

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR HUMANGENETIK
PROF. DR. RER. NAT. BERNHARD WEBER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

„UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS DER
AMD-ASSOZIIERTEN GENETISCHEN VARIANTEN rs79744308
IM *NEURTURIN*-GEN AUF STABILITÄT UND FUNKTION
DES PROTEINS IN DER NETZHAUT“

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Franziska Maria Groß
aus Weißenhorn

2021

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR HUMANGENETIK
PROF. DR. RER. NAT. BERNHARD WEBER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

„UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS DER
AMD-ASSOZIIERTEN GENETISCHEN VARIANTEN rs79744308
IM *NEURTURIN*-GEN AUF STABILITÄT UND FUNKTION
DES PROTEINS IN DER NETZHAUT“

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Franziska Maria Groß
aus Weißenhorn

2021

Dekan: Prof. Dr. med. Dipl. Phys. Dirk Hellwig
1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Bernhard Weber
2. Berichterstatter: PD Dr. med. habil. Caroline Brandl
Tag der mündlichen Prüfung: 10.03.2022

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die altersbedingte Makuladegeneration	1
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Pathologie und Symptomatik	2
1.1.3	Risikofaktoren zur Entstehung der AMD	4
1.1.4	Pathomechanismen der AMD	8
1.1.5	Aktueller Stand der Therapie	11
1.2	Eine mögliche Rolle des Neurturin (NRTN) in der AMD-Pathogenese	12
1.2.1	Das Protein Neurturin (NRTN) – Aufbau	13
1.2.2	Funktionen des NRTN-Proteins	14
1.3	Ziel der Arbeit	16
2	Material	18
2.1	Zellen und Organismen	18
2.1.1	<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	18
2.1.2	Zelllinien	18
2.2	Oligonukleotide	19
2.3	Plasmide und Expressionskonstrukte	19
2.4	Primäre Antikörper	20
2.5	Sekundäre Antikörper	21
2.6	Enzyme	21
2.7	Molekularmassenstandards	21
2.8	Kit-Systeme	22
2.9	Chemikalien und Reagenzien	22
2.10	Puffer und Lösungen	25
2.11	Zellkulturmedien und Zusätze	26
2.12	Verbrauchsmaterial	27
2.13	Laborgeräte	28

2.14	Software	30
3	Methoden	31
3.1	Kultivierung eukaryotischer Zelllinien	31
3.1.1	Hek293 EBNA.....	31
3.1.2	ARPE-19.....	31
3.1.3	Weri-Rb1 und Y-79.....	32
3.1.4	BV2.....	32
3.1.5	HUVEC	33
3.1.6	Aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte RPE-Zellen (hiPSC-RPE).....	34
3.2	Heterologe Proteinexpression in Hek293 EBNA	34
3.2.1	Calciumphosphat Transfektion	34
3.2.2	Ernte von Zellen und Überstand nach Calciumphosphat Transfektion ...	35
3.2.3	Transfektion mit dem Mirus Bio™ TransIT®-LT1 Transfektionsreagenz	36
3.2.4	Ernte von Zellen, Überstand und EZM nach Transfektion mit dem Mirus Bio™ TransIT®-LT1 Transfektionsreagenz.....	36
3.3	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	37
3.4	Western Blot – Semi Dry Verfahren	38
3.5	Aufreinigung von Myc-getagten NRTN-Varianten	38
3.6	Klonierung eines bicistronischen Expressionsvektors mit Expressionskassetten für NRTN und dem Green Fluorescent Protein (GFP)	39
3.6.1	Gewinnung der NRTN-Expressionskassetten durch Exzision aus pcDNA3_NRTN:G oder pcDNA3_NRTN:A	40
3.6.2	Agarose-Gelelektrophorese.....	40
3.6.3	Gelaufreinigung von DNA-Fragmenten.....	41
3.6.4	Phosphorylierung der eluierten NRTN-Expressionskassette	41
3.6.5	Öffnung des Zielvektors pcDNA4_GFP	42
3.6.6	Dephosphorylierung des Vektors.....	42

3.6.7	Blunt-End Ligation der Insert-DNA mit der Vektor-DNA.....	43
3.6.8	Hitzeschock-Transformation in <i>E. coli</i> strain DH5 α Zellen	43
3.6.9	Plasmid Präparation (im ng/ μ l Bereich)	43
3.6.10	Testverdau	44
3.6.11	Sequenzierung der Plasmid-DNA nach Sanger	45
3.6.12	Plasmid Präparation (im μ g/ μ l Bereich).....	46
3.6.13	Herstellung von Glycerinkulturen zur Langzeitaufbewahrung	47
3.7	Versuche zur Überprüfung der NRTN-Bindung an verschiedene Zelllinien	47
3.7.1	Bindeversuche an adhärenente Zellen	47
3.7.2	Bindeversuche an Zellen in Suspension	48
3.7.3	Bindeversuche an hiPSC-RPE Zellen.....	48
3.8	Funktionelle Versuche an transfizierten Zellen.....	49
3.8.1	Etablierung der ARPE-19 Transfektion.....	49
3.8.2	Etablierung der Weri-Rb1 Transfektion.....	50
3.8.3	Autophagie-Assay mit transfizierten ARPE-19 Zellen.....	50
3.8.4	Differenzierungsversuch mit transfizierten Weri-Rb1 Zellen	51
3.9	Funktionelle Versuche an Zellen auf NRTN-haltiger extrazellulärer Matrix (EZM)	52
3.9.1	Herstellung NRTN-haltiger EZM	52
3.9.2	Autophagie-Assay mit ARPE-19 Zellen auf NRTN-haltiger EZM.....	53
3.9.3	Autophagie-Assay mit hiPSC-RPE Zellen auf NRTN-haltiger EZM	53
3.9.4	Autophagie-Assay mit Weri-Rb1 Zellen auf NRTN-haltiger EZM.....	54
3.9.5	MTT-Assay an Weri-Rb1 Zellen auf NRTN-haltiger EZM nach oxidativem Stress	54
3.9.6	Quantitativer Real Time PCR-Assay an Weri-Rb1 und hiPSC-RPE Zellen auf NRTN-haltiger EZM nach oxidativem Stress.....	55
4	Ergebnisse	58

4.1	Überprüfung der Bindung der sezernierten NRTN Varianten an verschiedene Zelllinien.....	58
4.2	Etablierung von Modellsystemen zur funktionellen Testung der NRTN Varianten.....	61
4.2.1	Aufreinigung des NRTN-Proteins.....	61
4.2.2	Herstellung NRTN-haltiger EZM	62
4.2.3	Heterologe NRTN-Expression in retinalen Zelllinien.....	63
4.3	Funktionelle Versuche mit NRTN-Varianten.....	69
4.3.1	Effekt von NRTN auf AMD-assoziierte zelluläre Prozesse in Weri-Rb1 Zellen	70
4.3.2	Effekt von NRTN auf AMD-assoziierte zelluläre Prozesse in ARPE-19 Zellen	80
4.3.3	Effekt von NRTN auf AMD-assoziierte zelluläre Prozesse in hiPSC-RPE Zellen	85
5	Diskussion.....	90
5.1	Einfluss der genetischen Varianten rs79744308 in der Propeptid-Region von NRTN auf die Bindung des reifen Proteins an Zelllinien.....	91
5.2	Etablierung von funktionellen Versuchen mit NRTN.....	92
5.3	Funktionelle Versuche mit NRTN	94
5.3.1	Effekt von NRTN auf MAPK Aktivierung	94
5.3.2	Effekt von NRTN auf neuronale Differenzierung.....	95
5.3.3	Effekte von NRTN auf Autophagie-Induktion in retinalen Zelllinien.....	96
5.3.4	Einfluss von NRTN auf durch oxidativen Stress induzierte Expressionsveränderungen	98
5.4	Ausblick.....	100
6	Zusammenfassung.....	101
7	Abstract.....	103
8	Abkürzungsverzeichnis	105
9	Tabellenverzeichnis	108

10	Abbildungsverzeichnis	110
11	Literaturverzeichnis	112
12	Danksagung	143
13	Eidesstattliche Erklärung	144

1 Einleitung

1.1 Die altersbedingte Makuladegeneration

Die altersbedingte Makuladegeneration (AMD) ist eine chronisch progrediente Erkrankung der Netzhaut, die sich durch Degeneration der Netzhaut an der „Makula lutea“, dem Ort des schärfsten Sehens, auszeichnet. In Industrienationen ist die AMD heutzutage die häufigste Ursache für Erblindung im Alter über 60 Jahre (zusammengefasst in Wong et al. 2014).

Der hohe Leidensdruck und die Einschränkung der vielen Betroffenen im Alltag sowie auch die damit verbundene hohe Belastung für das Gesundheitssystem führen dazu, dass aktuell viel Forschung zur Aufklärung der AMD-Pathogenese und daraus möglicherweise abzuleitenden Therapieansätzen betrieben wird.

1.1.1 Epidemiologie

Nach aktuellen Studien, bei welchen insgesamt über 120.000 Personen zwischen 30 und 97 Jahren untersucht wurden, sind weltweit 8,7 % der Bevölkerung an AMD erkrankt. Bis zum Jahr 2040 wird sogar ein Anstieg auf 288 Millionen Betroffene erwartet (zusammengefasst in Wong et al. 2014).

Die Prävalenz der Erkrankung variiert mit der geographischen Herkunft. Demnach sind europäische Personen häufiger von der Erkrankung betroffen (12,3 %), als beispielsweise Menschen mit afrikanischem (7,5 %) oder asiatischem (7,4 %) Ursprung (zusammengefasst in Wong et al. 2014). Geschlechtsspezifische Unterschiede bei der Erkrankung sind in aktuellen Studien nicht erkennbar (zusammengefasst in Wong et al. 2014; Colijn J. M. et al. 2017).

In einer Meta-Analyse aus dem Jahr 2017 von Colijn und Kollegen werden die Erkrankungsprävalenzen in Europa beschrieben. Bei Personen über 70 Jahren aus Europa beträgt die Häufigkeit für die frühen Formen der AMD 13,2 %, während Spätformen mit 3,0 % deutlich seltener auftreten (Colijn J. M. et al. 2017). Ein klarer Anstieg der AMD Prävalenz in Europa zeigt sich vor allem mit zunehmendem Alter. Bei der frühen Form der AMD steigt die Erkrankungshäufigkeit beispielsweise von 3,5 % im Alter von 55-59 Jahren auf 17,6 % bei den über 85-Jährigen. Ebenso drastisch ist die Zunahme von annähernd 0 % in der jüngsten getesteten Altersgruppe

Einleitung

(55 - 59 Jahre) auf 9,8 % (Personen über 85 Jahre) bei Spätformen der AMD (Colijn J. M. et al. 2017). In einer früheren Meta-Analyse mit über 14.000 erkrankten Personen aus Europa, Australien und den USA wurde ein ähnlicher altersabhängiger Anstieg aller AMD-Formen insgesamt verzeichnet. Von 0,2 % bei den 55 - 64 Jährigen auf 13 % im Alter von über 85 Jahren (Smith et al. 2001).

Zur Entwicklung der Situation in Europa wurden Vergleiche zwischen den Prävalenzen vor und nach 2006 durchgeführt, um eine Vorhersage über die weitere Entwicklung der Erkrankung machen zu können. Dazu wurden Studien des „European Eye Epidemiology“ (E3) Konsortiums (Delcourt et al. 2016) in Gruppen vor und nach 2006 eingeteilt. Diese Analysen zeigen eine leichte Zunahme bzw. eine stabile Häufigkeit bei der Frühform, allerdings eine Abnahme bei der späten Form der AMD (Colijn J. M. et al. 2017), was auf eine mögliche Verbesserung der Therapie- oder Präventionsmethoden schließen lässt.

1.1.2 Pathologie und Symptomatik

Die Unterscheidung der AMD in die frühe und späte Form erfolgt über die Beurteilung der Netzhautveränderungen. Nach einer diagnostischen Untersuchung des Augenhintergrundes mittels Funduskopie kann bei Verdacht auf eine fortgeschrittene AMD auch eine Fluoreszenzangiografie durchgeführt werden, um die Gefäße am Augenhintergrund gezielt mit fluoreszierendem Farbstoff darzustellen. Eine weitere diagnostische Möglichkeit besteht in der optischen Kohärenztomografie (OCT), bei der mittels reflektierender Laserstrahlung Schnittbilder des Netzhautaufbaus erstellt werden (zusammengefasst in Chakravarthy et al. 2010a; sowie Lim et al. 2012).

Die Frühform verläuft meist asymptomatisch und langsam progredient, wobei bereits erste Symptome, wie eine reduzierte Sehschärfe, verringerte Kontrastsensitivität oder verschwommenes Sehen auftreten können (zusammengefasst in Bressler et al. 1988; Stangos et al. 1995; sowie Lim et al. 2012). Eine erste pathologische Veränderung der Netzhaut ist dabei das Auftreten spezifischer Drusen (siehe Abbildung 1A), Ablagerungen von extrazellulärem Material zwischen der Basallamina des retinalen Pigmentepithels (RPE) und der inneren Kollagenschicht der Bruch'schen Membran (Hageman und Mullins 1999). Drusen werden morphologisch in harte oder weiche Drusen klassifiziert. Als harte Drusen werden kleine, begrenzt lokalisierte, gelbliche

Einleitung

Ablagerungen mit einem Durchmesser $< 63 \mu\text{m}$ beschrieben. Das Auftreten von harten Drusen ist nicht mit einem erhöhten AMD-Risiko assoziiert (zusammengefasst in Ding et al. 2009). Im Gegenzug gelten weiche Drusen, welche heller und größer sind und unscharfe Begrenzungen aufweisen, als signifikanter Risikofaktor für die Entstehung der AMD-Spätform (zusammengefasst in Ding et al. 2009). Als molekulare Bestandteile von Drusen wurden unter anderem Komponenten des Komplementsystems wie Vitronectin (VTN) oder Clusterin (CLU), Lipide, Lipoproteine (z.B. Apolipoprotein E (APOE)), Glykoproteine und inflammatorische Moleküle identifiziert (Hageman et al. 1999; Hageman und Mullins 1999; Russell et al. 2000; Mullins et al. 2000; Crabb et al. 2002; Anderson et al. 2004). Beim Fortschreiten der Erkrankung und Übergang in eine AMD-Spätform finden sich in der Netzhaut zusätzlich Bereiche von hypo- oder hyperpigmentiertem RPE (zusammengefasst in Lim et al. 2012) und verdickte Stellen der Bruch'schen Membran (zusammengefasst in Ding et al. 2009).

Es werden zwei AMD-Spätformen beschrieben: die sogenannte „trockene“ Form, auch bezeichnet als geographische Atrophie (GA) und die „feuchte“ Form oder choroidale Neovaskularisation (CNV) (zusammengefasst in Lim et al. 2012).



Abbildung 1: Fundusaufnahmen eines Auges mit Drusen (A) eines Auges mit fortgeschrittener GA (B) und eines Auges mit CNV (C).

Fundusaufnahmen von verschiedenen Erkrankten mit unterschiedlichen AMD Formen (A-C). Fundus mit großen Drusen (A). Makula einer trockenen AMD mit Erhöhung der Drusengröße und des befallenen Areals (B). Makula einer feuchten AMD bzw. CNV mit Neovaskularisationen und subretinaler Einblutung (weißer Kreis) (C) (modifiziert aus Lim et al. 2012).

Die GA zeichnet sich durch eine zunehmende Atrophie des RPE und daraus resultierende flächenförmige Hypopigmentierung aus (Abbildung 1B). Durch den RPE Zellverlust kommt es zum Absterben von assoziierten Photorezeptorzellen und

Einleitung

dadurch zunehmendem Sehverlust (Curcio et al. 1996; Jong 2006; zusammengefasst in Ding et al. 2009). Als CNV bezeichnet man die seltenere Spätform der AMD, die mit dem Auswachsen von unreifen Blutgefäßen aus dem Choroid (Aderhaut) in die Schicht zwischen RPE und Photorezeptoren assoziiert wird. Bei dieser pathologischen Veränderung kann es zu Einblutungen oder Flüssigkeitsansammlungen (Abbildung 1C) unter dem Pigmentepithel kommen, die eine Anhebung des RPE verursachen können (zusammengefasst in Ding et al. 2009; Chen et al. 2010b; Lim et al. 2012; sowie Ambati und Fowler 2012). Im Gegensatz zur GA führt die CNV in der Regel zu einem plötzlich auftretenden und sehr schnell fortschreitenden Sehverlust (zusammengefasst in Ambati und Fowler 2012).

Symptomatisch kommt es bei beiden Spätformen der AMD zu einer Verschlechterung der Sehschärfe, begleitet von Symptomen, wie dunklen Flecken im zentralen Gesichtsfeld (Skotome) oder Veränderungen des subjektiven Sehens mit Schlieren oder Strichen im Sehfeld (Metamorphopsien) (zusammengefasst in Lim et al. 2012). Die Erkrankten leiden durch den zentralen Sehverlust meist unter Schwierigkeiten beim Lesen, Autofahren oder beim Erkennen von Gesichtern, was eine bedeutende Einschränkung im alltäglichen Leben bedeutet (zusammengefasst in Chakravarthy et al. 2010a). Unbehandelt können beide Spätformen der AMD zu vollständigem Sehverlust führen (zusammengefasst in Lim et al. 2012).

1.1.3 Risikofaktoren zur Entstehung der AMD

Die AMD ist eine komplexe Erkrankung mit multifaktorieller Genese und somit vielen möglichen Risikofaktoren.

1.1.3.1 Erhöhtes Alter als Hauptrisikofaktor für die Entstehung der AMD

Als einer der stärksten Risikofaktoren gilt ein erhöhtes Alter (Age-Related Eye Disease Study Research Group (AREDS) 2000; Buch et al. 2005; Klein et al. 2007; Wang et al. 2007). Erhöhtes Alter geht mit verschiedenen Veränderungen auf organischer und zellulärer Ebene einher, denen wiederum ein Einfluss auf die AMD Pathogenese nachgesagt wird. Dazu gehören unter anderem Bildung von extrazellulären Drusen, Verdickung, Versteifung und Lipidanreicherung der Bruch'schen Membran,

Einleitung

intrazelluläre Ablagerungen von Zell- oder Gewebeschädigungen oder Lipofuszin, Defekte in den Mitochondrien, sowie Zellverlust und Gewebedegeneration retinaler Strukturen durch oxidativen Stress (Pauleikhoff et al. 1990; Ramrattan et al. 1994; Delori et al. 2001; zusammengefasst in Ardeljan und Chan 2013). Zusätzlich könnten auch altersbedingte Veränderungen in der mitochondrialen DNA zur Entwicklung der AMD beitragen (Barron et al. 2001; zusammengefasst in Ding et al. 2009; Kenney et al. 2010).

1.1.3.2 Umweltfaktoren als Risikofaktoren für die Entstehung der AMD

Neben dem Alter tragen äußere Umwelteinflüsse oder Verhaltensweisen als modifizierbare Risikofaktoren zur Entstehung der AMD bei. Dabei wurde vor allem Rauchen mit der Entstehung der AMD assoziiert, aber auch als zusätzlicher Risikofaktor für die Progression von der Frühform zu einer der AMD-Spätformen genannt (Age-Related Eye Disease Study Research Group (AREDS) 2000; Smith et al. 2001; zusammengefasst in Evans 2001; Age-Related Eye Disease Study Research Group (AREDS) 2005; Cong et al. 2008; zusammengefasst in Chakravarthy et al. 2010b; Lawrenson und Evans 2013). Rauchende haben dabei ein fast zweifach höheres Risiko, eine AMD-Spätform zu entwickeln als Nichtraucher (Vinding et al. 1992; Vingerling et al. 1996; Delcourt et al. 1998; zusammengefasst in Swaroop et al. 2009). Eine mögliche Erklärung dafür kann der Einfluss des Rauchens auf die choroidale Blutzirkulation und damit verbundene Prozesse wie Hypoxie, Ischämie und Mikroinfarkte in Gefäßen sein, da diese Veränderungen zur Degeneration verschiedener Strukturen in der Netzhaut führen könnten. Eine weitere Erklärung für den schädlichen Effekt des Rauchens wäre ein erhöhter oxidativer Stress auf retinale Strukturen und gleichzeitig eine Reduktion von Antioxidantien, wie den Carotinoiden Lutein und Zeaxantin, was zu Schädigungen der Netzhaut führen könnte (zusammengefasst in Solberg et al. 1998; sowie Ding et al. 2009).

Zusätzlich wird ein erhöhter Body-Mass-Index als möglicher Risikofaktor diskutiert (Seddon et al. 2003; zusammengefasst in Zhang et al. 2016). Dabei wird vermutet, dass hohes Körpergewicht zu vermehrtem oxidativem Stress führt, inflammatorische Prozesse fördert und Veränderungen von Lipiden und Lipoproteinen im Blut hervorruft,

Einleitung

was wiederum die AMD begünstigen könnte (Keaney et al. 2003; zusammengefasst in Johnson 2005; sowie Zhang et al. 2016).

Auch UV- und Sonnenlicht-Exposition wird in mehreren Studien als AMD-Risikofaktor angesehen (Cruickshanks 1993; Miguel et al. 2003; Roduit und Schorderet 2008; Youn et al. 2010), was allerdings noch nicht bestätigt ist (Darzins et al. 1997; Delcourt 2001; Khan et al. 2006). In diesem Zusammenhang wurden unter UV-Licht Bestrahlung in RPE Zellen pathologische Prozesse wie eine verstärkte Apoptose, verringerte phagozytotische Aktivität und Degradierung von DNA und Mitochondrien beobachtet (Roduit und Schorderet 2008; Youn et al. 2010).

Darüberhinaus wird ein Zusammenhang mit anderen Erkrankungen diskutiert, wobei beispielsweise kardiovaskuläre Risikofaktoren wie ein erhöhter Gesamtcholesterin/HDL-Quotient, Diabetes, kardiovaskuläre Ereignisse oder ein erhöhter systolischer Blutdruck mit der AMD assoziiert werden (Klein et al. 2003; Tan et al. 2007; Pennington und DeAngelis 2016).

Auch einer vorangegangenen Katarakt-Operation wird ein erhöhtes Risiko für die Entstehung der AMD nachgesagt (Klein et al. 2002; Wang et al. 2003; z.B. Cugati et al. 2006; zusammengefasst in Casparis et al. 2017). Die bisherigen Ergebnisse verschiedener Studien sind diesbezüglich jedoch inkonsistent (zusammengefasst in Bockelbrink et al. 2008; sowie Ehmann und Ho 2017).

1.1.3.3 Ethnizität und AMD-Risiko

Als weiterer wichtiger Risikofaktor gilt die Ethnizität. Wie zuvor in Kapitel 1.1.1 erwähnt, haben Menschen europäischer Herkunft ein signifikant höheres Risiko zur Ausbildung einer AMD als Menschen asiatischer oder afrikanischer Herkunft (Klein et al. 2006; zusammengefasst in Wong et al. 2014). Obwohl Drusen im Alter sowohl in der kaukasischen Bevölkerung als auch bei Nicht-Kaukasiern gleichermaßen vorkommen, entwickeln hellhäutige Menschen vermehrt größere Drusen und Pigmentveränderungen. Des Weiteren sind Unterschiede bei der Ausbildung von fortgeschrittenen AMD-Formen erkennbar, die bei hellhäutiger Bevölkerung vermehrt auftreten (Friedman et al. 1999; Frank et al. 2000; Smith et al. 2001; Bressler et al. 2008; zusammengefasst in Lambert et al. 2016). Als eine mögliche Erklärung gilt der

Einleitung

unterschiedliche Melanin Gehalt im RPE, da Melanin möglicherweise protektiv gegen freie Radikale wirkt (Jampol und Tielsch 1992).

Ein weiterer Einfluss könnte von der Irisfarbe ausgehen, da in mehreren Studien eine helle Färbung der Iris mit einem bis zu zweifach erhöhten Risiko einer AMD einhergeht (Frank et al. 2000; Nicolas et al. 2003; zusammengefasst in Lambert et al. 2016). Als Grund wird hierfür ebenfalls ein höherer Melanin Gehalt und höhere okuläre Pigmentierung bei dunkler Irisfärbung angegeben, die zu reduziertem Einfall und verringerter Absorption von Licht ins Auge führen und somit oxidative Schäden reduzieren könnten (Weiter et al. 1985; Jampol und Tielsch 1992; Sandberg et al. 1994).

1.1.3.4 Genetische Risikofaktoren für die AMD

Genetische Faktoren tragen in erheblichem Maße zum AMD-Risiko bei. Ihr Einfluss wird auf 46 % bis 71 % geschätzt (Seddon et al. 2005).

Zur Analyse des genetischen Hintergrundes von komplexen Erkrankungen werden genomweite Assoziationsstudien (GWAS) durchgeführt. Dabei werden, in Form einer Fall-Kontroll-Studie, sowohl Probanden mit der zu untersuchenden Erkrankung als auch gesunde Kontrollprobanden genotypisiert und deren DNA-Varianten verglichen. Sind Allelfrequenzen bei Erkrankten und Kontrollpersonen statistisch signifikant unterschiedlich, gilt dieses Gen als assoziiert mit der Erkrankung (Pearson und Manolio 2008).

In der aktuellsten und größten GWAS aus dem Jahr 2016, einer Meta-Analyse mit jeweils über 16.000 europäischen Erkrankten und Kontrollpersonen, wurden insgesamt 52 unabhängige, AMD-assoziierte Varianten auf 34 verschiedenen Genloci identifiziert, die genomweite Signifikanz (GWS, $p < 5 \times 10^{-8}$) erreichten (Fritsche et al. 2016). Die stärksten Assoziationssignale wurden dabei, wie schon in verschiedenen Studien zuvor (Klein et al. 2005; Haines et al. 2005; Edwards et al. 2005; Jakobsdottir et al. 2005; Rivera et al. 2005; Fritsche et al. 2008), bei den Sequenzvariationen im age-related maculopathy susceptibility 2 / high-temperature requirement A serine peptidase 1 (*ARMS2/HTRA1*) Genlocus und Complement factor H (*CFH*) Gen beobachtet. Weitere 16 schon zuvor mit der AMD assoziierte Loci, wie zum Beispiel die Gene Complement factor I (*CFI*) (Fagerness et al. 2009; van de Ven et al. 2013),

Einleitung

Vascular endothelial growth factor A (*VEGFA*) (Churchill et al. 2006; Richardson et al. 2007; Lin et al. 2008; Janik-Papis et al. 2009) oder Synapsin 3-TIMP metallopeptidase inhibitor 3 (*SYN3-TIMP3*) (Kaur et al. 2010; Chen et al. 2010a) wurden im Rahmen dieser Studie verifiziert. Zusätzlich wurden 16, zuvor noch nicht bekannte Loci identifiziert, die ebenfalls eine genomweit signifikante Assoziation mit der AMD aufwiesen, wie zum Beispiel ATP Binding Cassette Subfamily A Member 1 (*ABCA1*), Matrix metallopeptidase 9 (*MMP9*) und Chymotrypsinogen B2-Chymotrypsinogen B1 (*CTRB2-CTRB1*) (Fritsche et al. 2016).

1.1.4 Pathomechanismen der AMD

Verschiedene molekulare und biochemische Prozesse tragen zur Entstehung der AMD bei.

Eine Vielzahl von Studien weist auf eine Fehlregulation des Komplementsystems im Zuge der AMD Pathogenese hin (unter anderem Johnson et al. 2001; Kumar et al. 2004; Hageman et al. 2005; zusammengefasst in Sivaprasad und Chong 2006; Scholl et al. 2008; Frederick und Kleinman 2014). Das Komplementsystem ist ein Teil des angeborenen Immunsystems und aktiviert über verschiedene Signalwege Enzymkaskaden, die wiederum zum Zelltod führen oder Entzündungsreaktionen auslösen (zusammengefasst in Cooper 1985; Müller-Eberhard 1988; Walport 2001; sowie Dunkelberger und Song 2010). Verschiedene Komponenten, welche in Entzündungsreaktionen eine Rolle spielen, beispielsweise der Entzündungsmarker CRP (C-reaktive protein) oder sFasL (soluble Fas-ligand), sICAM-1 (soluble intercellular adhesion molecule-1) und sTNFRII (TNF- α receptor II), wurden in erhöhten Konzentrationen bereits mit einem verstärkten AMD Risiko assoziiert (zusammengefasst in Kauppinen et al. 2016). Die Netzhaut reagiert auf Gefahrensignale, welche auch häufig in der AMD Pathogenese vorkommen, mit einer Aktivierung eines Inflammasom-Komplexes, welcher die Bildung von aktiven Zytokinen IL-18 (Interleukin-18) und IL-1 β (Interleukin-1 β) fördert (zusammengefasst in Ambati et al. 2013). Inflammasomen-Aktivierung und erhöhte Werte von IL-18 und IL-1 β wurden dabei ebenfalls mit einem erhöhten AMD Risiko in Verbindung gebracht (zusammengefasst in Ambati et al. 2013). Des Weiteren wurden in molekularen Untersuchungen von AMD-assoziierten Drusen Bestandteile des

Einleitung

Komplementsystems, wie der terminale Komplement Komplex C5b-9, Komplementfaktoren 3, 8 oder 9 und Komplement Regulatoren, wie Clusterin oder Vitronectin, nachgewiesen (Mullins et al. 2000; Crabb et al. 2002; Anderson et al. 2004). Zudem wurden einige AMD-assoziierte Polymorphismen in Genen gefunden, die für Faktoren des Komplementsystems kodieren (zusammengefasst in Geerlings et al. 2017). Dazu gehören unter anderem *CFH* (Edwards et al. 2005; Hageman et al. 2005; Haines et al. 2005), Complement component 2 / complement factor B (*C2/CFB*) (Gold et al. 2006), Complement component 3 (*C3*) (Helgason et al. 2013; Maller et al. 2007; Yates et al. 2007), *CFI* (Fagerness et al. 2009; van de Ven et al. 2013) oder *VTN* (Fritsche et al. 2016).

Reaktive Sauerstoffspezies (*Reactive Oxygen Species, ROS*) spielen ebenfalls eine Rolle bei pathophysiologischen Inflammationsreaktionen und Autophagie-Prozessen der AMD. Sie werden unter physiologischen Bedingungen bei der Reduktion von molekularem Sauerstoff in der Atmungskette in Mitochondrien, sowie bei enzymatischen Reaktionen und als Reaktion auf UV-Licht Exposition und ionisierende Strahlung gebildet (zusammengefasst in Nita und Grzybowski 2016). Durch ein Ungleichgewicht zwischen Bildung und Abbau von ROS und verstärkter Bildung der ROS im Alter kommt es zur Entstehung von oxidativem Stress, der wiederum zur Schädigung von Biomolekülen in Zellen und Geweben führen kann (Harman 1981; Grune et al. 2005). Dabei werden unter anderem Proteine angegriffen und es kommt zu einer Störung der proteasomalen und lysosomalen Systeme, welche im gesunden Zustand als antioxidative Schutzmechanismen gelten (zusammengefasst in Höhn et al. 2013). Dies könnte zu Lipofuszin-Ablagerungen in Netzhaut und RPE führen, welche aus oxidiertem Material von Proteinen und Lipiden bestehen (zusammengefasst in Höhn et al. 2013). Inwiefern Lipofuszin-Ablagerungen jedoch die AMD beeinflussen, wird aktuell noch widersprüchlich diskutiert (zusammengefasst in Lambris et al. 2010; Boyer et al. 2012; Zhao et al. 2017). Des Weiteren bilden die Lipide in der Netzhaut in Gegenwart von ROS sogenannte „advanced lipid peroxidation end-products“, spezielle Endprodukte der Lipidperoxidation, welche einen schädigenden Einfluss auf Photorezeptoren oder andere Strukturen der Netzhaut ausüben (zusammengefasst in Catalá 2006; sowie Kishan et al. 2011).

Einleitung

Neben der Oxidation von Lipiden, soll auch eine Veränderung im Lipidmetabolismus einen Einfluss auf die AMD haben (Xu et al. 2018). Dabei wurden in einer Studie erhöhte HDL (High density lipoprotein)-Werte mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung der frühen und späten AMD-Formen assoziiert (Cougnard-Grégoire et al. 2014). Weiterhin wird die Anreicherung von Apolipoprotein B in der Bruch'schen Membran im erhöhten Alter mit der Entstehung von AMD-typischen Läsionen, wie Drusen und basalen Ablagerungen in Verbindung gebracht (Curcio et al. 2009). Des Weiteren wurden Variationen im *APOE*-Gen, welche drei Allele des *APOE*-Gens (*APOE2*, *APOE3*, und *APOE4*) definieren, mit der AMD assoziiert. Die *APOE2*-Isoform scheint dabei als prädisponierender Faktor zu gelten, während *APOE4* protektiv wirkt (Fritsche et al. 2009; McKay et al. 2011). Schließlich sind Lipide, dabei vor allem Cholesterol und Phosphatidylcholin, ein bedeutender Bestandteil in Drusen und machen bis zu 40 % des Drusen-Volumens aus (Wang et al. 2010).

Auch die Fehlregulation von Signalwegen gerät immer häufiger in den Fokus als zusätzlicher Faktor bei der Entstehung der AMD. Zahlreiche Publikationen weisen dabei im Speziellen auf eine Beteiligung des Mitogen-activated protein kinase (MAPK) Signalwegs hin. So ist dieser an der Aktivierung von VEGF und somit an der Regulation der Angiogenese beteiligt, die wiederum ein wichtiger pathologischer Prozess bei der CNV ist (Curry et al. 2008; Liu et al. 2010; Xie et al. 2011). Auch durch oxidativen Stress, welcher ein wichtiger Pathomechanismus der AMD ist und unter anderem zur Schädigung von RPE Zellen führen kann, kommt es zu einer Aktivierung des MAPK Signalweges (Wang et al. 1998; Ho et al. 2006; zusammengefasst in Kyosseva 2016). Des Weiteren berichteten Dridi und Kollegen im Jahr 2012, dass die Degeneration von RPE Zellen, welche durch *Alu* RNA/DICER1 Mangel induziert wird, über eine Aktivierung des MAPK Signalweges vermittelt wird (Dridi et al. 2012). MAPKs wurden zudem mit der Regulation verschiedener inflammatorischer Prozesse in der Netzhaut in Verbindung gebracht (Guo et al. 2014). Schließlich wurden von SanGiovanni und Lee im Jahr 2013 Sequenzvariationen in Genen beschrieben, die als MAPK Regulatoren bekannt sind (SanGiovanni und Lee 2013).

Inwiefern diese molekularen Prozesse die AMD-assoziierten zellulären Prozesse wie Apoptose, RPE-Fehlfunktion, strukturelle Veränderungen der Photorezeptoren oder choroidale Neovaskularisation genau beeinflussen, ist jedoch weiterhin unklar.

1.1.5 Aktueller Stand der Therapie

Als präventive Maßnahmen für die Entwicklung einer AMD werden neben der Vermeidung von Risikofaktoren, wie Rauchen, auch Nahrungsergänzungsmittel, zum Beispiel in Form von Antioxidantien, Omega-3 Fettsäuren, Carotinoiden und Vitaminen diskutiert (Seddon et al. 1994; Moschos et al. 2018). Die AREDS Forschungsgruppe berichtete über eine verzögerte Progression der frühen AMD Stadien zu Spätformen durch antioxidative Nahrungsergänzung in Form von Vitamin E, Vitamin C, Zink und Beta-Carotin oder Lutein/Zeaxantin (Age-Related Eye Disease Study Research Group (AREDS) 2001). Ähnliche Ergebnisse, die ebenfalls eine mögliche verlangsamte AMD-Progression durch antioxidative Vitamine und Mineralstoffe als Nahrungsergänzung zeigten, wurden durch Evans und Kollegen veröffentlicht (Evans und Lawrenson 2017b). Jedoch können Vitamin- und Antioxidativa-Supplementationen die Entstehung einer AMD-Erkrankung nicht verhindern oder verzögern (Evans und Lawrenson 2017a).

Für die Behandlung der AMD gibt es derzeit nur sehr begrenzt therapeutische Optionen, weswegen sich derzeit viele Studien mit potentiellen therapeutischen Ansätzen für die AMD befassen (zusammengefasst in Bandello et al. 2017). Während für die GA bislang noch keine wirksame Therapie vorliegt, gibt es bei der seltener vorkommenden CNV inzwischen erfolgsversprechende Maßnahmen zur Behandlung (zusammengefasst in Lim et al. 2012; sowie Sacconi et al. 2017). Diese beruhen auf einer Inhibition des VEGF, welcher eine bedeutende Rolle bei der Entstehung der neovaskulären Form der AMD spielt, da er das Auswachsen neuer Blutgefäße stimuliert (Aiello et al. 1994). Zu den momentan verfügbaren und FDA (Food and Drug Administration) geprüften Medikamenten für die AMD zählen zum Beispiel Macugen™ (Gragoudas et al. 2004), Lucentis™ (Rosenfeld et al. 2006) oder Eylea™ (Heier et al. 2012). Die Wirkung dieser Medikamente liegt in der Blockierung der VEGF-Aktivität, beispielsweise durch die Bindung eines 28 Basen langen RNA Aptamers an VEGF (Pegaptanib, Macugen™) oder durch die VEGF Bindung durch zielgerichtete monoklonale Antikörper (Ranibizumab, Lucentis™). Aflibercept, Eylea™ wirkt als eine Art Rezeptorattrappe, die VEGF bindet, aber keine Signale weiterleitet (Gragoudas et al. 2004; zusammengefasst in Mousa und Mousa 2010). Alle oben genannten Medikamente werden als intravitale Injektionen in verschiedenen Zeitabständen

Einleitung

angewandt, die je nach Therapeutikum unterschiedlich sein können (zusammengefasst in Mousa und Mousa 2010).

Für die Spätform GA finden präklinische und klinische Studien statt, um mögliche therapeutische Ansätze, wie zum Beispiel die Minderung retinaler Toxine, Komplementinhibition, antiinflammatorische Intervention, Neuroprotektion oder Minderung von oxidativem Stress zu testen (zusammengefasst in Schmitz-Valckenberg et al. 2010; sowie Holz et al. 2014). Die Hoffnung besteht für die Zukunft vor allem darin, neue Ansätze durch ein besseres Verständnis der Pathogenese und der pathophysiologischen Prozesse der AMD zu erhalten.

1.2 Eine mögliche Rolle des Neurturin (NRTN) in der AMD-Pathogenese

Aktuelle Studien am Institut für Humangenetik der Universität Regensburg beschäftigen sich mit der funktionellen Analyse AMD-assoziiierter Variationen in Genen, welche mit dem MAPK Signalweg in Verbindung stehen. So soll eine mögliche Beteiligung des MAPK Signalwegs in der AMD-Pathogenese untersucht werden und gleichzeitig sollen Einblicke in weitere und womöglich neuartige, durch diese Gene beeinflusste, Pathomechanismen der AMD erhalten werden.

Für das im Rahmen dieser Dissertation bearbeitete Projekt wurden aus dem von Fritsche und Kollegen im Jahr 2016 publizierten GWAS-Datensatz (Fritsche et al. 2016) Gene ausgewählt, deren AMD-assoziierte Varianten in vielversprechenden Regionen, wie zum Beispiel in kodierenden Sequenzen oder in der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) liegen und die somit mit höherer Wahrscheinlichkeit einen Effekt auf die Proteinfunktion ausüben als zum Beispiel Varianten, die weit entfernt im intronischen Bereich liegen. Zudem sollten die Gene in einem Zusammenhang mit dem MAPK Signalweg stehen und bereits in wissenschaftlichen Publikationen mit der AMD oder mit AMD-assoziierten pathologischen Prozessen in Verbindung gebracht worden sein.

Im Rahmen dieses Auswahlverfahrens wurde das *NRTN*-Gen mit dem AMD-assoziierten Einzelnukleotid-Polymorphismus (Single Nucleotid Polymorphism, SNP) rs79744308:G>A als Kandidat für weitere funktionelle Analysen ermittelt. Der SNP rs79744308 befindet sich auf Chromosom 19p13.3, steht in einem fast vollständigen

Einleitung

Kopplungsungleichgewicht mit rs12019136, dem Lead-SNP dieser Region ($D' = 1,00$; berechnet nach Machiela und Chanock 2015), und ist in Exon 2 des *NRTN*-Gens lokalisiert. Er führt durch einen Basentausch von Guanin zu Adenin zu einer Missense-Mutation mit einem Aminosäureaustausch von Alanin zu Threonin an Aminosäure-Position 59 im kodierten Protein NRTN.

1.2.1 Das Protein Neurturin (NRTN) – Aufbau

Das humane *NRTN*-Gen weist 2 Exone auf und kodiert für das 197 Aminosäuren (AS) umfassende Protein NRTN (Kotzbauer et al. 1996).

