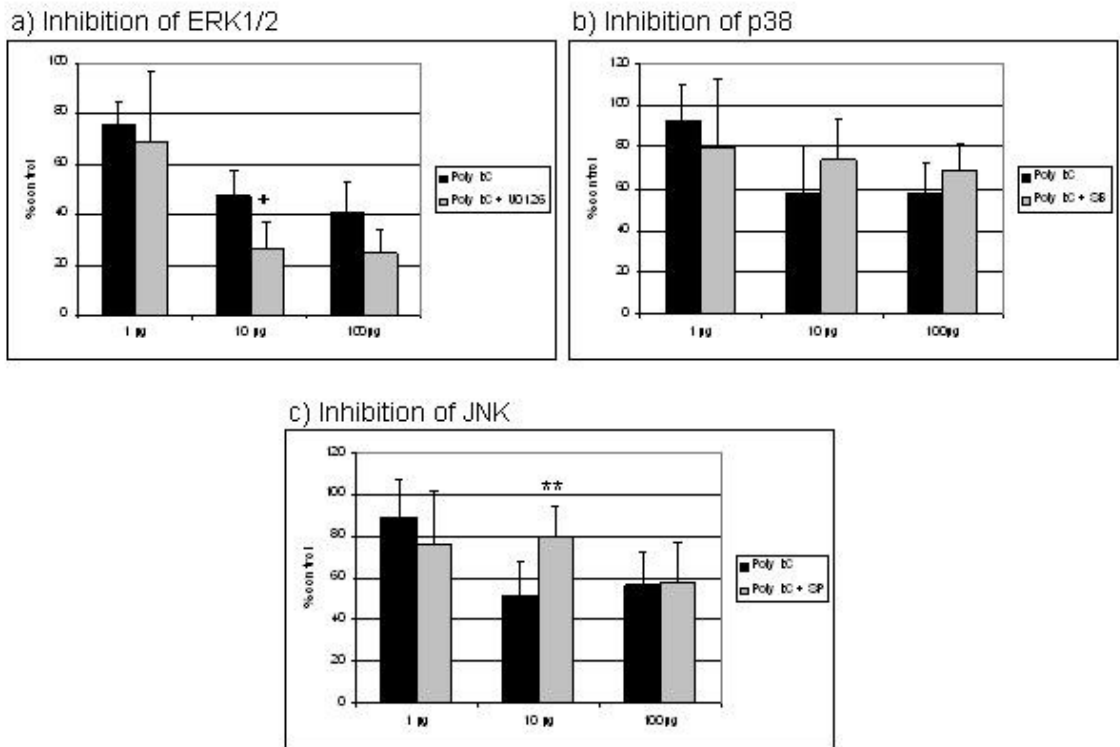


Abbildung 2: Einfluss unterschiedlicher MAPK auf den durch Poly I:C induzierten Zelltod nach 24 h, gemessen in Trypanblau Exclusion Assay. A) ERK1/2, b) p38, c) JNK.

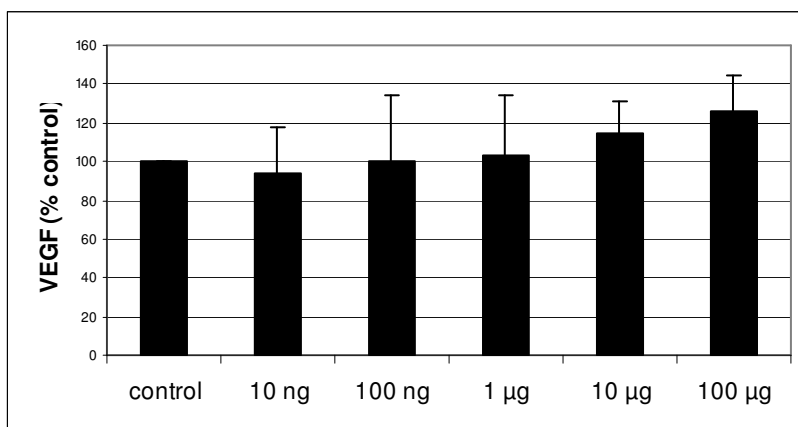


Abbildung 3: VEGF Konzentration nach Gabe unterschiedlicher Poly I:C Konzentrationen, gemessen im VEGF ELISA 4 h nach Stimulation.

Einfluss von MAPK auf die VEGF-Sekretion

Die Inhibition der MAPK p38, ERK1/2 und JNK zeigen keinen signifikanten Einfluss auf die VEGF-Sekretion unter Poly I:C Stimulation (Abbildung 4).

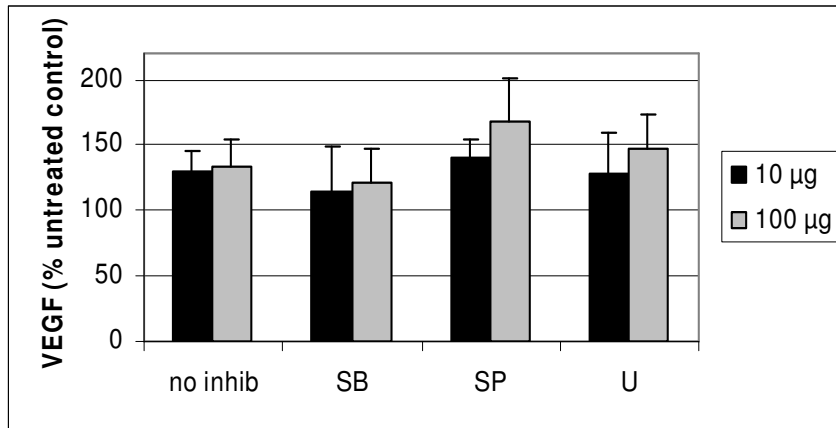


Abbildung 4: VEGF Konzentration nach Gabe von 10 µg/ml bzw. 100 µg/ml Poly I:C bei Inhibition unterschiedlicher MAPK (SB = p38 Inhibitor, SP = JNK Inhibitor, U = ERK1/2 Inhibitor), gemessen im VEGF ELISA 4 h nach Stimulation.