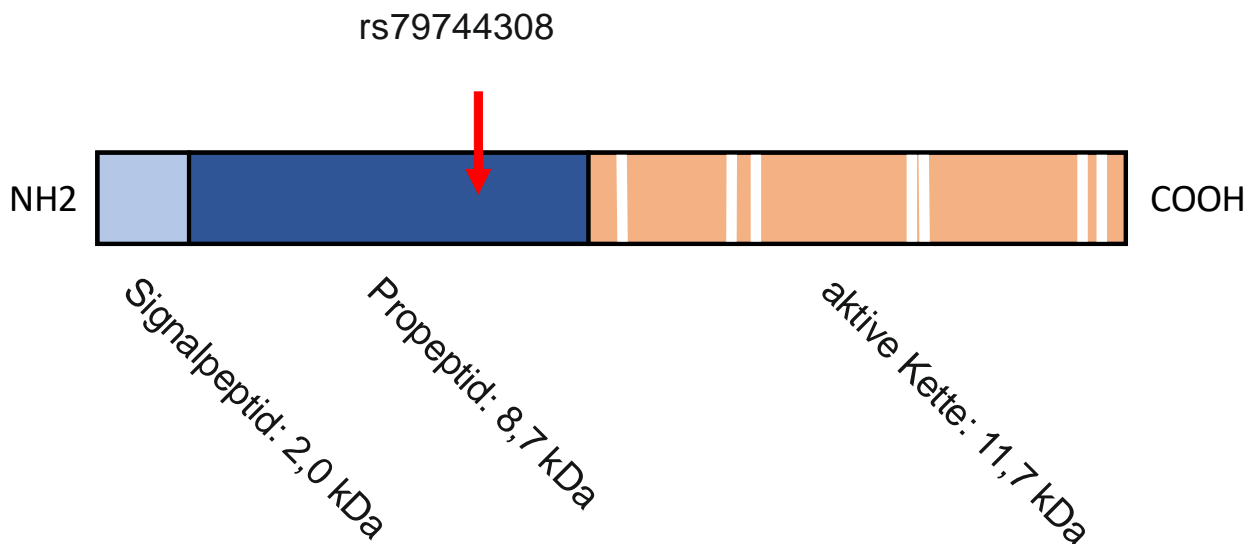


Abbildung 2: Darstellung des NRTN-Proteins

Schematisch dargestellt sind die verschiedenen Domänen des NRTN-Proteins, die Position des SNP rs79744308 (roter Pfeil) in der Propeptidregion und konservierte Cysteinreste (weiße vertikale Linien) (modifiziert nach Saarma und Sariola, 1999)

Das sezernierte NRTN besteht aus einem 19 AS langen Signalpeptid, welches im Zuge der Sezernierung abgespalten wird, einem Propeptid aus 76 AS und einer aktiven Kette aus 102 AS (siehe Abbildung 2). NRTN zählt zur Transforming Growth Factor- β (TGF- β) Superfamilie, da es wie andere Mitglieder der TGF- β Superfamilie sieben charakteristisch, konservierte Cysteinreste (siehe Abbildung 2, weiße vertikale Linien) besitzt. Die 33 TGF- β Mitglieder sind multifunktionelle Wachstumsfaktoren mit der typischen Struktur sekretierter Signalmoleküle. Sie werden als Vorläufermoleküle

Einleitung

synthetisiert und erreichen durch Abspaltung der Propeptidregion die reife, sezernierte Proteinform. Die Gemeinsamkeit aller Mitglieder ist die Cysteinknoten-Struktur aus sieben Cysteinresten an ähnlichen Stellen im Protein (zusammengefasst in Clark und Coker 1998; Saarma und Sariola 1999; Saarma et al. 2000; sowie Hinck et al. 2016). Die AS-Sequenz weist zu anderen Mitgliedern der TGF- β Superfamilie lediglich ca. 20 % identische AS auf (Kotzbauer et al. 1996). Hingegen haben NRTN und der Glial Cell Line Derived Neurotrophic Factor (GDNF) zu 42 % identische AS und bilden mit Artemin (ART) und Persephin (PSP) eine Unterfamilie der TGF- β Superfamilie, die GDNF-Familie neurotropher Faktoren (Kotzbauer et al. 1996). Ein deutlicher Unterschied zwischen den Mitgliedern der GDNF-Unterfamilie und den Mitgliedern der TGF- β Superfamilie ist die Signalübertragung, welche bei GDNF, NRTN, ART und PSP über die Rezeptor-Tyrosinkinase RET (Rearranged during transfection) und nicht über Rezeptor Serin/Threonin Kinasen vermittelt wird (zusammengefasst in Saarma et al. 2000; Bigalke et al. 2019).

Der AMD-assoziierte SNP rs79744308 befindet sich in der Propeptid-Region des NRTN-Proteins, welche bei Aktivierung des Proteins abgespalten wird (Fjord-Larsen et al. 2005).

1.2.2 Funktionen des NRTN-Proteins

Das sezernierte NRTN bindet hauptsächlich den GDNF Family Rezeptor $\alpha 2$ (GFR $\alpha 2$), wobei auch eine Bindung an GFR $\alpha 1$ möglich ist. Diese Rezeptoren sind über einen Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI) Anker in der äußeren Zellmembran befestigt, fungieren als Teil eines Multikomponenten-Rezeptorkomplexes und aktivieren dann als Liganden-Rezeptor-Komplex die Rezeptor-Tyrosinkinase RET. Das führt wiederum zur Autophosphorylierung der intrazellulär liegenden Tyrosinkinase-Domänen des RET-Rezeptors und endet schließlich in der Aktivierung intrazellulärer Signalwege, wie dem RAS/Extrazellulär Signal-regulierte Kinase (ERK), Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase (PI3K)/AKT, p38 MAPK and c-Jun N-terminale Kinase (JNK) Signalweg (Kotzbauer et al. 1996; Baloh et al. 1997; Buj-Bello et al. 1997; Klein et al. 1997; Trupp et al. 1998; zusammengefasst in Saarma und Sariola 1999; sowie Takahashi 2001). Weiterhin wird eine starke Bindung von NRTN an Heparin und verwandte Heparansulfate, die vor allem in der Extrazellulären Matrix (EZM) und auf der Zelloberfläche vorkommen,

Einleitung

beschrieben (Alfano et al. 2007; Bespalov et al. 2011; zusammengefasst in Rider und Mulloy 2017). Dabei wird sogar vermutet, dass NRTN eine spezifische Bindestelle für Heparansulfate besitzt, durch welche NRTN stark an der Zellmembran angereichert wird (Sandmark et al. 2018; Bigalke et al. 2019). Diese Heparansulfate stehen im Verdacht, einen Einfluss auf die Signalübertragung vom Ligand-GRF α -RET Komplex zu haben, wobei in der Literatur dazu widersprüchliche Informationen zu finden sind (Barnett 2002; Davies et al. 2003; Sandmark et al. 2018).

NRTN ist ein Mitglied der GDNF-Familie und somit als neurotropher Faktor bekannt, der Wachstum, Überleben und Differenzierung von Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems, sowohl während der Entwicklung, als auch im ausgewachsenen Organismus, fördert (Lin et al. 1993; Arenas et al. 1995; Buj-Bello et al. 1995; Kotzbauer et al. 1996; Golden et al. 1998; zusammengefasst in Saarma und Sariola 1999; Wolf et al. 2008).

Im Jahr 1997 wurde erstmals die NRTN- (und GDNF-) Expression in der Netzhaut beschrieben (Nosrat et al. 1996; Widenfalk et al. 1997; Jomary et al. 1999). Die mRNA Expression von NRTN und dessen Rezeptor GFR α 2 wurde in Mäuseretinae vor allem in Zellen der inneren und äußeren plexiformen Schicht (IPL, OPL), den äußeren Photorezeptor-Segmenten und in Zellen der Ganglien-Zellschicht (GCL) lokalisiert (Jomary et al. 1999). In Rattenaugen wurde NRTN hingegen in der GCL und inneren nukleären Schicht (INL) entdeckt (Harada et al. 2003). Nachdem gezeigt wurde, dass der Faktor GDNF in axotomierten retinalen Ganglionzellen (RGC) einen neuroprotektiven Effekt hat und das Überleben der RGCs deutlich erhöht (Klöcker et al. 1997; Koeberle und Ball 1998), wurde aufgrund der starken strukturellen Ähnlichkeit und der Expression von NRTN in der Netzhaut vermutet, dass NRTN ebenfalls eine neuroprotektive Funktion in der menschlichen Netzhaut einnehmen kann. Dies wurde einige Jahre später von Koeberle und Ball bestätigt, die zeigten, dass intraokuläre NRTN-Injektionen innerhalb von 14 Tagen nach Transsektion des Nervus opticus das Überleben von RGCs signifikant verbesserten (Koeberle und Ball 2002).

Neben der Aufgabe zur Aufrechterhaltung einer normalen retinalen Funktion, wird NRTN auch eine bedeutende Rolle bei der retinalen Entwicklung zugeschrieben. Dabei wurde festgestellt, dass NRTN Knockout Mäuse eine dünnere und abnormale äußere plexiforme Schicht (OPL) mit veränderten synaptischen Verbindungen

Einleitung

zwischen Photorezeptoren, Horizontal- und Bipolarzellen ausbilden als NRTN Wildtyp Mäuse (Brantley et al. 2008). Daher soll NRTN die Differenzierung von Horizontal- und Bipolarzellen stimulieren und die Bildung der äußeren plexiformen Schicht in der Netzhaut fördern (Brantley et al. 2008; Wolf et al. 2008; Hoover et al. 2014).

Initial kommt es dabei in primären Neuronen über den Transmembranrezeptor RET sowohl zur Aktivierung des MAPK, als auch des Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3-K) Signalwegs (Creedon et al. 1997; Wolf et al. 2008).

Derzeit wird NRTN als mögliches therapeutisches Agens zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen, wie beispielsweise Morbus Parkinson, diskutiert, da es ebenfalls einen protektiven Effekt auf dopaminerge Neuronen im Mittelhirn aufweist (Marks et al. 2010; zusammengefasst in Lindholm et al. 2016; Axelsen und Woldbye 2018). Allerdings konnten klinische Phase 2 Studien diesen therapeutischen Ansatz noch nicht als wirksam belegen, da durch sehr starke Bindeaffinität von NRTN an Heparansulfat-Proteoglykane in der EZM bzw. auf der Zelloberfläche die Verteilung von NRTN im sehr großflächigen Hirngewebe verhindert wird und es somit nur kurzzeitig wirken kann (Hamilton et al. 2001; Bernalov et al. 2011; Runeberg-Roos et al. 2016).

1.3 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von NRTN in der AMD-Pathogenese zu beleuchten. Hierfür wurden verschiedene Modellsysteme, wie neuronale oder retinale Zelllinien, eingesetzt. NRTN sollte diesen aufgereinigt oder durch heterologe Überexpression zugeführt werden. Nach Überprüfung der NRTN-Bindung an die Membranoberflächen der jeweiligen Zelllinien sollte der Einfluss von NRTN auf die MAPK Aktivierung sowie auf charakteristische Prozesse der AMD-Pathogenese wie Autophagie, neuronale Viabilität und Differenzierung oder die Reaktion auf oxidativen Stress untersucht werden. Gleichzeitig sollte die funktionelle Auswirkung des AMD-assoziierten Polymorphismus rs79744308 auf die Funktion des NRTN-Proteins analysiert werden.

Einleitung

Durch diese Arbeiten sollte das Verständnis der initialen Pathomechanismen der AMD vertieft werden. Diese Erkenntnisse könnten langfristig Ansätze für therapeutische Optionen liefern (z.B. über eine Regulation des MAPK Signalweges).

2 Material

2.1 Zellen und Organismen

2.1.1 *Escherichia coli* (*E. coli*)

Tabelle 1: Aufgelistet ist der in dieser Arbeit verwendete *Escherichia coli* (*E. coli*) Stamm und seine Quelle.

Stamm	Quelle
<i>E.coli</i> strain DH5α	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

2.1.2 Zelllinien

Tabelle 2: Aufgelistet ist die in der Arbeit verwendete Zelllinie, ihr Ursprungsorganismus, ihr Ursprungszelltyp und ihre Quelle.

Zelllinie	Ursprungsorganismus	Ursprungszelltyp	Quelle
ARPE-19	<i>Homo sapiens</i>	retinale Pigmentepithelzellen	ATCC; LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland
BV2	<i>Mus musculus</i>	Mikroglia-Zellen	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Thomas Langmann, Zentrum für Augenheilkunde, Universitätsklinikum Köln, Deutschland
Hek293 EBNA	<i>Homo sapiens</i>	embryonale Nierenzellen	ATCC; LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland
HUVEC	<i>Homo sapiens</i>	Gefäßendothelzellen der Nabelschnurvene	ATCC; LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland
hiPSC-RPE *	<i>Homo sapiens</i>	Humane, aus pluripotenten Stammzellen induzierte RPE Zellen	Institut für Humangenetik, Universität Regensburg, Deutschland
Weri-Rb1	<i>Homo sapiens</i>	Retinoblastomzellen	ATCC; LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland
Y-79	<i>Homo sapiens</i>	Retinoblastomzellen	ATCC; LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland

* Die Generierung und Analyse der hiPSC-RPE-Zellen aus humanem Donor-Material wurden durch das Ethikkomitee der Universität Regensburg genehmigt (Referenz-Nr. 12-101-0241 und Amendment zu 12-101-0241)

2.2 Oligonukleotide

Tabelle 3: Aufgelistet sind alle in der Arbeit verwendeten Primer, ihre 5'-3'-Sequenz und ihr Verwendungszweck.

Primername	5'-3'-Sequenz	Verwendungszweck
BGH_R	TAGAAGGCACAGTCGAGG	Sequenzierung von pcDNA3 Konstrukten
hCD46-RT-F	AATTTGTGTTGTCCCGTACAGA	Taqman-Analyse
hCD46-RT-R	TCTGTGGGTCTCATCAGTTAGG	Taqman-Analyse
hFOS-qRT-F	ACTACCACTCACCCGCAGAC	Taqman-Analyse
hFOS-qRT-R	CCAGGTCCGTGCAGAAGT	Taqman-Analyse
hHPRT1-qRT-F	TGATAGATCCATTCTATGACTGTAGA	Taqman-Analyse
hHPRT1-qRT-R	AAGACATTCTTTCCAGTTAAAGTTGAG	Taqman-Analyse
hp21-qRT-F	TCACTGTCTTGTACCCTTGTGC	Taqman-Analyse
hp21-qRT-R	GGCGTTTGGAGTGGTAGAAA	Taqman-Analyse
hVEGF-qRT-F	GCAGCTTGAGTTAAACGAACG	Taqman-Analyse
hVEGF-qRT-R	GGTTCCCGAAACCCTGAG	Taqman-Analyse
NRTN_BamHI_F	GGATCCATGCAGCGCTGGAAGGCGGC GGCC	Sequenzierung der pcDNA3 und pcDNA4 Konstrukte
NRTN_XhoI_R	CTCGAGTCACACGCAGGCGCACTCGC GCGC	Sequenzierung der pcDNA3 und pcDNA4 Konstrukte
RT_pCAG_GFP_EG FP_F	ACGTAAACGGCCACAAGTTC	Sequenzierung der pcDNA3 und pcDNA4 Konstrukte
T7_F	TAATACGACTCACTATAGGG	Sequenzierung von pcDNA3 Konstrukten

2.3 Plasmide und Expressionskonstrukte

Tabelle 4: Aufgelistet sind alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide/ Expressionskonstrukte, ihr Verwendungszweck und ihre Quelle.

Vektor	Verwendungszweck	Quelle
pcDNA3_GFP	Expression	Institut für Humangenetik, Universität Regensburg
pcDNA3_NRTN:G	Klonierung; Expression von NRTN:G	Institut für Humangenetik, Universität Regensburg
pcDNA3_NRTN:A	Klonierung; Expression von NRTN:A (protektive NRTN Variante)	Institut für Humangenetik, Universität Regensburg
pcDNA3_Myc_NRTN:G	Expression	Institut für Humangenetik, Universität Regensburg
pcDNA3_Myc_NRTN:A	Expression	Institut für Humangenetik, Universität Regensburg
pcDNA4_GFP	Klonierung; Expression	Institut für Humangenetik, Universität Regensburg

Material

pcDNA4_GFP_NRTN:G	Expression	Generiert im Rahmen dieser Arbeit
pcDNA4_GFP_NRTN:A	Expression	Generiert im Rahmen dieser Arbeit

2.4 Primäre Antikörper

Tabelle 5: Aufgelistet sind alle in der Arbeit verwendeten primären Antikörper, ihr Typ, ihre Spezies, ihre Verdünnung, ihr Verwendungszweck und ihre Quelle.

Antikörper gegen	Typ	Spezies	Verdünnung	Verwendungszweck	Quelle
β-Aktin (#A5441)	mAK	Maus	1:10000 in Milch	WB	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Elastin	pAK	Kaninchen	1:200 in Milch	WB	(Calbiochem) Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
GFP	pAK	Kaninchen	1:10000 in Milch	WB	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA
LC3B (#4108)	pAK	Kaninchen	1:1000 in BSA	WB	Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA
Myc-Tag (9B11) (#2276)	mAK	Maus	1:1000 in Milch	WB	Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA
NRTN (#MBS420928)	pAK	Ziege	1:2000 in Milch	WB	MyBioSource, Inc., San Diego, CA, USA
NRTN (#MBS420928)	pAK	Ziege	1:1000 in Milch	WB	MyBioSource, Inc., San Diego, CA, USA
p-62 (SQSTM1)	mAK	Kaninchen	1:1000 in BSA	WB	Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA
p44/42 MAPK (Erk1/2) (137F5)	mAK	Kaninchen	1:2000 in BSA	WB	Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204), (D.13.14.4E) XP®	mAK	Kaninchen	1:2000 in Milch	WB	Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA

pAK: polyklonaler Antikörper, mAK: monoklonaler Antikörper, WB: Western Blot, (#): Herstelleridentifikationsnummern angegeben, wenn vorhanden

2.5 Sekundäre Antikörper

Tabelle 6: Aufgelistet sind alle in der Arbeit verwendeten sekundären Antikörper, ihre Verdünnung, ihr Verwendungszweck und ihre Quelle.

Antikörper	Verdünnung	Verwendungszweck	Quelle
Ziege Anti-Kaninchen IgG, Peroxidase-Konjugat	1:10000	WB	(Calbiochem) Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Ziege Anti-Maus IgG, Peroxidase-Konjugat	1:10000	WB	(Calbiochem) Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Ziege Anti-Ziege IgG, Peroxidase-Konjugat	1:10000	WB	(Calbiochem) Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland

WB: Western Blot

2.6 Enzyme

Tabelle 7: Aufgelistet sind alle in der Arbeit verwendeten Enzyme und ihre Quelle.

Enzym	Quelle
Bam-HI HF	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
GoTaq® DNA Polymerase	Promega Corporation, Madison, WI, USA
Hind III	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Hind III HF	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Kpn I HF	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Not I	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Not I HF	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Psi I	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Stu I	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
T4-DNA Ligase	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Xho I	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Xmn I	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA

2.7 Molekularmassenstandards

Tabelle 8: Aufgelistet sind alle in der Arbeit verwendeten Molekularmassenstandards, ihr Verwendungszweck und ihre Quelle.

Molekularmassenstandard	Verwendungszweck	Quelle
GeneRuler™ DNA Ladder Mix	Molekularmassenstandard für die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Material

PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Molekularmassenstandard für die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
--------------------------------------	---	--

2.8 Kit-Systeme

Tabelle 9: Aufgelistet sind alle in der Arbeit verwendeten Kit-Systeme und ihre Quelle.

Kit-System	Quelle
BigDye Terminator v1.1, v3.1 Cycle Sequencing Kit	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Clarity Max™ Western Blotting Substrate	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Clarity™ Western Blotting Substrate	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Gibco™ N-2 Supplement (100x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
GoTaq® Long PCR Master Mix	Promega Corporation, Madison, WI, USA
Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
NucleoBond® XtraMidi	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
NucleoSpin® Plasmid	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
Pierce™ Anti-c-Myc Agarose	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
P3000 Reagent	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
PureLink™ RNA Mini Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Random Hexamer Primer (100 µM)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
TransIT®-LT1 Transfektionsreagenz	Mirus Bio LLC, Madison, WI, USA
T-4 DNA Ligase Kit	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA

2.9 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 10: Aufgelistet sind alle in der Arbeit verwendeten Chemikalien/ Reagenzien und ihre Quelle.

Chemikalie	Quelle
1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazan, MTT, C ₁₈ H ₁₇ N ₅ S	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)-Stain-Lösung	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactopyranoside, C ₁₄ H ₁₅ BrClNO ₆ (X-Gal)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany

Material

Agarose (Biozym LE)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Germany
Alexa Fluor™ 488-conjugated peanut agglutinin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Ammoniak-Lösung 25%, NH ₃	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumperoxidisulfat (APS), (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ampicillin Natriumsalz, C ₁₆ H ₁₈ N ₃ NaO ₄ S	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Bacto Agar	BD Bioscience, Heidelberg, Germany
Bacto Hefextrakt	BD Bioscience, Heidelberg, Germany
Bromphenolblau Natriumsalz, C ₁₉ H ₉ Br ₄ O ₅ SNa	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Calciumchlorid, CaCl ₂	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Chloroquin, C ₁₈ H ₂₆ ClN ₃	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
cOmplete™ ULTRA Tablets, Mini, EASYpack Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dako Eindeckmedium	Agilent, Santa Clara, CA, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO), C ₂ H ₆ OS	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	Genaxxon Bioscience, Ulm, Deutschland
Dithiothreitol, DTT	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Essigsäure (100 %), C ₂ H ₄ O ₂	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Ethanol ≥99,8 p.a, C ₂ H ₆ O	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid-Lösung, 0,07 %, C ₂₁ H ₂₀ BrN ₃	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat Dinatrium Dihydrat Salz (EDTA), C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ *2H ₂ O	(Titrplex) Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Glutaraldehyd-Lösung, 25 %, C ₅ H ₈ O ₂	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Formaldehyd-Lösung, 37 %, CH ₂ O	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Glycerin 99,5 %, C ₃ H ₈ O ₃	Chemikalienlager der Universität Regensburg
Glycin, C ₂ H ₅ NO ₂	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Glycerin 87 %, C ₃ H ₈ O ₃	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Hefeextrakt	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
HiDi™ Formamid, CH ₃ NO	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Hydrogen peroxide, H ₂ O ₂	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside, C ₉ H ₁₈ O ₅ S (IPTG)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany
Isopropanol, C ₃ H ₈ O	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland

Material

Kaliumchlorid, KCl	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Magnesiumchlorid, MgCl_2	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Methanol, CH_4O	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumacetat Trihydrat $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot\text{H}_2\text{O}$	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Germany
Natriumcarbonat, NaHCO_3	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Germany
Natriumchlorid, NaCl	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat, NaH_2PO_4	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (Sodium dodecyl sulfate – SDS) $\geq 99\%$, $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumthiosulfat Pentahydrat, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3\cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Germany
Sodiumcarbonate, Na_2CO_3	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Germany
Paraformaldehyde, $(\text{CH}_2\text{O})_n$ (PFA)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Pepton	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany
PhosSTOP™ Phosphatase Inhibitor	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Rotiphorese Gel 40 % Acrylamid/ Bisacrylamid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure rauchend 37 %, HCl	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
β -Mercaptoethanol, $\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tetramethylethylendiamin (TEMED), $(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromid 98%	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$	Affymetrix, Santa Clara, USA
Tris-HCl	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland
Triton® X-100	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Trypton	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Tween® 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ziegenserum	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich

2.10 Puffer und Lösungen

Tabelle 11: Aufgelistet sind alle in der Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen, ihre Zusammensetzung und Menge.

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung	Menge
Antikörper-Lösung für Western Blot	1x TBS-T Milchpulver	5 % w/v
Blocklösung für Western Blot	1x TBS-T Milchpulver	5 % w/v
Bromphenolblau DNA-Ladepuffer	Bromphenolblau Glycerin 87% H ₂ O dest.	0,01 % w/v 40 % v/v
Chloroquin-Phosphat-Lösung	Chloroquin-Phosphat H ₂ O dest.	0,025 M
2x HBS	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ HEPES H ₂ O dest.	280 mM 10 mM 1,5 mM 50 mM
House Taq DNA Polymerase 10 x Puffer	KCl Tris, pH 9,0 MgCl ₂ Triton X H ₂ O dest.	500 mM 100 mM 15 mM 1 % v/v
Lysogeny Broth (LB) Agar	Trypton Hefeextrakt NaCl Bacto-Agar H ₂ O dest.	1 % w/v 0,5 % w/v 1 % w/v 15 % w/v
LB-Medium	Pepton Hefeextrakt NaCl H ₂ O dest.	1 % w/v 0,5 % w/v 1 % w/v
Lämmli-Puffer 5x	Bromphenolblau Tris-HCl pH 6,8 β-Mercaptoethanol SDS Glycerin H ₂ O dest.	0,01 % v/v 60 mM 5 % w/v 2 % w/v 10 % v/v
PB, pH 7,2	Na ₂ HPO ₄ NaH ₂ PO ₄ H ₂ O dest.	78 mM 26 mM
PBS, pH 7,4	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ H ₂ O dest.	137 mM 0,27 mM 10 mM 1,8 mM
PFA-Lösung	PFA PBS	4 % w/v
Poly-L-Lysin-Lösung	PBS (1x) Poly-L-Lysin (10 mg/ml) Penicillin/Streptomycin	1 % v/v 1 % v/v
SDS-Laufpuffer, pH 8,6	Tris-HCl Glycin	0,25 mM 0,2 M

Material

	SDS H ₂ O dest.	1 % w/v
SOC Medium	Trypton Hefeextrakt NaCl KCl MgCl ₂ Glukose H ₂ O dest.	2 % w/v 0,5 % w/v 10 mM 2,5 mM 10 mM 20 mM
TBE, pH 8,0	Tris Borsäure EDTA H ₂ O dest.	100 mM 100 mM 1 mM
TBS, pH 7,5	Tris NaCl H ₂ O dest.	50 mM 150 mM
TBS-T	Tween® 20 TBS	0,1 % v/v
Towbin	Glycin Tris Methanol H ₂ O dest.	190 mM 0,25 mM 20 % v/v
TritonX-100-Lösung	TritonX-100 H ₂ O dest.	1,5 % v/v

2.11 Zellkulturmedien und Zusätze

Tabelle 12: Aufgelistet sind alle in der Arbeit verwendeten Zellkulturmedien und Zusätze und ihre Quelle.

Medium/ Zusatz	Quelle
β-Mercaptoethanol, HSCH ₂ CH ₂ OH	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) F12	(Gibco) Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
DMEM High Glucose Medium (4,5 g/L)	(Gibco) Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Dulbecco's PBS	(Gibco) Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
EBM™-Plus Endothelial Cell Growth Basal Medium-Plus	Lonza Group Ltd, Basel, Schweiz
EGM™-Plus Endothelial Cell Growth Medium - Plus SingleQuot™ Kits and Growth Supplements	Lonza Group Ltd, Basel, Schweiz
Ethylendiamintetraacetat Dinatrium Dihydrat Salz (EDTA), C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ •2H ₂ O	(Titriplex) Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Fetal Bovine Serum Gold (FBS)	(Gibco) Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Geneticin (G418)-Sulfat-Lösung, C ₂₀ H ₄₀ N ₄ O ₁₀ *2H ₂ SO ₄	(Gibco) Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Gentamycin (50 mg/ml)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Material

Gibco™ MEM Non-Essential Amino Acids Solution	(Gibco) Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Insulin (27 USP-Einheiten/mg)	(Gibco) Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
KnockOut™ DMEM	(Gibco) Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
KnockOut™ Serum Replacement	(Gibco) Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
L-Glutamin 200 mM (100x)	(Gibco) Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Nikotinamid, C ₆ H ₆ N ₂ O, 10 mM	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
OptiMEM™ Medium	RPMI 1640 Medium
Penicillin (10.000 Units)/ Streptomycin (10 mg/ml), Pen/Strep	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Poly-L-Lysin Hydrobromid (10 mg/ml)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
RPMI 1640 Medium	(Gibco) Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Trypsin (0,5 %) - EDTA (0,2 %) 10 x in PBS	(PAA) GE Healthcare, Galfont St Giles, Vereinigtes Königreich

2.12 Verbrauchsmaterial

Tabelle 13: Aufgelistet sind alle in der Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien und ihre Quelle.

Material	Quelle
6-Well Zellkultur-Platten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
12-Well Zellkultur-Platten	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
24-Well Zellkultur-Platten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
CryoPure Gefäß violett 1,6 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
CombiTips –Eppendorf 5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
CombiTips –Eppendorf 10 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Deckgläschen 10 mm	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland
Einwegpasteurpipetten 3ml	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland
Einbettschälchen	Polysciences Inc, Warrington, USA
Reaktionsgefäß 0,5 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäß 2,0 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Falcontube 15 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Falcontube 50 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Filterspitzen 10 µl	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Filterspitzen 100 µl	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland

Material

Filterspitzen 1000 µl	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Gradientengele Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Handschuhe Nitril blau	Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
Handschuhe Nitril grün	Kimberly-Clark Professional, Roswell, GA, USA
Küvetten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
NEG 50TM Gefrierschnittmedium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Superfrost® Plus Objektträger	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland
Petrischale (10 cm)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen 10 µl	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland
Pipettenspitzen 100 µl	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland
Pipettenspitzen 1000 µl	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland
PVDF Membran	(Millipore) Merck Chemicals GmbH, Schwabach, Deutschland
Rührfisch	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Reagenz-Reservoir 25ml	(Moonlab®) neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Skalpell No 22	FEATHER® Safety Razor Co, Japan
Wägeschalen	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland
Whatman Papier 3 mm	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Whatman® Nucleopore Track-Etch Membrane	Merck Chemicals GmbH, Schwabach, Deutschland
Zellkulturflaschen T25, 10 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflaschen T75, 30 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturschalen 10 cm	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Zellschaber	Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgien

2.13 Laborgeräte

Tabelle 14: Aufgelistet sind alle in der Arbeit verwendeten Laborgeräte und ihre Quelle.

Laborgeräte	Quelle
Abzug	Wesemann GmbH – Zentrale, Syk, Deutschland
Autoklav V-150	Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland
Axio Imager 2 Confocal-Mikroskop	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Bunsenbrenner Gasprofi1	WLD Tec, Göttingen, Deutschland
Duomax 1030 Rocking Platform Shaker	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, Deutschland

Material

Eismaschine AF 100	Scotsman, VerNicht Hills, IL, USA
Färbekammer, ABS Deckel	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland
Feinwaage Explorer	OHAUS, Nänikon, Schweiz
Glasflaschen	DWK Life Sciences GmbH, Wertheim/Main, Deutschland
Gelelektrophoreseapparatur Mini PROTEAN 3	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Gelkammer Blue Marine200	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Glaspipetten	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Inkubator Zellen 37 °C	Kendro Lab Products, Langenselbold, Deutschland
Kältemikrotom Leica CM1850	Leica, Solmis, Deutschland
Mikrowelle KOR-6D07	Daewoo, Seoul, Korea
Milli-Q-Synthesis Reinstwasseranlage	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland (Millipore)
Leica TCS SP5 konfokales Fluoreszenzmikroskop	Leica GmbH, Wetzlar, Deutschland
NanoDrop® ND1000 Spektrophotometer	NanoDrop, Wilmington, DE, USA
Netzgerät Blue Power 500	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Nikon Eclipse TE2000-S, inverses Epifluoreszenzmikroskop	Nikon Corporation, Chiyoda, Tokio, Japan
Odyssey Fc Imager	LI-COR Biosciences GmbH, Lincoln, NE, USA
pH Meter Lab 850	SI Analytics GmbH, Mainz, Deutschland
Pipettierhilfe accu-jet	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System, 384-Well	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Rotator RS-24	Biosan, Riga, Lettland
RM5 Rollschüttler	(Assistent®) Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim/Rhön, Deutschland
RS-TR5 Rollenmischer (für Falcontubes)	Phoenix Instrument, Garbsen, Deutschland
Schüttelinkubator Certomat R	B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Deutschland
SDS-PAGE Platten 1,5mm	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
SDS-PAGE Platten Mini Protean System Short Plates	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Sterilbank	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Tecan Spark®	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz
Thermocycler peqSTAR	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland
Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Transferpipette ® 10 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Transferpipette ® 100 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Material

Transferpipette ® 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Transilluminator UST-30_M-8R	BioView Ltd., Billerica, MA, USA
Ultraschallgerät Vibra Cell VCX400	Sonics Materials, Newtown, CT, USA
Vakuumpumpe MZ 2 C	Vacuubrand GmbH, Wertheim, Deutschland
Vortex Genie2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Waage	SCALTEC Instruments GmbH, Heiligenstadt, Deutschland
Wasserbad W12	Labortechnik Medingen, Arnsdorf, Deutschland
Wasserdestilliergerät	GFL GmbH, Burgwedel, Deutschland
Werkbank Heraguard	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Biofuge pico (Tischzentrifuge)	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Biofuge fresco (Tischzentrifuge)	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 1.0R (Kühlzentrifuge Falcontube)	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Sigma 2-5 (Falcontube)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

2.14 Software

Tabelle 15: Aufgelistet sind alle in der Arbeit verwendeten Software-Programme und ihre Quelle.

Software	Quelle
Amber03 force field (Assisted Model Building with Energy Refinement)	Amber Software Administrator, University of California, San Francisco, CA, USA
ApE - A Plasmid Editor	M.Wayne Davis, Department of Biology, University of Utah, UT, USA
AxioVision LE 4.8	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
CorelDRAW Graphicssuite X8	Corel Corporation, Ottawa, Ontario, Kanada
Corel PHOTO-PAINT	Corel Corporation, Ottawa, Ontario, Kanada
GROMACS (Groningen Machine for Chemical Simulations), Version 5.1.2	KTH Stockholm, Universität Uppsala, Uppsala, Schweden
ImageJ	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA
Image Studio	LI-COR Biosciences GmbH, Lincoln, NE, USA
Microsoft Office	Microsoft Cooperation, Redmond, WA, USA
MOLE 2, Version 2.13.9.6	National Center for Biomolecular Research, Masaryk Universität, Brünn, Tschechien
Photoshop Elements	Adobe Systems GmbH, München, Deutschland
PyMOL	DeLano Scientific LLC, Portland, OR, USA
SigmaPlot Version12.5	Systat Software, San Jose, CA, USA

3 Methoden

3.1 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien

3.1.1 Hek293 EBNA

Die Kultivierung der Zelllinie Hek293 EBNA erfolgte in DMEM High Glucose Medium in 10 cm Zellkulturschalen. Zusätze im Medium waren 10 % (v/v) FCS, 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin (aus einer 5 mg/ml Lösung) und 1 % (v/v) G418-Sulfat (aus einer 50 mg/ml Lösung).

Die adhärent wachsenden Hek293 EBNA Zellen wurden zweimal wöchentlich im Verhältnis 1:10 gesplittet. Dabei wurde das alte Medium von einer voll bewachsenen Schale (80 – 90 % Konfluenz) abgenommen und die Platte mit 10 ml frischem Medium versetzt. Durch Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen vorsichtig von der Platte gelöst. Anschließend wurde 1 ml dieser Zellsuspension entnommen und zu 9 ml frischem Medium in eine neue 10 cm Zellkulturschale gegeben. Durch leichtes Schwenken wurde die Zellsuspension vermischt und danach im Inkubator bei konstanter Temperatur von 37°C und konstantem CO₂-Gehalt von 5 % zur Kultivierung aufbewahrt. Alle zwei Tage wurden sowohl Zustand als auch Wachstum der Zellen unter dem Mikroskop beurteilt.

3.1.2 ARPE-19

Die Kultivierung der adhärent wachsenden Zelllinie ARPE-19 erfolgte in DMEM/F-12 (1:1) Medium in 10 cm Zellkulturschalen. Zusätze im Medium waren 10 % (v/v) FCS und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin.

Die ARPE-19 Zellen wurden einmal wöchentlich im Verhältnis 1:3 gesplittet. Dabei wurde das alte Medium einer voll bewachsenen Schale (80 – 90 % Konfluenz) abgenommen und 3 ml Trypsin-Lösung (5 ml 10x Trypsin - EDTA in 45 ml PBS) hinzugegeben. Nach 3 Minuten Inkubation bei 37°C wurden die Zellen unter dem Mikroskop auf den Übergang von einer fusiformen zu einer runden Form beurteilt. Anschließend wurden 7 ml frisches Medium auf die Zellkulturschale gegeben und die Zellen aufgrund ihrer starken Adhäsion an den Schalenboden mit einem kleinen Spatel vorsichtig von der Platte gelöst. Diese Zellsuspension wurde anschließend in ein

Methoden

15 ml Falcontube überführt und für 3 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert (Zentrifuge Sigma 2-5). Nach Zentrifugation folgte das Absaugen des Überstandes und Resuspension des Pellet in 12 ml frischem Medium. In neuen Zellkulturschalen wurden je 6 ml DMEM/F-12 vorgelegt und mit 4 ml der Zellsuspension auf 10 ml Endvolumen aufgefüllt. Die Zellkulturschalen wurden leicht geschwenkt und anschließend in den 37°C Inkubator zur Kultivierung gestellt. Alle zwei Tage wurden sowohl Zustand als auch Wachstum der Zellen mithilfe von Mikroskopie beurteilt.

3.1.3 Weri-Rb1 und Y-79

Die Kultivierung der Zelllinien Weri-Rb1 und Y-79 erfolgte in RPMI 1640 Medium mit Zusatz von 10 % (v/v) FCS und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin.

Die Suspensionszelllinien Weri-Rb1 und Y-79 wurden zweimal wöchentlich im Verhältnis 1:3 passagiert. Dabei wurde die Zellsuspension einer gut bewachsenen 10 ml Zellkulturflasche durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Neue 10 ml Zellkulturflaschen wurden mit je 7 ml frischem Medium befüllt. Anschließend wurden 3 ml Zellsuspension in die neuen Flaschen pipettiert, sodass ein Endvolumen von 10 ml entstand. Ein Durchmischen von Zellen und Flüssigkeit erfolgte durch leichtes Schwenken. Im Anschluss wurden die Zellen bei 37°C kultiviert. Alle 2 Tage wurden sowohl Zustand als auch Wachstum der Zellen unter dem Mikroskop beurteilt.

3.1.4 BV2

Die Kultivierung der adhärent wachsenden BV2 Zelllinie erfolgte in DMEM/F-12 (1:1) Medium, versetzt mit 5 % (v/v) FCS und 0,01 % β -Mercaptoethanol.

Die Zellen wurden nach dem Auftauen in eine T75 Zellkulturflasche in 30 ml des oben genannten Mediums ausgesät. Bei einer Konfluenz der BV2 Zellen von circa 80 – 90 % wurden diese in T25 Zellkulturflaschen im Verhältnis 1:12 passagiert. Dazu wurde zunächst das ursprüngliche Medium abgesaugt und 10 ml 0,3 mM EDTA in PBS (30 μ l 0,5M EDTA und 50 ml PBS) dazugegeben. Nach einer Inkubationszeit von circa 20 Minuten bei Raumtemperatur wurden die abgelösten Zellen resuspendiert, in ein 15 ml Falcontube gegeben und bei 1000 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert (Zentrifuge Sigma 2-5). Anschließend wurden die Zellen mit 10 ml 1x PBS gewaschen und noch

Methoden

einmal bei denselben Einstellungen wie zuvor zentrifugiert. Es wurden 12 ml des Mediums auf die Zellen gegeben, diese resuspendiert und je 1 ml der Suspension in eine T25 Zellkulturflasche mit 9 ml Medium pipettiert. Die BV2 Zellen wurden bei 37°C kultiviert. Alle zwei Tage wurden sowohl Zustand als auch Wachstum der Zellen unter dem Mikroskop beurteilt.

3.1.5 HUVEC

Die Kultivierung der adhärent wachsenden HUVEC Zelllinie erfolgte in EBM™-Plus Medium mit den Zusätzen L-Glutamin (25 ml), FCS (10 ml), Ascorbinsäure (0,5 ml) rhEGF (0,5 ml), Hydrocortison (0,5 ml), Heparin (0,5 ml) und BBE (1,0 ml) aus dem EGM™-Plus Endothelial Cell Growth Medium - Plus SingleQuot™ Kits and Growth Supplements.

Nach dem Auftauen wurden die Zellen in eine T75 Zellkulturflasche mit 40 ml des oben beschriebenen Mediums gegeben und über Nacht unter sterilen Bedingungen bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 10 ml frischem Kultivierungsmedium gewaschen. Nachdem dieses Medium abgesaugt wurde, erfolgte die Zugabe von 20 ml frischem Medium. Zur weiteren Kultivierung nach 3 Tagen wurde das verbrauchte Medium entfernt und 10 ml einer Trypsin-Lösung (5 ml 10x Trypsin - EDTA in 45 ml PBS) zu den Zellen pipettiert. Unter dem Mikroskop wurde kontrolliert, wann die Zellen sich vom Boden ablösten und zu einer runden Form konvertierten. Nach leichtem Schwenken zur vollständigen Ablösung der Zellen, wurden 5 ml Trypsin-Neutralisierungslösung hinzugegeben (10 ml FCS in 40 ml PBS) und in ein 50 ml Falcontube überführt. Im Anschluss folgte eine Zentrifugation (Zentrifuge Sigma 2-5) bei 1200 rpm für 5 Minuten und der Überstand wurde entfernt. Das Pellet wurde in 5 ml Kultivierungsmedium resuspendiert und die Zellen anschließend mit einer Konzentration von 5000 Zellen pro cm² in T25 Zellkulturflaschen ausgesät. Mit frischem Medium wurde auf ein Gesamtvolumen von 10 ml aufgefüllt. Die Kultivierung dieser Zellen wurde am Institut für Humangenetik von Lisa Parakenings durchgeführt und die Zellen für Versuche zur Verfügung gestellt.

3.1.6 Aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte RPE-Zellen (hiPSC-RPE)

Am Institut für Humangenetik wurden aus Fibroblasten hiPSC-RPE Zellen gewonnen, indem zunächst eine Reprogrammierung der Fibroblasten zu hiPSC Zellen stattfand (Brandl et al. 2014). Diese Zellen wurden anschließend, ebenfalls nach dem Protokoll von Brandl und Kollegen (Brandl et al. 2014), in RPE-Zellen ausdifferenziert, auf Matrigel kultiviert und auf Transwell Filter in eine 12 Well-Platte passagiert. Diese Vorarbeiten wurden von Nico Hertel am Institut für Humangenetik durchgeführt. Die weitere Kultivierung der hiPSC-RPE Zellen fand in KnockOut™ DMEM Medium mit 2 mM L-Glutamin, 5 % (v/v) KnockOut™ Serum Replacement, 0,1 mM Gibco™ MEM Non-Essential Amino Acids Solution, 0,1 mM β-Mercaptoethanol, 5 µg/ml Gentamycin und 10 mM Nicotinamid statt. Alle zwei Tage wurde zunächst eine mikroskopische Kontrolle der Zellen durchgeführt. Im Anschluss wurde das gebrauchte Medium auf dem Filter und im Well abgenommen und durch frisches Kultivierungsmedium ersetzt. Die Kultivierung fand bei 37°C Temperatur und 5 % CO₂ statt.

3.2 Heterologe Proteinexpression in Hek293 EBNA

3.2.1 Calciumphosphat Transfektion

Hek293 EBNA Zellen wurden mit der Calciumphosphat Methode transfiziert. Am Vortag der Transfektion wurden 10 cm Zellkulturschalen 1 Stunde lang mit 5 ml einer Poly-L-Lysin-Lösung bei 37°C im Inkubator beschichtet. Anschließend wurde das Poly-L-Lysin abgenommen und durch 5 ml PBS ersetzt. Durch mehrmaliges Schwenken wurde die restliche Lösung heruntergewaschen. Dann wurde die leere, beschichtete Zellkulturschale im Kühlschrank bis zur Verwendung aufbewahrt.

Für die Transfektion wurden Hek293 EBNA Zellen mit einer Konfluenz von ca. 70 % in einer 10 cm Schale verwendet. Diese wurden am Tag vor der Transfektion im Verhältnis 1:3 auf die Poly-L-Lysin beschichtete Zellkulturschale gesplittet. Dazu wurde das alte Medium von der bewachsenen Schale entnommen und durch 10 ml frisches DMEM Medium ersetzt. Durch Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen von der Schale gelöst. Die Poly-L-Lysin beschichteten Schalen mit 7 ml DMEM Medium

Methoden

wurden mit 3 ml der Zellsuspension auf 10 ml aufgefüllt und über Nacht im 37°C Inkubator kultiviert.

Am Tag der Transfektion wurde zunächst das Medium durch 10 ml DMEM (ohne G418-Zusatz) und 10 µl Chloroquin (aus einer 25 mM Stammlösung) ersetzt. Nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde bei 37°C wurde das Medium durch 10 ml des ursprünglichen DMEM Mediums ausgetauscht und 1 ml des Transfektionsansatzes zugegeben. Dieser bestand aus 20 µg DNA in 438 µl sterilem H₂O mit 62 µl Calciumchlorid, welcher nach kurzem Vortexen mit 500 µl 2xHBS unterschichtet und durch mehrmaliges Durchblubbern vermischt wurde. Nach 10 - 15 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde der Transfektionsansatz tröpfchenweise unter Schwenken auf die Schale geträufelt. Nach einer Inkubationszeit von 7 Stunden bei 37°C erfolgte ein erneuter Mediumwechsel zu FCS-freiem DMEM Medium. Die transfizierten Zellen wurden dann für 5 Tage im 37°C Inkubator kultiviert, worauf Zellen und Überstand geerntet wurden.

3.2.2 Ernte von Zellen und Überstand nach Calciumphosphat Transfektion

5 Tage nach der Calciumphosphat Transfektion wurden Zellpellet und Überstand geerntet. Dazu wurden die 10 ml Mediumüberstand aus der Zellkulturschale zunächst in ein 15 ml Falcontube überführt und bei 700 rpm für 5 Minuten zentrifugiert (Zentrifuge Megafuge 1.0R). Der daraus entstandene Überstand wurde bei -20°C im Gefrierschrank aufbewahrt. Zur Ernte der Hek293 EBNA Zellen wurde die Schale mit 10 ml 1xPBS gefüllt, die Zellen wurden vorsichtig mit einem Zellschaber vom Boden abgelöst und in ein 15 ml Falcontube überführt. Als nächstes folgte ein Zentrifugationsschritt bei 1000 rpm für 3 Minuten (Zentrifuge Megafuge 1.0R). Nach Entfernen des Überstandes wurden die Zellen in 500 µl PBS gelöst, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und erneut 3 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert (Zentrifuge Biofuge fresco). Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 800 µl PBS gelöst und bei 38 % Amplitude sonifiziert. Zum Schluss wurden 200 µl Lämmli-Puffer zugegeben und das Pellet bei -20°C eingefroren.

3.2.3 Transfektion mit dem Mirus Bio™ TransIT®-LT1 Transfektionsreagenz

Am Vortag der Transfektion wurden Hek293 EBNA Zellen (1:18 einer mit 70 – 80 % Konfluenz gut bewachsenen 10 cm Zellkulturschale) auf 6-Well-Platten passagiert. Dabei wurde das alte Medium einer Zellkulturschale abgenommen und durch 18 ml frisches DMEM Medium ersetzt. Durch Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen vom Boden gelöst und anschließend 1 ml dieser Zellsuspension in jedes Well überführt. Dazu wurde noch je 2 ml DMEM Medium zugegeben. Daraufhin wurden die Zellen über Nacht bei 37°C inkubiert.

Am Tag der Transfektion wurde ein Transfektionsansatz vorbereitet, der aus 250 µl FCS-freiem DMEM Medium, 2,5 µl der DNA (1 µg/µl) und 7,5 µl des TransIT®-LT1 Transfektionsreagenzes bestand. Dieser Ansatz wurde 15 - 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Das Medium der am Vortag in 6-Well-Platten ausgesäten Hek293 EBNA Zellen wurde durch 3 ml frisches, FCS-freies DMEM Medium ersetzt und im Anschluss der Transfektionsansatz tröpfchenweise dazugegeben.

Zellen, Überstand und EZM wurden nach 3 Tagen geerntet.

3.2.4 Ernte von Zellen, Überstand und EZM nach Transfektion mit dem Mirus Bio™ TransIT®-LT1 Transfektionsreagenz

Zu Beginn wurde der Mediumüberstand abgenommen, in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 2000 rpm für 3 Minuten zentrifugiert (Zentrifuge Biofuge fresco). Der daraus entstandene Überstand wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäßen eingefroren.

Zur Ernte der Zellen wurden zunächst 300 µl PBS in jedes Well gegeben und die Zellen durch leichtes Schwenken vom Boden gelöst. Diese Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und bei 2000 rpm für 3 Minuten zentrifugiert (Zentrifuge Biofuge fresco). Der Überstand wurde entfernt und es erfolgte ein erneuter Waschschriff mit 200 µl PBS mit Zentrifugation für 3 Minuten bei 2000 rpm. Das Pellet wurde dann in 200 µl PBS resuspendiert, 15 - 20 Sekunden bei 38 % Amplitude sonifiziert und danach mit 50 µl 5x Lämmli Puffer für 3 Minuten auf 93°C aufgeköcht.

Methoden

Die Gewinnung der EZM fand nach dem Protokoll von Hellewell und Kollegen statt (Hellewell et al. 2017). Dazu wurden 200 µl Ammoniumhydroxid (NH₄OH) in die Wells gegeben, um restliche, an der EZM anhaftende Zellen zu lysieren. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur mit intermittierendem, leichtem Schwenken der Zellkulturschale wurde das Zellysate abgenommen. Es folgten mindestens 5 Waschschriffe der EZM mit je 1 ml de-ionisiertem H₂O. Durch Mikroskopie wurde sichergestellt, dass sich keine Zellen mehr auf dem Boden der Wells befanden. Die Flüssigkeit wurde abgenommen, sodass die Wells vollständig trocken waren. Anschließend wurde ein Gemisch aus 1x Lämmli und 100 mM DTT angesetzt, 2 Minuten bei 95°C erhitzt und davon je 50 µl in jedes Well pipettiert. Mit einem Zellschaber wurde die EZM vorsichtig vom Boden abgelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden bei 93°C für 3 Minuten aufgekocht.

3.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurden SDS-Polyacrylamid-Gele hergestellt, die sich aus 12,5 %-igem Trenngel und 3 %-igem Sammelgel zusammensetzen.

Tabelle 16: Aufgelistet sind die Zusammensetzungen des SDS-Trenngels mit 12,5 % und des SDS-Sammelgels mit 3 %.

Komponente	Trenngel (12,5 %)	Sammelgel (3 %)
1M Tris/HCl, pH 6,8	-	2,76 ml
1M Tris/HCl, pH 8,8	3,83 ml	-
H ₂ O dest	3,045 ml	1,69 ml
Acrylamid-Lösung (40%)	3,125 ml	0,55 ml
20% SDS	100 µl	50 µl
10% APS	100 µl	50 µl
TEMED	10 µl	5 µl

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Western-Blot Analysen wurden 1,5 mm dicke Gele verwendet.

Die aufzutragenden Proben wurden zunächst mit 5x Lämmli-Puffer versetzt und für 3 Minuten bei 93°C aufgekocht. Als Molekularmassenstandard wurden 3,5 µl des PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10 - 180 kDa, Thermo Fisher Scientific) auf

Methoden

das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 50 V, bis die Proben das Sammelgel durchlaufen hatten, darauf wurde die Spannung auf 150 V erhöht.

3.4 Western Blot – Semi Dry Verfahren

Im Anschluss an die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die Proteine mittels Semi-Dry Verfahren auf eine PVDF-Membran geblottet. Diese wurde zunächst 30 Sekunden lang in Methanol aktiviert und danach zusammen mit zwei 3 mm dicken Whatman-Papieren in 1x Towbin-Puffer gelegt. Im Trans-Blot®Turbo™ Transfer System von Bio-Rad erfolgte der Transfer vom Gel auf die Membran bei 24 V in 25 (bei NRTN) oder 40 Minuten. Die Membran wurde in 5 %-iger Milchpulverlösung bei Raumtemperatur für mindestens 1 Stunde unter leichtem Schwenken blockiert und anschließend über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper inkubiert.

Am nächsten Tag erfolgten zunächst 3 Waschschrte mit TBS-T und jeweils 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Im Anschluss wurde der sekundäre Antikörper auf die Membran gegeben und für mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Danach wiederholte sich der 3-malige Waschschrte mit TBS-T.

Die Membran wurde mit Clarity™ Western Blotting Substrate oder bei schwächeren Signalen mit dem Clarity Max™ Western Blotting Substrate befeuchtet und anschließend die Bilder im Odyssey Fc Imager von LI-COR Biosciences GmbH entwickelt.

3.5 Aufreinigung von Myc-getagten NRTN-Varianten

Um Myc-getagte NRTN-Proteine aufzureinigen, wurden je NRTN-Variante 250 µl Pierce™ Anti-c-Myc Agarose Beads in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Nach einem Zentrifugationsschrte bei 12.000 rpm (Zentrifuge Biofuge fresco) für 30 Sekunden und Abnahme des Überstandes wurden die Beads mit 100 µl TBS gewaschen und erneut bei 12000 rpm für 30 Sekunden zentrifugiert. Die Beads wurden zusammen mit 10 ml Mediumüberstand, in welchen die Myc-getagten NRTN-Varianten nach Calciumphosphat-Transfektion von Hek293 EBNA Zellen sezerniert

Methoden

worden waren, in ein 15 ml Falcontube pipettiert und über Nacht im Kühlraum bei 4°C invertiert.

Am nächsten Tag wurde die Suspension für 3 Minuten bei 4°C und 4000 rpm in der Zentrifuge Megafuge 1.0R zentrifugiert. Die pelletierten Beads wurden in 500 µl TBS-T (0,05 %) gelöst, in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 12.000 rpm für 30 Sekunden zentrifugiert (Zentrifuge Biofuge fresco). Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Nach Abnahme der Waschüberstände wurden die gebundenen Proteine eluiert. Dazu wurden 100 µl c-Myc Peptid zu den Beads zugegeben, 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und erneut bei 12000 rpm für 30 Sekunden abzentrifugiert. Der Überstand, in welchem sich die aufgereinigten Proteine befanden, wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß aufbewahrt. Dieser Elutionsschrift wurde ein zweites Mal mit 100 µl c-Myc Peptid wiederholt. Die beiden Eluate wurden vereinigt und einer Western Blot Analyse unterzogen.

3.6 Klonierung eines bicistronischen Expressionsvektors mit Expressionskassetten für NRTN und dem Green Fluorescent Protein (GFP)

Im Zuge dieser Arbeit wurden neue Expressionsvektoren für die nicht-protective und die protective Variante des NRTN generiert, die zusätzlich zur NRTN-Expressionskassette noch eine GFP-Expressionskassette enthalten sollten. Die dadurch von einem Vektor ausgehende, bicistronische Expression von NRTN und GFP sollte bei heterologer NRTN-Expression die Ermittlung der Transfektionseffizienz (durch gleichzeitige GFP-Expression) ermöglichen.

Als Zielvektor wurde ein pcDNA4-Plasmid verwendet, in welches schon zuvor am Institut für Humangenetik in Regensburg die kodierende Sequenz für GFP kloniert worden war (pcDNA4_GFP).

Die NRTN-Expressionskassetten wurden (mitsamt eigenem Promotor und eigener Polyadenylierungsstelle für die Expression der NRTN-Varianten) über zwei Blunt-End Endonukleasen aus pcDNA3-Vektoren herausgeschnitten, in welche bereits zuvor am Institut für Humangenetik in Regensburg die kodierenden Sequenzen für NRTN der

Methoden

nicht-protaktiven („NRTN:G“) und der protaktiven Variante („NRTN:A“) generiert worden waren.

Die NRTN-Expressionskassetten wurden in pcDNA4_GFP ligiert, welcher ebenfalls mit einer Blunt-End Endonuklease verdaut worden war.

3.6.1 Gewinnung der NRTN-Expressionskassetten durch Exzision aus pcDNA3_NRTN:G oder pcDNA3_NRTN:A

Um NRTN-Expressionskassetten zu generieren, wurden pcDNA3_NRTN:G oder pcDNA3_NRTN:A Plasmide mit den Restriktionsenzymen Xmn I und Nru I verdaut. Diese beiden Restriktionsendonukleasen erzeugen beim Schneiden der DNA Blunt-Ends. Die Zusammensetzung des Ansatzes ist in Tabelle 17 angegeben. Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei 37°C inkubiert.

Durch den Verdau der pcDNA3_NRTN Vektoren mit Xmn I und Nru I wurden diese in drei Stücke mit 3400 bp, 2100 bp und 500 bp geschnitten. Das Stück, das die NRTN-Expressionskassette beinhaltete, war 2100 bp groß, die anderen beiden Fragmente stellten die Reste des ursprünglichen Expressionsplasmids pcDNA3 dar.

Tabelle 17: Angegeben ist die Zusammensetzung des pcDNA3_NRTN Verdauansatzes mit Xmn I und Nru I.

Substanz	Menge
pcDNA3_NRTN:G/_NRTN:A	3 µg (= 3 µl bei 1µg/µl)
Xmn I	1 µl
Nru I	1 µl
Cut Smart Puffer	1 µl
Millipore H ₂ O	4 µl

3.6.2 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurde zunächst ein 1 %iges Agarose-Gel hergestellt, das sich aus 1,5 g Agarosepulver, 150 ml TBE Puffer und 2 Tropfen Ethidiumbromid-Lösung zusammensetzte. Daraufhin wurden die 10 µl des Verdauansatzes mit 5 µl Bromphenolblau DNA-Ladepuffer versetzt, auf das Gel geladen und bei circa 100 V aufgetrennt.

Methoden

Im Anschluss wurden die aufgetrennten DNA-Banden im Transilluminator UST-30_M-8R unter UV-Licht visualisiert.

3.6.3 Gelaufreinigung von DNA-Fragmenten

Die 2100 bp großen Fragmente, welche die NRTN-Expressionskassetten enthielten, wurden mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Aufreinigung der DNA-Fragmente aus dem Gel erfolgte mithilfe des Kit-Systems NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up der MACHEREY-NAGEL GmbH und Co. KG.

In jedes Reaktionsgefäß wurde, pro 1 g des ausgeschnittenen Gels, 1 ml NT1 Puffer zugegeben und das Gemisch für 5 - 10 Minuten bei 50°C auf dem Thermomixer compact inkubiert, bis sich das Gelstück im Gefäß auflöste. Die Lösung wurde danach auf die im Kit beigelegten Filter pipettiert und für 30 Sekunden bei 12.000 rpm zentrifugiert (Zentrifuge Biofuge fresco). Nach Entfernen des Überstandes und Zugabe von 700 µl NT3 Puffer auf den Filter fand eine erneute Zentrifugation bei gleichen Einstellungen statt. Anschließend wurde der Überstand wieder verworfen und das Filtergefäß nochmal zentrifugiert und getrocknet. Als letzter Schritt folgte die Elution des Inserts in 25 µl Millipore H₂O mit einer Inkubation bei Raumtemperatur für 1 Minute, gefolgt von einer Zentrifugation bei 12.000 rpm für 1 Minute. Die Konzentration des Inserts wurde im Anschluss im NanoDrop® ND1000 Spektrophotometer gemessen.

3.6.4 Phosphorylierung der eluierten NRTN-Expressionskassette

Um die Ligation der NRTN-Expressionskassette mit dem Zielvektor zu verbessern, wurde diese zuvor phosphoryliert. Die Phosphorylierung der eluierten NRTN-Expressionskassette erfolgte mit der T4 Polynukleotid Kinase. Der Ansatz wurde, wie in Tabelle 18 angegeben, zusammen pipettiert und zunächst bei 37°C 1 Stunde lang inkubiert. Danach fand bei 65°C eine 20-minütige Hitzeinaktivierung statt.

Tabelle 18: Angegeben ist die Zusammensetzung des Phosphorylierungs-Ansatzes.

Substanz	Menge
Eluierte NRTN-Expressionskassette	5 µl
T4 Polynukleotid Kinase	1 µl

Methoden

10x Polynukleotid Kinase Puffer	1 µl
ATP 100 µM	1 µl
Millipore H ₂ O	2 µl

3.6.5 Öffnung des Zielvektors pcDNA4_GFP

Der Verdau des Zielvektors pcDNA4_GFP erfolgte mit dem Restriktionsenzym Nru I. Die Zusammensetzung des Ansatzes ist in Tabelle 19 angegeben. Dieser Restriktionsansatz wurde über Nacht bei 37°C inkubiert.

Der Zielvektor wurde mit Nru I lediglich an einer Stelle geschnitten und somit nur geöffnet.

Tabelle 19: Angegeben ist die Zusammensetzung des Zielvektor-Verdauansatzes mit Nru I.

Substanz	Menge
pcDNA4_GFP	3 µg (= 6 µl bei 516 ng/µl)
Nru I	1 µl
NEBuffer 3.1	1 µl
Millipore H ₂ O	2 µl

Im Anschluss daran erfolgte, wie oben beim Insert beschrieben, die Agarose-Gelelektrophorese und Gelaufreinigung des Vektors.

3.6.6 Dephosphorylierung des Vektors

Um die Religation des Zielvektors zu verhindern, wurden die durch den Verdau entstandenen Blunt-Ends mithilfe der Antarktischen Phosphatase dephosphoryliert (Ansatz siehe Tabelle 20). Die Inkubationszeit betrug 1 Stunde bei 37°C, anschließend wurde die Antarktische Phosphatase für 20 Minuten bei 75°C hitzeinaktiviert.

Tabelle 20: Angegeben ist die Zusammensetzung des Dephosphorylierungsansatzes.

Substanz	Menge
pcDNA4_GFP verdaut	500 ng (= 16 µl bei 28 ng/µl)
Antarktische Phosphatase (AAP)	1 µl
10x AAP Puffer	2 µl
Millipore H ₂ O	1 µl

3.6.7 Blunt-End Ligation der Insert-DNA mit der Vektor-DNA

Die unten angegebenen Ligationsansätze (Tabelle 21) wurden angesetzt und bei 4°C für mindestens 2 Stunden oder über Nacht inkubiert.

Tabelle 21: Angegeben ist die Zusammensetzung der Ligationsansätze.

Substanz	Ligation Kontrollansatz	Ligation pcDNA4_GFP_NRTN:G	Ligation pcDNA4_GFP_NRTN:A
Ligase	1 µl	1 µl	1 µl
Ligase Puffer (10x)	1 µl	1 µl	1 µl
pcDNA4_GFP	1 µl	1 µl	1 µl
NRTN Expressionskassette	-	4 µl NRTN:G Expressionskassette	4 µl NRTN:A Expressionskassette
Millipore H ₂ O	7 µl	3 µl	3 µl

3.6.8 Hitzeschock-Transformation in *E. coli* strain DH5α Zellen

Zur Transformation wurden *E. coli* Bakterien vom Stamm DH5α verwendet. Davon wurde ein Aliquot mit 50 µl chemisch kompetenten Zellen (bereitgestellt vom Institut für Humangenetik, Regensburg) benutzt und 10 µl des jeweiligen Ligationsansatzes zugegeben. Diese Lösung wurde für 30 Minuten auf Eis inkubiert und im Anschluss für 45 Sekunden im Thermomixer compact bei 42°C erhitzt. Es folgte eine erneute Inkubation auf Eis für 10 Minuten und Zugabe von 100 µl SOC-Medium. Die Zellen wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß für mindestens 45 Minuten bei 37°C im Thermoblock bei ungefähr 400 rpm geschüttelt. Anschließend wurde der gesamte Ansatz mit einem hitzesterilisierten Spatel auf LB-Agarplatten mit Ampicillin aufgetragen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.6.9 Plasmid Präparation (im ng/µl Bereich)

Die über Nacht angewachsenen *E. coli* Kolonien wurden in 5 ml flüssigem LB-Medium mit Ampicillin angeimpft und über Nacht im 37°C Schüttler inkubiert.

Aus dieser Kultur wurden die Plasmide nach Hersteller-Angaben mit dem Kit NucleoSpin® Plasmid der MACHEREY-NAGEL GmbH & Co KG isoliert.

Zur Ernte der Bakterienzellen wurden zweimal 2 ml der Bakteriensuspension in einem 2 ml Reaktionsgefäß nacheinander für 1 Minute bei 12.000 rpm abzentrifugiert

Methoden

(Zentrifuge Biofuge fresco). Zum finalen Zellpellet wurden 250 µl A1 Puffer ("Resuspendierungspuffer") hinzugegeben, die Zellen durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert und danach 250 µl A2 Puffer ("Lysepuffer") zupipettiert. Die Suspension wurde durchmischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bis die Flüssigkeit klar erschien. Im Anschluss wurden 300 µl des A3 Puffers ("Neutralisierungspuffer") zupipettiert, die Probe für 2-5 Minuten bei 12.000 rpm zentrifugiert und der Überstand, welcher das Zelllysate mitsamt DNA enthielt, auf die im Kit beigelegten Filter pipettiert. Es fand ein erneuter Zentrifugationsschritt bei 12.000 rpm für 1 Minute statt und nach Verwerfen des Überstandes wurden 600 µl A4 Puffer ("Waschpuffer") auf die Membran pipettiert. Erneut wurden die Proben für 1 Minute bei 12.000 rpm zentrifugiert. Die Filtermembran wurde darauf durch 2-minütige Zentrifugation bei 12.000 rpm getrocknet. Danach wurde der Filter in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gestellt und die an den Filter gebundene DNA in 25 µl Millipore H₂O eluiert. Die Elution fand durch zunächst 1 Minute Inkubation bei Raumtemperatur gefolgt von 1 Minute Zentrifugation bei 12.000 rpm statt.

Die Konzentration der eluierten Plasmid-DNA wurde im NanoDrop® ND1000 Spektrophotometer gemessen.

3.6.10 Testverdau

Zur Selektion korrekt ligierter Plasmidkonstrukte (pcDNA4_GFP_NRTN:G/_NRTN:A) wurde ein Testverdau mit Kpn I angesetzt. Dieses Enzym schnitt je einmal im Zielvektor (pcDNA4_GFP) und einmal im Insert (NRTN-Expressionskassette). Die Inkubationszeit betrug 1 Stunde bei 37°C Temperatur. Anschließend wurde der Ansatz mit Bromphenolblau versetzt, auf ein Agarosegel geladen und unter UV Licht beurteilt. Bei korrekt ligierten Plasmidkonstrukten (Gesamtgröße 8600 bp), welche sowohl die NRTN- als auch die GFP-Expressionskassetten enthielten, ergab sich, je nach Insertionsrichtung (Blunt-End Klonierung) der NRTN Expressionskassette, folgendes Bandenmuster: 2400 bp + 6200 bp oder 2200 bp + 6400 bp.

Tabelle 22: Angegeben ist die Zusammensetzung des Testverdauansatzes.

Substanz	Menge
Plasmidkonstrukt	1 µg (= 3 µl bei 370 ng/µl)
Cut Smart Puffer	1 µl
Kpn I - HF	0,5 µl
Millipore H ₂ O	5,5 µl

3.6.11 Sequenzierung der Plasmid-DNA nach Sanger

Nach dem Testverdau wurden positive Plasmidkonstrukte sequenziert, um sicherzustellen, dass die Zielvektoren die korrekten NRTN- und GFP-Expressionskassetten enthielten. Dazu wurden die Primer NRTN_BamHI_F, NRTN_XhoI_R und RT_pCAG_GFP_EGFP_F verwendet. Hierfür wurde der in Tabelle 23 aufgeführte Mastermix hergestellt und anschließend das in Tabelle 24 angegebene PCR-Programm mithilfe des Thermocyclers durchgeführt.

Tabelle 23: Angegeben ist die Zusammensetzung des Cycle Sequencing Ansatzes.

Substanz	Menge
Plasmid-DNA (20 ng/µl)	2 µl
Primer (10 µM)	1 µl
BigDye® Terminator Reaktionsmix	0,3 µl
5x BigDye® Terminator Sequencing Buffer	2 µl
Millipore H ₂ O	4,7 µl

Tabelle 24: Aufgeführt ist das PCR-Programm für das in dieser Arbeit durchgeführte Cycle Sequencing.

PCR-Schritt	Temperatur	Laufzeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	94°C	3 min	
1. Schritt: Denaturierung	94°C	30 s	27
2. Schritt: Annealing	58°C	30 s	
3. Schritt: Elongation	60°C	3 min	
Finale Elongation	60°C	5 min	
Pause	15°C	∞ min	

Im Anschluss wurde die DNA gefällt. Dazu fand nach Zugabe von 2 µl 3 M Natriumacetat und 25 µl Ethanol (100 %) ein Zentrifugationsschritt (Zentrifuge

Methoden

Megafuge 1.0R) für 30 Minuten bei 4000 rpm und 4°C statt. Durch kurzes Über-Kopf-Zentrifugieren (< 400 rpm) wurde der Überstand mithilfe eines Küchenpapiers aufgesaugt und entfernt. Durch Zugabe von 100 µl Ethanol (70 %) wurde das Pellet gewaschen, woraufhin erneut bei 4000 rpm und 4°C für 20 Minuten zentrifugiert und der Überstand, wie zuvor beschrieben, entfernt wurde. Zum Schluss wurden 15 µl HiDi™ Formamid zur DNA gegeben und durch Vortexen gut vermischt. Die Analyse der Proben fand mittels Abi3130x1 Genetic Analyser statt und die anschließende Auswertung erfolgte mit der Software ApE – A Plasmid Editor.

3.6.12 Plasmid Präparation (im µg/µl Bereich)

Für die Aufreinigung von Plasmiden im µg Bereich wurden *E-coli* Zellen über Nacht in 100 ml LB-Medium mit Ampicillin bei 37°C angezchtet.

Die Plasmid-Präparation fand nach Hersteller-Angaben mit dem Kit NucleoBond® XtraMidi der MACHEREY-NAGEL GmbH & Co KG statt.

Zur Gewinnung der Bakterien wurden die 100 ml Zellsuspension zunächst auf zwei 50 ml Falcontubes aufgeteilt und für 15 Minuten bei 4000 g und 4°C zentrifugiert (Zentrifuge Megafuge 1.0R). Nach Abnahme des Überstandes wurden die Pellets jeweils in 4 ml Resuspensionspuffer gelöst und vereinigt. Es folgte die Zugabe von 8 ml Lysepuffer, ein Durchmischen der Lösung durch leichtes Schütteln und eine Inkubation bei Raumtemperatur für 5 Minuten. In dieser Zeit wurden die im Kit beigelegten Filter in einem Elutionsröhrchen mit 12 ml Äquilibriumspuffer am Filterrand befeuchtet. Nach Zugabe von 8 ml Neutralisationspuffer in das Falcon und leichtem Schütteln kam es zur Verfärbung der Lösung von blau zu farblos. Die Lösung wurde dann auf den vorbereiteten Filter gegeben. Der erste Waschschrift fand mit 5 ml Equilibrationspuffer statt, anschließend wurde der Filter verworfen und ein zweiter Waschschrift mit 8 ml Waschpuffer durchgeführt. Nachdem ein 15 ml Falcontube unter dem Gefäß platziert wurde, fand die Elution mit 5 ml Elutionspuffer statt. Im Anschluss wurde auf das Eluat 3,5 ml Isopropanol gegeben und gemischt, wodurch die eluierte DNA gefällt wurde. Daraufhin wurde bei 4°C und 4000 g für mindestens 45 Minuten zentrifugiert (Zentrifuge Megafuge 1.0R). Nach Entfernen des Überstandes wurden 2 ml 70 % Ethanol auf das Pellet pipettiert und nochmal bei 4°C und 4000 g für mindestens 30 Minuten zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Ethanol vorsichtig mit

Methoden

einer Pipette entfernt, das Falcontube kopfüber bei Raumtemperatur getrocknet und im letzten Schritt die Plasmid-DNA in 100 µl Millipore H₂O gelöst.

Nach 1 Stunde Inkubation im Thermomixer compact bei Raumtemperatur und circa 1000 rpm, konnte die Konzentration der DNA im NanoDrop® ND1000 Spektrophotometer gemessen werden.

3.6.13 Herstellung von Glycerinkulturen zur Langzeitaufbewahrung

Für die Langzeitaufbewahrung transformierter *E. coli* Klone wurden 4 ml einer über Nacht inkubierten *E. coli* Kultur bei 1000 rpm für 3 Minuten zentrifugiert (Zentrifuge Megafuge 1.0R). Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet in 500 µl LB Medium ohne Ampicillin resuspendiert und mit 600 µl 87 % Glycerol versetzt. Anschließend wurde die Zellsuspension in CryoPure Gefäßen bei -80°C eingefroren.

3.7 Versuche zur Überprüfung der NRTN-Bindung an verschiedene Zelllinien

3.7.1 Bindeversuche an adhärenente Zellen

Um die NRTN-Bindung an adhärenente Zelllinien zu überprüfen, wurden die Zellen am Vortag, wie in Kapitel 3.1 beschrieben, auf 6-Well-Platten passagiert (je Well 1:6 der Zellen einer zu 70 – 80 % konfluenten 10 cm Platte).

Am folgenden Tag wurde das Kultivierungsmedium abgenommen und je 1 ml des Überstandes aus einer Calciumphosphat Transfektion (siehe Kapitel 3.2.1 und 3.2.2) in jedes Well pipettiert. Für diese Calciumphosphat Transfektion wurden Hek293 EBNA Zellen mit pcDNA3_Myc_NRTN:G und pcDNA3_Myc_NRTN:A transfiziert und die Überstände enthielten somit Myc-getagte NRTN Proteine. Auch für die weiteren Bindeversuche wurden Myc-getagte NRTN Varianten verwendet. Im Anschluss folgte 1 Stunde Inkubationszeit bei 37°C. Nach der Inkubation wurden die Zellen auf der Platte resuspendiert. Je nach Zelllinie und Anhaftung der Zellen am Boden erfolgte dies mittels Pipette (Hek293 EBNA, BV-2, HUVEC) oder Zellschaber (ARPE-19). Die Zellsuspension wurde dann 3 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert (Zentrifuge Biofuge fresco) und der Überstand verworfen. Anschließend folgten drei Waschschrte, wobei

Methoden

jeweils 1 ml PBS zum Pellet zugegeben wurde und nach Vortexen ein Zentrifugationsschritt für 3 Minuten bei 4600 rpm durchgeführt wurde. Der Überstand wurde jeweils verworfen und das Pellet nach dem letzten Waschschrift in 200 µl PBS resuspendiert. Darauf folgte eine Sonifizierung bei einer Amplitude von 38 % für ca. 10 - 20 Sekunden. Am Schluss erfolgte die Zugabe von 50 µl Lämmli und ein Aufkochen der Probe für 3 Minuten bei 93°C.

3.7.2 Bindeversuche an Zellen in Suspension

Um die NRTN-Bindung an Suspensions-Zelllinien zu überprüfen, wurden jeweils zwei voll bewachsene Zellkulturflaschen der Weri-Rb1 oder Y-79 Zelllinie in einem Falcontube vereinigt und bei 1000 rpm für 3 Minuten abzentrifugiert (Zentrifuge Sigma 2-5). Das Pellet wurde in 1,5 ml des NRTN-haltigen Überstandes aus der Calciumphosphat Transfektion (siehe Kapitel 3.2.1 und 3.2.2) gelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Nach 1 Stunde Inkubation bei 37°C im Thermomixer compact bei ca. 300 rpm wurden die Zellen in der Zentrifuge Biofuge fresco bei 1000 rpm für 3 Minuten abzentrifugiert. Anschließend erfolgten die Waschschriffe und weitere Präparation, wie in Kapitel 3.7.1 beschrieben.

3.7.3 Bindeversuche an hiPSC-RPE Zellen

Um die NRTN-Bindung an die auf Filtern kultivierten Zellen zu überprüfen, wurde diesen Zellen zunächst das Kultivierungsmedium abgenommen. 500 µl des NRTN-haltigen Überstandes aus der Calciumphosphat Transfektion (siehe Kapitel 3.2.1 und 3.2.2) wurden auf den Filter und 1,5 ml auf den Boden der 12-Well-Platte pipettiert, in der die Zellen kultiviert waren. Es folgte eine Inkubation bei 37°C für 1 Stunde. Im Anschluss wurde der Filter mit einem Skalpelle aus seinem Gestell herausgeschnitten und in eine Zellkulturschale gelegt. Nach Zugabe von 500 µl PBS wurden die Zellen mit einem Schaber vom Filter entfernt, resuspendiert und anschließend in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Es folgten Waschschriffe und die weitere Präparation, wie in Kapitel 3.7.1 beschrieben.

3.8 Funktionelle Versuche an transfizierten Zellen

3.8.1 Etablierung der ARPE-19 Transfektion

Zur Etablierung einer effizienten Transfektionsmethode für ARPE-19 Zellen wurden ARPE-19 Zellen einer vollen 10 cm Zellkulturschale nach dem o.g. Schema (Kapitel 3.1.2) im Verhältnis 1:6 auf eine 6-Well-Platte passagiert und auf insgesamt 3 ml mit DMEM/F-12 (1:1) Medium inklusive 10 % (v/v) FCS und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin aufgefüllt. Die Platte wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden Testtransfektionen mit verschiedenen Transfektionsreagenzien durchgeführt. Zur Visualisierung transfizierter Zellen wurde mit einem für GFP kodierenden Expressionsplasmid (pcDNA3_GFP) transfiziert.

Ein Transfektionsansatz wurde mit dem Mirus Bio™ TransIT®-LT1 Transfektionsreagenz hergestellt. Hierfür wurden 2,5 µl des Test-Plasmids (pcDNA3_GFP mit 1 µg/µl) zu 250 µl FCS-freiem DMEM/F-12 (1:1) Medium gegeben und durch Auf- und Abpipettieren durchmischt. Anschließend folgte die Zugabe von 7,5 µl TransIT-LT1 Reagenz und erneutes Durchmischen. Darauf wurde der Ansatz 15 - 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und tropfend auf die Zellen pipettiert.

Ein weiterer Transfektionsansatz wurde mit dem Lipofectamin 3000 Reagenz durchgeführt. Hierfür wurden 4 µl des Lipofectamin 3000 Reagenz und 125 µl OptiMEM in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gemischt. In einem weiteren 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 125 µl OptiMEM Medium, 5 µl des Test-Plasmids (pcDNA3_GFP) und 10 µl P3000 Reagenz zusammenpipettiert und durchmischt. Anschließend wurden die Flüssigkeiten beider Gefäße vereinigt, für 10 - 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich auf die Zellen getropft.

Als Kontrolle wurden 2,5 µl des Test-Plasmids ohne Transfektionsreagenz auf die Zellen pipettiert.

Nach 3 Tagen Inkubation bei 37°C wurde die Transfektionseffizienz anhand der GFP-Fluoreszenz unter dem inversen Epifluoreszenzmikroskop Nikon Eclipse TE2000 beurteilt.

3.8.2 Etablierung der Weri-Rb1 Transfektion

Zur Etablierung einer effizienten Transfektionsmethode für Weri-Rb1 Zellen wurden Weri-Rb1 Zellen aus drei vollen Zellkulturflaschen in einer Poly-L Lysin beschichteten 10 cm Zellkulturschale vereinigt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am Folgetag wurden die nun anhaftenden Zellen durch Zugabe von 3 ml Trypsin und Inkubation für 5 Minuten bei 37°C von der Schale abgelöst und anschließend bei 1000 rpm für 3 Minuten zentrifugiert (Zentrifuge Sigma 2-5). Das Zellpellet wurde in 10 ml FCS-freiem RPMI 1640 Medium gelöst. Daraufhin wurde mithilfe einer Zählkammer die Zellzahl bestimmt. 2,5 Millionen Weri-Rb1 Zellen wurden in ein Well einer Poly-L-Lysin beschichteten 6-Well-Platte ausgesät und mit FCS-freiem RPMI 1640 Medium auf 3 ml Gesamtvolumen aufgefüllt.

Am nächsten Tag fanden Testtransfektionen mit pcDNA3_GFP unter Verwendung des Mirus Bio™ TransIT®-LT1 und des Lipofectamin 3000 Transfektionsreagenzes statt (Ansätze siehe Kapitel 3.8.1).

Als Testplasmid wurde bei diesem Versuch ebenfalls pcDNA3_GFP benutzt. Die GFP-Fluoreszenz wurde nach 3 Tagen Inkubation bei 37°C unter dem inversen Epifluoreszenzmikroskop Nikon Eclipse TE2000 beurteilt.

3.8.3 Autophagie-Assay mit transfizierten ARPE-19 Zellen

Für den Autophagie-Assay an transfizierten ARPE-19 Zellen wurden 1/10 der ARPE-19 Zellen einer voll (80 – 90 % Konfluenz) bewachsenen 10 cm Zellkulturschale in 12-Well-Platten passagiert. Nach 24 Stunden Inkubation der Zellen bei 37°C wurden diese Zellen im 12-Well mit Lipofectamin 3000, wie in Kapitel 3.8.1 beschrieben, jedoch mit veränderten Volumina des Transfektionsansatzes (siehe Tabelle 25), transfiziert.

Tabelle 25: Angegeben ist der in diesem Versuch verwendete Lipofectamin 3000 Transfektionsansatz.

Lipofectamin 3000 Transfektionsansatz	
OptiMEM	50 µl
Lipofectamin 3000 Reagent	1,5 µl
OptiMEM	50 µl
DNA (1µg/µl)	2 µl
P3000 Reagent	4 µl

Methoden

Die zur Transfektion verwendeten Vektoren waren pcDNA4_GFP, pcDNA4_GFP_NRTN:G und pcDNA4_GFP_NRTN:A, wobei jeweils 2 Wells je Plasmid transfiziert wurden. Nach drei Tagen Inkubation bei 37°C im Inkubator wurden die Zellen zunächst unter dem Nikon Mikroskop bezüglich ihrer Transfektionseffizienz beurteilt. Im Anschluss wurde zur Induktion der Autophagie jeweils eines von zwei gleich transfizierten Wells mit 1mM H₂O₂ für 2 Stunden bei 37°C inkubiert (Szatmári-Tóth et al. 2016). Das jeweils andere Well blieb unbehandelt.

Im Anschluss wurde der Überstand abgenommen und die ARPE-19 Zellen mit 100 µl 1x PBS und 4 µl der nach Angaben des Herstellers aufgelösten cComplete™ ULTRA Tablette überschichtet. Die Zellen wurden anschließend mit einem Zellschaber von der Platte gelöst, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und auf Eis positioniert. Danach folgte die Sonifizierung der Zellen, Zugabe von 5-fach Lämmli und ein Aufkochen der Proben auf 93°C.

In anschließenden Western Blot Analysen wurde die Autophagie der Zellen anhand der Autophagie-Marker p62 und LC3 (II), sowie die ERK1/2 Phosphorylierung verfolgt.

3.8.4 Differenzierungsversuch mit transfizierten Weri-Rb1 Zellen

Die Differenzierungsversuche wurden an Weri-Rb1 Zellen im 12-Well-Format durchgeführt. Dazu wurden zunächst in jedes Poly-L-Lysin beschichtete 12-Well 1 Million Zellen (aus einer zuvor Poly-L-Lysin beschichteten 10 cm Schale, siehe Kapitel 3.8.2) pipettiert. Das Volumen im Well wurde mit FCS-freiem RPMI Medium auf 1 ml aufgefüllt und es erfolgte die Zugabe von 30 µl N-2 Supplement (100x) (nach Hirooka et al. 2002 modifiziert). Nach einer Inkubation über Nacht fand am nächsten Tag die Transfektion der Weri-Rb1 Zellen mit dem Lipofectamin 3000 Reagenz, wie in Kapitel 3.8.2 beschrieben, jedoch mit veränderten Volumina des Transfektionsansatzes (Tabelle 25), statt.

Dabei wurden die Vektoren pcDNA4_GFP, pcDNA4_GFP_NRTN:G und pcDNA4_GFP_NRTN:A verwendet.

Nach fünf Tagen Inkubation bei 37°C wurden unter einem Nikon-Mikroskop zunächst die fluoreszierenden und somit transfizierten Zellen gesucht und anschließend deren Differenzierung mikroskopisch verglichen.