IFN-beta Sekretion

Die TLR3 Aktivierung durch Poly I:C induziert auch bei geringen Konzentrationen eine Sekretion von IFN-beta. Diese Experimente sind noch nicht abgeschlossen.

Aktivierung von ERK1/2

Die MAPK ERK1/2 wird konzentrationsabhängig durch Poly I:C aktiviert. Diese Aktivierung steht nicht mit dem Zelltod oder mit der VEGF-Ausschüttung in Zusammenhang.

Vorläufige Monozytenexperimente

Die Kultur der Monozyten ist etabliert worden und erste Experimente zur Interaktion von RPE Organkulturen und Monozyten wurden bereits durchgeführt. Die Charakterisierung der Interaktion von Monozyten und RPE wird in der nächsten Förderperiode bearbeitet. Erste Experimente zur Interaktion von RPE Zellen mit Monozyten im 2-Photonenmikroskop wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Miura aus dem Laserzentrum Lübeck durchgeführt (Abbildung 5).

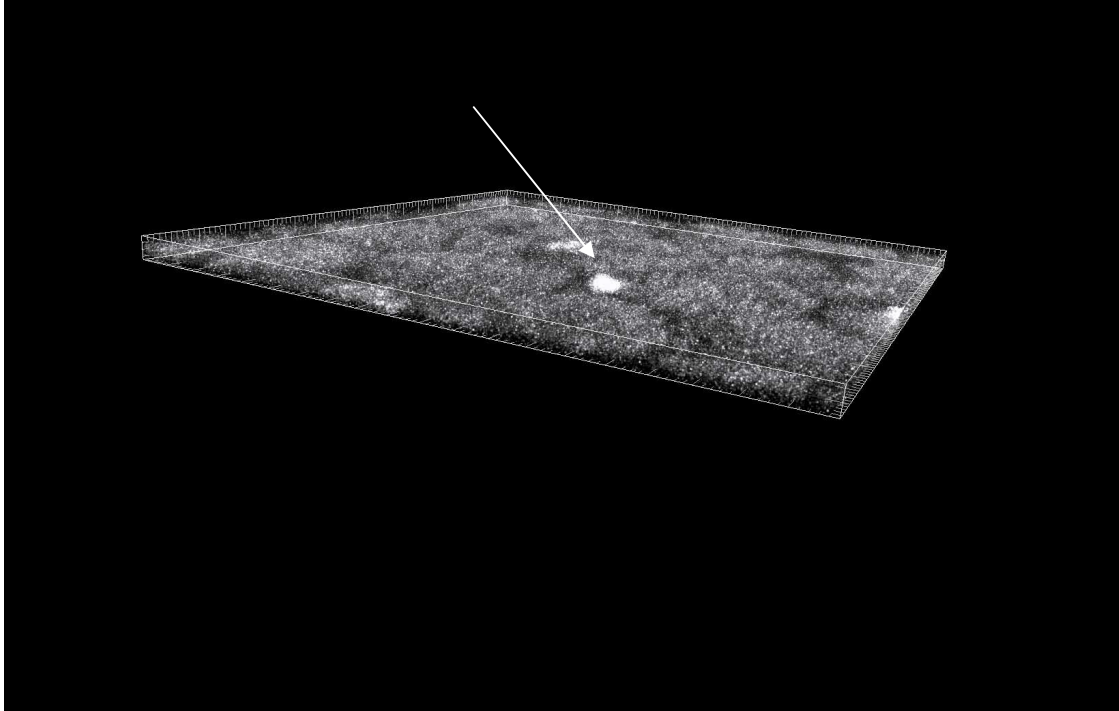


Abbildung 5: 2-Photonenmikroskopisches Bild einer RPE Zellschicht (Organkultur) in Interaktion mit Monozyten (Pfeil)

Ausblick

Im zweiten Jahr der Förderung wird die Interaktion von Monozyten mit dem retinalen Pigmentepithel bearbeitet. Dafür wird in Transwellkokulturen zum einen das Migrationsverhalten von Monozyten bei aktiviertem RPE untersucht, zum anderen die Auswirkungen der RPE-Aktivierung auf die Phänotyp der Monozyten, wie im Antrag beschrieben.

Veröffentlichungen der Ergebnisse

Die Ergebnisse wurden als Kongressbeitrag für die ARVO 2011 eingereicht. Nach Abschluss Experimente zur IFN- β Ausschüttung wird eine Publikation in einem Fachjournal eingereicht.

Literatur

Kleinman ME, Yamada K, Takeda A, et al. 2008 *Nature* 452:591

Kumar MV, Nagineni C, Chin MS, Hooks JJ, Detrick B. 2004 *J Neuroimmunol* 153:7