3.9 Funktionelle Versuche an Zellen auf NRTN-haltiger extrazellulärer Matrix (EZM)

3.9.1 Herstellung NRTN-haltiger EZM

Für die Herstellung NRTN-haltiger EZM wurden Hek293 EBNA Zellen auf Poly-L-Lysin beschichteten Wells ausgesät (Menge siehe Tabelle 26) und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag fand eine Transfektion der zu ca. 80 – 90 % konfluenten Hek293 EBNA Zellen mittels Mirus Bio™ TransIT®-LT1 Reagenz mit den Vektoren pcDNA3, pcDNA3_NRTN:G und pcDNA3_NRTN:A (siehe Kapitel 3.2.3) mit den in Tabelle 26 angegebenen Mengen statt.

Tabelle 26: Angegeben sind die verwendeten Mirus-Transfektionsansätze in unterschiedlichen Well-Formaten.

Zusammensetzung	6-Well Platte	12-Well Platte	24-Well Platte
Anteil einer voll bewachsenen 10 cm Platte, der ausgesät wurde	1:18	1:30	1:80
FCS-freies Medium	250 µl	100 µl	50 µl
DNA (1µg/µl)	2,5 µg = 2,5 µl	1 µg = 1 µl	0,5 µg = 0,5 µl
TransIT-LT1 Reagenz	7,5 µl	3 µl	1,5 µl

Nach einem Mediumwechsel der Zellen zu FCS-freiem Medium, wurde der Transfektionsansatz nach 20-30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur auf das Medium pipettiert und die Zellen anschließend für 72 Stunden bei 37°C kultiviert.

Nach 3 Tagen fand die Präparation der EZM statt (Hellewell et al. 2017). Dazu wurde zunächst der Überstand abgenommen, die Zellen mit 300 µl 1x PBS gewaschen und danach mit 200 µl einer steril gefilterten 20 mM Ammoniumhydroxid-Lösung lysiert. Dabei wurden die Zellen 5 Minuten lang bei Raumtemperatur durch Schwenken der Platte vom Boden gelöst. Das entstandene Zelllysate wurde anschließend abgenommen, in 1,5 ml Reaktionsgefäßen aufbewahrt und für spätere Western-Blot-Analysen mit 5-fach Lämmli-Puffer versetzt. Darauf fanden 5 bis 7 Waschschriffe der EZM statt, bei welchen jeweils 1 ml Millipore H₂O in jedes Well pipettiert und nach leichtem Schwenken wieder abgenommen wurde. Die vollständige Ablösung der Zellen von der EZM wurde schließlich noch unter dem Mikroskop beurteilt.

3.9.2 Autophagie-Assay mit ARPE-19 Zellen auf NRTN-haltiger EZM

Der Autophagie-Assay an ARPE-19 Zellen auf NRTN-haltiger EZM wurde in 12-Well-Platten durchgeführt. ARPE-19 Zellen wurden hierfür auf die EZM von Hek293 EBNA Zellen aufgebracht, die mit pcDNA3, pcDNA3_NRTN:G und pcDNA3_NRTN:A transfiziert worden waren (je zwei Wells pro Plasmid). Auf die frisch präparierte NRTN-haltige EZM (Kapitel 3.9.1) wurden ARPE-19 Zellen (je 1/10 einer voll bewachsenen 10 cm Schale) ausgesät und in FCS-freiem Medium für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurde zunächst ein Mediumaustausch zu FCS-freiem Medium durchgeführt. Eine Hälfte der Wells (ARPE-19 Zellen auf EZM mit NRTN:G, NRTN:A oder Kontroll-EZM) wurde mit 1 mM H₂O₂ für 2 Stunden bei 37°C behandelt, um die Autophagie zu induzieren (Szatmári-Tóth et al. 2016). Die andere Hälfte der Wells (ebenfalls ARPE-19 Zellen auf EZM mit NRTN:G, NRTN:A oder Kontroll-EZM) blieben unbehandelt.

Die Zellen wurden im Anschluss an diese Inkubationszeit, wie in 3.8.3 angegeben, geerntet und für Western Blot Analysen vorbereitet. Die Autophagie wurde dabei anhand der Autophagie Marker p62 und LC3 (II), sowie die ERK1/2 Phosphorylierung verfolgt.

3.9.3 Autophagie-Assay mit hiPSC-RPE Zellen auf NRTN-haltiger EZM

Wie in Kapitel 3.9.2 wurde ein Autophagie-Versuch auf NRTN-haltiger EZM auch in hiPSC-RPE Zellen durchgeführt. Dazu wurden zunächst NRTN:G-haltige, NRTN:A-haltige und Kontroll-EZM von Hek293 EBNA Zellen in 12-Well Platten hergestellt, indem diese mit pcDNA3, pcDNA3_NRTN:G und pcDNA3_NRTN:A transfiziert worden waren (je zwei Wells pro Plasmid). Anschließend wurden hiPSC-RPE Zellen mit TrypLE von den Filtern gelöst, auf welchen die Zellen kultiviert wurden und anschließend über Nacht in Serum-freiem KnockOut Medium auf der präparierten EZM inkubiert. Darauf folgte die Zugabe von 1 mM H₂O₂ für 2 Stunden bei 37°C in je ein Well mit Zellen auf NRTN:G-, NRTN:A- und Kontroll-EZM. Das jeweils andere Well blieb unbehandelt.

Wie in 3.8.3 wurden die Zellen geerntet und Western Blot Analysen mit Antikörpern gegen LC3 (II), p62, ERK1/2 und pERK1/2 unterzogen.

3.9.4 Autophagie-Assay mit Weri-Rb1 Zellen auf NRTN-haltiger EZM

Um den Einfluss NRTN-haltiger EZM auf die Autophagie-Induktion in Weri-Rb1 Zellen zu überprüfen, wurde die NRTN-haltige EZM zunächst, wie in Kapitel 3.9.1 beschrieben, in 6-Well-Platten hergestellt (je zwei Wells mit EZM mit NRTN:G-, NRTN:A- oder Kontroll-EZM). Im Anschluss wurden je 3 Millionen Weri-Rb1 Zellen (aus einer zuvor Poly-L-Lysin beschichteten 10 cm Schale, siehe Kapitel 3.8.2) in FCS-freiem Medium in jedes Well der Platte ausgesät. Nach 2 Tagen Inkubation wurden die nun auf der EZM anhaftenden Zellen (jeweils ein Well mit NRTN:G-, NRTN:A- oder Kontroll-EZM) mit 1 mM H₂O₂ für 2 Stunden bei 37°C behandelt, um die Autophagie zu induzieren. Die Kontrollen (ebenfalls jeweils ein Well mit NRTN:G-, NRTN:A- oder Kontroll-EZM) wurden lediglich mit frischem, FCS-freiem Medium versetzt. Nach dieser Inkubationszeit fand die Ernte der Zellen, wie in Kapitel 3.8.3 beschrieben, statt. Mittels Western Blot Analysen wurde die Autophagie der Zellen anhand der Autophagie-Marker p62 und LC3 (II), sowie die ERK1/2 Phosphorylierung verfolgt.

3.9.5 MTT-Assay an Weri-Rb1 Zellen auf NRTN-haltiger EZM nach oxidativem Stress

Der MTT-Assay zur Überprüfung der Zellviabilität nach oxidativem Stress wurde im 24-Well Format durchgeführt. Weri-Rb1 Zellen wurden hierfür auf die EZM von Hek293 EBNA Zellen aufgebracht, die mit pcDNA3, pcDNA3_NRTN:G und pcDNA3_NRTN:A transfiziert worden waren (siehe Kapitel 3.9.1, je zwei Wells pro Plasmid). Je 1 Million Weri-Rb1 Zellen wurden in jedes Well pipettiert und für zwei Tage inkubiert. Anschließend wurden, nach Zugabe von frischem FCS-freiem Medium, verschiedene Mengen (1 mM, 0,25 mM, 0,175 mM, 0,1 mM H₂O₂) in die dafür vorgesehenen Wells gegeben (jeweils ein Well mit NRTN:G-, NRTN:A- oder Kontroll-EZM) und für 24 Stunden auf den Zellen belassen. Die Kontrollen (jeweils ein Well mit NRTN:G-, NRTN:A- oder Kontroll-EZM) blieben wiederum unbehandelt.

Nach dieser Inkubationszeit fanden ein 2-facher Waschschrift mit je 1 ml 1x PBS und ein Mediumwechsel zu 0,5 ml FCS-freiem Medium statt. In dieses wurde 50 µl MTT-Lösung pipettiert. Die ca. 30 - 45-minütige Inkubation wurde im 37°C Inkubator durchgeführt, bis sich lilafarbene Kristalle bildeten. Darauf wurde das zweimalige Waschen der Zellen wiederholt und 200 µl HCl-Isopropanol (5 ml HCl und 45 ml

Methoden

Isopropanol) zugegeben. Abschließend wurden je 80 µl der Proben in eine 96-Well Platte mit flachem Boden pipettiert und die Absorption bei 540 nm im Tecan Spark® gemessen.

3.9.6 Quantitativer Real Time PCR-Assay an Weri-Rb1 und hiPSC-RPE Zellen auf NRTN-haltiger EZM nach oxidativem Stress

Die NRTN-haltige EZM wurde bei diesem Assay in 12-Well Platten vorbereitet (aus Hek293 EBNA Zellen, die mit pcDNA3, pcDNA3_NRTN:G und pcDNA3_NRTN:A transfiziert worden waren, siehe Kapitel 3.9.1, je 2 Wells pro Plasmid). Dieser Assay wurde sowohl mit hiPSC-RPE Zellen als auch mit Weri-Rb1 Zellen durchgeführt.

Von den im 12-Well auf Filtern kultivierten hiPSC-RPE Zellen wurden die Zellen von je zwei vollen Filtern in ein Well mit NRTN-haltiger EZM gegeben. Dabei wurden die Zellen zunächst mit Tryp-LE von den Filtern gelöst und im Anschluss in Serum-freiem KnockOut Medium auf die präparierte EZM gegeben. Nach 6 Stunden Inkubation zum Anhaften der Zellen auf dem Plattenboden wurden, nach Zugabe von frischem Medium, 1 mM H₂O₂ in die dafür vorgesehenen Wells (jeweils ein Well mit NRTN:G-, NRTN:A- oder Kontroll-EZM) gegeben. Es folgte eine Inkubation für weitere 24 Stunden im 37°C Inkubator.

Die Weri-Rb1 Zellen wurden, wie zuvor beschrieben (Kapitel 3.8.2), gezählt und jeweils 2 Millionen Zellen in FCS-freiem Medium in ein Well pipettiert. Nach zwei Tagen wurden die am Boden festgesetzten Zellen mit frischem FCS-freiem Medium versehen und die zu stressenden Zellen für 24 Stunden mit 0,1 mM H₂O₂ versetzt.

Für die Zellernte wurde zunächst der Überstand aus den 12-Well Platten abgenommen, die Zellen in 700 µl Lysepuffer mit 1 % β-Mercaptoethanol suspendiert und mithilfe eines Schabers vorsichtig vom Plattenboden abgelöst. Nach dem Überführen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden die Zellen sofort auf Eis gelagert und anschließend bei -80°C eingefroren.

3.9.6.1 RNA-Präparation

Die RNA Präparation fand nach Herstellerangaben mit dem PureLink™ RNA Mini Kit von Thermo Fisher Scientific statt. Zu Beginn der RNA-Synthese wurden die

Methoden

gefrorenen Zellen nach dem Auftauen mit einer Spritze 5 bis 10 Mal auf- und abpipettiert, um die Lösung zu homogenisieren. Nach Zugabe von 700 µl Ethanol in jedes Reaktionsgefäß und Durchmischen der Probe, wurden 700 µl davon auf einen beigelegten Filter in einem Sammelbehälter gegeben und bei 12.000 g für 15 Sekunden bei Raumtemperatur zentrifugiert (Zentrifuge Biofuge pico). Dieser Schritt wurde so oft wiederholt, bis die Probe vollständig aufgebraucht war. Anschließend wurden 350 µl Waschpuffer I und 70 µl RDD Puffer zum Zellpellet hinzu pipettiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden noch einmal 350 µl Waschpuffer auf den Filter gegeben und die Probe erneut bei 12.000 g für 15 Sekunden zentrifugiert. Nach Abkippen des Überstandes wurden 500 µl des Waschpuffers II mit Ethanol zu den Proben pipettiert und ein weiteres Mal bei denselben Einstellungen zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde noch einmal wiederholt und im Anschluss der Filter durch 2-minütiges Zentrifugieren bei 12.000 g getrocknet. Der Filter wurde dann in ein neues Reaktionsgefäß positioniert, mit 30 - 100 µl RNase-freiem H₂O versetzt und für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Elution wurde 2 Minuten bei 12.000 g zentrifugiert. Die Konzentration der RNA wurde im NanoDrop® ND1000 Spektrophotometer gemessen und die RNA bei -80°C gelagert.

3.9.6.2 cDNA-Synthese

Zur cDNA Synthese wurden 250 ng RNA mit RNase-freiem H₂O auf ein Volumen von 11,5 µl aufgefüllt. Anschließend wurde 1 µl Random Hexamer Primer (100 µM) hinzugefügt und die Mischung für 5 Minuten bei 65°C im Thermocycler inkubiert. In der Zwischenzeit wurde ein Mastermix für die cDNA Synthese nach Tabelle 27 hergestellt.

Tabelle 27: Angegeben sind die Komponenten und Volumina des Mastermixes.

Komponenten	Volumen
RNase-freies H ₂ O	0,5 µl
5x Reaction Buffer	4 µl
dNTPs	2 µl
Reverse Transkriptase	1 µl

Die RNA-Ansätze wurden nach den 5 Minuten Inkubation bei 65°C aus dem Thermocycler genommen und auf Eis platziert. Nach Zugabe von 7,5 µl des

Methoden

Mastermixes in jeden Ansatz, wurde die cDNA Synthesereaktion im Thermocycler durchgeführt (siehe Tabelle 28).

Tabelle 28: Angegeben sind die Reaktionsschritte der cDNA Synthese mit Temperaturen und Laufzeiten.

Reaktionsschritt	Temperatur	Laufzeit
1. Schritt: Annealing	65°C	5 min
2. Schritt: cDNA-Synthese und Hitzeinaktivierung	25°C	10 min
	42°C	60 min
	70°C	10 min

3.9.6.3 Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR)

Für die qRT-PCR wurde ein Ansatz nach den Angaben in Tabelle 29 hergestellt.

Tabelle 29: Angegeben sind die Komponenten und Volumina des Ansatzes für die qRT-PCR.

Komponenten	Volumen
Millipore H ₂ O	0,375 µl
2x TaqMan™ Gene Expression Master Mix	5 µl
Primer forward (50 µm)	1 µl
Primer reverse (50 µm)	1 µl
Sonde	0,125 µl
cDNA (20 ng/µl)	2,5 µl

Die auf 20 ng/µl verdünnte cDNA wurde zunächst durch Vortexen gut durchmischt, herunterzentrifugiert und im Anschluss als Erstes auf den Boden der zu füllenden Platte pipettiert. Danach wurden je 7,5 µl des vorbereiteten qRT-PCR-Mastermixes hinzugegeben. Die Platte wurde mit einer Folie verschlossen und für einige Sekunden bei 1000 rpm abzentrifugiert (Zentrifuge Megafuge 1.0R). Danach wurde die qRT-PCR im QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System durchgeführt (Ablauf siehe Tabelle 30).

Tabelle 30: Angegeben sind die Reaktionsschritte der qRT-PCR mit Temperaturen, Laufzeiten und Zyklen.

Reaktionsschritt	Temperatur	Laufzeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	10 min	
1. Schritt: Denaturierung	95°C	40 s	40
2. Schritt: Annealing	60°C	1 min	
3. Schritt: Elongation	72°C	2 min	

4 Ergebnisse

In den folgenden Versuchen soll die Rolle des sezernierten NRTN-Proteins an AMD-assoziierten Prozessen analysiert werden. Des Weiteren soll die Auswirkung des AMD-assoziierten Polymorphismus rs79744308 auf die Funktion des NRTN-Proteins überprüft werden.

4.1 Überprüfung der Bindung der sezernierten NRTN Varianten an verschiedene Zelllinien

Im ersten Schritt wurde die Bindung der sezernierten NRTN Varianten (nicht protektive Variante NRTN:G und protektive Variante NRTN:A) an verschiedene, retinale und nicht retinale Zelllinien überprüft. Folgende Zelllinien wurden getestet: die humanen Retinoblastomzelllinien Weri-Rb1 und Y-79, die humane RPE Zelllinie ARPE-19, die murine Mikroglia-Zelllinie BV2, die aus humanen Endothelzellen der Nabelschnurvene abgeleitete HUVEC-Zelllinie, die humane Nierenzelllinie Hek293 EBNA und aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte RPE (hiPSC-RPE) Zellen. Mit Ausnahme der Hek293 EBNA Zelllinie stellen diese Zelllinien wichtige Modellsysteme bei der Erforschung molekularer Mechanismen der AMD Pathogenese dar (Buj-Bello et al. 1995; Kotzbauer et al. 1996; Golden et al. 1998; Salcedo et al. 1999; Wolf et al. 2008; Ma et al. 2009; Datta et al. 2017).

Zunächst wurden NRTN-haltige Mediumüberstände generiert, indem Hek293 EBNA Zellen mit Expressionsvektoren für Myc-getagtes NRTN transfiziert und für fünf Tage kultiviert wurden. Die Mengen an sezerniertem NRTN der nicht protektiven Variante (NRTN:G) und der protektiven Variante (NRTN:A) wurden mittels Western Blot Analysen angeglichen (siehe Abbildung 3A und 4A, Input).

Die Mediumüberstände mit den angeglichenen NRTN-Mengen wurden auf die oben genannten Zellen gegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen mehrfach gewaschen und einer Western Blot Analyse mit Antikörpern gegen β -Aktin (ACTB) als zelluläre Ladekontrolle und c-Myc unterzogen.

Ergebnisse

Abbildung 3A zeigt die Bindung von NRTN an die drei retinalen Zelllinien ARPE-19, Weri-Rb1 und Y-79. NRTN band an alle drei untersuchten retinalen Zelllinien. Des Weiteren hatte rs79744308 keinen Einfluss auf die Bindungsstärke der NRTN-Isoformen an die Zelllinien: Die Menge an gebundenem NRTN:G und NRTN:A in den Zellpellets zeigte keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 3B).

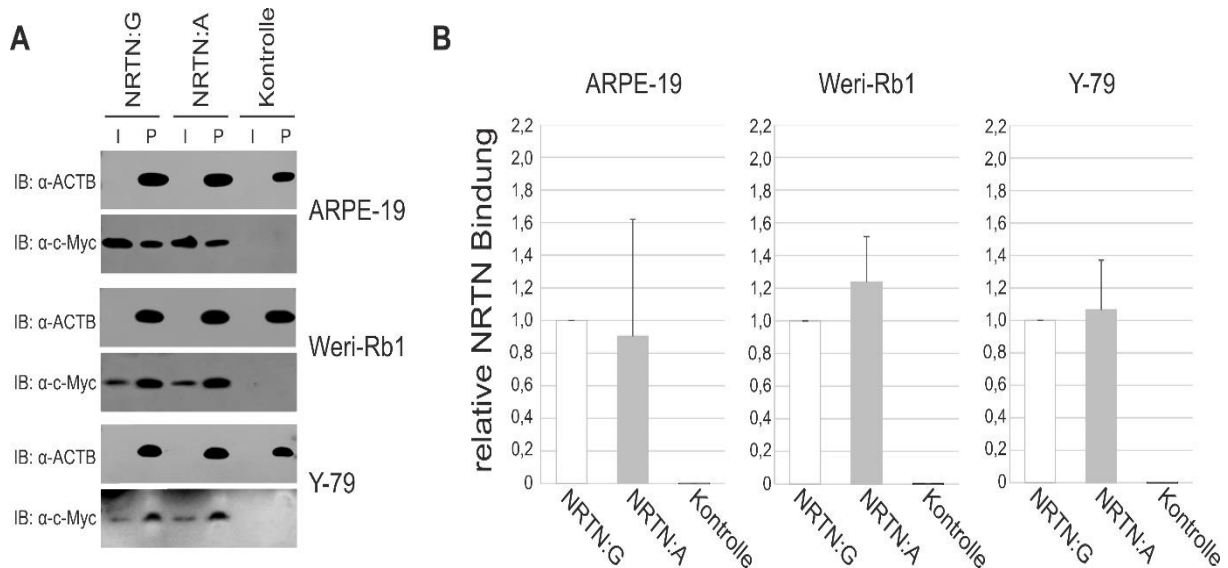


Abbildung 3: Bindung von NRTN an retinale Zelllinien.

A: ARPE-19, Weri-Rb1 und Y-79 Zellen wurden für 1 Stunde mit NRTN:G, NRTN:A oder Kontrollprotein enthaltendem Mediumüberstand (aus Hek293 EBNA Zellen, welche für fünf Tage mit pcDNA3_Myc_NRTN:G, pcDNA_Myc_NRTN:A oder pcDNA3 transfiziert worden waren) inkubiert. Nach mehreren Waschschritten wurden Western Blot Analysen mit Antikörpern gegen ACTB (Ladekontrolle), sowie gegen den Myc-Tag der NRTN-Proteine durchgeführt. I = Input, NRTN- oder Kontrollprotein enthaltender Mediumüberstand, P = Zellpellet. **B:** Die Signale von c-Myc im Pellet wurden gegen ACTB und das Signal des jeweiligen NRTN-Inputs normalisiert und auf NRTN:G kalibriert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. Die statistische Evaluierung erfolgte mittels Mann-Whitney-Test.

Abbildung 4A zeigt die Bindung von NRTN an die drei nicht-retinalen Zelllinien Hek293 EBNA, HUVEC und BV2. Dabei wurde eine Bindung von NRTN an alle diese Zelllinien festgestellt. Wie bei den retinalen Zelllinien wurde auch hier kein statistisch signifikanter Einfluss des AMD-assoziierten Polymorphismus rs79744308 auf die Bindungsstärke der NRTN Varianten an diese Zelllinien verzeichnet.

Ergebnisse

Bei Weri-Rb1, Hek293 EBNA und BV2 Zellen erscheint es, als könnte die protektive Variante NRTN:A eine leicht stärkere Bindungsaffinität als die nicht protektive Variante NRTN:G aufweisen (Abbildung 3B und 4B). Um diese Vermutung zu bestätigen, sollten zusätzliche Replikationen dieses Versuches durchgeführt werden.

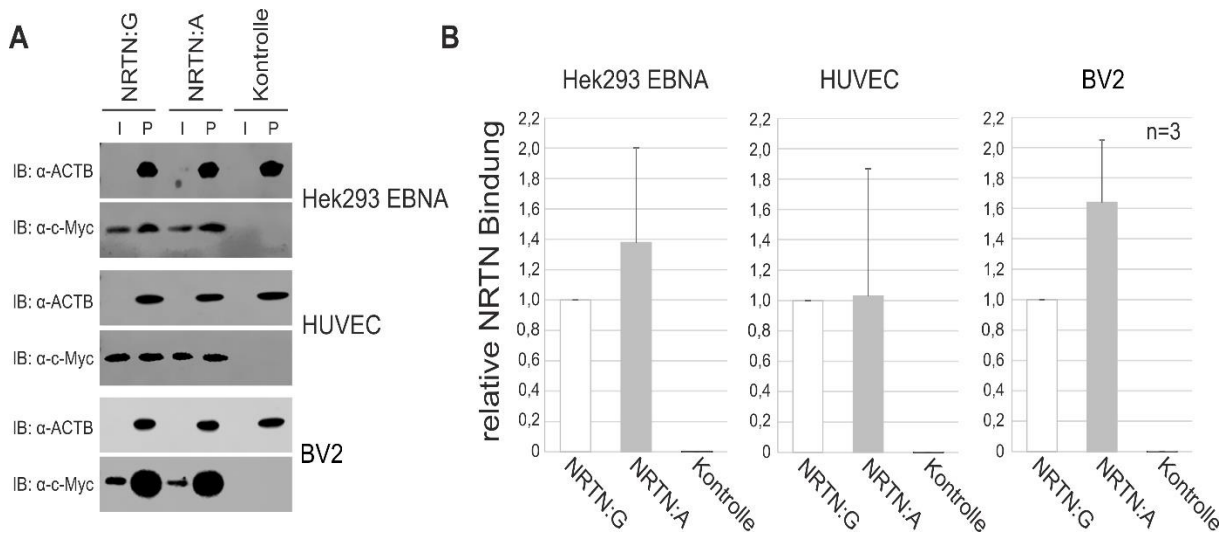


Abbildung 4: Bindung von NRTN an nicht retinale Zelllinien.

A: Hek293 EBNA, HUVEC und BV2 Zellen wurden für 1 Stunde mit NRTN:G, NRTN:A oder Kontrollprotein enthaltendem Mediumüberstand (aus Hek293 EBNA Zellen, welche für fünf Tage mit pcDNA3_Myc_NRTN:G, pcDNA_Myc_NRTN:A oder pcDNA3 transfiziert worden waren) inkubiert. Nach mehreren Waschschritten wurden Western Blot Analysen mit Antikörpern gegen ACTB (Ladekontrolle), sowie gegen den Myc-Tag der NRTN-Proteine durchgeführt. I = Input, NRTN- oder Kontrollprotein enthaltender Mediumüberstand, P = Zellpellet. **B:** Die Signale von c-Myc im Pellet wurden gegen ACTB und das Signal des jeweiligen NRTN-Inputs normalisiert und auf NRTN:G kalibriert. Gezeigt sind Mittelwerte Standardabweichungen. Die statistische Evaluierung erfolgte mittels Mann-Whitney-Test.

In Abbildung 5 ist die Bindung der NRTN Varianten an hiPSC-RPE Zellen gezeigt. Sowohl NRTN:G als auch NRTN:A zeigen eine Bindung an diese Zellen. Eine Quantifizierung der Bindungsstärken konnte aufgrund der geringen Verfügbarkeit dieser Zellen nicht im verfügbaren Zeitrahmen durchgeführt werden.

Ergebnisse

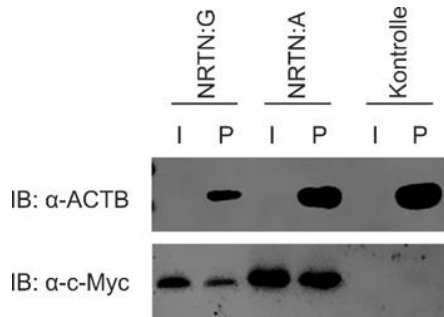


Abbildung 5: Bindung der NRTN:G und NRTN:A Varianten an hiPSC-RPE Zellen.

hiPSC-RPE Zellen wurden für 1 Stunde mit NRTN:G, NRTN:A oder Kontrollprotein enthaltendem Mediumüberstand (aus Hek293 EBNA Zellen, welche für fünf Tage mit pcDNA3_Myc_NRTN:G, pcDNA_Myc_NRTN:A oder pcDNA3 transfiziert worden waren) inkubiert. Nach mehreren Waschschrinen wurden Western Blot Analysen mit Antikörpern gegen ACTB (Ladekontrolle), sowie gegen den Myc-Tag der NRTN-Proteine durchgeführt. I = Input, NRTN- oder Kontrollprotein enthaltender Mediumüberstand, P = Zellpellet.

4.2 Etablierung von Modellsystemen zur funktionellen Testung der NRTN Varianten

4.2.1 Aufreinigung des NRTN-Proteins

Zunächst sollten funktionelle Tests mit aufgereinigten, rekombinanten NRTN Proteinen durchgeführt werden. In Vorarbeiten am Institut für Humangenetik wurde hierfür die Aufreinigung C-terminal Streptavidin-getagter NRTN Varianten versucht. Dies gelang jedoch nicht – nach der Aufreinigung befand sich kein Protein im Eluat. Im Rahmen dieser Arbeit sollten nun N-terminal Myc-getagte NRTN Varianten mittels Immunpräzipitation aufgereinigt werden. Der Myc-Tag ist deutlich kleiner, als der Streptavidin-Tag (1,2 kDa gegenüber 4,3 kDa) und wurde an den N-Terminus (zwischen Signalpeptid und Propeptid) kloniert. Hierdurch sollten mögliche negative Auswirkungen aufgrund der Größe und Position des Tags auf Faltung des Proteins oder Zugänglichkeit des Tags vermieden werden.

Die Aufreinigung der Myc-getagten NRTN Varianten erfolgte nun über Agarosegekoppelte c-Myc-Antikörper. Es wurden mehrere Versuche durchgeführt, wobei unter anderem auch die Menge des empfohlenen Inputs (Myc-NRTN haltiger Überstand) stark erhöht wurde. Bei keinem der Versuche konnte Myc-getagtes NRTN in der Eluatfraktion detektiert werden (Abbildung 6).

Ergebnisse

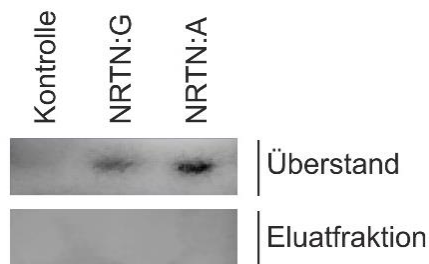


Abbildung 6: Aufreinigung von Myc-getagten NRTN-Varianten.

Myc_NRTN:G, Myc_NRTN:A oder Kontrollprotein enthaltender Mediumüberstand (aus Hek293 EBNA Zellen, welche für fünf Tage mit pcDNA3_Myc_NRTN:G, pcDNA3_Myc_NRTN:A oder pcDNA3 transfiziert worden waren) wurden in eine affinitätschromatographische Aufreinigung mit Pierce™ Anti-c-Myc Agarose eingesetzt. Im Anschluss wurden Western Blot Analysen der Überstände und Eluatfraktionen mit Antikörpern gegen den Myc-Tag der NRTN Proteine durchgeführt.

Da die Aufreinigung von NRTN trotz Verwendung zweier unterschiedlicher Tags (N-teminaler Myc-Tag und C-terminaler Streptavidin-Tag) im gegebenen Zeitrahmen nicht erfolgreich war, wurden andere Ansätze für die Analyse von NRTN Varianten für definierte zelluläre Prozesse etabliert.

4.2.2 Herstellung NRTN-haltiger EZM

Da NRTN mit hoher Affinität an die EZM bindet und dort vorliegt (Bespalov et al. 2011), sollten funktionelle Versuche an Zellen durchgeführt werden, welche auf NRTN-haltiger EZM inkubiert wurden. In der Literatur sind bereits einige Studien zu finden, bei welchen Analysen von zellulären Prozessen auf speziell hergestellter EZM durchgeführt wurden (unter anderem Soboleva et al. 2003; Hellewell et al. 2017; Fernandez-Godino et al. 2018).

Für die Herstellung NRTN-haltiger EZM wurden zunächst Hek293 EBNA Zellen mit Expressionsvektoren für NRTN (pcDNA3_NRTN:G, pcDNA3_NRTN:A oder pcDNA3) transfiziert und für drei Tage inkubiert. Anschließend wurden die Zellen von der EZM entfernt (nach Hellewell et al. 2017) und die EZM in Lämmli-Puffer gelöst. Die Zellen wurden einer Western Blot Analyse mit Antikörpern gegen ACTB (Ladekontrolle) und NRTN unterzogen, die EZM einer Western Blot Analyse mit Antikörpern gegen Elastin (EZM-Ladekontrolle) und NRTN.

In Abbildung 7 ist zu erkennen, dass NRTN von den Zellen exprimiert wurde und in der EZM abgelagert wurde. Damit ist die Herstellung NRTN-haltiger EZM gelungen und kann nun für weitere funktionelle Versuche angewandt werden.

Ergebnisse

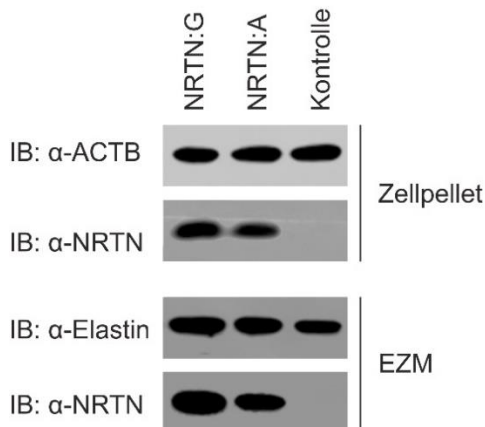


Abbildung 7: Heterologe NRTN-Expression und – Ablagerung in der EZM durch Hek293 EBNA Zellen.

Hek293 EBNA Zellen wurden mit pcDNA3_NRTN:G, pcDNA3_NRTN:A oder pcDNA3 transfiziert und für drei Tage inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen und EZM geerntet. Diese wurden Western Blot Analysen mit Antikörpern gegen ACTB (zelluläre Ladekontrolle), Elastin (EZM-Ladekontrolle) und NRTN unterzogen.

4.2.3 Heterologe NRTN-Expression in retinalen Zelllinien

4.2.3.1 Herstellung von bicistronischen Expressionsvektoren mit NRTN- und GFP-Expressions-kassetten

Als weiteres Modellsystem für funktionelle Versuche sollten retinale Zelllinien dienen, welche die NRTN Varianten heterolog überexprimieren. Die transfizierten Zellen sollten gleichzeitig GFP exprimieren, um transfizierte Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop zu identifizieren und die Transfektionseffizienz der NRTN Expressionsvektoren vergleichen zu können. Zu diesem Zweck wurden bicistronische Expressionsvektoren generiert, welche die heterologe Expression von GFP und NRTN der nicht protektiven (NRTN:G) oder protektiven (NRTN:A) Variante ermöglichen.

Die NRTN-Expressionskassetten wurden aus den bereits zuvor am Institut generierten Vektoren pcDNA3_NRTN:G und pcDNA3_NRTN:A mit den Blunt-End generierenden Restriktionsenzymen Nru I und Xmn I herausgeschnitten. Das herausgeschnittene Vektorstück enthielt neben der kodierenden Sequenz für NRTN:G oder NRTN:A, welche über BamH I und Xho I in pcDNA3 inseriert wurde, auch den CMV Promotor und das Poly-Adenylierungs-Signal (BGH polyA) (Abbildung 8A).

Diese NRTN-Expressionskassetten wurden in den ebenfalls am Institut für Humangenetik bereits generierten Zielvektor pcDNA4_GFP integriert. In diesen war die kodierende Sequenz für GFP über Kpn I und Not I inseriert worden. Für das

Ergebnisse

Einbringen der NRTN-Expressionskassette wurde der Zielvektor pcDNA4_GFP mit dem Restriktionsenzym Nru I verdaut und somit geöffnet (Abbildung 8B).

Die neu generierten Vektoren pcDNA4_GFP_NRTN:G und pcDNA4_GFP_NRTN:A enthielten nach der Ligation jeweils eine GFP-Expressionskassette mit eigenem Promotor und Poly-Adenylierungs-Sequenz und eine NRTN-Expressionskassette ebenfalls mit eigenem Promotor und Poly-Adenylierungs-Sequenz (Abbildung 8C).

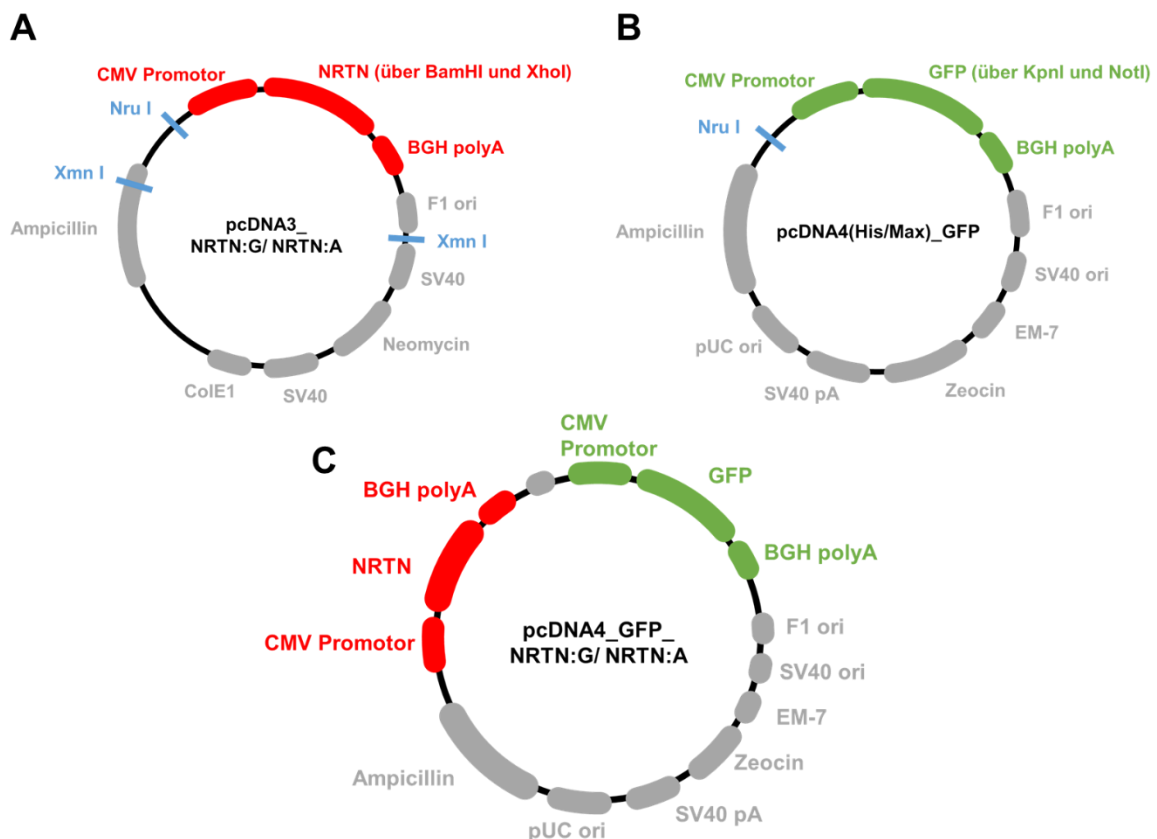


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Ausgangsvektoren pcDNA3_NRTN (A) und pcDNA4_GFP (B) und des neu generierten bicistronischen Expressionsvektors pcDNA4_GFP_NRTN (C).

A Die NRTN-Expressionskassetten, welche die kodierende Sequenz für NRTN:G oder NRTN:A, einen CMV Promotor und eine Poly-Adenylierungs-Sequenz (BGH polyA) enthielten, wurden aus den entsprechenden pcDNA3_NRTN Vektoren mit Nru I und Xmn I (blau) herausgeschnitten und in einen **B** mit Nru I (blau) geöffneten pcDNA4_GFP Vektor kloniert. **C:** Neu klonierter Expressionsvektor mit GFP- (grün) und NRTN- (rot) Expressionskassetten.

Ergebnisse

4.2.3.2 Testung der neu klonierten, bicistronischen Expressionsvektoren

Im nächsten Schritt wurde getestet, ob die neu generierten, bicistronischen Expressionsvektoren die gleichzeitig heterologe Expression von GFP und NRTN ermöglichen. Hierfür wurden Hek293 EBNA Zellen mit den beiden bicistronischen Vektoren pcDNA4_GFP_NRTN:G und pcDNA4_GFP_NRTN:A, sowie mit einem Kontrollvektor (pcDNA4_GFP) transfiziert. Nach 3 Tagen Inkubation wurde zunächst die GFP-Fluoreszenz unter einem inversen Epifluoreszenzmikroskop beurteilt. Wie in Abbildung 9 gezeigt, wird das GFP-Protein von beiden neu generierten Vektorkonstrukten exprimiert. Die Transfektionseffizienz des pcDNA4_GFP Vektors war deutlich höher, was daran liegen könnte, dass dieser mit 6 kb deutlich kleiner ist, als die bicistronischen GFP- und NRTN-Expressionsvektoren mit 8,1 kb und somit leichter von den Zellen aufgenommen wird.

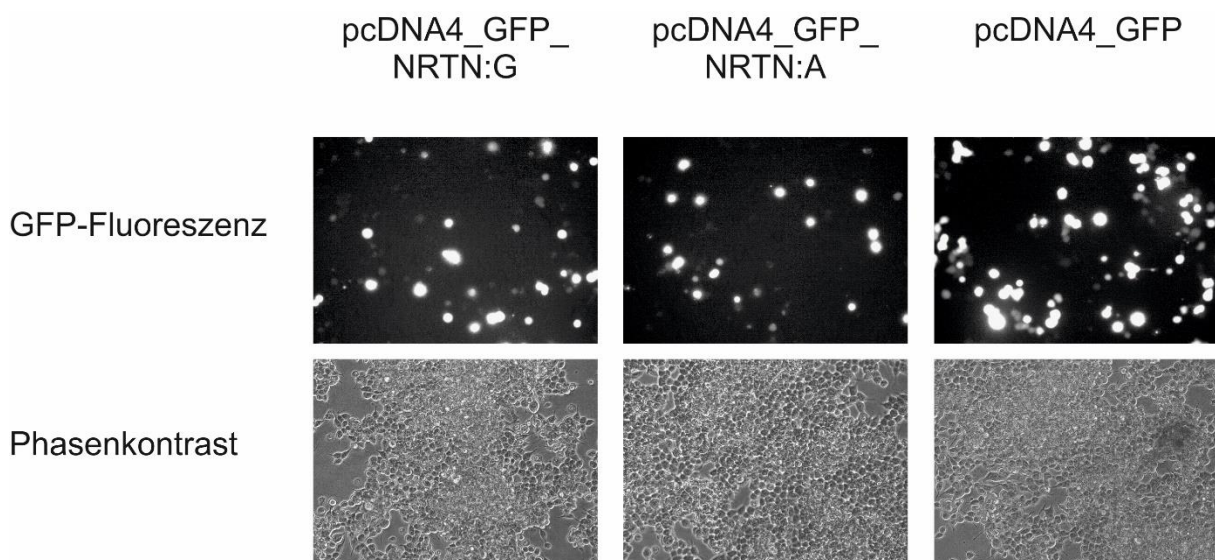


Abbildung 9: Fluoreszenzmikroskopie zur Überprüfung der heterologen Expression von GFP ausgehend von den neu generierten bicistronischen Expressionsvektoren.

Hek293 EBNA Zellen wurden mit pcDNA4_GFP_NRTN:G, pcDNA4_GFP_NRTN:A oder pcDNA4_GFP transfiziert und für drei Tage inkubiert. Im Anschluss wurden unter einem inversen Fluoreszenzmikroskop unter 10-facher Vergrößerung Fluoreszenz- und Phasenkontrastaufnahmen angefertigt.

Im nächsten Schritt wurden die transfizierten Hek293 EBNA Zellen einer Western Blot Analyse mit Antikörpern gegen ACTB (als Ladekontrolle), GFP (zur Kontrolle der Transfektionseffizienz) und NRTN unterzogen. Sowohl GFP, als auch NRTN wurden in den Zellpellets nachgewiesen (Abbildung 10). Die neu generierten Konstrukte können somit für weitere Versuche herangezogen werden.

Ergebnisse

In Abbildung 10 ist zusätzlich zu erkennen, dass die Expression von GFP in den mit pcDNA4_GFP transfizierten Zellen höher war, als in den Zellen, die mit den pcDNA4_GFP_NRTN Expressionsvektoren transfiziert worden waren. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den fluoreszenzmikroskopischen Analysen (Abbildung 9).

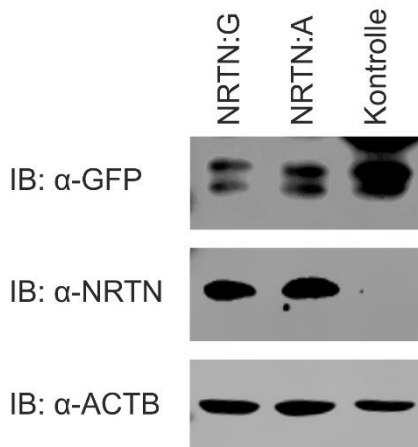


Abbildung 10: Western Blot Analysen zur Überprüfung der heterologen Expression von GFP und NRTN ausgehend von den neu generierten bicistronischen Expressionsvektoren.

Hek293 EBNA Zellen wurden mit pcDNA4_GFP_NRTN:G, pcDNA4_GFP_NRTN:A und pcDNA4_GFP transfiziert und für drei Tage inkubiert. Im Anschluss wurden diese Zellen einer Western Blot Analyse mit Antikörpern gegen ACTB (Ladekontrolle), GFP und NRTN unterzogen.

4.2.3.3 Testung verschiedener Transfektionsreagenzien an retinalen Zelllinien

Zu Beginn der funktionellen Versuche, welche an NRTN-überexprimierenden retinalen Zelllinien durchgeführt werden sollen, sollten zunächst verschiedene Transfektionsreagenzien ausgetestet werden, um eine möglichst hohe Transfektionseffizienz der Zellen zu erreichen.

Hierfür wurden Weri-Rb1 und ARPE-19 Zellen mit einem pcDNA3_GFP Expressionsvektor transfiziert, um die Transfektionseffizienz anhand der GFP-Fluoreszenz bestimmen zu können. Es wurden die Transfektionsreagenzien Mirus TransIT LT1 und Lipofectamin 3000 getestet.

Bei Weri-Rb1 Zellen war nach drei Tagen Inkubation noch keine GFP-Fluoreszenz unter dem Fluoreszenzmikroskop zu erkennen, weswegen die Zellen für weitere zwei Tage im Inkubator belassen wurden. Nach insgesamt fünf Tagen war eine GFP-Fluoreszenz lediglich bei der Transfektion mit dem Lipofectamin 3000 Reagenz sichtbar (Abbildung 11). Allerdings war die Transfektionseffizienz mit < 5 % sehr gering. Daher ist diese Methode für die Durchführung der meisten funktionellen Versuche nicht geeignet, kann aber für morphologische Untersuchungen an mit

Ergebnisse

pcDNA4_GFP_NRTN transfizierten Zellen herangezogen werden, da diese anhand der GFP-Fluoreszenz unter dem Fluoreszenzmikroskop identifiziert werden können. Bei der Phasenkontrast-Mikroskopie war allerdings eine Schädigung der transfizierten Zellen zu sehen, welche sich anhand von kristallinen Einschlüssen und abschwimmenden, toten Zellen bemerkbar machte.

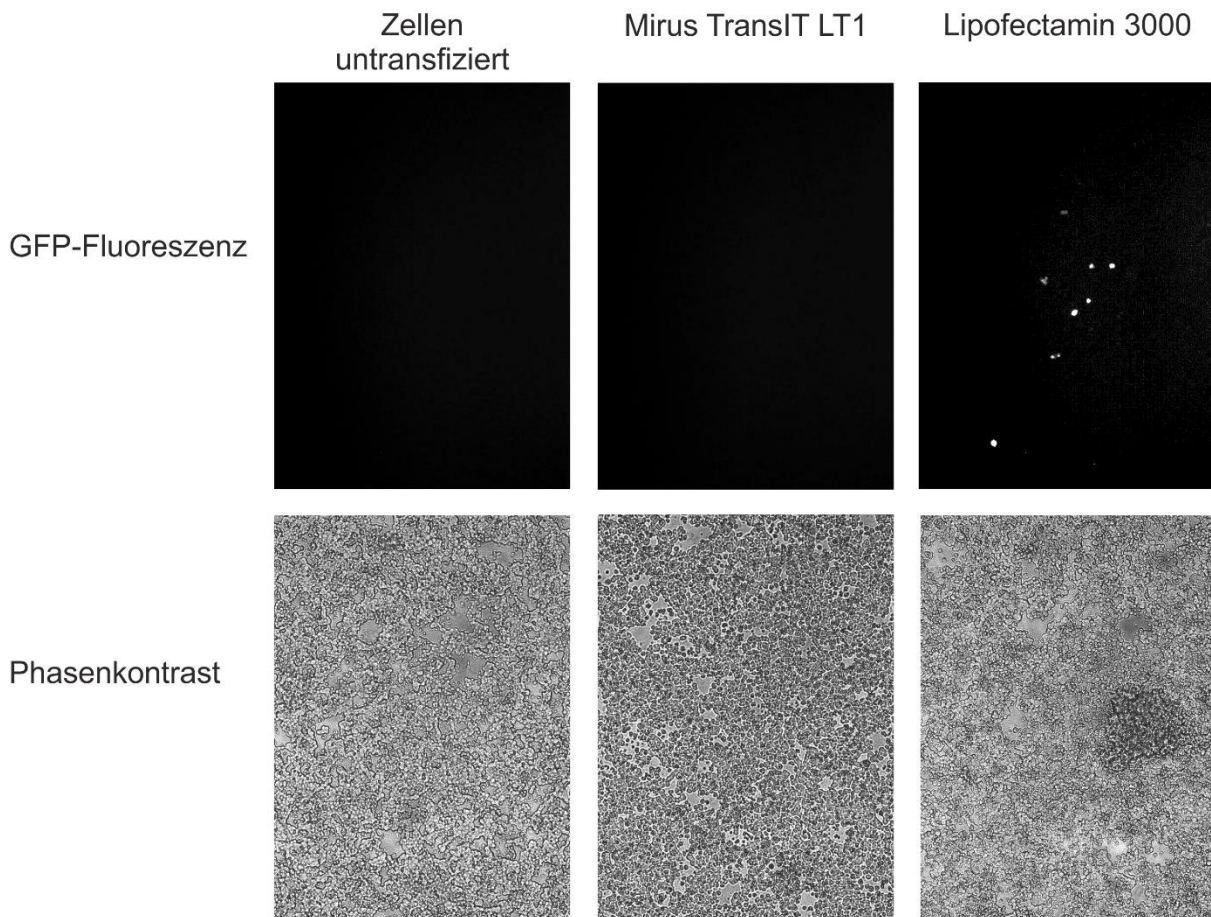


Abbildung 11: Fluoreszenzmikroskopie zur Testung zweier verschiedener Transfektionsmethoden in Weri-Rb1 Zellen.

Weri-Rb1 Zellen wurden unter Verwendung der Transfektionsreagenzien Mirus TransIT LT1 oder Lipofectamin 3000 mit pcDNA3_GFP transfiziert und für fünf Tage inkubiert. Im Anschluss wurden unter einem inversen Fluoreszenzmikroskop unter 10-facher Vergrößerung Fluoreszenz- und Phasenkontrastaufnahmen angefertigt.

Bei ARPE-19 Zellen wurde nach 3-tägiger Transfektion mit pcDNA3_GFP (und dem Mirus TransIT LT1 oder dem Lipofectamin 3000 Transfektionsreagenz) unter dem Fluoreszenzmikroskop eine GFP-Fluoreszenz beobachtet. Dabei betrug die Transfektionseffizienz bei Verwendung von Mirus TransIT LT1 ungefähr 20 %,

Ergebnisse

wohingegen sie bei Verwendung von Lipofectamin 3000 mit 50 – 60 % deutlich höher lag (Abbildung 12). Auch hier wurde in der Phasenkontrast-Mikroskopie beobachtet, dass die Zellen durch die Transfektion geschädigt wurden. Verglichen mit den untransfizierten Zellen waren deutlich mehr kristalline Einschlüsse und abschwimmende Zellen sichtbar. Dabei wurden die Zellen durch Lipofectamin 3000 noch etwas stärker geschädigt, als durch Mirus TransIT LT1.

Zusammengefasst ist die Transfektion mit dem Lipofectamin 3000 Reagenz für ARPE-19 Zellen die effizientere Methode. Bei 50 – 60 % Transfektionseffizienz können auch funktionelle Versuche durchgeführt werden, insbesondere, da das heterolog exprimierte NRTN ja sezerniert wird und somit auch den untransfizierten Zellen zur Verfügung steht. Dabei sollte jedoch bedacht werden, dass durch die Transfektion allein schon eine gewisse Zellschädigung verursacht wird, die möglicherweise die Ergebnisse der funktionellen Analysen beeinflusst.

Ergebnisse

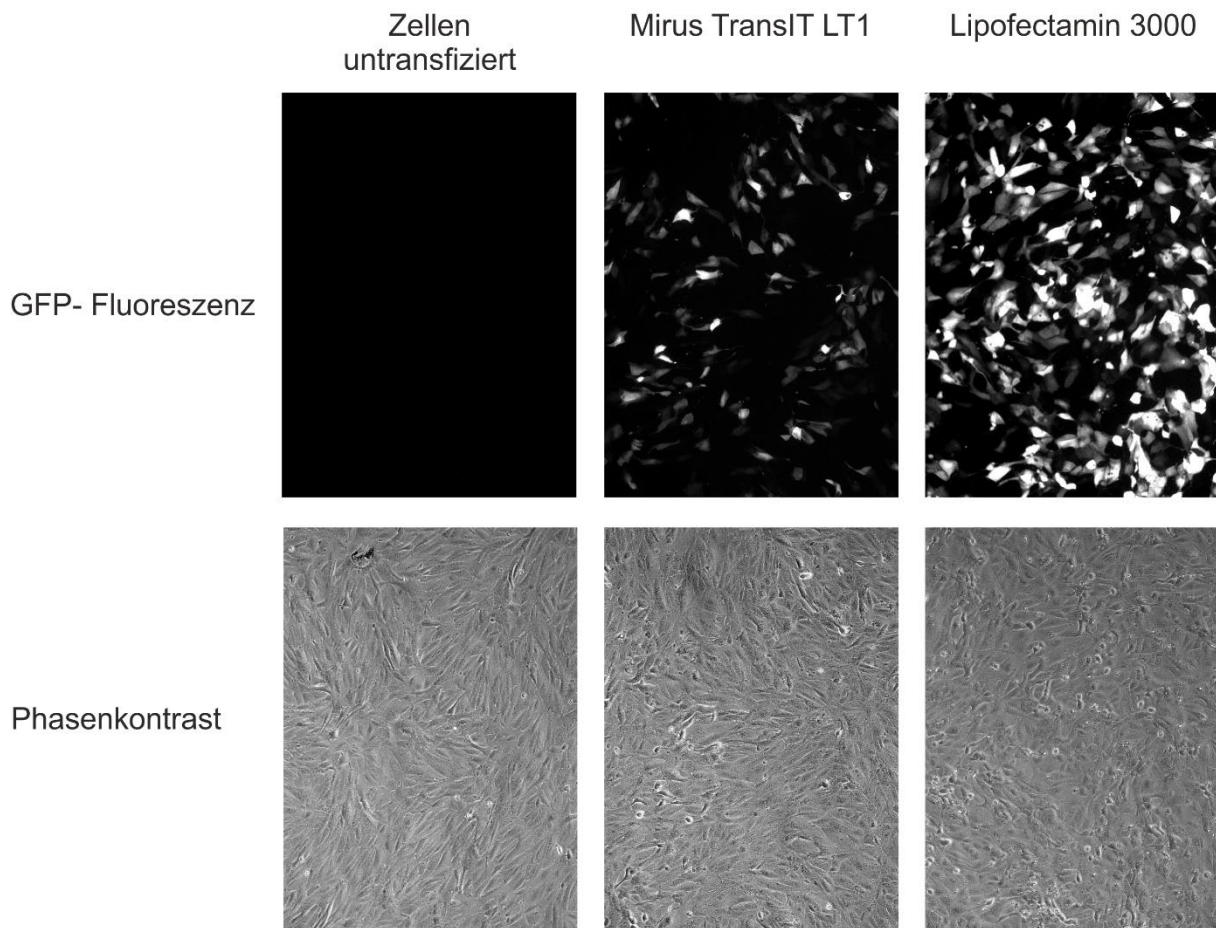


Abbildung 12: Fluoreszenzmikroskopie zur Testung zweier verschiedener Transfektionsmethoden in ARPE-19 Zellen.

ARPE-19 Zellen wurden unter Verwendung der Transfektionsreagenzien Mirus TransIT LT1 oder Lipofectamin 3000 mit pcDNA3_GFP transfiziert und für drei Tage inkubiert. Im Anschluss wurden unter dem Inversmikroskop unter 10-facher Vergrößerung Fluoreszenz- und Phasenkontrastaufnahmen angefertigt.

4.3 Funktionelle Versuche mit NRTN-Varianten

In den nachfolgenden funktionellen Versuchen sollte ein möglicher Effekt des SNP rs79744308 auf AMD-assoziierte, zelluläre Prozesse wie aberrante MAPK Aktivierung (Dridi et al. 2012; Du et al. 2013; zusammengefasst in Kyosseva 2016), Autophagie (Mitter et al. 2014; Golestaneh et al. 2017) oder Zellviabilität (zusammengefasst in Adler et al. 1999) untersucht werden. Für diese Versuche wurden die Zelllinien Weri-Rb1 und ARPE-19 sowie hiPSC-RPE Zellen verwendet.

4.3.1 Effekt von NRTN auf AMD-assoziierte zelluläre Prozesse in Weri-Rb1 Zellen

Weri-Rb1 Zellen, welche aus humanen Retinoblastomzellen abgeleitet wurden (McFall et al. 1977), wurden als Modellsystem für retinale neuronale Zellen gewählt.

4.3.1.1 MAPK Aktivierung

NRTN ist als Regulator des MAPK Signalwegs bekannt (Kotzbauer et al. 1996), welchem eine entscheidende Rolle in der AMD-Pathogenese zugeschrieben wird (zusammengefasst in Kyosseva 2016). Deswegen wurde in folgenden Analysen die Aktivierung des MAPK Signalweges anhand der Phosphorylierung und damit Aktivierung von ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases 1 and 2) und charakteristischen Zielproteinen in der NRTN stimulierten Signalkaskade untersucht (Kotzbauer et al. 1996). Dazu wurden Weri-Rb1 Zellen für 18 Stunden auf NRTN-haltiger EZM inkubiert und anschließend Western Blot Analysen mit Antikörpern gegen ACTB (Ladekontrolle), gesamtem ERK1/2 und phosphoryliertem ERK1/2 (pERK1/2) unterzogen.

Bei Weri-Rb1 Zellen, die auf NRTN-haltiger EZM (beider NRTN-Varianten) inkubiert worden waren, wurde eine Aktivierung des MAPK Signalwegs im Vergleich zu Weri-Rb1 Zellen, die auf Kontrollmatrix inkubiert worden waren, detektiert. Dies zeigte sich sowohl bei der Normalisierung des pERK Signals gegen ACTB (Abbildung 13B) als auch gegen ERK1/2 (Abbildung 13C). Für NRTN:G wurde hierbei eine Steigerung der ERK Aktivierung um das ca. 8-fache (Abbildung 13B,C, statistisch signifikant mit $p = 0,012$ bei Normalisierung gegen ACTB) und für NRTN:A eine Steigerung der ERK Aktivierung um das ca. 2,5-fache (Abbildung 13B,C) beobachtet. Intrazelluläre ERK1/2 Mengen wurden durch die Kultivierung auf NRTN-haltiger EZM nicht beeinflusst (Abbildung 13D).

Ergebnisse

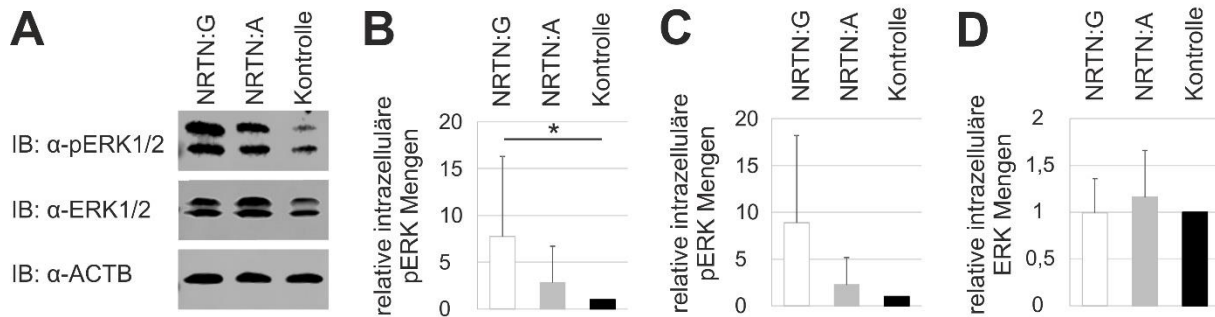


Abbildung 13: Aktivierung von ERK1/2 in Weri-Rb1 Zellen nach 18-stündiger Inkubation auf NRTN-haltiger EZM.

Weri-Rb1 Zellen wurden auf EZM aufgebracht, welche NRTN:G, NRTN:A oder kein NRTN (Kontrolle) enthielt, und 18 Stunden darauf inkubiert. Im Anschluss wurden Western Blot Analysen mit Antikörpern gegen ACTB (Ladekontrolle), ERK1/2 und pERK1/2 durchgeführt (A). B-D: Densitometrische Quantifizierung von 7 unabhängigen Immunoblots, kalibriert auf die Signale der Kontrolle. Die phosphorylierte Form pERK1/2 wurde gegen ACTB (B) und gegen ERK (C) normalisiert. Gesamtes ERK1/2 wurde gegen ACTB normalisiert (D). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. Eine statistische Evaluierung erfolgte mittels Kruskal Wallis Test gefolgt von Dunn's Post Test, mit Bonferroni Korrektur. Statistisch signifikante Unterschiede (Bonferroni korrigiertes Signifikanzniveau = $p < 0,0167$) sind durch Sternchen (*) markiert.

4.3.1.2 Neuronale Differenzierung

Wachstumsfaktoren der TGF- β Superfamilie und insbesondere der GDNF-Subfamilie sind dafür bekannt, die Differenzierung von neuronalen Zellen zu fördern (Mount et al. 1995; Pozas und Ibáñez 2005; zusammengefasst in Meyers und Kessler 2017). Deswegen wurde auch ein möglicher Einfluss der NRTN Varianten auf die neuronale Differenzierung von Weri-Rb1 Zellen untersucht.

Hierfür wurden Weri-Rb1 Zellen mit den bicistronischen NRTN- und GFP-Expressionsvektoren (pcDNA4_GFP_NRTN:G und pcDNA4_GFP_NRTN:A), sowie mit pcDNA4_GFP als Kontrolle transfiziert und zur Induktion der Differenzierung für fünf Tage in Poly-L-Lysin beschichteten Wells in Gegenwart von N2-Supplement inkubiert (Hirooka et al. 2002). Im Anschluss wurden die grün fluoreszierenden und somit transfizierten Zellen unter einem inversen Epifluoreszenzmikroskop identifiziert und morphologisch analysiert. Die Differenzierung der Weri-Rb1 Zellen wurde anhand von Fortsätzen beurteilt, welche die neuronalen Zellen bei einer Differenzierung ausbilden (zusammengefasst in Sainath und Gallo 2014). In Abbildung 14A sind beispielhaft je zwei Zellen gezeigt, welche als undifferenziert oder differenziert beurteilt wurden.

Ergebnisse

Von den unterschiedlich transfizierten Ansätzen wurden je 27 fluoreszierende Zellen ermittelt und von diesen das Vorliegen von Fortsätzen beurteilt. Abbildung 14B zeigt, dass von 27 Weri-Rb1 Zellen, welche mit dem Kontrollvektor ohne NRTN transfiziert worden waren, 14 im undifferenzierten Zustand vorlagen. Bei Weri-Rb1 Zellen, welche mit den Expressionsvektoren für NRTN:G oder NRTN:A transfiziert worden waren, waren hingegen nur sieben (NRTN:G) oder sechs (NRTN:A) aus 27 Zellen undifferenziert. Im Gegenzug wurde bei den mit NRTN-Expressionsvektoren transfizierten Zellen eine Zunahme der differenzierten Zellen gegenüber den kontrolltransfizierten Zellen beobachtet (Abbildung 14B).

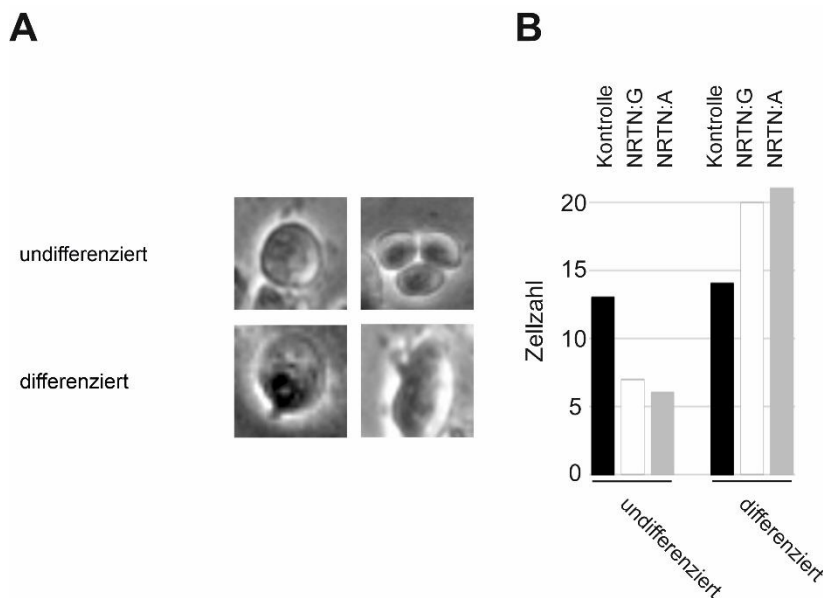


Abbildung 14: Differenzierung von Weri-Rb1 Zellen nach Transfektion mit pcDNA4_GFP, pcDNA4_GFP_NRTN:G und pcDNA4_GFP_NRTN:A.

Weri-Rb1 Zellen wurden mit pcDNA4_GFP_NRTN:G und pcDNA4_GFP_NRTN:A und pcDNA4_GFP als Kontrolle transfiziert und für fünf Tage in Poly-L-lysinierten Wells in Gegenwart von N2-Supplement inkubiert. GFP-fluoreszierende Zellen wurden unter dem Mikroskop ermittelt und nach ihrer Differenzierung beurteilt, indem das Vorliegen von Fortsätzen beurteilt wurde (**A**). Je 27 Zellen je transfiziertem Plasmid wurden beurteilt und in die Gruppen undifferenziert oder differenziert eingeteilt (**B**).

4.3.1.3 Autophagie-Induktion

Fehlerhaft regulierte Autophagie gilt als weiterer pathologischer Prozess, der mit der AMD in Verbindung gebracht wird (Mitter et al. 2012; Golestaneh et al. 2017; Kivinen 2018). In Zellen wird sie insbesondere durch oxidativen Stress induziert

Ergebnisse

(zusammengefasst in Kiffin et al. 2006; sowie Höhn et al. 2013; Mitter et al. 2014), ebenfalls ein wichtiger Risikofaktor der AMD (zusammengefasst in Blasiak et al. 2014; Nita und Grzybowski 2016; sowie Datta et al. 2017). Da der RET-Signalweg die Autophagie-Induktion kontrolliert (u.a. Sandilands et al. 2012; Rudat et al. 2018) könnte NRTN über seinen Einfluss auf die RET Aktivierung ebenfalls einen Einfluss auf die Autophagie-Induktion haben. Im folgenden Versuch sollte daher die Auswirkung von oxidativem Stress über eine H₂O₂ Behandlung auf die Autophagie-Induktion in Weri-Rb1 Zellen untersucht werden, die auf NRTN-haltiger EZM kultiviert wurden. Die Autophagie-Induktion wurde anhand der Markerproteine „Leichtkette“ (light chain) 3 (LC3) und p62 beurteilt. Bei Autophagie-Induktion wird die etwas schwerere Form LC3 (I) in die leichtere, Phosphatidylethanolamin konjugierte LC3 (II) Form umgewandelt, weswegen das Verhältnis von LC3 (II) zu LC3 (I) zunimmt (Tanida et al. 2008; Tanida und Waguri 2010). Das Markerprotein p62 wird bei zunehmender Autophagie abgebaut (Bjørkøy et al. 2009). Da die Autophagie auch stark mit dem ERK Signalweg assoziiert ist (zusammengefasst in Cagnol und Chambard 2010), wurde gleichzeitig auch die Phosphorylierung von ERK1/2 verfolgt.

Zunächst wurden Weri-Rb1 Zellen auf NRTN-haltiger oder Kontroll-EZM zwei Tage lang inkubiert und anschließend 2 Stunden lang bei 37°C mit 1 mM H₂O₂ behandelt. Im Anschluss wurden Western Blot Analysen gegen LC3, p62, phosphoryliertes ERK1/2 und gesamtes ERK1/2 durchgeführt.

In dem für Abbildung 15 ausgewählten Experiment ist zu erkennen, dass die Autophagie durch die H₂O₂ Behandlung in Weri-Rb1 Zellen induziert werden konnte: Die untere, leichtere LC3 (II) Variante nahm durch H₂O₂ zu, die obere, schwerere LC3 (I) Variante ab. Auch die erhaltenen Signale für p62 nahmen durch die H₂O₂ Behandlung ab. Im Gegenzug wurde ein starker Anstieg an phosphoryliertem ERK1/2 beobachtet, während die Menge an gesamtem ERK1/2 nicht zunahm, sondern eher leicht verringert wurde.

Ergebnisse

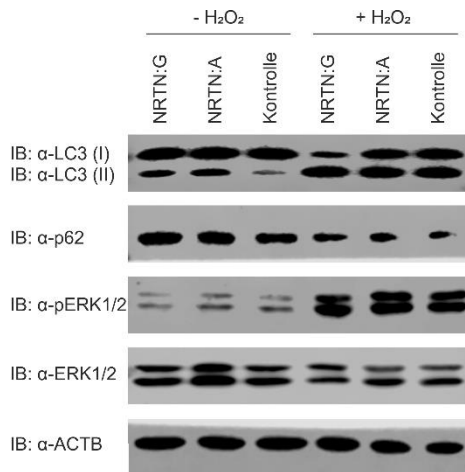


Abbildung 15: Immunoblot nach H₂O₂ induzierter Autophagie an Weri-Rb1 Zellen in Abhängigkeit von NRTN.

Weri-Rb1 Zellen wurden auf Kontroll-, NRTN:G- und NRTN:A-haltiger EZM für zwei Tage inkubiert und darauf für 2 Stunden bei 37°C mit 0 oder 1 mM H₂O₂ behandelt. Anschließend wurden die Zellen geerntet und mittels Western Blot Analysen mit Antikörpern gegen ACTB (Ladekontrolle), LC3, p62, phosphoryliertes ERK1/2 (pERK1/2) und gesamtes ERK1/2 untersucht.

Eine densitometrische Auswertung aus drei unabhängigen Experimenten (Abbildung 16) zeigte ebenfalls im Vergleich mit der unbehandelten, NRTN-freien Kontrolle nach H₂O₂ Behandlung die Zunahme des Autophagie-Markers LC3 (II) um das 20- bis 40-fache (Abbildung 16A) und das verringerte Verhältnis von LC3 (I) zu LC3 (II) (auf unter 5 %, Abbildung 16B, $p = 0,001$ zwischen der unbehandelten NRTN-freien Kontrolle und H₂O₂ behandelten Zellen, die auf NRTN:G-haltiger EZM kultiviert worden waren). Interessanterweise wurde in unbehandelten Zellen, die auf NRTN-haltiger EZM kultiviert worden waren, ebenfalls eine stärkere Autophagie (steigende Mengen an LC3 (II) sowie ein geringeres LC3 (I) zu LC3 (II) Verhältnis) verglichen zur Kontrolle ohne NRTN beobachtet. Die Mengen des Autophagie-Markers p62 zeigten nach H₂O₂ Behandlung ebenfalls eine deutliche Reduktion um 50 bis 75 % (Abbildung 16C).

Die Mengen an phosphoryliertem ERK1/2 nahmen durch die H₂O₂ Behandlung stark zu (Abbildung 16D und 16E), wohingegen die Mengen an gesamtem ERK1/2 keine auffallende Veränderung zeigten (Abbildung 16F).

In diesen Versuchen konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede und somit kein Effekt von NRTN Varianten auf die H₂O₂ induzierte Autophagie oder ERK Aktivierung nachgewiesen werden. Allerdings muss dabei bedacht werden, dass lediglich drei unabhängige Versuche quantifiziert werden konnten und zudem bei den Ergebnissen hohe Standardabweichungen auftraten. Daher sollten diesbezüglich noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Ergebnisse

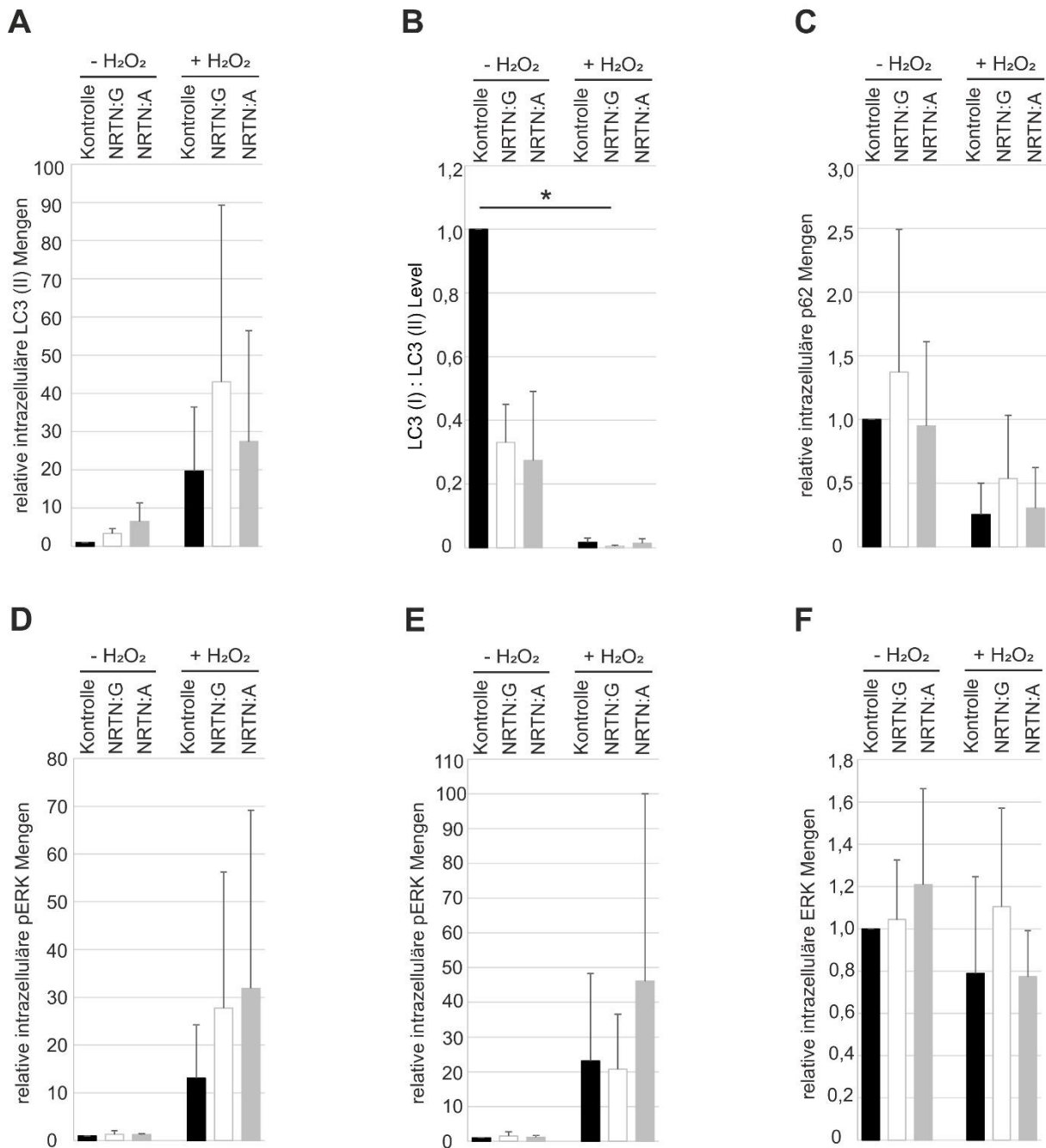


Abbildung 16: Densitometrische Auswertung von Immunoblots aus drei unabhängigen Autophagie Experimenten an Weri-Rb1.

Gezeigt sind relative Mengen an LC3 (II), normalisiert gegen ACTB (A) sowie die Verhältnisse von LC3 (I) zu LC3 (II) (B), p62 Mengen, normalisiert gegen ACTB (C), pERK1/2 Mengen, normalisiert gegen ACTB (D) und gegen ERK1/2 (E), und ERK1/2 Mengen, normalisiert gegen ACTB (F). Alle Signale wurden auf die jeweilige NRTN-freie unbehandelte Kontrolle kalibriert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen. Eine statistische Evaluierung erfolgte mittels Kruskal Wallis Test, gefolgt von Dunn's Post Test mit Bonferroni Korrektur. Statistisch signifikante Unterschiede (Bonferroni korrigiertes Signifikanzniveau = $p < 0,0033$) sind durch Sternchen (*) markiert.

Ergebnisse

4.3.1.4 Zellviabilität nach oxidativem Stress

Oxidativer Stress ist einer der wichtigsten pathophysiologischen Prozesse bei der Entstehung der AMD und hat großen Einfluss auf die Degeneration und Schädigung verschiedener Zellen (zusammengefasst in Nita und Grzybowski 2016). Daher sollte die Zellviabilität von Weri-Rb1 Zellen nach oxidativem Stress in Gegenwart der NRTN-Varianten NRTN:G und NRTN:A ermittelt werden. Des Weiteren sollten für spätere Versuche H_2O_2 Konzentrationen gefunden werden, unter denen die Zellen zwar gestresst sind, aber noch keine nennenswerte Verminderung ihrer Zellviabilität aufweisen, um so den chronischen oxidativen Stress in AMD-Erkrankten zu simulieren.

Hierfür wurden Weri-Rb1 Zellen auf Kontroll-EZM, sowie auf NRTN:G- und NRTN:A-haltiger EZM für zwei Tage kultiviert. Im Anschluss wurden verschiedene Mengen an H_2O_2 (1 mM, 0,25 mM, 0,175 mM, 0,1 mM) zu den Zellen gegeben und diese für 24 h inkubiert. Danach wurde die Zellviabilität der Weri-Rb1 Zellen in einem MTT-Assay bestimmt, welcher anhand der Aktivität der NAD(P)H abhängigen Oxidoreduktasen die metabolische Aktivität in den Zellen verfolgt (Mosmann 1983).

Bei einer H_2O_2 Konzentration von 1 mM wurden die Zellen so stark geschädigt, dass diese sich vom Plattenboden lösten und beim Waschen entfernt wurden. Somit konnten bei dieser Konzentration keine Messungen durchgeführt werden.

Bei 0,25 mM H_2O_2 (Abbildung 17A) fand eine starke Reduktion der Zellviabilität auf circa 20 % statt. Ein Einfluss der NRTN-Varianten auf die Zellviabilität war hierbei nicht erkennbar.

Bei einer H_2O_2 Konzentration von 0,175 mM (Abbildung 17B) sank die Zellviabilität auf ungefähr 80 – 90 %, bei der H_2O_2 Konzentration von 0,1 mM (Abbildung 17C) wurde eine noch geringere Reduktion der Zellviabilität auf circa 90 – 95 % beobachtet. Signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen NRTN Varianten oder der Kontrolle wurden nicht gemessen.

Für weiterführende Untersuchungen an Weri-Rb1 Zellen zur Reaktion auf oxidativen Stress, welcher nicht zu einer Reduktion der Zellviabilität führt, wurde eine Konzentration von 0,1 mM H_2O_2 verwendet.

Ergebnisse

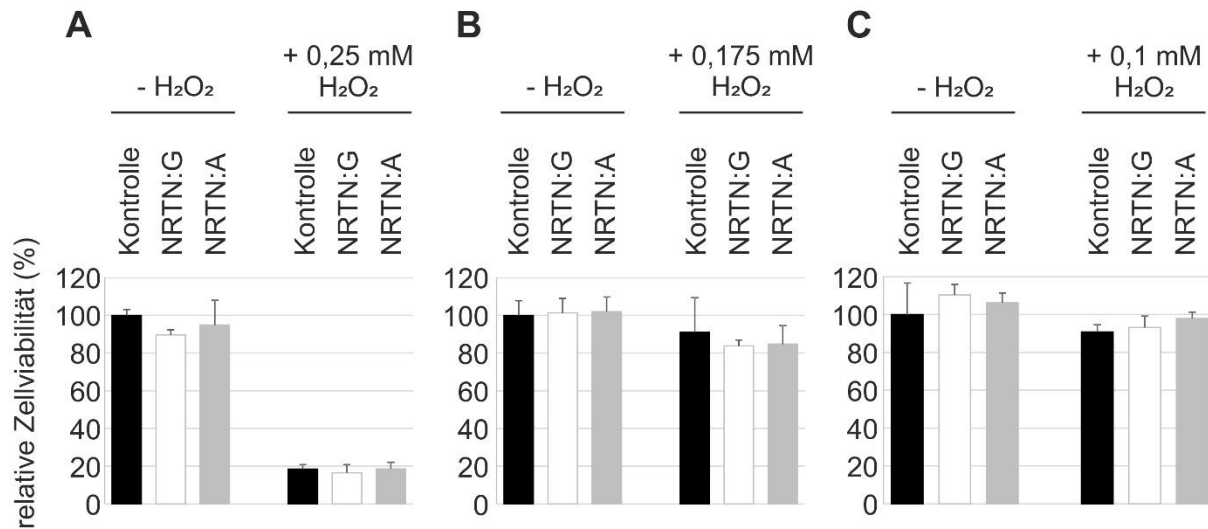


Abbildung 17: Zellviabilität (in %) von Weri-Rb1 Zellen auf NRTN-haltiger EZM ohne und mit H₂O₂ Stress unterschiedlicher Konzentrationen (A-C).

Weri-Rb1 Zellen wurden zwei Tage lang auf Kontroll-EZM oder NRTN:G- bzw. NRTN:A-haltiger EZM kultiviert. Anschließend wurden sie mit 0 mM oder 0,25 mM (A), 0,175 mM (B) bzw. 0,1 mM (C) H₂O₂ für 24 Stunden behandelt. Zur Beurteilung der Zellviabilität wurde darauf ein MTT-Assay durchgeführt. Dargestellt ist die relative Zellviabilität in je drei unabhängigen Versuchen, kalibriert auf die unbehandelte Kontrolle. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. Eine statistische Evaluierung erfolgte mittels Kruskal Wallis Test, gefolgt von Dunn's Post Test mit Bonferroni Korrektur. Bonferroni korrigiertes Signifikanzniveau = $p < 0,0033$.

4.3.1.5 Expressionsveränderung nach oxidativem Stress

Im folgenden Experiment sollte der Einfluss von NRTN auf die durch geringen oxidativen Stress induzierte Expressionsveränderung in Weri-Rb1 Zellen ermittelt werden. Der oxidative Stress wurde hierbei durch die 24-stündige Behandlung mit 0,1 mM H₂O₂ induziert, was, wie in Kapitel 4.3.1.4 gezeigt, nicht zu einer bedeutenden Reduktion der Zellviabilität dieser Zellen führt. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet, die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mittels qRT-PCR wurde die Expression der Gene für VEGF (Vascular endothelial growth factor), CD46 (Cluster of differentiation 46) und p21 (Cyclin-dependent kinase inhibitor 1) untersucht, da diese in vorherigen Untersuchungen zu AMD-assoziierten Prozessen eine besonders starke Reaktion auf oxidativen Stress hin zeigten (Byeon et al. 2010; Vogt et al. 2011; Marazita et al. 2016). Zudem wurde die Expression von *cFOS* (FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homologue) als Marker für die Aktivierung des ERK

Ergebnisse

Signalweges (zusammengefasst in Hazzalin und Mahadevan 2002; Whitmarsh 2007; sowie Roskoski 2012) untersucht.

Abbildung 18 zeigt die Ergebnisse aus vier unabhängigen Versuchen. Die *VEGF* Expression wurde in diesen Versuchen weder durch die H_2O_2 Behandlung, noch durch NRTN beeinflusst (Abbildung 18A). Bei *CD46* konnte ein leichter Anstieg der Expression durch die H_2O_2 Behandlung auf das circa 1,3-fache im Vergleich zur NRTN-freien unbehandelten Kontrolle festgestellt werden. Hierbei wurde ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der NRTN-freien unbehandelten Kontrolle und der H_2O_2 behandelten Kontrolle erhalten (Abbildung 18B, $p = 0,003$), jedoch nicht zwischen der NRTN-freien unbehandelten Kontrolle und den NRTN-haltigen H_2O_2 behandelten Proben ($p = 0,012$ für NRTN:G + H_2O_2 , $p = 0,004$ für NRTN:A + H_2O_2). Bei der Expression von *p21* wurde ebenfalls ein Anstieg um das circa 1,5-fache im Vergleich zur NRTN-freien, unbehandelten Kontrolle verzeichnet (Abbildung 18C, $p = 0,004$ für die H_2O_2 behandelte Kontrolle, $p = 0,011$ für NRTN:G + H_2O_2 , $p = 0,012$ für NRTN:A + H_2O_2). NRTN im Gegenzug hatte bei diesem Gen ebenfalls keinen Effekt auf die Genexpression. Beim ERK1/2-Aktivierungsmarker *cFOS* war durch die H_2O_2 Behandlung ebenfalls ein Expressionsanstieg um das circa 1,5-fache in den NRTN-freien Zellen zu beobachten (Abbildung 18D, $p = 0,25$ für die H_2O_2 behandelte Kontrolle). Hier wurde zusätzlich sowohl bei unbehandelten, als auch bei H_2O_2 behandelten Zellen eine Verstärkung der *cFOS* Expression bei den auf NRTN-haltiger EZM kultivierten Zellen beobachtet (Abbildung 18D, $p = 0,004$ für NRTN:G + H_2O_2 , $p = 0,009$ für NRTN:A + H_2O_2).

Ergebnisse

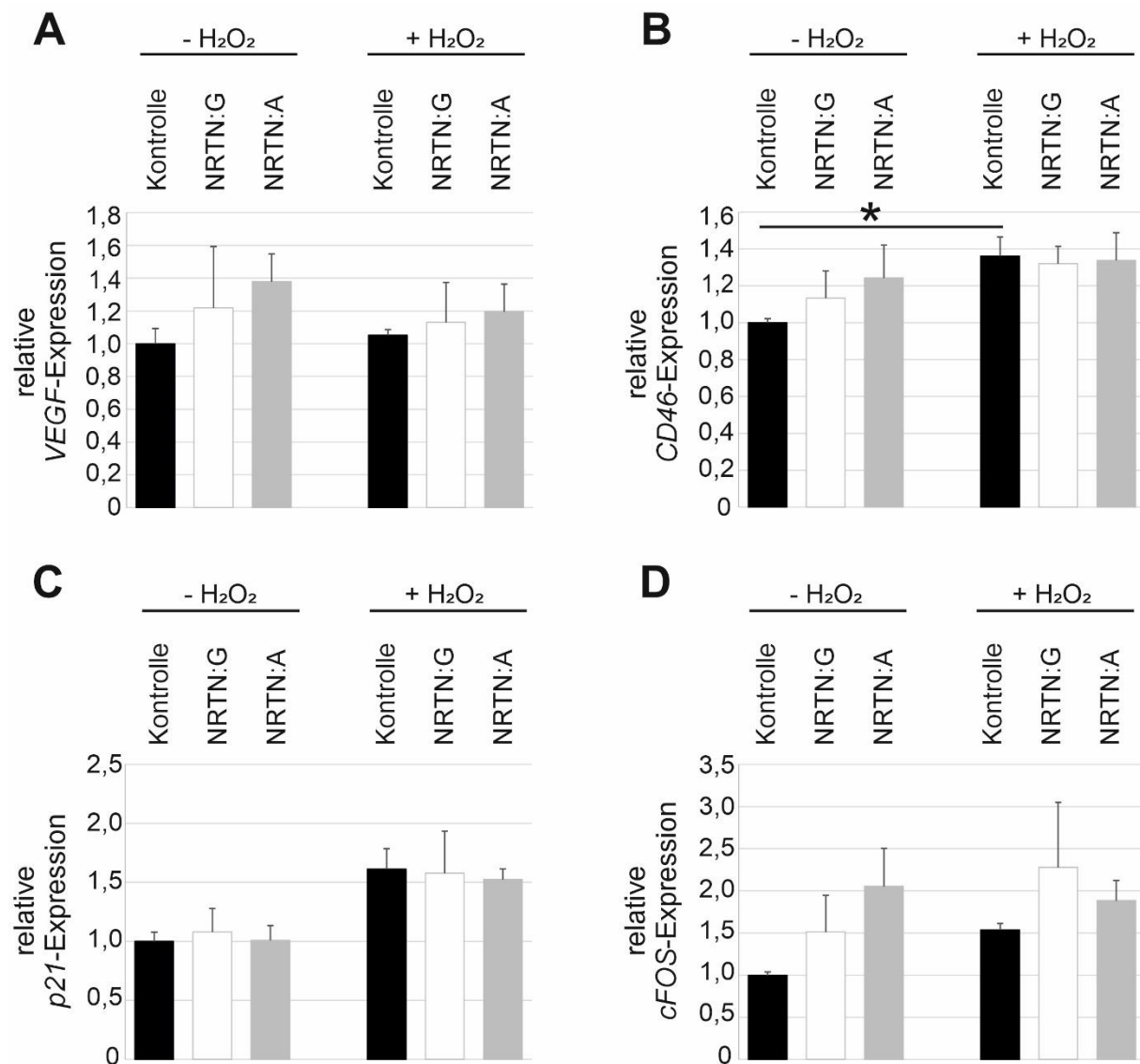


Abbildung 18: Effekt von NRTN:G und NRTN:A auf die Genexpression von VEGF (A), CD46 (B), p21 (C) und cFOS (D) in Weri-Rb1 Zellen inkubiert auf NRTN-haltiger EZM.

Weri-Rb1 Zellen wurden zwei Tage lang auf Kontroll-EZM oder NRTN:G- bzw. NRTN:A-haltiger EZM inkubiert. Anschließend wurden sie für 24 Stunden mit 0 oder 0,1 mM H₂O₂ behandelt. Mittels qRT-PCR wurde darauf die Genexpression von VEGF (A), CD46 (B), p21 (C) und cFOS (D) gemessen. Die Werte wurden auf die Expression von HPRT (Hypoxanthin Guanin Phosphoribosyl Transferase) normalisiert und auf die unbehandelte Kontrolle kalibriert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus vier unabhängigen Versuchen. Eine statistische Evaluierung erfolgte mittels Kruskal Wallis Test, gefolgt von Dunn's Post Test mit Bonferroni Korrektur. Statistisch signifikante Unterschiede (Bonferroni korrigiertes Signifikanzniveau = $p < 0,0033$) sind durch Sternchen (*) markiert.

4.3.2 Effekt von NRTN auf AMD-assoziierte zelluläre Prozesse in ARPE-19 Zellen

ARPE-19 Zellen sind aus humanen RPE-Zellen abgeleitet (Dunn et al. 1996) und wurden als ein zelluläres Modellsystem für die Untersuchung pathophysiologischer Prozesse in RPE-Zellen gewählt.

4.3.2.1 Autophagie-Induktion

Wie in Punkt 4.3.1.3 beschrieben, gilt eine fehlerhaft regulierte Autophagie-Induktion als ein wichtiger AMD-assoziiertes Prozess (Mitter et al. 2014; Golestaneh et al. 2017; zusammengefasst in Kaarniranta et al. 2017), darüber hinaus wird die Autophagie von der von NRTN aktivierten RET Tyrosinkinase beeinflusst (u.a. Rudat et al. 2018). Im folgenden Versuchsteil sollte deswegen auch die NRTN-abhängige Autophagie-Regulation in ARPE-19 Zellen untersucht werden. Hierfür wurden zum einen ARPE-19 Zellen eingesetzt, die heterolog NRTN:G und NRTN:A überexprimierten, zum anderen wurden diese Versuche an ARPE-19 Zellen durchgeführt, die zuvor auf NRTN:G- sowie NRTN:A-haltiger EZM kultiviert worden waren.

Für die heterologe Überexpression wurden ARPE-19 Zellen mit den neu klonierten bicistronischen Vektoren pcDNA4_GFP_NRTN:G und pcDNA4_GFP_NRTN:A (siehe 4.2.3.1) oder dem Kontrollvektor pcDNA4_GFP transfiziert. Nach drei Tagen Inkubation wurden die Zellen zur Autophagie-Induktion mit 0 oder 1 mM H₂O₂ für 2 Stunden bei 37°C inkubiert (nach Szatmári-Tóth et al. 2016).

Die Autophagie-Induktion wurde, wie in Kapitel 4.3.1.3 beschrieben, mittels Western Blot Analysen der Markerproteine LC3 und p62 verfolgt. Zusätzlich wurde die ERK Signalwegsaktivierung über Western Blot Analysen von phosphoryliertem ERK1/2 überprüft (siehe ebenfalls 4.3.1.3).

In Abbildung 19 sind beispielhaft die Immunoblots eines Autophagie Experimentes gezeigt. Im Gegensatz zu den Autophagie Versuchen an Weri-Rb1 (4.3.1.3), konnte hier nach H₂O₂ Behandlung keine Zunahme der LC3 (II) Bande, sowie keine Abnahme von p62 festgestellt werden. Auch auf die Mengen an phosphoryliertem ERK1/2 hatte die H₂O₂ Behandlung scheinbar keinen Einfluss.

Ergebnisse

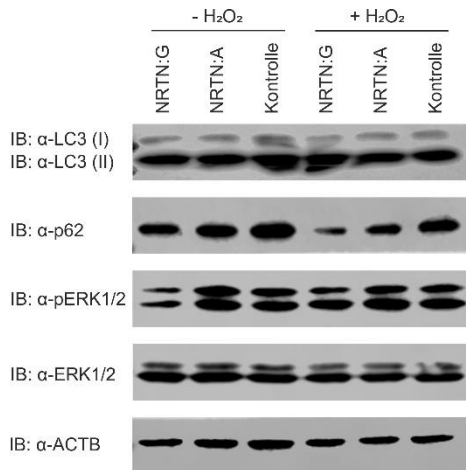


Abbildung 19: Immunoblot nach H₂O₂ induzierter Autophagie an ARPE-19 Zellen in Abhängigkeit von heterologer NRTN-Expression.

ARPE-19 Zellen wurden mit pcDNA4_GFP_NRTN:G und pcDNA4_GFP_NRTN:A oder dem Kontrollvektor pcDNA4_GFP transfiziert. Nach drei Tagen Inkubation wurden sie für 2 Stunden bei 37°C mit 0 oder 1mM H₂O₂ behandelt. Anschließend wurden die Zellen geerntet und mittels Western Blot Analysen mit Antikörpern gegen ACTB (Ladekontrolle), LC3, p62, phosphoryliertes ERK1/2 (pERK1/2) und gesamtes ERK1/2 untersucht.

Eine densitometrische Auswertung von sieben unabhängigen Experimenten (Abbildung 20) zeigte ebenfalls, dass die Mengen an LC3 (II) durch die H₂O₂ Behandlung nicht anstiegen (Abbildung 20A). Lediglich in NRTN-behandelten Zellen wurde ein leichter Anstieg auf das circa 1,5-fache an LC3 (II) im Vergleich zu NRTN-freien Zellen beobachtet. Dieser Effekt konnte jedoch beim Verhältnis von LC3 (I) zu LC3 (II) nicht bestätigt werden (Abbildung 20B), wobei hier sogar ein Anstieg des LC3 (I) zu LC3 (II) Verhältnisses aufzutreten schien. In beiden Auswertungen fallen jedoch die hohen Standardabweichungen der Messwerte ins Auge, welche keine statistische Aussage zulassen. Auch der Autophagie-Marker p62 zeigt keine Abnahme und somit keine Autophagie-Induktion in H₂O₂ behandelten Zellen (Abbildung 20C).

Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass die Autophagie-Induktion in diesem Experiment nicht erfolgreich war.

Die H₂O₂ Behandlung schien zu einer leichten Steigerung der ERK1/2 Phosphorylierung in den Zellen geführt zu haben (Abbildung 20D,E). Auch hier sind die Standardabweichungen der sieben Messwerte jedoch so hoch, dass keine statistische Aussage getroffen werden kann. Es wurde kein Effekt von NRTN auf die ERK1/2 Phosphorylierung unbehandelter Zellen festgestellt, bei den behandelten Zellen ist aufgrund der hohen Standardabweichungen erneut keine Aussage möglich. Die ERK1/2 Mengen wurden durch oxidativen Stress oder NRTN nicht wesentlich beeinflusst (Abbildung 20F).

Ergebnisse

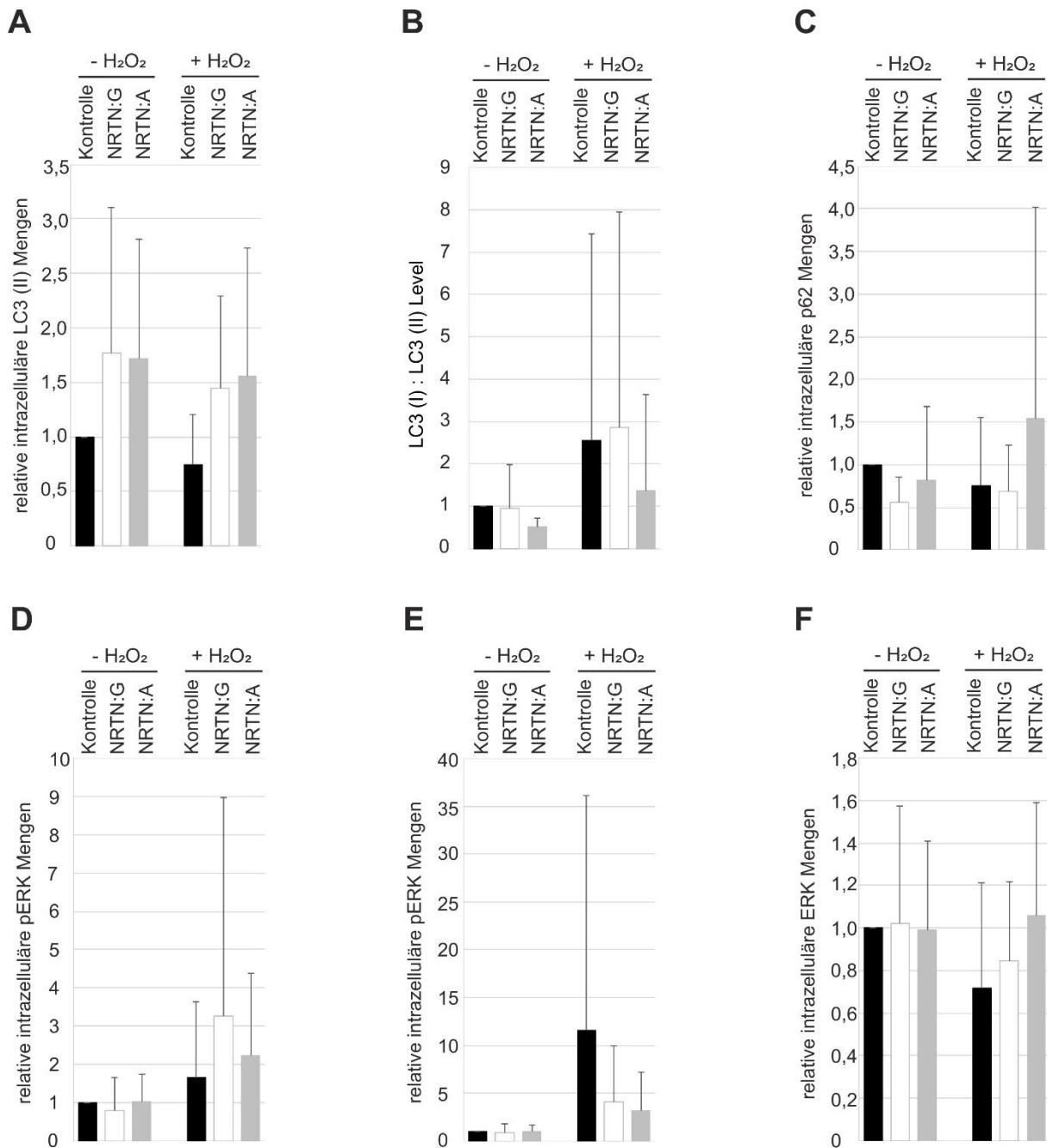


Abbildung 20: Densitometrische Auswertung von Immunoblots aus sieben unabhängigen Autophagie Experimenten an heterolog NRTN exprimierenden ARPE-19 Zellen.

Gezeigt sind relative Mengen an LC3 (II), normalisiert gegen ACTB (A) sowie die Verhältnisse von LC3 (I) zu LC3 (II) (B), p62 Mengen, normalisiert gegen ACTB (C), pERK1/2 Mengen, normalisiert gegen ACTB (D) und gegen ERK1/2 (E), und ERK1/2 Mengen, normalisiert gegen ACTB (F). Alle Signale wurden auf die jeweilige NRTN-freie unbehandelte Kontrolle kalibriert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus sieben unabhängigen Versuchen. Eine statistische Evaluierung erfolgte mittels Kruskal Wallis Test, gefolgt von Dunn's Post Test mit Bonferroni Korrektur. Bonferroni korrigiertes Signifikanzniveau = $p < 0,0033$.

Ergebnisse

In einem weiteren Versuch wurden ARPE-19 Zellen vor der Autophagie-Induktion auf Kontroll-EZM, sowie NRTN:G- oder NRTN:A-haltiger EZM für 24 Stunden inkubiert und darauf mit 0 oder 1 mM H₂O₂ für 2 Stunden behandelt.

Als Autophagie-Marker wurden, wie in Kapitel 4.3.1.3, LC3 und p62 verwendet und zusätzlich die ERK Aktivierung über eine Phosphorylierung zu pERK1/2 analysiert.

Die durchgeführten Immunoblots (beispielhaft dargestellt in Abbildung 21) und eine densitometrische Auswertung aus sieben unabhängigen Ergebnissen (Abbildung 22) zeigten bezüglich der Autophagie-Induktion ähnliche Resultate wie die vorherigen Versuche an transfizierten ARPE-19 Zellen: Durch die H₂O₂ Behandlung wurde erneut keine Autophagie induziert, ersichtlich am fehlenden Anstieg an LC3 (II) Mengen und an der fehlenden Abnahme der p62 Mengen (Abbildung 21, Abbildung 22A-C). Im Gegenzug zu den vorherigen Versuchen wurde jedoch eine deutliche Abnahme an phosphoryliertem ERK1/2 auf circa 30 % in NRTN-freien Proben durch die H₂O₂ Behandlung induziert (Abbildung 21, Abbildung 22D,E, p = 0,001 nach Normalisierung gegen ACTB, p = 0,002 nach Normalisierung gegen gesamtes ERK1/2), wohingegen die Mengen an gesamtem ERK1/2 keiner Veränderung unterlagen. Auch hier fallen für viele Ansätze die sehr hohen Standardabweichungen auf, was keine Aussage über den Einfluss von NRTN auf die untersuchten zellulären Prozesse zulässt.

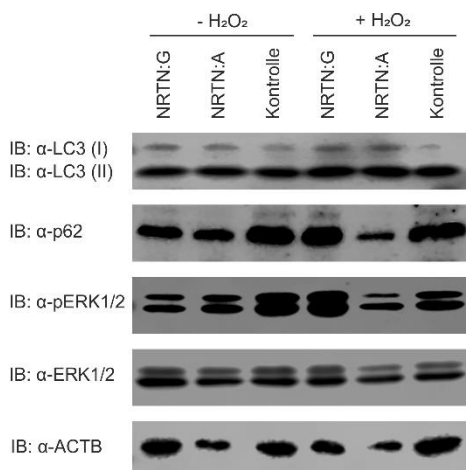


Abbildung 21: Immunoblot nach H₂O₂ induzierter Autophagie an ARPE-19 Zellen, die auf NRTN-haltiger EZM kultiviert worden waren.

ARPE-19 Zellen wurden auf Kontroll-, NRTN:G- und NRTN:A-haltiger EZM für 24 Stunden inkubiert. Darauf wurden sie für 2 Stunden bei 37°C mit 0 oder 1 mM H₂O₂ behandelt. Anschließend wurden die Zellen geerntet und mittels Western Blot Analysen mit Antikörpern gegen ACTB (Ladekontrolle), LC3, p62, phosphoryliertes ERK1/2 (pERK1/2) und gesamtes ERK1/2 untersucht.

Ergebnisse

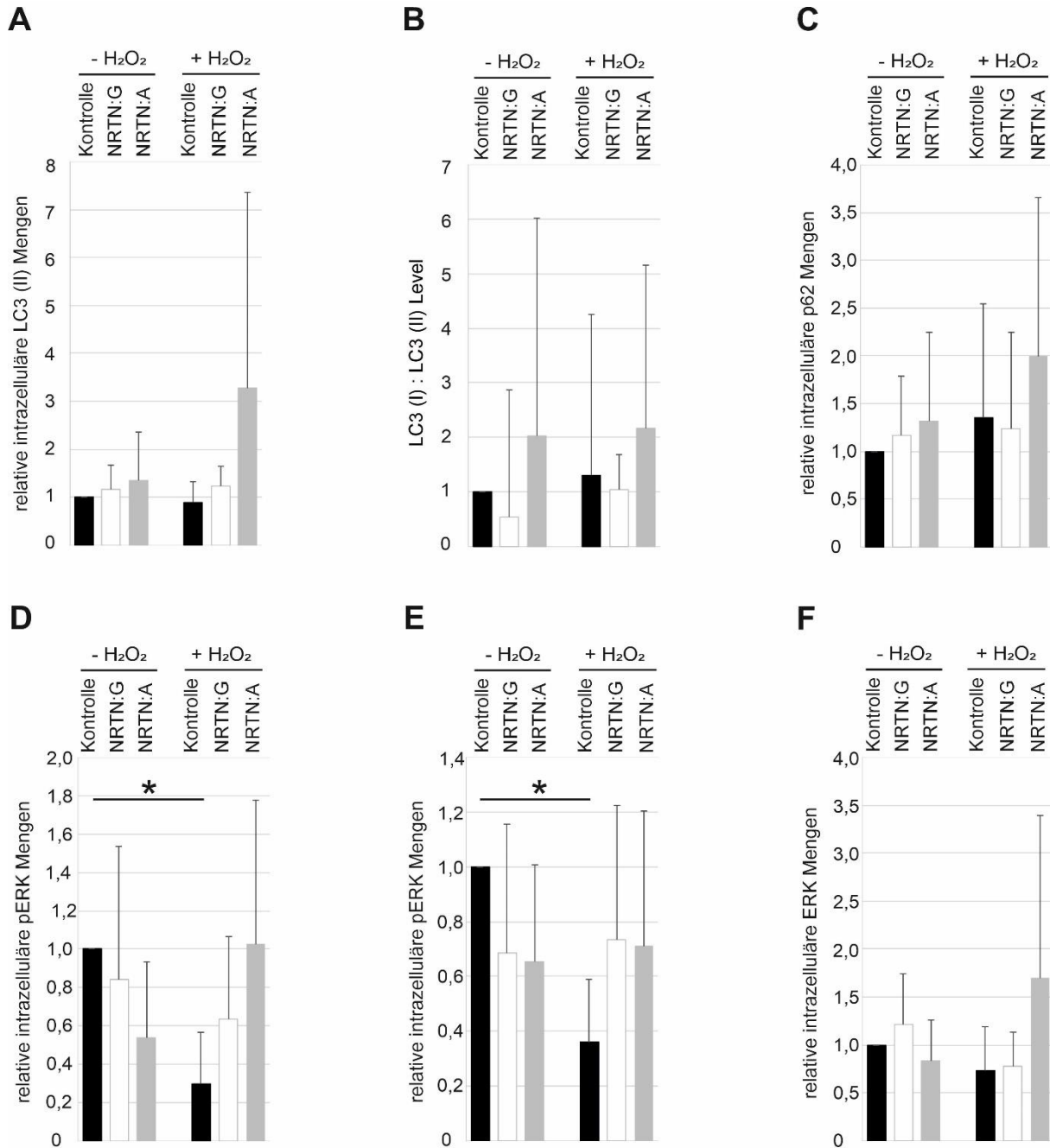


Abbildung 22: Densitometrische Auswertung von Immunoblots aus sieben unabhängigen Autophagie Experimenten an ARPE-19 Zellen, welche auf NRTN-haltiger EZM kultiviert worden waren.

Gezeigt sind relative Mengen an LC3 (II), normalisiert gegen ACTB (A) sowie die Verhältnisse von LC3 (I) zu LC3 (II) (B), p62 Mengen, normalisiert gegen ACTB (C), pERK1/2 Mengen, normalisiert gegen ACTB (D) und gegen ERK1/2 (E), und ERK1/2 Mengen, normalisiert gegen ACTB (F). Alle Signale wurden auf die jeweilige NRTN-freie unbehandelte Kontrolle kalibriert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus sieben unabhängigen Versuchen. Eine statistische Evaluierung erfolgte mittels Kruskal Wallis Test, gefolgt von Dunn's Post Test mit Bonferroni Korrektur. Statistisch signifikante Unterschiede (Bonferroni korrigiertes Signifikanzniveau = $p < 0,0033$) sind durch Sternchen (*) markiert.

4.3.3 Effekt von NRTN auf AMD-assoziierte zelluläre Prozesse in hiPSC-RPE Zellen

Als weiteres Zellsystem für die Untersuchung pathophysiologischer Prozesse wurden hiPSC-RPE abgeleitete Zellen gewählt. Aufgrund des limitierten Zeitrahmens konnten für diese Arbeit nur wenige Versuchsansätze mit diesem Zellsystem durchgeführt werden.

4.3.3.1 Autophagie-Induktion

Im folgenden Teilprojekt wurde der Effekt von NRTN:G und NRTN:A auf die Autophagie-Induktion in hiPSC-RPE Zellen untersucht. Dazu wurden hiPSC-RPE Zellen auf Kontroll-EZM, NRTN:G- oder NRTN:A-haltiger EZM für 24 Stunden inkubiert und anschließend mit 0 oder 1 mM H₂O₂ für 2 Stunden behandelt (nach Szatmári-Tóth et al. 2016).

Auch hier wurden, wie in den Abschnitten 4.3.1.3 und 4.3.2.1, die Autophagie-Marker LC3 (II) und p62 zur Verfolgung der Autophagie-Induktion herangezogen und zusätzlich die ERK Signalwegsaktivierung über die Phosphorylierung von ERK1/2 mittels Western Blot Analysen verfolgt.

In Abbildung 23 ist beispielhaft an einem Experiment erkennbar, dass die LC3 (II) Mengen in oxidativ gestressten Zellen erhöht waren. Allerdings war das LC3 (I) in allen Ansätzen, unabhängig von der H₂O₂ Behandlung kaum zu erkennen, was auf eine bereits starke Autophagie-Induktion in diesen Zellen schließen lässt. Bei p62 war durch die H₂O₂ Behandlung keine Abnahme zu erkennen. Die Menge an phosphoryliertem ERK1/2 schien durch NRTN:G abzunehmen, wohingegen sie durch H₂O₂ unbeeinflusst blieb (Abbildung 23).

Ergebnisse

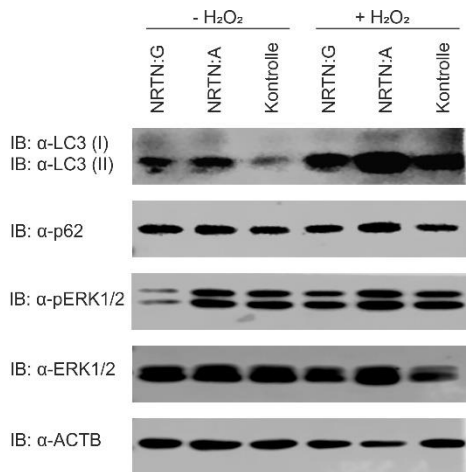


Abbildung 23: Immunoblot nach H₂O₂ induzierter Autophagie an hiPSC-RPE Zellen, die auf NRTN-haltiger EZM kultiviert worden waren.

hiPSC-RPE Zellen wurden für 24 Stunden auf Kontroll-EZM, sowie NRTN:G- oder NRTN:A-haltiger EZM kultiviert. Darauf wurden sie für 2 Stunden bei 37°C mit 0 oder 1 mM H₂O₂ behandelt. Anschließend wurden die Zellen geerntet und mittels Western Blot Analysen mit Antikörpern gegen ACTB (Ladekontrolle), LC3, p62, phosphoryliertes ERK1/2 (pERK1/2) und gesamtes ERK1/2 untersucht.

Die densitometrische Quantifizierung aus drei unabhängigen Immunoblots (Abbildung 24) zeigte ebenfalls die Zunahme der LC3 (II) Bande nach H₂O₂ Behandlung (Abbildung 24A) und die Abnahme des LC3 (I) zu LC3 (II) Verhältnisses (Abbildung 24B). Die Mengen an p62 (Abbildung 24C) und phosphoryliertem ERK1/2 (Abbildung 24D,E), sowie die Mengen an gesamtem ERK1/2 (Abbildung 24F) blieben durch die H₂O₂ Behandlung unbeeinflusst.

Ergebnisse

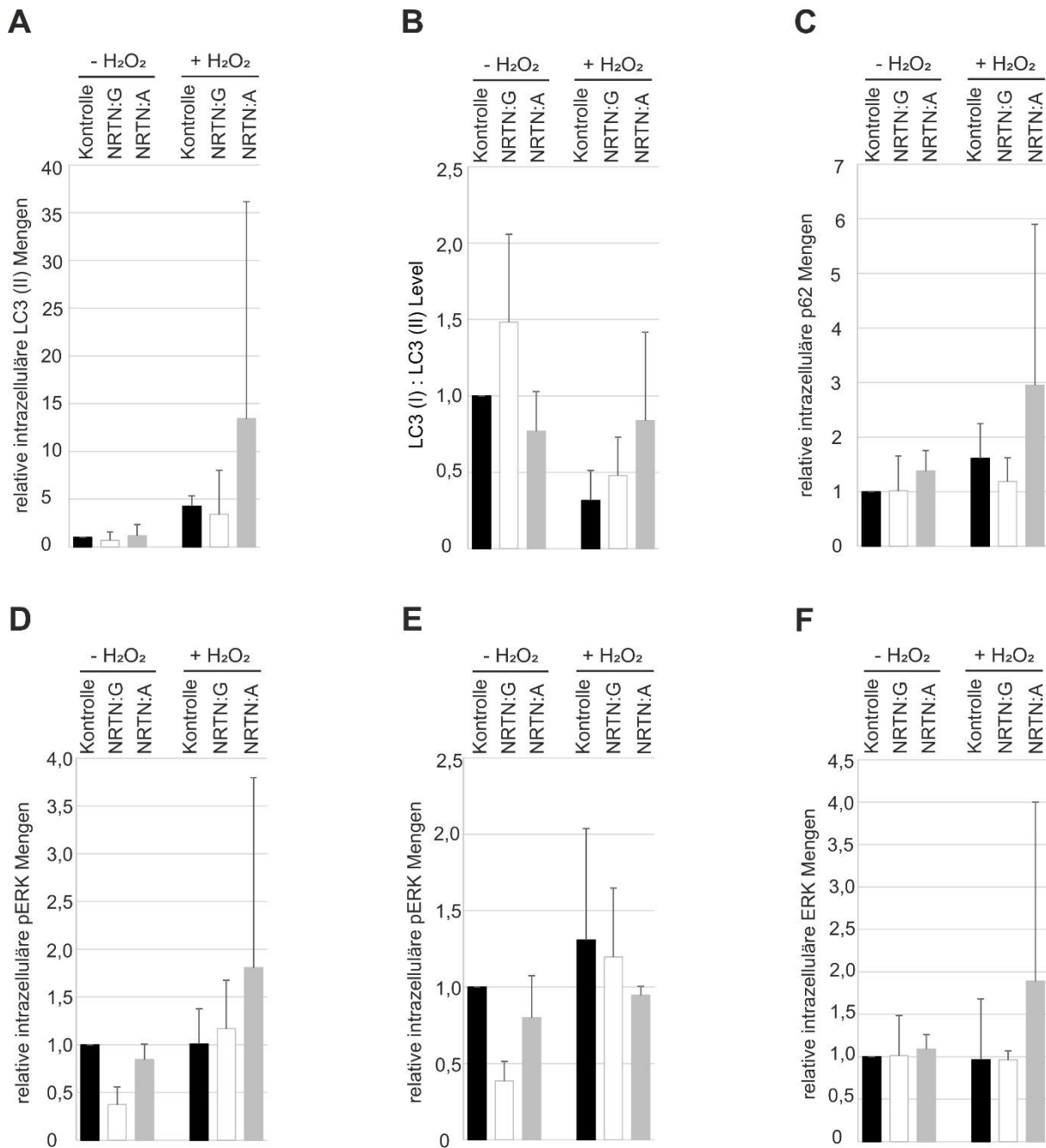


Abbildung 24: Densitometrische Auswertung von Immunoblots aus drei unabhängigen Autophagie Experimenten an hiPSC-RPE Zellen, welche auf NRTN-haltiger EZM kultiviert worden waren.

Gezeigt sind relative Mengen an LC3 (II), normalisiert gegen ACTB (**A**) sowie die Verhältnisse von LC3 (I) zu LC3 (II) (**B**), p62 Mengen, normalisiert gegen ACTB (**C**), pERK1/2 Mengen, normalisiert gegen ACTB (**D**) und gegen ERK1/2 Mengen, normalisiert gegen ACTB (**F**). Alle Signale wurden auf die jeweilige NRTN-freie unbehandelte Kontrolle kalibriert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. Eine statistische Evaluierung erfolgte mittels Kruskal Wallis Test, gefolgt von Dunn's Post Test mit Bonferroni Korrektur. Bonferroni korrigiertes Signifikanzniveau = $p < 0,0033$.

Ergebnisse

4.3.3.2 Expressionsveränderungen nach oxidativem Stress

Auch in hiPSC-RPE Zellen wurde eine mögliche Veränderung der Expression bestimmter Gene auf oxidativen Stress und NRTN-Behandlung hin untersucht. Hierfür wurden hiPSC-RPE Zellen 6 Stunden auf Kontroll-EZM, NRTN:G- oder NRTN:A-haltiger EZM inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 24 Stunden mit 0 oder 1 mM H₂O₂ behandelt. Im Anschluss daran wurde die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und einer qRT-PCR Analyse unterzogen. In dieser wurde, wie in Abschnitt 4.3.1.5 beschrieben, die Expression von *VEGF*, *CD46* und *p21* gemessen. Zudem wurde, wie ebenfalls in 4.3.1.5 beschrieben, die Expression von *cFOS* als Marker für die ERK Signalwegsaktivierung untersucht.

Die Expression von *VEGF* schien in diesem Experiment durch die Kultivierung der Zellen auf NRTN-haltiger EZM auf das circa 2-fache stimuliert zu werden, wohingegen nach H₂O₂ Behandlung ein hemmender Effekt auf die *VEGF* Expression (um circa 50 % im Vergleich zu H₂O₂-freien Zellen) beobachtet wurde (Abbildung 25A). *CD46* zeigte durch die H₂O₂ Behandlung ebenfalls eine um etwa 50 % verringerte Expression (Abbildung 25B), wohingegen bei *p21* durch die H₂O₂ Behandlung eine deutliche Steigerung der Expression auf das circa 5-fache erzielt wurde (Abbildung 25C). Die Expression von *p21* schien auch in Gegenwart von NRTN im Vergleich zu Kontrollzellen zuzunehmen (Abbildung 25C). In Abbildung 25D ist schließlich eine erhöhte *cFOS* Expression durch oxidativen Stress bei den auf NRTN-haltiger EZM kultivierten Zellen zu sehen. Bei den Kontrollzellen, welche mit H₂O₂ behandelt wurden, kann aufgrund der hohen Standardabweichung keine Aussage getroffen werden.

Für diesen Versuch standen lediglich drei (auf NRTN-EZM kultivierte Zellen) bzw. zwei (auf Kontroll-EZM kultivierte Zellen) Replikate zur Verfügung, weswegen keine statistische Auswertung durchgeführt wurde.

Ergebnisse

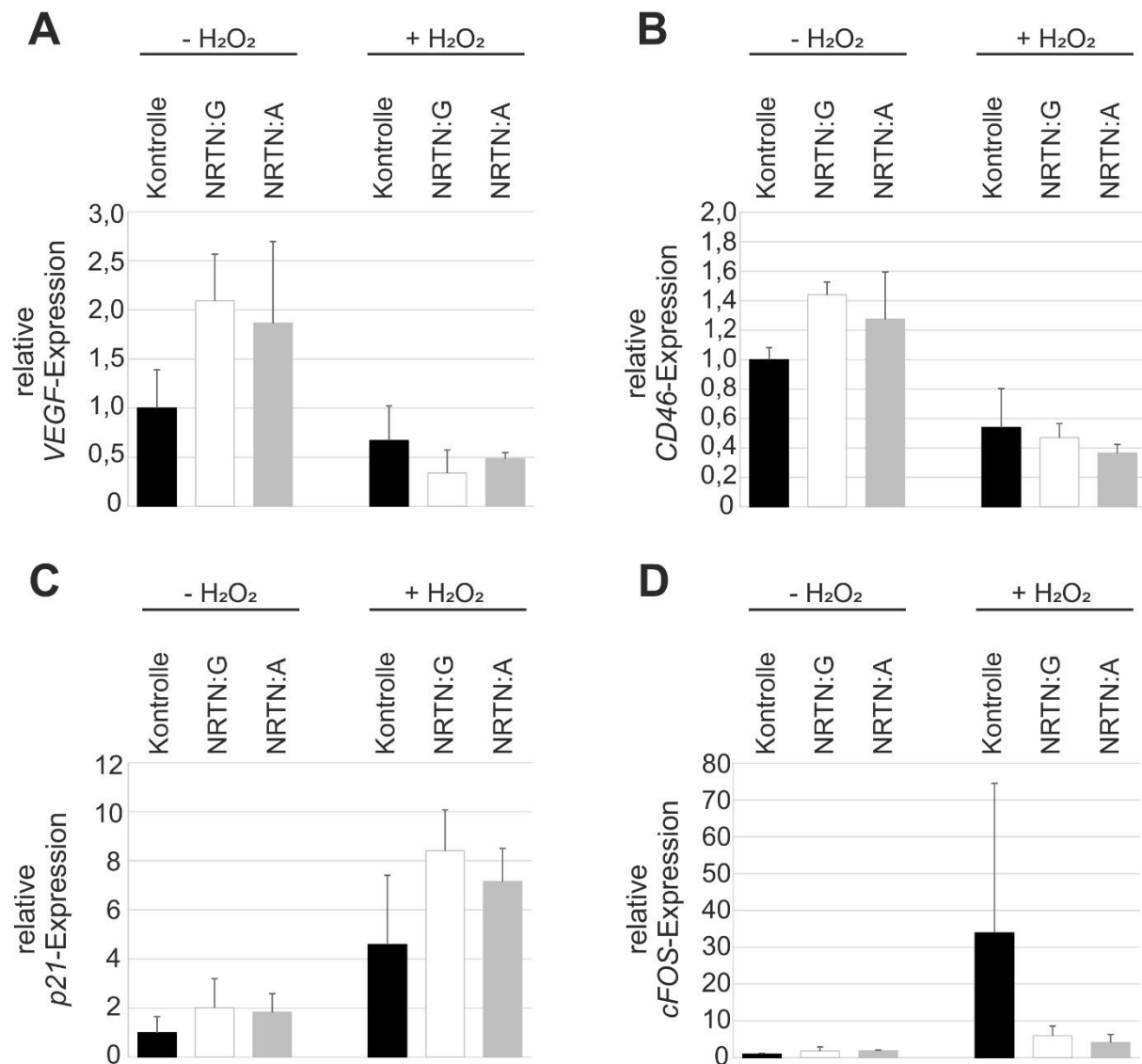


Abbildung 25: Effekt von NRTN:G und NRTN:A auf die Genexpression von VEGF (A), CD46 (B), p21 (C) und cFOS (D) in hiPSC-RPE Zellen inkubiert auf NRTN-haltiger EZM.

hiPSC-RPE Zellen wurden 6 Stunden lang auf Kontroll-, NRTN:G- und NRTN:A-haltiger EZM inkubiert. Anschließend wurden sie für 24 Stunden mit 0 oder 1 mM H₂O₂ behandelt. Mittels qRT-PCR wurde darauf die Genexpression von VEGF (A), CD46 (B), p21 (C) und cFOS (D) gemessen. Die Werte wurden auf die Expression von HPRT normalisiert und auf die unbehandelte Kontrolle kalibriert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. n = 2 für NRTN-freie Kontrollen, n = 3 für NRTN-haltigen Proben.

5 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit sollten funktionelle Versuche durchgeführt werden, mit welchen der Effekt der genetischen Varianten rs79744308 im *NRTN*-Gen auf ihre NRTN Proteinfunktion analysiert werden kann.

In anfänglich durchgeführten Bindeversuchen konnte eine Bindung von NRTN an die äußere Plasmamembran aller getesteten retinalen (ARPE-19, hiPSC-RPE, Weri-Rb1 und Y-79) und nicht retinalen (HUVEC, Hek293 EBNA und BV2) Zelllinien beobachtet werden. Dabei wurde kein Einfluss der genetischen Varianten rs79744308 auf die Bindungskapazität des NRTN-Proteins festgestellt.

Die NRTN Proteinaufreinigung über einen angehefteten Tag gelang trotz zahlreicher Modifikationen im Rahmen dieser Arbeit, aber auch in vorher durchgeführten unabhängigen Versuchen am Institut, nicht. Somit wurden andere Modellsysteme etabliert, welche funktionelle Analysen an NRTN ermöglichten. Dazu wurde zum einen die Herstellung einer NRTN:G und NRTN:A-haltigen EZM etabliert, auf welcher dann AMD-assoziierte zelluläre Prozesse untersucht werden konnten. Zum anderen wurden neue Expressionsvektoren pcDNA4_GFP_NRTN:G und pcDNA4_GFP_NRTN:A kloniert, welche die gleichzeitige heterologe Expression von GFP und NRTN ermöglichen. Dadurch sind funktionelle Analysen an heterolog NRTN exprimierenden und durch GFP-Expression identifizierbaren Zellen möglich.

Initiale Versuche adressierten den Einfluss von NRTN auf MAPK Signalwegsaktivierung, neuronale Differenzierung, Autophagie-Induktion und die Expressionsveränderung nach chronischem, oxidativem Stress. Während für manche Ansätze ein Einfluss von NRTN gezeigt wurde (z.B. erhöhte MAPK Aktivierung bei Weri-Rb1 Zellen durch NRTN), müssen für andere Prozesse (z.B. Autophagie-Induktion in ARPE-19 Zellen) noch geeignete Versuchsprotokolle entwickelt werden oder die Versuche repliziert werden (z.B. Expressionsveränderungen nach oxidativem Stress in hiPSC-RPE Zellen), um die beobachteten Effekte zu verifizieren und mit der nötigen statistischen Aussagekraft zu untermauern.

5.1 Einfluss der genetischen Varianten rs79744308 in der Propeptid-Region von NRTN auf die Bindung des reifen Proteins an Zelllinien

Im ersten Schritt wurde ein möglicher Einfluss von rs79744308 auf die Bindung von NRTN an verschiedene retinale und nicht-retinale Zelllinien überprüft.

Die Bindestelle des NRTN-Proteins an seinen Rezeptor GFR α 2 liegt in der aktiven Kette (Sandmark et al. 2018). Mutationen im Propeptid können jedoch auch die aktive Kette auf verschiedene Weise beeinflussen: Das Propeptid spielt bei vielen TGF- β Familienmitgliedern eine wichtige Rolle bei der Faltung der bioaktiven Domäne während der Synthese (zusammengefasst in Massagué 1990), bei der Disulfidbrücken-stabilisierten Dimerisierung des NRTN-Proteins und bei der Abspaltung des reifen Proteins (Gray und Mason 1990). Auch für den neurotrophen Faktor GDNF, welcher zu 42 % gleiche Aminosäuresequenzen wie NRTN aufweist (Kotzbauer et al. 1996), spielt das Propeptid eine bedeutende Rolle bei der Faltung und Abspaltung des biologisch aktiven Proteins (Oh-hashii et al. 2009). Für NRTN zeigte eine Untersuchung von Fjord-Larsen und Kollegen bislang jedoch keinen Einfluss des Propeptids auf die Faltung der aktiven Domäne oder die Formation der Disulfidbrücken (Fjord-Larsen et al. 2005).

In den hier durchgeführten Versuchen konnten NRTN:G und NRTN:A an alle Zelllinien binden. Dies steht im Einklang mit der Expression des GFR α 2 Rezeptors, der ubiquitär exprimiert wird (Golden et al. 1999). Jedoch weist NRTN auch eine hohe Affinität zu Heparin und den in der EZM und an Zelloberflächen vorhandenen Heparansulfaten auf (Alfano et al. 2007; Bessalov et al. 2011; zusammengefasst in Rider und Mulloy 2017). Es ist daher durchaus denkbar, dass die beobachtete, starke Bindung der NRTN Varianten nicht über eine direkte Interaktion zwischen NRTN und dem GFR α 2 Rezeptor vermittelt wird, sondern über die Bindung von NRTN an Heparansulfate, die an Proteine der EZM oder der Zelloberfläche gebunden sind (zusammengefasst in Sarrazin et al. 2011; Sandmark et al. 2018).

NRTN:G und NRTN:A wiesen in allen Zelllinien eine vergleichbare Bindeaffinität auf, was vermuten lässt, dass durch den Polymorphismus rs79744308 die Faltung des Proteins oder die Zugänglichkeit der Interaktionsregion (für GFR α 2 oder Heparin) im NRTN nicht so verändert wird, dass die Bindefähigkeit eingeschränkt wird.

Diskussion

Wichtig ist hierbei zu erwähnen, dass in den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen über Western Blot Analysen nur das Pro-Protein aus Propeptid und aktiver Kette detektiert werden konnte. Das reife Protein, also die abgespaltene aktive Kette, wurde nicht detektiert.

Es ist unklar, ob unter den gewählten Versuchsbedingungen keine Abspaltung der aktiven Kette stattfand oder ob diese eventuell aufgrund zu geringer Konzentration oder zu geringer Sensitivität des Antikörpers (der aber an die aktive Kette bindet) nicht detektiert werden konnte. Dies steht im Einklang mit Ergebnissen der Studie von Fjord-Larsen und Kollegen, die ebenfalls zeigte, dass bei heterologer Expression des NRTNs eine äußerst geringe Prozessierung des rekombinanten Proteins zum reifen Protein stattfand (Fjord-Larsen et al. 2005). In den hier durchgeführten Versuchen kann also keine Aussage darüber getroffen werden, ob rs79744308 die Abspaltung der aktiven Kette beeinflusst und somit einen Effekt auf die Bindung des aktiven Proteins an die Zelllinien haben könnte. Diesbezüglich wurde von Fjord-Larsen et al. beschrieben, dass nur das reife NRTN (nach Abspaltung des Propeptids), nicht jedoch das unreife NRTN, über Bindung an den GFR α Rezeptor die Aktivierung der RET Tyrosinkinase induzieren konnte (Fjord-Larsen et al. 2005). Ob das unreife Protein bei Fjord-Larsen et al. zur Bindung an den GFR α Rezeptor fähig war und lediglich keine Aktivierung von RET vermitteln konnte oder ob es nicht an den Rezeptor binden konnte, konnte in diesen Versuchen nicht ermittelt werden. Die Autoren vermuteten eine mangelnde Bindungsfähigkeit des unreifen NRTNs (Fjord-Larsen et al. 2005). Zum Einfluss des Propeptids auf die NRTN-Bindung an Heparin wurden keine publizierten Studien gefunden.

5.2 Etablierung von funktionellen Versuchen mit NRTN

Für funktionelle Versuche sollten die rekombinant hergestellten Proteine NRTN:G und NRTN:A über einen N-terminal angehefteten Myc-Tag aufgereinigt werden. Die heterologe Überexpression der Proteine gelang, jedoch konnten in der affinitätschromatographischen Aufreinigung trotz mehrerer Wiederholungen und Modifikationen des Aufreinigungsprotokolles keine Proteine im Eluat detektiert werden. In vorherigen Versuchen am Institut für Humangenetik, in welchen C-terminal Strep-getagtes NRTN aufgereinigt werden sollte, wurde ebenfalls kein Protein eluiert.

Diskussion

Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die Tags nicht an der Protein-Oberfläche zugänglich waren oder zu einer veränderten Stabilität oder Faltung des Proteins führten. Dies ist ein Phänomen, das häufig im Zusammenhang mit Epitopen-Tags, wie dem Myc-Tag, beobachtet wird (Borjigin und Nathans 1994; zusammengefasst in Zhao et al. 2013). Eine weitere Erklärung könnte in der hohen Affinität von NRTN zu Heparin und Glykosaminoglykanen (GAG), wie Heparansulfat, liegen (Alfano et al. 2007; Bespalov et al. 2011; zusammengefasst in Rider und Mulloy 2017), welches sich auch im Säulenmaterial des Aufreinigungskits befindet. Für andere GAG-bindende Proteine, wie Wachstumsfaktoren, Glykoproteine der EZM oder sezernierte Proteasen ist bekannt, dass hohe Konzentrationen an Salz benötigt werden, um diese Proteine von Heparin-Agarose Säulen zu eluieren (Lee und Lander 1991). Demnach wäre es unter Umständen angeraten, die Aufreinigung unter hohen Salzkonzentrationen zu wiederholen. Zu bedenken ist, dass diese unphysiologischen Bedingungen jedoch eine Fehlfaltung oder Denaturierung des Proteins zur Folge haben, welche für funktionelle Untersuchungen rückgängig gemacht werden müssten.

Da NRTN, vermutlich durch seine hohe Heparin-Bindungsaffinität, in großen Mengen in der EZM abgelagert wird, wurde die Herstellung NRTN-haltiger EZM (produziert von transfizierten Hek293 EBNA Zellen) etabliert. Auf dieser wurden retinale Zelllinien inkubiert und Untersuchungen zu AMD-assoziierten zellulären Prozessen durchgeführt. Diesbezüglich sind auch in der Literatur bereits einige Publikationen zu finden, welche krankheitsassoziierte Prozesse an Zellen untersuchten, die auf speziell präparierter EZM kultiviert worden waren (Soboleva et al. 2003; Thibault et al. 2010; Hellewell et al. 2017; Fernandez-Godino et al. 2018). Bei derartigen Versuchen muss jedoch bedacht werden, dass ein beobachteter Effekt nicht durch die direkte Interaktion mit NRTN, sondern eventuell auch durch eine vorherige Veränderung der EZM im Zusammenhang mit der heterologen NRTN-Expression verursacht werden kann. So wurde zum Beispiel eine Beeinflussung der EZM durch *EFEMP1* Knockout in ARPE-19 Zellen beschrieben (Fernandez-Godino et al. 2018). Vor weiteren Untersuchungen wäre also eine Untersuchung der EZM Zusammensetzung und Konformation nach heterologer EZM-Expression anzuraten.

Für funktionelle Analysen an Zellen, welche mit NRTN Expressionvektoren transfiziert wurden, bestätigten die Ergebnisse eine deutliche heterologe Expression von NRTN. Allerdings konnte hier lediglich die unreife, ungespaltene NRTN Form in Western Blot

Analysen detektiert werden, was, wie schon zuvor diskutiert, auch von Fjord-Larsen und Kollegen nach heterologer Überexpression beobachtet wurde (Fjord-Larsen et al. 2005).

5.3 Funktionelle Versuche mit NRTN

NRTN ist als Mitglied der TGF- β Familie ein sezerniertes Signalmolekül und ein Wachstumsfaktor, welcher als Vorläufermolekül mit einem Signalpeptid und einem Propeptid synthetisiert wird. Zwei NRTN Monomere bilden eine homodimere Struktur, welche über Disulfidbrücken verbunden ist. Nach Abspaltung der Propeptid-Region entsteht dann das reife, aktive Protein (zusammengefasst in Massagué 1990; sowie Kingsley 1994). Die proteolytische Spaltung des Pro-NRTN erfolgt an der RXXR-Konsensus Erkennungssequenz über Furin-ähnliche Proteasen, wodurch das reife, 102 AS-lange NRTN Protein entsteht (Fjord-Larsen et al. 2005). Der Polymorphismus rs79744308 im *NRTN* Gen liegt in der Propeptid-Region, 36 Aminosäuren von der Spaltstelle entfernt, und führt zu einem Aminosäureaustausch von Threonin zu Alanin. Somit stellt sich die Frage, inwiefern die in diesem Projekt untersuchte Missense Mutation im Propeptid einen möglichen Einfluss auf das reife Protein und dessen Aktivität oder Funktion haben könnte.

5.3.1 Effekt von NRTN auf MAPK Aktivierung

Weri-Rb1 Zellen zeigten eine deutliche Aktivierung der MAPK Proteine ERK1/2 durch NRTN:G und etwas weniger durch NRTN:A im Vergleich zur Kontrolle. Auch die ersten Expressionsanalysen an hiPSC-RPE Zellen lassen auf eine Induktion des MAPK Zielgens *cFOS* durch NRTN schließen. Dies steht im Einklang mit vorherigen Studien, die zeigen, dass die Bindung von NRTN an GFR α 2 und zu einem geringeren Teil auch an GFR α 1 über die Tyrosinkinase RET eine Aktivierung des MAPK Signalweg induziert (Durbec et al. 1996; Creedon et al. 1997). Das lässt vermuten, dass NRTN zelluläre Prozesse, wie Proliferation, Differenzierung, Autophagie oder Apoptose beeinflussen kann, welche durch den MAPK Signalweg vermittelt werden (zusammengefasst in Seger und Krebs 1995; Wada und Penninger 2004; sowie Sridharan et al. 2011). Wie es die Ergebnisse der unterschiedlichen ERK1/2

Diskussion

Aktivierung durch NRTN:G und NRTN:A in Weri-Rb1 Zellen vermuten lassen, könnte der AMD-assoziierte Polymorphismus rs79744308 diese Fähigkeit und somit die Regulation der zellulären Prozesse beeinflussen.

5.3.2 Effekt von NRTN auf neuronale Differenzierung

Sowohl NRTN:G, als auch NRTN:A stimulierten die Ausbildung zellulärer Fortsätze (Neuriten) in Weri-Rb1, was ein Marker für die neuronale Differenzierung in dieser Zelllinie ist (zusammengefasst in Sainath und Gallo 2014; Liu et al. 2017). Dies steht im Einklang mit einer Studie von Hishiki et al., in der eine Förderung der Differenzierung und Neuritenbildung in Neuroblastomzellen, zu denen auch Weri-Rb1 Zellen zählen, durch GDNF und NRTN beschrieben ist (Hishiki et al. 1998). Zudem ist bekannt, dass andere Mitglieder der TGF- β Familie ebenfalls die Differenzierung neuronaler Zellen stimulieren (Mount et al. 1995; Pozas und Ibáñez 2005; zusammengefasst in Meyers und Kessler 2017). In diesem Versuch konnten keine Unterschiede zwischen NRTN:G und NRTN:A beobachtet werden, allerdings sind für die Bestätigung dieser Beobachtung noch weitere unabhängige Replikationen erforderlich. Generell stellt sich die Frage, inwiefern die neuronale Differenzierung einen Einfluss auf die AMD Pathogenese ausüben könnte. Eventuell könnte eine gewisse „Vorschädigung“ in der frühen Entwicklung und Differenzierung von Photorezeptoren die Suszeptibilität zur Entstehung einer AMD begünstigen. Dazu wurde bereits diskutiert, inwiefern regulatorische Transkriptionsfaktoren, welche die Entwicklung und Differenzierung der Photorezeptoren beeinflussen, mit retinalen degenerativen Erkrankungen zusammenhängen und möglicherweise als therapeutische Angriffspunkte dienen könnten (zusammengefasst in Swaroop et al. 2010). Über andere Eigenschaften, wie beispielsweise seine neuroprotektive und neurorestaurative Kapazität (zusammengefasst in Domanskyi et al. 2015; sowie Xiao und Le 2016) könnte NRTN möglicherweise auch später bei der beobachteten Degeneration von Photorezeptoren an der AMD Pathogenese beteiligt sein. Dazu beschrieben Baranov et al., dass der neurotrophe Faktor GDNF in Modellen von retinaler Degeneration das Überleben von Photorezeptoren deutlich verbessert (Baranov et al. 2017).

5.3.3 Effekte von NRTN auf Autophagie-Induktion in retinalen Zelllinien

Die Versuche zeigten eine eindeutige Autophagie-Induktion in H₂O₂ behandelten Weri-Rb1 Zellen. Jedoch wurde kein Effekt von NRTN auf die Autophagie-Induktion in diesen Zellen beobachtet. In vorherigen Publikationen wurde beschrieben, dass der Rezeptor GFR α 1, der auch NRTN binden kann, die Autophagie in Osteosarkom Zellen induzieren kann (Kim et al. 2017). Zudem ist eine Beeinflussung der Autophagie über die RET Tyrosinkinase in Zellen der Akuten myeloischen Leukämie beschrieben (Rudat et al. 2018). Als Erklärung für einen fehlenden Einfluss von NRTN auf die Autophagie in den hier durchgeführten Versuchen wäre es denkbar, dass nicht genügend biologisch aktives NRTN vorlag, um die Autophagie-Induktion zu beeinflussen. Denn wie die vorherigen Versuche zeigten, lag NRTN hauptsächlich in der unreifen, inaktiven Form vor. Des Weiteren wäre es möglich, dass die Ergebnisse zum Einfluss von GFR α 1 oder dem RET-Signalweg auf die Autophagie in Osteosarkom Zellen (Kim et al. 2017) oder in Zellen der Akuten myeloischen Leukämie (Rudat et al. 2018) nicht auf die neuronalen Weri-Rb1 Zellen zu übertragen sind. In dieser Zelllinie fehlen möglicherweise die entscheidenden Faktoren, welche den Einfluss von NRTN auf die Autophagie vermitteln. Schließlich könnte es sein, dass die Testbedingungen für Weri-Rb1 Zellen in dieser Form nicht geeignet waren (z.B. falscher Messzeitpunkt oder zu geringe Sensitivität), um den Effekt von NRTN auf die Autophagie in Weri-Rb1 zu detektieren.

Interessanterweise wurde in Weri-Rb1 Zellen ohne H₂O₂ Behandlung, die auf NRTN-haltiger EZM kultiviert worden waren, eine stärkere Autophagie als in Weri-Rb1 Zellen auf Kontroll-EZM beobachtet. Dies könnte bedeuten, dass NRTN auf Weri-Rb1 Zellen einen Autophagie-stimulierenden Effekt ausübt. Wie zuvor erwähnt, wäre es möglich, dass NRTN durch die Bindung an GFR α 1 oder α 2 und Aktivierung der RET Tyrosinkinase die Autophagie beeinflusst (Kim et al. 2017; Rudat et al. 2018). Hier könnte die MAPK Aktivierung über RET eine Rolle spielen. Dabei ist bekannt, dass eine ERK Aktivierung in vielen Zellen zu einer Induktion der Autophagie führt, unter anderem auch in neuronalen Zellen (Plowey et al. 2008; zusammengefasst in Sridharan et al. 2011). Nachdem in den durchgeführten Versuchen gezeigt werden konnte, dass NRTN in Weri-Rb1 zu einer Aktivierung des ERK Signalweges führt, wäre dies eine mögliche Erklärung für die Autophagie-Induktion durch NRTN in unbehandelten Weri-Rb1 Zellen. Eine weitere denkbare Erklärung wäre, dass die

Diskussion

heterologe Überexpression von NRTN in Hek293 EBNA Zellen, welche zur Produktion der NRTN-haltigen EZM durchgeführt wird, in diesen Zellen auch die Expression weiterer Faktoren stimulieren könnte, welche die Zusammensetzung der EZM und somit ihren Einfluss auf die Weri-Rb1 Zellen beeinflussen. So wurde in Fernandez-Godino et al. beobachtet, dass ein Knockout im AMD-assoziierten *EFEMP1* Gen (EGF Containing Fibulin Extracellular Matrix Protein 1) in ARPE-19 Zellen die Menge und die Struktur anderer EZM-Bestandteile, wie Laminin, Fibronectin, Kollagen IV und VI verändert, und somit zur Produktion einer abnormen EZM führt (Fernandez-Godino et al. 2018).

Weitere Versuche zum Effekt von NRTN auf die Autophagie-Induktion wurden in den RPE-Zelllinien ARPE-19 und hiPSC-RPE Zellen durchgeführt. In der Literatur ist beschrieben, dass eine Dysregulation der Autophagie in RPE Zellen zu erhöhter Anfälligkeit für oxidativen Stress und AMD führt (Mitter et al. 2014). Des Weiteren wurde gezeigt, dass RPE Zellen von Menschen mit AMD verringerte Autophagieprozesse aufweisen als RPE Zellen von gesunden Personen (Golestaneh et al. 2017). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass eine fehlregulierte Autophagie, vor allem in RPE Zellen, ein Mechanismus ist, welcher zur Entstehung einer AMD beitragen kann (zusammengefasst in Mitter et al. 2012; sowie Kaarniranta et al. 2017; Golestaneh et al. 2017). Die Autophagie-Induktion wurde in ARPE-19 und hiPSC-RPE Zellen nach einem etablierten Protokoll (Szatmári-Tóth et al. 2016) durchgeführt, welches auch in Vorversuchen am Institut für Humangenetik erfolgreich angewandt wurde. Jedoch konnte mit diesem Protokoll bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen sowohl in ARPE-19 als auch in den hiPSC-RPE Zellen keine Autophagie induziert werden. Dabei ist aufgefallen, dass im Gegensatz zu publizierten Daten (Szatmári-Tóth et al. 2016) in allen Zellen die Mengen an LC3 (I) selbst in den unbehandelten Zellen sehr gering und teils kaum in Western Blot Analysen zu detektieren waren, wohingegen sehr hohe Mengen an LC3 (II) bereits in den H₂O₂-freien Zellen zu erkennen waren. Dies deutet auf eine bereits starke Konversion von LC3 (I) in LC3 (II) und bereits erfolgte Autophagie-Induktion in diesen Zellen hin. Eine Erklärung hierfür wäre eine schon bestehende Vorschädigung der Zellen, zum Beispiel dadurch, dass die Zellen zu lange in Kultur gehalten worden sind. In alternden Zellen kommt es zu einer zunehmenden Degeneration von Organellen. Die Autophagie ist dabei ein wichtiger homöostatischer Prozess und hilft dabei, diese geschädigten

Zellorganellen abzubauen und somit das Überleben der Zelle zu verlängern oder zu erhalten (zusammengefasst in DiLoreto und Murphy 2015). In den hiPSC-RPE Zellen könnte möglicherweise auch eine Schädigung der Zellen während des Versuches der Auslöser für die Autophagie-Induktion gewesen sein. Die hiPSC-RPE Zellen mussten zunächst von den Filtern gelöst werden, auf welchen diese Zellen kultiviert worden waren. Im Anschluss daran wurden sie resuspendiert und auf die NRTN-haltige EZM ausgesät. Bei diesen Abläufen ist eine mögliche Stressreaktion und eine daraus resultierende Schädigung der Zellen nicht auszuschließen. Für diese Zelllinie sollten somit eventuell andere Versuchskonditionen getestet werden, bei welchen die Zellen nicht bereits durch das Aussäen gestresst werden. Die Versuche in ARPE-19 Zellen sollten mit frisch aufgetauten Zellen, die zuvor ebenfalls nur selten passagiert wurden, wiederholt werden.

5.3.4 Einfluss von NRTN auf durch oxidativen Stress induzierte Expressionsveränderungen

Im letzten Projektteil wurde untersucht, inwiefern sich NRTN auf die durch oxidativen Stress verursachte Expressionveränderung in retinalen Zelllinien (Weri-Rb1 und hiPSC-RPE) auswirkt. Beispielhaft wurde hier die Expression der Gene *VEGF*, *CD46*, *p21* und *cFOS* untersucht.

In neuronalen Zellen wirkt VEGF protektiv gegen eine Degeneration durch oxidativen Stress (Oosthuyse et al. 2001; Storkebaum und Carmeliet 2004). Auch in RPE Zellen ist VEGF dafür bekannt, das Überleben von unter oxidativem Stress stehenden Zellen zu erhöhen. Eine Hochregulierung der *VEGF* Genexpression in oxidativ gestressten ARPE-19 Zellen ist auch in der Literatur beschrieben (unter anderem Byeon et al. 2010; Marazita et al. 2016). Weder bei Weri-Rb1 noch bei hiPSC-RPE Zellen wurde jedoch eine Steigerung der *VEGF* Expression durch oxidativen Stress beobachtet. Die hiPSC-RPE Zellen zeigten sogar eine Reduktion der *VEGF* Expression auf oxidativen Stress. Eine mögliche Erklärung für diese Ergebnisse ist die Verwendung von anderen Zellen in den publizierten Studien. In den oben genannten Publikationen wurden ARPE-19 Zellen verwendet (Byeon et al. 2010; Marazita et al. 2016), welche auf oxidativen Stress mit einer erhöhten *VEGF* Expression reagieren. Es ist jedoch bekannt, dass neuronale Zellen, wie die verwendeten Weri-Rb1 Zellen, häufig andere

Diskussion

Expressionsveränderungen zeigen als nicht-neuronale Zellen: So aktivieren beispielsweise beim Prozess der Apoptose neuronale Zellen den MAPK Signalweg (Estus 1994), während RPE Zellen ihn herunterregulieren (Guillonnet al. 1998; Bryckaert et al. 2000). Für die hiPSC-RPE Zellen ist bekannt, dass die bei ARPE-19 etablierten Stimuli häufig in ihrer Stärke nicht ausreichen, um einen entsprechenden Effekt auszulösen (z.B. Garcia et al. 2015). Es wäre also denkbar, dass die H₂O₂ Konzentration hier erhöht werden muss, um eine *VEGF* Induktion zu etablieren.

Die Expression von *CD46*, einem membrangebundenen Komplement-Aktivator, ist in RPE Zellen in frühen Stadien der GA reduziert (Vogt et al. 2011). Außerdem wurde in RPE Zellen eine verringerte Expression von *CD46* nach oxidativem Stress nachgewiesen (Thurman et al. 2009; Ebrahimi et al. 2013; Carver und Yang 2016). In dieser Arbeit wurde in den hiPSC-RPE Zellen, in Übereinstimmung mit der Literatur, eine verringerte Expression von *CD46* nach H₂O₂ Behandlung detektiert. Über einen Einfluss von NRTN konnte aufgrund der geringen Probenzahl noch keine Aussage getroffen werden. Für neuronale Zellen, wie Weri-Rb1, ist in der Literatur keine Information zu einer veränderten Genexpression von *CD46* unter oxidativem Stress zu finden, dennoch sollte dieser Marker auch in Weri-Rb1 Zellen untersucht werden. Die H₂O₂ Behandlung führte hier jedoch nicht zu einer Verringerung der *CD46* Expression, es wurde im Gegenteil ein leichter Anstieg verzeichnet. Ein Einfluss von NRTN wurde nicht festgestellt.

Das Protein p21 gilt als Seneszenzmarker und reagiert bei oxidativem Stress mit einer Zunahme der Expression (Marazita et al. 2016). Die hier durchgeführten Versuche zeigten ebenfalls eine Hochregulierung von *p21* nach H₂O₂ Behandlung von hiPSC-RPE, aber auch von Weri-Rb1 Zellen. In den hiPSC-RPE Zellen schien zusätzlich NRTN eine stimulierende Wirkung auf die *p21* Expression zu haben. In der Literatur sind keine Angaben zu einer Regulation der *p21* Expression durch NRTN oder GDNF zu finden. Auch hier muss allerdings für eine gesicherte Aussage der hier durchgeführten Versuchsreihen die Probenzahl wesentlich erhöht werden.

Der MAPK Signalweg wird in RPE Zellen durch oxidativen Stress erhöht (Glotin et al. 2006; Ho et al. 2006). Des Weiteren wurde bei AMD Erkrankten bereits eine fehlerhafte Regulation des MAPK Signalwegs beschrieben (Dridi et al. 2012; zusammengefasst in Kyosseva 2016). Auch in neuronalen Zellen führt oxidativer Stress zu einer

Diskussion

Hochregulierung bzw. Aktivierung des MAPK Signalwegs (Liu et al. 1996; Samanta et al. 1998). In hiPSC-RPE Zellen wurde im Einklang mit diesen Daten durch den oxidativen Stress eine deutliche Erhöhung der *cFOS* Expression gemessen. Um den Effekt von NRTN statistisch gesichert zu evaluieren, müssen zusätzliche Replikationen durchgeführt werden. Bei Weri-Rb1 Zellen wurde, ebenfalls im Einklang mit den oben beschriebenen Daten, sowohl durch oxidativen Stress als auch durch NRTN eine Steigerung der *cFOS* Expression induziert.

5.4 Ausblick

In dieser Arbeit konnten verschiedene Zellsysteme für funktionelle Untersuchungen zum Einfluss von NRTN bzw. den beiden polymorphen Isoformen auf AMD-assoziierte zelluläre Prozesse etabliert werden. Hierzu gehören die Aktivierung von MAPK Signalwegen, Autophagie, neuronale Differenzierung und Expressionsveränderungen auf oxidativen Stress. Damit wurde eine Grundlage für Versuche geschaffen, welche einen Effekt des AMD-assoziierten Polymorphismus rs79744308 auf diese Prozesse und somit die mögliche Beteiligung dieses Polymorphismus in der AMD Pathogenese untersuchen. Hierfür sollten weitere Replikationen der beschriebenen Versuche mit erhöhter Probenzahl durchgeführt werden. Darüber hinaus gilt es noch, weitere Versuche zu etablieren, welche den Einfluss von NRTN auf andere AMD-assoziierte Prozesse, wie Apoptose oder choroidale Neovaskularisation adressieren. Ergänzt durch *in vivo* Daten könnten so mögliche Zusammenhänge mit Mechanismen der AMD-Pathogenese aufgeklärt werden und dadurch auch Anhaltspunkte für neue Therapieansätze abgeleitet werden. So wird NRTN zum Beispiel bereits in mehreren Studien als vielversprechendes therapeutisches Agens bei der Behandlung von Morbus Parkinson untersucht (Marks et al. 2010; zusammengefasst in Lindholm et al. 2016; Runeberg-Roos et al. 2016; Axelsen und Woldbye 2018). Weitere Untersuchungen könnten somit auch einen therapeutischen Nutzen von NRTN in der Therapie der AMD nahelegen.

6 Zusammenfassung

Die AMD ist eine degenerative Erkrankung der Netzhaut und geht mit einem Absterben von RPE Zellen und Photorezeptoren, speziell in der zentralen Region der Netzhaut, der Makula, einher (zusammengefasst in Ding et al. 2009). Als führende Ursache für irreversible Sehschäden bei Menschen über 60 Jahren in der westlichen Welt (zusammengefasst in Wong et al. 2014), ist die AMD eine weit verbreitete multifaktorielle Erkrankung, welche mit hohem Leidensdruck bei den Erkrankten verbunden ist. Mehrere Faktoren tragen zur Entstehung der Erkrankung bei. Dazu gehört neben Alter, Rauchen, Ethnizität und weiteren Umweltfaktoren auch und zu einem großen Anteil die genetische Disposition. Varianten im *CFH* Gen und im *ARMS2/HTRA1* Locus machen dabei den Großteil des genetischen Risikos aus (zusammengefasst in DeAngelis et al. 2017). Nachdem die AMD unbehandelt zur Erblindung führt und lediglich für die CNV, die „feuchte“ Spätform der AMD, mit der anti-VEGF Therapie eine Möglichkeit zur Behandlung existiert, besteht die Hoffnung, dass die zunehmende Aufklärung der molekularen Pathogenese der AMD, insbesondere der geographischen Atrophie, zu weiteren therapeutischen Ansätzen führt.

In einer Genom-weiten Assoziationsstudie im Jahr 2016 wurden von Fritsche und Kollegen 18 bekannte und 16 neue AMD-assoziierte Genloci mit Genom-weiter Signifikanz beschrieben (Fritsche et al. 2016). Für dieses Projekt sollte der AMD-assoziierte Polymorphismus rs79744308:G>A im *NRTN*-Gen bezüglich seines Effekts auf die NRTN Proteinfunktion analysiert werden, um so einen möglichen Einfluss von NRTN auf die AMD-Pathogenese zu untersuchen.

Bindeversuche der nicht protektiven (rs79744308:G) und der protektiven (rs79744308:A) NRTN Varianten an den Zelllinien ARPE-19, BV2, Hek293 EBNA, hiPSC-RPE, HUVEC, Weri-Rb1 und Y-79, welche auch in anschließenden funktionellen Versuchen eingesetzt wurden, zeigten die Bindung von NRTN an diese Zelllinien, jedoch keinen Effekt von rs79744308 auf die Bindungsaffinität. Im nächsten Schritt wurden dann Ansätze etabliert, welche als Grundlage für Versuche zum Effekt von NRTN auf AMD-assoziierte zelluläre Prozesse dienen. Die Aufreinigung rekombinant hergestellten NRTNs misslang trotz mehrerer Modifikationen des Versuchsprotokolls, vermutlich aufgrund der Bindung von NRTN an das

Zusammenfassung

Säulenmaterial. Daraufhin wurden weitere Ansätze entwickelt, welche eine Untersuchung von AMD-assoziierten Prozessen an Zellen ermöglichten, die auf NRTN-haltiger EZM kultiviert worden waren. Des Weiteren wurden bicistronische Expressionsvektoren kloniert, welche die gleichzeitige heterologe Expression von GFP als Transfektionsmarker und NRTN ermöglichten. Durch diese Vektoren können funktionelle Analysen an Zellen durchgeführt werden, die heterolog NRTN der AMD-protektiven oder nicht protektiven assoziierten Variante exprimieren. Hierfür wurden zusätzlich verschiedene Transfektionsstrategien für retinale Zelllinien ausgetestet.

In ersten funktionellen Versuchen wurde ein Effekt von NRTN auf den ERK Signalweg und die neuronale Differenzierung von Weri-Rb1 Zellen gezeigt. Untersuchungen zur Autophagie wiesen eine erfolgreiche Autophagie-Induktion in Weri-Rb1 nach, während dies bei ARPE-19 und hiPSC-RPE Zellen misslang. In Expressionsstudien wurde die Veränderung spezifischer Transkripte in Weri-Rb1 und hiPSC-RPE Zellen, welche eine Rolle in der AMD-Pathogenese spielen, auf oxidativen Stress hin untersucht. Die ersten Ergebnisse lassen bereits auf Effekte von NRTN bei der Expression bestimmter Gene, wie zum Beispiel *cFOS* schließen. Weitere Replikationen und eventuelle Modifikationen der Versuchsprotokolle (z.B. für Autophagie-Induktion in RPE-Zelllinien) müssen durchgeführt werden, um die beobachteten Effekte zu verifizieren und mit der nötigen statistischen Aussagekraft zu versehen.

7 Abstract

AMD is a degenerative disease of the retina and is accompanied by a loss of RPE cells and photoreceptors in the central region of the retina, the macula (summarized by Ding et al. 2009). As the leading cause for irreversible blindness in people over 60 years of age in western societies (summarized in Wong et al. 2014), AMD is a wide-spread disease causing great suffering for affected individuals. Many risk factors contribute to its development. These include age, smoking, ethnicity and other environmental factors as well as genetic disposition. Variants in the *CFH* gene and in the *ARMS2/HTRA1* locus account for the largest part of the genetic risk (summarized in DeAngelis et al. 2017). As AMD leads to irreversible blindness if left untreated, and as there is only a therapeutic possibility for CNV, the „wet“ late stage AMD, there is hope that further clarification of the AMD pathogenesis will lead to new therapeutical approaches, specifically for the “dry” atrophic form of the disease.

In a large genome-wide association study, Fritsche and colleagues identified 18 known and 16 new AMD associated gene loci with genom-wide significance (Fritsche et al. 2016). In the present thesis, the AMD associated polymorphism rs79744308:G>A in the *NRTN* gene was analysed for its effects on NRTN protein function, in order to investigate a putative involvement of NRTN in AMD pathogenesis.

Binding assays of the non protective and protective NRTN variants to the cell lines ARPE-19, BV2, Hek293 EBNA, hiPSC-RPE, HUVEC, Weri-Rb1 and Y-79, which were also used for further functional investigations, showed binding of NRTN to these cell lines, although there was no effect of rs79744308 on binding affinity. In the next step, model systems were established as a basis for further investigations of NRTN effects on AMD associated cellular processes. The purification of recombinantly produced NRTNs failed despite different modifications of the initial purification protocol, presumably due to binding of NRTN to the column material. Consequently further approaches were developed enabling an investigation of cells which had been cultivated on NRTN-containing ECM. Furthermore bicistronic expression vectors were cloned facilitating simultaneous heterologous expression of GFP as a transfection marker and the NRTN propeptide. These vectors now allow functional analyses on cells which heterologously express NRTN of the AMD non protective or protective

Abstract

variant. In connection therewith, different transfection conditions were tested for retinal cell lines.

First results from the functional assays revealed an effect of NRTN on the ERK signaling pathway, but also an effect on neuronal differentiation of Weri-Rb1 cells. Experiments addressing autophagy showed a successful autophagy induction in Weri-Rb1 cells, but not in ARPE-19 or hiPSC-RPE cells. After oxidative stress treatment the expression of specific target genes that play a role in AMD pathogenesis was investigated in qRT-PCR experiments in Weri-Rb1 and hiPSC-RPE cells. First results indicate an effect of NRTN on the expression of distinct genes, like *cFOS*. Nevertheless additional replications and modifications of the assay protocols (e.g. for autophagy induction in RPE cell lines) need to be performed to verify observed effects and provide appropriate statistical significance.

8 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
μ	Mikro
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
A	Ampère
AAP	Antarktische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
cDNA	Complementary DNA (komplementäre DNA)
cm	Zentimeter
CNV	Choroidale Neovaskularisation
Dapi	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinacid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Nukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et aliter (und andere)
EZM	Extrazelluläre Matrix
FBS/ FCS	Fetal bovine/ calf serum (Fötales Kälberserum)
g	Gramm
G-418	Geneticin
GA	Geografische Atrophie
GFP	Green fluoreszent protein (Grün fluoreszierendes Protein)
h	Stunde
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide (Wasserstoffperoxid)
IB	Immunoblot
IHC	Immunohistochemie
INL	Inner nuclear layer (Innere Körnerschicht)
IPL	Inner plexiform layer (Innere plexiforme Schicht)
kb	Kilobasen

Abkürzungsverzeichnis

kDA	Kilodalton
l	Liter
LB	Liquid broth (flüssige Brühe)
LE	Leereluat
m	Milli
M	Molar
mA	Milliampère
mAK	Monoklonaler Antikörper
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MM	Mastermix
MTT	1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazan
n	Nano
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NRTN	Neurturin
ns	Nanosekunde
ONL	Outer nuclear layer (Äußere Körnerschicht)
OPL	Outer plexiform layer (Äußere plexiforme Schicht)
pAK	Polyklonaler Antikörper
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Saline)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
Pen/ Strep	Penicillin/ Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
Poly-A	Poly-Adenylierung
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	Quantitative Realtime Polymerase Kettenreaktion
RNA	Ribonucleinacid (Ribonukleinsäure)
RPE	Retinales Pigmentepithel
rpm	Rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Abkürzungsverzeichnis

SOC	Super optimal broth + glucose (super optimale Brühe + Glucose)
TBE	Tris Borat EDTA
TBS	Tris-buffered saline (Trisgepufferte Saline)
Temed	Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
V	Volt
VEGF	Vascular endothelial growth factor (Vaskulär endothelialer Wachstumsfaktor)
WB	Western Blot

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Aufgelistet ist der in dieser Arbeit verwendete <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) Stamm und seine Quelle.	18
Tabelle 2: Aufgelistet ist die in der Arbeit verwendete Zelllinie, ihr Ursprungsorganismus, ihr Ursprungszelltyp und ihre Quelle.	18
Tabelle 3: Aufgelistet sind alle in der Arbeit verwendeten Primer, ihre 5'-3'-Sequenz und ihr Verwendungszweck.	19
Tabelle 4: Aufgelistet sind alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide/ Expressionskonstrukte, ihr Verwendungszweck und ihre Quelle.	19
Tabelle 5: Aufgelistet sind alle in der Arbeit verwendeten primären Antikörper, ihr Typ, ihre Spezies, ihre Verdünnung, ihr Verwendungszweck und ihre Quelle.	20
Tabelle 6: Aufgelistet sind alle in der Arbeit verwendeten sekundären Antikörper, ihre Verdünnung, ihr Verwendungszweck und ihre Quelle.	21
Tabelle 7: Aufgelistet sind alle in der Arbeit verwendeten Enzyme und ihre Quelle.	21
Tabelle 8: Aufgelistet sind alle in der Arbeit verwendeten Molekularmassenstandards, ihr Verwendungszweck und ihre Quelle.	21
Tabelle 9: Aufgelistet sind alle in der Arbeit verwendeten Kit-Systeme und ihre Quelle.	22
Tabelle 10: Aufgelistet sind alle in der Arbeit verwendeten Chemikalien/ Reagenzien und ihre Quelle.	22
Tabelle 11: Aufgelistet sind alle in der Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen, ihre Zusammensetzung und Menge.	25
Tabelle 12: Aufgelistet sind alle in der Arbeit verwendeten Zellkulturmedien und Zusätze und ihre Quelle.	26
Tabelle 13: Aufgelistet sind alle in der Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien und ihre Quelle.	27
Tabelle 14: Aufgelistet sind alle in der Arbeit verwendeten Laborgeräte und ihre Quelle.	28
Tabelle 15: Aufgelistet sind alle in der Arbeit verwendeten Software-Programme und ihre Quelle.	30
Tabelle 16: Aufgelistet sind die Zusammensetzungen des SDS-Trenngels mit 12,5 % und des SDS-Sammelgels mit 3 %.	37

Tabellenverzeichnis

Tabelle 17: Angegeben ist die Zusammensetzung des pcDNA3_NRTN Verdauansatzes mit Xmn I und Nru I.....	40
Tabelle 18: Angegeben ist die Zusammensetzung des Phosphorylierungs-Ansatzes.	41
Tabelle 19: Angegeben ist die Zusammensetzung des Zielvektor-Verdauansatzes mit Nru I.....	42
Tabelle 20: Angegeben ist die Zusammensetzung des Dephosphorylierungsansatzes.	42
Tabelle 21: Angegeben ist die Zusammensetzung der Ligationsansätze.....	43
Tabelle 22: Angegeben ist die Zusammensetzung des Testverdauansatzes.....	45
Tabelle 23: Angegeben ist die Zusammensetzung des Cycle Sequencing Ansatzes.	45
Tabelle 24: Aufgeführt ist das PCR-Programm für das in dieser Arbeit durchgeführte Cycle Sequencing.....	45
Tabelle 25: Angegeben ist der in diesem Versuch verwendete Lipofectamin 3000 Transfektionsansatz.	50
Tabelle 26: Angegeben sind die verwendeten Mirus-Transfektionsansätze in unterschiedlichen Well-Formaten.	52
Tabelle 27: Angegeben sind die Komponenten und Volumina des Mastermixes.	56
Tabelle 28: Angegeben sind die Reaktionsschritte der cDNA Synthese mit Temperaturen und Laufzeiten.....	57
Tabelle 29: Angegeben sind die Komponenten und Volumina des Ansatzes für die qRT-PCR.....	57
Tabelle 30: Angegeben sind die Reaktionsschritte der qRT-PCR mit Temperaturen, Laufzeiten und Zyklen.	57

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Fundusaufnahmen eines Auges mit Drusen (A) eines Auges mit fortgeschrittener GA (B) und eines Auges mit CNV (C).....	3
Abbildung 2: Darstellung des NRTN-Proteins.....	13
Abbildung 3: Bindung von NRTN an retinale Zelllinien.	59
Abbildung 4: Bindung von NRTN an nicht retinale Zelllinien.	60
Abbildung 5: Bindung der NRTN:G und NRTN:A Varianten an hiPSC-RPE Zellen..	61
Abbildung 6: Aufreinigung von Myc-getagten NRTN-Varianten.....	62
Abbildung 7: Heterologe NRTN-Expression und –Ablagerung in der EZM durch Hek293 EBNA Zellen.....	63
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Ausgangsvektoren pcDNA3_NRTN (A) und pcDNA4_GFP (B) und des neu generierten bicistronischen Expressionsvektors pcDNA4_GFP_NRTN (C).....	64
Abbildung 9: Fluoreszenzmikroskopie zur Überprüfung der heterologen Expression von GFP ausgehend von den neu generierten bicistronischen Expressionsvektoren.	65
Abbildung 10: Western Blot Analysen zur Überprüfung der heterologen Expression von GFP und NRTN ausgehend von den neu generierten bicistronischen Expressionsvektoren.	66
Abbildung 11: Fluoreszenzmikroskopie zur Testung zweier verschiedener Transfektionsmethoden in Weri-Rb1 Zellen.....	67
Abbildung 12: Fluoreszenzmikroskopie zur Testung zweier verschiedener Transfektionsmethoden in ARPE-19 Zellen.....	69
Abbildung 13: Aktivierung von ERK1/2 in Weri-Rb1 Zellen nach 18-stündiger Inkubation auf NRTN-haltiger EZM.....	71
Abbildung 14: Differenzierung von Weri-Rb1 Zellen nach Transfektion mit pcDNA4_GFP, pcDNA4_GFP_NRTN:G und pcDNA4_GFP_NRTN:A.....	72
Abbildung 15: Immunoblot nach H ₂ O ₂ induzierter Autophagie an Weri-Rb1 Zellen in Abhängigkeit von NRTN.	74
Abbildung 16: Densitometrische Auswertung von Immunoblots aus drei unabhängigen Autophagie Experimenten an Weri-Rb1.	75
Abbildung 17: Zellviabilität (in %) von Weri-Rb1 Zellen auf NRTN-haltiger EZM ohne und mit H ₂ O ₂ Stress unterschiedlicher Konzentrationen (A-C).....	77

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 18: Effekt von NRTN:G und NRTN:A auf die Genexpression von <i>VEGF</i> (A), <i>CD46</i> (B), <i>p21</i> (C) und <i>cFOS</i> (D) in Weri-Rb1 Zellen inkubiert auf NRTN-haltiger EZM.	79
Abbildung 19: Immunoblot nach H ₂ O ₂ induzierter Autophagie an ARPE-19 Zellen in Abhängigkeit von heterologer NRTN-Expression.	81
Abbildung 20: Densitometrische Auswertung von Immunoblots aus sieben unabhängigen Autophagie Experimenten an heterolog NRTN exprimierenden ARPE-19 Zellen.	82
Abbildung 21: Immunoblot nach H ₂ O ₂ induzierter Autophagie an ARPE-19 Zellen, die auf NRTN-haltiger EZM kultiviert worden waren.	83
Abbildung 22: Densitometrische Auswertung von Immunoblots aus sieben unabhängigen Autophagie Experimenten an ARPE-19 Zellen, welche auf NRTN-haltiger EZM kultiviert worden waren.	84
Abbildung 23: Immunoblot nach H ₂ O ₂ induzierter Autophagie an hiPSC-RPE Zellen, die auf NRTN-haltiger EZM kultiviert worden waren.	86
Abbildung 24: Densitometrische Auswertung von Immunoblots aus drei unabhängigen Autophagie Experimenten an hiPSC-RPE Zellen, welche auf NRTN-haltiger EZM kultiviert worden waren.	87
Abbildung 25: Effekt von NRTN:G und NRTN:A auf die Genexpression von <i>VEGF</i> (A), <i>CD46</i> (B), <i>p21</i> (C) und <i>cFOS</i> (D) in hiPSC-RPE Zellen inkubiert auf NRTN-haltiger EZM.	89

11 Literaturverzeichnis

Adler, R.; Curcio, C.; Hicks, D.; Price, D.; Wong, F. (1999): Cell death in age-related macular degeneration. In: *Molecular vision* 5, S. 31.

Age-Related Eye Disease Study Research Group (AREDS) (2000): Risk factors associated with age-related macular degeneration. A case-control study in the age-related eye disease study: Age-Related Eye Disease Study Report Number 3. In: *Ophthalmology* 107 (12), S. 2224–2232.

Age-Related Eye Disease Study Research Group (AREDS) (2001): A Randomized, Placebo-Controlled, Clinical Trial of High-Dose Supplementation With Vitamins C and E, Beta Carotene, and Zinc for Age-Related Macular Degeneration and Vision Loss: AREDS Report No. 8. In: *Archives of ophthalmology* 119 (10), S. 1417–1436.

Age-Related Eye Disease Study Research Group (AREDS) (2005): Risk Factors for the Incidence of Advanced Age-Related Macular Degeneration in the Age-Related Eye Disease Study (AREDS) AREDS Report No. 19. In: *Ophthalmology* 112 (4), S. 533–539. DOI: 10.1016/j.optha.2004.10.047.

Aiello, L. P.; Avery, R. L.; Arrigg, P. G.; Keyt, B. A.; Jampel, H. D.; Shah, S. T. et al. (1994): Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. In: *The New England journal of medicine* 331 (22), S. 1480–1487. DOI: 10.1056/NEJM199412013312203.

Alfano, Ivan; Vora, Parvez; Mummery, Rosemary S.; Mulloy, Barbara; Rider, Christopher C. (2007): The major determinant of the heparin binding of glial cell-line-derived neurotrophic factor is near the N-terminus and is dispensable for receptor binding. In: *The Biochemical journal* 404 (1), S. 131–140. DOI: 10.1042/BJ20061747.

Ambati, Jayakrishna; Atkinson, John P.; Gelfand, Bradley D. (2013): Immunology of age-related macular degeneration. In: *Nature reviews. Immunology* 13 (6), S. 438–451. DOI: 10.1038/nri3459.

Ambati, Jayakrishna; Fowler, Benjamin J. (2012): Mechanisms of age-related macular degeneration. In: *Neuron* 75 (1), S. 26–39. DOI: 10.1016/j.neuron.2012.06.018.

- Anderson, Don H.; Talaga, Kevin C.; Rivest, Alexander J.; Barron, Ernesto; Hageman, Gregory S.; Johnson, Lincoln V. (2004): Characterization of beta amyloid assemblies in drusen: the deposits associated with aging and age-related macular degeneration. In: *Experimental eye research* 78 (2), S. 243–256.
- Ardeljan, Daniel; Chan, Chi-Chao (2013): Aging is not a disease: distinguishing age-related macular degeneration from aging. In: *Progress in retinal and eye research* 37, S. 68–89. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2013.07.003.
- Arenas, Ernest; Trupp, Miles; Åkerud, Peter; Ibáñez, Carlos F. (1995): GDNF prevents degeneration and promotes the phenotype of brain noradrenergic neurons in vivo. In: *Neuron* 15 (6), S. 1465–1473. DOI: 10.1016/0896-6273(95)90024-1.
- Axelsen, Tobias M.; Woldbye, David P. D. (2018): Gene Therapy for Parkinson's Disease, An Update. In: *Journal of Parkinson's disease* 8 (2), S. 195–215. DOI: 10.3233/JPD-181331.
- Baloh, R. H.; Tansey, M. G.; Golden, J. P.; Creedon, D. J.; Heuckeroth, R. O.; Keck, C. L. et al. (1997): TrnR2, a novel receptor that mediates neurturin and GDNF signaling through Ret. In: *Neuron* 18 (5), S. 793–802.
- Bandello, Francesco; Sacconi, Riccardo; Querques, Lea; Corbelli, Eleonora; Cicinelli, Maria Vittoria; Querques, Giuseppe (2017): Recent advances in the management of dry age-related macular degeneration: A review. In: *F1000Research* 6, S. 245. DOI: 10.12688/f1000research.10664.1.
- Baranov, Petr; Lin, Hong; McCabe, Kathryn; Gale, David; Cai, Shenshen; Lieppman, Burke et al. (2017): A Novel Neuroprotective Small Molecule for Glial Cell Derived Neurotrophic Factor Induction and Photoreceptor Rescue. In: *Journal of ocular pharmacology and therapeutics : the official journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics* 33 (5), S. 412–422. DOI: 10.1089/jop.2016.0121.
- Barnett, M. W. (2002): Signalling by glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) requires heparan sulphate glycosaminoglycan. In: *Journal of Cell Science* 115 (23), S. 4495–4503. DOI: 10.1242/jcs.00114.
- Barron, M. J.; Johnson, M. A.; Andrews, R. M.; Clarke, M. P.; Griffiths, P. G.; Bristow, E. et al. (2001): Mitochondrial abnormalities in ageing macular photoreceptors. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 42 (12), S. 3016–3022.

Literaturverzeichnis

Bespalov, Maxim M.; Sidorova, Yulia A.; Tumova, Sarka; Ahonen-Bishopp, Anni; Magalhães, Ana Cathia; Kulesskiy, Evgeny et al. (2011): Heparan sulfate proteoglycan syndecan-3 is a novel receptor for GDNF, neurturin, and artemin. In: *The Journal of cell biology* 192 (1), S. 153–169. DOI: 10.1083/jcb.201009136.

Bigalke, Janna M.; Aibara, Shintaro; Roth, Robert; Dahl, Göran; Gordon, Euan; Dorbéus, Sarah et al. (2019): Cryo-EM structure of the activated RET signaling complex reveals the importance of its cysteine-rich domain. In: *Science Advances* 5 (7). DOI: 10.1126/sciadv.aau4202.

Bjørkøy, Geir; Lamark, Trond; Pankiv, Serhiy; Øvervatn, Aud; Brech, Andreas; Johansen, Terje (2009): Chapter 12 Monitoring Autophagic Degradation of p62/SQSTM1. In: Daniel J. Klionsky (Hg.): *Autophagy in mammalian systems*. Part B, Bd. 452. San Diego, Calif, London: Academic (Methods in Enzymology, v. 452), S. 181–197.

Blasiak, Janusz; Petrovski, Goran; Veréb, Zoltán; Facskó, Andrea; Kaarniranta, Kai (2014): Oxidative stress, hypoxia, and autophagy in the neovascular processes of age-related macular degeneration. In: *BioMed research international* 2014, S. 768026. DOI: 10.1155/2014/768026.

Bockelbrink, Angelina; Roll, Stephanie; Ruether, Klaus; Rasch, Andrej; Greiner, Wolfgang; Willich, Stefan N. (2008): Cataract Surgery and the Development or Progression of Age-related Macular Degeneration: A Systematic Review. In: *Survey of ophthalmology* 53 (4), S. 359–367. DOI: 10.1016/j.survophthal.2008.04.001.

Borjigin, J.; Nathans, J. (1994): Insertional mutagenesis as a probe of rhodopsin's topography, stability, and activity. In: *The Journal of biological chemistry* 269 (20), S. 14715–14722.

Boyer, Nicholas P.; Tang, Peter H.; Higbee, Daniel; Ablonczy, Zsolt; Crouch, Rosalie K.; Koutalos, Yiannis (2012): Lipofuscin and A2E Accumulate with Age in the Retinal Pigment Epithelium of *Nrl*^{-/-} Mice†. In: *Photochemistry and Photobiology* 88 (6), S. 1373–1377. DOI: 10.1111/j.1751-1097.2012.01127.x.

Brandl, Caroline; Zimmermann, Stephanie J.; Milenkovic, Vladimir M.; Rosendahl, Sibylle M. G.; Grassmann, Felix; Milenkovic, Andrea et al. (2014): In-depth characterisation of Retinal Pigment Epithelium (RPE) cells derived from human

induced pluripotent stem cells (hiPSC). In: *Neuromolecular medicine* 16 (3), S. 551–564. DOI: 10.1007/s12017-014-8308-8.

Brantley, Milam A.; Jain, Sanjay; Barr, Emily E.; Johnson, Eugene M.; Milbrandt, Jeffrey (2008): Neurturin-mediated ret activation is required for retinal function. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28 (16), S. 4123–4135. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0249-08.2008.

Bressler, N. M.; Bressler, S. B.; Fine, S. L. (1988): PII: 0039-6257(88)90052-5. In: *Survey of ophthalmology* (VOLUME 32 I NUMBER 6).

Bressler, Susan B.; Muñoz, Beatriz; Solomon, Sharon D.; West, Sheila K. (2008): Racial Differences in the Prevalence of Age-Related Macular Degeneration: The Salisbury Eye Evaluation (SEE) Project. In: *Arch Ophthalmol* 126 (2), S. 241–245. DOI: 10.1001/archophthalmol.2007.53.

Bryckaert, M.; Guillonneau, X.; Hecquet, C.; Perani, P.; Courtois, Y.; Mascarelli, F. (2000): Regulation of proliferation-survival decisions is controlled by FGF1 secretion in retinal pigmented epithelial cells. In: *Oncogene* 19 (42), S. 4917–4929. DOI: 10.1038/sj.onc.1203872.

Buch, Helena; Vinding, Troels; La Cour, Morten; Jensen, Gorm B.; Prause, Jan U.; Nielsen, Niels V. (2005): Risk factors for age-related maculopathy in a 14-year follow-up study: the Copenhagen City Eye Study. In: *Acta ophthalmologica Scandinavica* 83 (4), S. 409–418. DOI: 10.1111/j.1600-0420.2005.00492.x.

Buj-Bello, Anna; Adu, Jimi; Piñón, Luzia G. P.; Horton, Antony; Thompson, Jane; Rosenthal, Arnon et al. (1997): Neurturin responsiveness requires a GPI-linked receptor and the Ret receptor tyrosine kinase. In: *Nature* 387 (6634), S. 721. DOI: 10.1038/42729.

Buj-Bello, Anna; Buchman, Vladimir L.; Horton, Antony; Rosenthal, Arnon; Davies, Alun M. (1995): GDNF is an age-specific survival factor for sensory and autonomic neurons. In: *Neuron* 15 (4), S. 821–828. DOI: 10.1016/0896-6273(95)90173-6.

Byeon, Suk Ho; Lee, Sung Chul; Choi, Soo Hyun; Lee, Hyung-Keun; Lee, Joon H.; Chu, Young Kwang; Kwon, Oh Woong (2010): Vascular endothelial growth factor as an autocrine survival factor for retinal pigment epithelial cells under oxidative stress

via the VEGF-R2/PI3K/Akt. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 51 (2), S. 1190–1197. DOI: 10.1167/iovs.09-4144.

Cagnol, Sebastien; Chambard, Jean-Claude (2010): ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death--apoptosis, autophagy and senescence. In: *The FEBS journal* 277 (1), S. 2–21. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2009.07366.x.

Carver, Kyle A.; Yang, Dongli (2016): N-Acetylcysteine Amide Protects Against Oxidative Stress–Induced Microparticle Release From Human Retinal Pigment Epithelial Cells. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 57 (2), S. 360–371. DOI: 10.1167/iovs.15-17117.

Casparis, Heather; Lindsley, Kristina; Kuo, Irene C.; Sikder, Shameema; Bressler, Neil M. (2017): Surgery for cataracts in people with age-related macular degeneration. In: *The Cochrane database of systematic reviews* 2, CD006757. DOI: 10.1002/14651858.CD006757.pub4.

Catalá, Angel (2006): An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 38 (9), S. 1482–1495. DOI: 10.1016/j.biocel.2006.02.010.

Chakravarthy, Usha; Evans, Jennifer; Rosenfeld, Philip J. (2010a): Age related macular degeneration. In: *BMJ (Clinical research ed.)* 340, c981. DOI: 10.1136/bmj.c981.

Chakravarthy, Usha; Wong, Tien Y.; Fletcher, Astrid; Pault, Elisabeth; Evans, Christopher; Zlateva, Gergana et al. (2010b): Clinical risk factors for age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. In: *BMC ophthalmology* 10, S. 31. DOI: 10.1186/1471-2415-10-31.

Chen, Wei; Stambolian, Dwight; Edwards, Albert O.; Branham, Kari E.; Othman, Mohammad; Jakobsdottir, Johanna et al. (2010a): Genetic variants near TIMP3 and high-density lipoprotein-associated loci influence susceptibility to age-related macular degeneration. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (16), S. 7401–7406. DOI: 10.1073/pnas.0912702107.

Literaturverzeichnis

- Chen, Yuhong; Bedell, Matthew; Zhang, Kang (2010b): Age-related macular degeneration: genetic and environmental factors of disease. In: *Molecular interventions* 10 (5), S. 271–281. DOI: 10.1124/mi.10.5.4.
- Churchill, Amanda J.; Carter, James G.; Lovell, Helen C.; Ramsden, Conor; Turner, Steven J.; Yeung, Anna et al. (2006): VEGF polymorphisms are associated with neovascular age-related macular degeneration. In: *Human molecular genetics* 15 (19), S. 2955–2961. DOI: 10.1093/hmg/ddl238.
- Clark, David A.; Coker, Robina (1998): Molecules in focus Transforming growth factor-beta (TGF- β). In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 30 (3), S. 293–298. DOI: 10.1016/S1357-2725(97)00128-3.
- Colijn J. M.; MD MSc; Buitendijk Gabriëlle H.S. MD MSc; Prokofyeva Elena MD PhD; Alves Dalila MSc; Cachulo Maria L. MD et al. (2017): Prevalence of Age-Related Macular Degeneration in Europe. In: *American Academy of Ophthalmology*.
- Cong, Rihong; Zhou, Bo; Sun, Qingmin; Gu, Haijuan; Tang, Naping; Wang, Bin (2008): Smoking and the risk of age-related macular degeneration: a meta-analysis. In: *Annals of epidemiology* 18 (8), S. 647–656. DOI: 10.1016/j.annepidem.2008.04.002.
- Cooper, Neil R. (1985): The Classical Complement Pathway: Activation and Regulation of the First Complement Component. In: Frank J. Dixon (Hg.): *Advances in immunology*, Bd. 37. Orlando, San Diego, London: Academic Press (*Advances in Immunology*), S. 151–216.
- Cougnard-Grégoire, Audrey; Delyfer, Marie-Noëlle; Korobelnik, Jean-François; Rougier, Marie-Bénédicte; Le Goff, Mélanie; Dartigues, Jean-François et al. (2014): Elevated high-density lipoprotein cholesterol and age-related macular degeneration: the Alienor study. In: *PloS one* 9 (3), e90973. DOI: 10.1371/journal.pone.0090973.
- Crabb, John W.; Miyagi, Masaru; Gu, Xiaorong; Shadrach, Karen; West, Karen A.; Sakaguchi, Hirokazu et al. (2002): Drusen proteome analysis: An approach to the etiology of age-related macular degeneration. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (23), S. 14682–14687. DOI: 10.1073/pnas.222551899.

Literaturverzeichnis

Creedon, Douglas J.; Tansey, Malú G.; Baloh, Robert H.; Osborne, Patricia A.; Lampe, Patricia A.; Fahrner, Timothy J. et al. (1997): Neurturin shares receptors and signal transduction pathways with glial cell line-derived neurotrophic factor in sympathetic neurons. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (13), S. 7018–7023.

Cruickshanks, Karen J. (1993): Sunlight and Age-Related Macular Degeneration. In: *Arch Ophthalmol* 111 (4), S. 514. DOI: 10.1001/archopht.1993.01090040106042.

Cugati, Sudha; Mitchell, Paul; Rochtchina, Elena; Tan, Ava G.; Smith, Wayne; Wang, Jie Jin (2006): Cataract surgery and the 10-year incidence of age-related maculopathy: the Blue Mountains Eye Study. In: *Ophthalmology* 113 (11), S. 2020–2025. DOI: 10.1016/j.ophtha.2006.05.047.

Curcio, C. A.; Medeiros N. E.; Millican C. L. (1996): Photoreceptor loss in age-related macular degeneration. In: *Investigative ophthalmology & visual science*.

Curcio, Christine A.; Johnson, Mark; Huang, Jiahn-Dar; Rudolf, Martin (2009): Aging, age-related macular degeneration, and the response-to-retention of apolipoprotein B-containing lipoproteins. In: *Progress in retinal and eye research* 28 (6), S. 393–422. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2009.08.001.

Curry, Jennifer M.; Eubank, Tim D.; Roberts, Ryan D.; Wang, Yijie; Pore, Nabendu; Maity, Amit; Marsh, Clay B. (2008): M-CSF Signals through the MAPK/ERK Pathway via Sp1 to Induce VEGF Production and Induces Angiogenesis In Vivo. In: *PLOS ONE* 3 (10), e3405. DOI: 10.1371/journal.pone.0003405.

Darzins, Peteris; Mitchell, Paul; Heller, Richard F. (1997): Sun Exposure and Age-related Macular Degeneration: An Australian Case—Control Study. In: *Ophthalmology* 104 (5), S. 770–776. DOI: 10.1016/S0161-6420(97)30235-8.

Datta, Sayantan; Cano, Marisol; Ebrahimi, Katayoon; Wang, Lei; Handa, James T. (2017): The impact of oxidative stress and inflammation on RPE degeneration in non-neovascular AMD. In: *Progress in retinal and eye research* 60, S. 201–218. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2017.03.002.

Davies, J. A.; Yates, E. A.; Turnbull, J. E. (2003): Structural Determinants of Heparan Sulphate Modulation of GDNF Signalling. In: *Growth Factors* 21 (3-4), S. 109–119. DOI: 10.1080/08977190310001621005.

Literaturverzeichnis

- DeAngelis, Margaret M.; Owen, Leah A.; Morrison, Margaux A.; Morgan, Denise J.; Li, Mingyao; Shakoor, Akbar et al. (2017): Genetics of age-related macular degeneration (AMD). In: *Human molecular genetics* 26 (R1), R45-R50. DOI: 10.1093/hmg/ddx228.
- Delcourt, C.; Diaz, J. L.; Ponton-Sanchez, A.; Papoz, L. (1998): Smoking and age-related macular degeneration. The POLA Study. *Pathologies Oculaires Liées à l'Age*. In: *Archives of ophthalmology* 116 (8), S. 1031–1035.
- Delcourt, Cécile (2001): Light Exposure and the Risk of Age-Related Macular Degeneration. In: *Arch Ophthalmol* 119 (10), S. 1463. DOI: 10.1001/archophth.119.10.1463.
- Delcourt, Cécile; Korobelnik, Jean-François; Buitendijk, Gabriëlle H. S.; Foster, Paul J.; Hammond, Christopher J.; Piermarocchi, Stefano et al. (2016): Ophthalmic epidemiology in Europe: the "European Eye Epidemiology" (E3) consortium. In: *European journal of epidemiology* 31 (2), S. 197–210. DOI: 10.1007/s10654-015-0098-2.
- Delori, F. C.; Goger, D. G.; Dorey, C. K. (2001): Age-related accumulation and spatial distribution of lipofuscin in RPE of normal subjects. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 42 (8), S. 1855–1866.
- DiLoreto, Race; Murphy, Coleen T. (2015): The cell biology of aging. In: *Molecular biology of the cell* 26 (25), S. 4524–4531. DOI: 10.1091/mbc.E14-06-1084.
- Ding, Xiaoyan; Patel, Mrinali; Chan, Chi-Chao (2009): Molecular pathology of age-related macular degeneration. In: *Progress in retinal and eye research* 28 (1), S. 1–18. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2008.10.001.
- Domanskyi, Andrii; Saarma, Mart; Airavaara, Mikko (2015): Prospects of Neurotrophic Factors for Parkinson's Disease: Comparison of Protein and Gene Therapy. In: *Human gene therapy* 26 (8), S. 550–559. DOI: 10.1089/hum.2015.065.
- Dridi, Sami; Hirano, Yoshio; Tarallo, Valeria; Kim, Younghee; Fowler, Benjamin J.; Ambati, Balamurali K. et al. (2012): ERK1/2 activation is a therapeutic target in age-related macular degeneration. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (34), S. 13781–13786. DOI: 10.1073/pnas.1206494109.

Literaturverzeichnis

Du, Hongjun; Sun, Xufang; Guma, Monica; Luo, Jing; Ouyang, Hong; Zhang, Xiaohui et al. (2013): JNK inhibition reduces apoptosis and neovascularization in a murine model of age-related macular degeneration. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (6), S. 2377–2382. DOI: 10.1073/pnas.1221729110.

Dunkelberger, Jason R.; Song, Wen-Chao (2010): Complement and its role in innate and adaptive immune responses. In: *Cell Research* 20 (1), S. 34. DOI: 10.1038/cr.2009.139.

Dunn, K. C.; Aotaki-Keen, A. E.; Putkey, F. R.; Hjelmeland, L. M. (1996): ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. In: *Experimental eye research* 62 (2), S. 155–169. DOI: 10.1006/exer.1996.0020.

Durbec, P.; Marcos-Gutierrez, C. V.; Kilkenny, C.; Grigoriou, M.; Wartiovaara, K.; Suvanto, P. et al. (1996): GDNF signalling through the Ret receptor tyrosine kinase. In: *Nature* 381 (6585), S. 789–793. DOI: 10.1038/381789a0.

Ebrahimi, Katayoon B.; Fijalkowski, Natalia; Cano, Marisol; Handa, James T. (2013): Decreased Membrane Complement Regulators in the RPE Contributes to AMD. In: *The Journal of pathology* 229 (5). DOI: 10.1002/path.4128.

Edwards, Albert O.; Ritter, Robert; Abel, Kenneth J.; Manning, Alisa; Panhuysen, Carolien; Farrer, Lindsay A. (2005): Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. In: *Science (New York, N.Y.)* 308 (5720), S. 421–424. DOI: 10.1126/science.1110189.

Ehmann, David S.; Ho, Allen C. (2017): Cataract surgery and age-related macular degeneration. In: *Current opinion in ophthalmology* 28 (1), S. 58–62. DOI: 10.1097/ICU.0000000000000331.

Estus, S. (1994): Altered gene expression in neurons during programmed cell death: identification of c-jun as necessary for neuronal apoptosis. In: *The Journal of cell biology* 127 (6), S. 1717–1727. DOI: 10.1083/jcb.127.6.1717.

Evans, J. R. (2001): Risk factors for age-related macular degeneration. In: *Progress in retinal and eye research* 20 (2), S. 227–253.

Literaturverzeichnis

Evans, Jennifer R.; Lawrenson, John G. (2017a): Antioxidant vitamin and mineral supplements for preventing age-related macular degeneration. In: *The Cochrane database of systematic reviews* 7, CD000253. DOI: 10.1002/14651858.CD000253.pub4.

Evans, Jennifer R.; Lawrenson, John G. (2017b): Antioxidant vitamin and mineral supplements for slowing the progression of age-related macular degeneration. In: *The Cochrane database of systematic reviews* 7, CD000254. DOI: 10.1002/14651858.CD000254.pub4.

Fagerness, Jesen A.; Maller, Julian B.; Neale, Benjamin M.; Reynolds, Robyn C.; Daly, Mark J.; Seddon, Johanna M. (2009): Variation near complement factor I is associated with risk of advanced AMD. In: *European journal of human genetics* : *EJHG* 17 (1), S. 100–104. DOI: 10.1038/ejhg.2008.140.

Fernandez-Godino, Rosario; Bujakowska, Kinga M.; Pierce, Eric A. (2018): Changes in extracellular matrix cause RPE cells to make basal deposits and activate the alternative complement pathway. In: *Human molecular genetics* 27 (1), S. 147–159. DOI: 10.1093/hmg/ddx392.

Fjord-Larsen, Lone; Johansen, Jens Leander; Kusk, Philip; Tornøe, Jens; Grønberg, Mette; Rosenblad, Carl; Wahlberg, Lars U. (2005): Efficient in vivo protection of nigral dopaminergic neurons by lentiviral gene transfer of a modified Neurturin construct. In: *Experimental neurology* 195 (1), S. 49–60. DOI: 10.1016/j.expneurol.2005.03.006.

Frank, R. N.; Puklin, J. E.; Stock, C.; Canter, L. A. (2000): Race, iris color, and age-related macular degeneration. In: *Transactions of the American Ophthalmological Society* 98, 109-15; discussion 115-7.

Frederick, Paul A.; Kleinman, Mark E. (2014): The Immune System and AMD. In: *Current ophthalmology reports* 2 (1), S. 14–19. DOI: 10.1007/s40135-013-0037-x.

Friedman, D. S.; Katz, J.; Bressler, N. M.; Rahmani, B.; Tielsch, J. M. (1999): Racial differences in the prevalence of age-related macular degeneration: the Baltimore Eye Survey. In: *Ophthalmology* 106 (6), S. 1049–1055. DOI: 10.1016/S0161-6420(99)90267-1.

Fritsche, Lars G.; Freitag-Wolf, Sandra; Bettecken, Thomas; Meitinger, Thomas; Keilhauer, Claudia N.; Krawczak, Michael; Weber, Bernhard H. F. (2009): Age-

related macular degeneration and functional promoter and coding variants of the apolipoprotein E gene. In: *Human mutation* 30 (7), S. 1048–1053. DOI: 10.1002/humu.20957.

Fritsche, Lars G.; Igl, Wilmar; Bailey, Jessica N. Cooke; Grassmann, Felix; Sengupta, Sebanti; Bragg-Gresham, Jennifer L. et al. (2016): A large genome-wide association study of age-related macular degeneration highlights contributions of rare and common variants. In: *Nature genetics* 48 (2), S. 134–143. DOI: 10.1038/ng.3448.

Fritsche, Lars G.; Loenhardt, Thomas; Janssen, Andreas; Fisher, Sheila A.; Rivera, Andrea; Keilhauer, Claudia N.; Weber, Bernhard H. F. (2008): Age-related macular degeneration is associated with an unstable *ARMS2 (LOC387715)* mRNA. In: *Nature genetics* 40 (7), S. 892. DOI: 10.1038/ng.170.

Garcia, Thelma Y.; Gutierrez, Mark; Reynolds, Joseph; Lamba, Deepak A. (2015): Modeling the Dynamic AMD-Associated Chronic Oxidative Stress Changes in Human ESC and iPSC-Derived RPE Cells. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 56 (12), S. 7480–7488. DOI: 10.1167/iovs.15-17251.

Geerlings, Maartje J.; Jong, Eiko K. de; den Hollander, Anneke I. (2017): The complement system in age-related macular degeneration: A review of rare genetic variants and implications for personalized treatment. In: *Molecular immunology* 84, S. 65–76. DOI: 10.1016/j.molimm.2016.11.016.

Glotin, Anne-Lise; Calipel, Armelle; Brossas, Jean-Yves; Faussat, Anne-Marie; Tréton, Jacques; Mascarelli, Frédéric (2006): Sustained versus transient ERK1/2 signaling underlies the anti- and proapoptotic effects of oxidative stress in human RPE cells. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 47 (10), S. 4614–4623. DOI: 10.1167/iovs.06-0297.

Gold, Bert; Merriam, Joanna E.; Zernant, Jana; Hancox, Lisa S.; Taiber, Andrew J.; Gehrs, Karen et al. (2006): Variation in factor B (BF) and complement component 2 (C2) genes is associated with age-related macular degeneration. In: *Nature genetics* 38 (4), S. 458–462. DOI: 10.1038/ng1750.

Golden, J. P.; Baloh, R. H.; Kotzbauer, P. T.; Lampe, P. A.; Osborne, P. A.; Milbrandt, J.; Johnson, E. M. (1998): Expression of neurturin, GDNF, and their

receptors in the adult mouse CNS. In: *The Journal of comparative neurology* 398 (1), S. 139–150.

Golden, J. P.; DeMaro, J. A.; Osborne, P. A.; Milbrandt, J.; Johnson, E. M. (1999): Expression of neurturin, GDNF, and GDNF family-receptor mRNA in the developing and mature mouse. In: *Experimental neurology* 158 (2), S. 504–528. DOI: 10.1006/exnr.1999.7127.

Golestaneh, Nady; Chu, Yi; Xiao, Yang-Yu; Stoleru, Gianna L.; Theos, Alexander C. (2017): Dysfunctional autophagy in RPE, a contributing factor in age-related macular degeneration. In: *Cell death & disease* 8 (1), e2537. DOI: 10.1038/cddis.2016.453.

Gragoudas, Evangelos S.; Adamis, Anthony P.; Cunningham, Emmett T.; Feinsod, Matthew; Guyer, David R. (2004): Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. In: *The New England journal of medicine* 351 (27), S. 2805–2816. DOI: 10.1056/NEJMoa042760.

Gray, A.; Mason, A. (1990): Requirement for activin A and transforming growth factor--beta 1 pro-regions in homodimer assembly. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 247 (4948), S. 1328–1330. DOI: 10.1126/science.2315700.

Grune, Tilman; Merker, Katrin; Jung, Tobias; Sitte, Nicolle; Davies, Kelvin J. A. (2005): Protein oxidation and degradation during postmitotic senescence. In: *Free radical biology & medicine* 39 (9), S. 1208–1215. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.06.009.

Guillonneau, Xavier; Bryckaert, Marijke; Launay-Longo, Catherine; Courtois, Yves; Mascarelli, Frédéric (1998): Endogenous FGF1-induced Activation and Synthesis of Extracellular Signal-regulated Kinase 2 Reduce Cell Apoptosis in Retinal-pigmented Epithelial Cells. In: *J. Biol. Chem.* 273 (35), S. 22367–22373. DOI: 10.1074/jbc.273.35.22367.

Guo, Xian Jun; Tian, Xue Song; Ruan, Zhi; Chen, Yu Ting; Wu, Lei; Gong, Qi et al. (2014): Dysregulation of neurotrophic and inflammatory systems accompanied by decreased CREB signaling in ischemic rat retina. In: *Experimental eye research* 125, S. 156–163. DOI: 10.1016/j.exer.2014.06.003.

Hageman, G. S.; Mullins, R. F. (1999): Molecular composition of drusen as related to substructural phenotype. In: *Molecular vision*.

Literaturverzeichnis

Hageman, G. S.; Mullins, R. F.; Russell, S. R.; Johnson, L. V.; Anderson, D. H. (1999): Vitronectin is a constituent of ocular drusen and the vitronectin gene is expressed in human retinal pigmented epithelial cells. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 13 (3), S. 477–484.

Hageman, Gregory S.; Anderson, Don H.; Johnson, Lincoln V.; Hancox, Lisa S.; Taiber, Andrew J.; Hardisty, Lisa I. et al. (2005): A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (20), S. 7227–7232. DOI: 10.1073/pnas.0501536102.

Haines, Jonathan L.; Hauser, Michael A.; Schmidt, Silke; Scott, William K.; Olson, Lana M.; Gallins, Paul et al. (2005): Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. In: *Science (New York, N.Y.)* 308 (5720), S. 419–421. DOI: 10.1126/science.11110359.

Hamilton, J. F.; Morrison, P. F.; Chen, M. Y.; Harvey-White, J.; Pernaute, R. S.; Phillips, H. et al. (2001): Heparin coinfusion during convection-enhanced delivery (CED) increases the distribution of the glial-derived neurotrophic factor (GDNF) ligand family in rat striatum and enhances the pharmacological activity of neurturin. In: *Experimental neurology* 168 (1), S. 155–161. DOI: 10.1006/exnr.2000.7571.

Harada, C.; Harada, T.; Quah, H.-M.A; Maekawa, F.; Yoshida, K.; Ohno, S. et al. (2003): Potential role of glial cell line-derived neurotrophic factor receptors in Müller glial cells during light-induced retinal degeneration. In: *Neuroscience* 122 (1), S. 229–235. DOI: 10.1016/S0306-4522(03)00599-2.

Harman, D. (1981): The aging process. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78 (11), S. 7124–7128.

Hazzalin, Catherine A.; Mahadevan, Louis C. (2002): MAPK-regulated transcription: a continuously variable gene switch? In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 3 (1), S. 30–40. DOI: 10.1038/nrm715.

Heier, Jeffrey S.; Brown, David M.; Chong, Victor; Korobelnik, Jean-Francois; Kaiser, Peter K.; Nguyen, Quan Dong et al. (2012): Intravitreal aflibercept (VEGF trap-eye) in

wet age-related macular degeneration. In: *Ophthalmology* 119 (12), S. 2537–2548. DOI: 10.1016/j.ophtha.2012.09.006.

Helgason, Hannes; Sulem, Patrick; Duvvari, Maheswara R.; Luo, Hongrong; Thorleifsson, Gudmar; Stefansson, Hreinn et al. (2013): A rare nonsynonymous sequence variant in C3 is associated with high risk of age-related macular degeneration. In: *Nature genetics* 45 (11), S. 1371–1374. DOI: 10.1038/ng.2740.

Hellewell, Andrew L.; Rosini, Silvia; Adams, Josephine C. (2017): A Rapid, Scalable Method for the Isolation, Functional Study, and Analysis of Cell-derived Extracellular Matrix. In: *Journal of visualized experiments : JoVE* (119). DOI: 10.3791/55051.

Hinck, Andrew P.; Mueller, Thomas D.; Springer, Timothy A. (2016): Structural Biology and Evolution of the TGF- β Family. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 8 (12). DOI: 10.1101/cshperspect.a022103.

Hirooka, Kazuyuki; Bertolesi, Gabriel E.; Kelly, Melanie E. M.; Denovan-Wright, Eileen M.; Sun, Xiaolu; Hamid, Jawed et al. (2002): T-Type calcium channel α 1G and α 1H subunits in human retinoblastoma cells and their loss after differentiation. In: *Journal of neurophysiology* 88 (1), S. 196–205. DOI: 10.1152/jn.2002.88.1.196.

Hishiki, T.; Nimura, Y.; Isogai, E.; Kondo, K.; Ichimiya, S.; Nakamura, Y. et al. (1998): Glial cell line-derived neurotrophic factor/neurturin-induced differentiation and its enhancement by retinoic acid in primary human neuroblastomas expressing c-Ret, GFR α -1, and GFR α -2. In: *Cancer research* 58 (10), S. 2158–2165.

Ho, T-C; Yang, Y-C; Cheng, H-C; Wu, A-C; Chen, S-L; Chen, H-K; Tsao, Y-P (2006): Activation of mitogen-activated protein kinases is essential for hydrogen peroxide - induced apoptosis in retinal pigment epithelial cells. In: *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 11 (11), S. 1899–1908. DOI: 10.1007/s10495-006-9403-6.

Höhn, Annika; König, Jeannette; Grune, Tilman (2013): Protein oxidation in aging and the removal of oxidized proteins. In: *Journal of proteomics* 92, S. 132–159. DOI: 10.1016/j.jprot.2013.01.004.

Holz, Frank G.; Strauss, Erich C.; Schmitz-Valckenberg, Steffen; van Lookeren Campagne, Menno (2014): Geographic atrophy: clinical features and potential

therapeutic approaches. In: *Ophthalmology* 121 (5), S. 1079–1091. DOI: 10.1016/j.ophtha.2013.11.023.

Hoover, Jeffrey L.; Bond, Cherie E.; Hoover, Donald B.; Defoe, Dennis M. (2014): Effect of neurturin deficiency on cholinergic and catecholaminergic innervation of the murine eye. In: *Experimental eye research* 122, S. 32–39. DOI: 10.1016/j.exer.2014.03.002.

Jakobsdottir, Johanna; Conley, Yvette P.; Weeks, Daniel E.; Mah, Tammy S.; Ferrell, Robert E.; Gorin, Michael B. (2005): Susceptibility genes for age-related maculopathy on chromosome 10q26. In: *American journal of human genetics* 77 (3), S. 389–407. DOI: 10.1086/444437.

Jampol, L. M.; Tielsch, J. (1992): Race, macular degeneration, and the Macular Photocoagulation Study. In: *Arch Ophthalmol* 110 (12), S. 1699–1700.

Janik-Papis, Katarzyna; Zaras, Malgorzata; Krzyzanowska, Anna; Wozniak, Katarzyna; Blasiak, Janusz; Szaflik, Jerzy; Szaflik, Jacek P. (2009): Association between vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and age-related macular degeneration in a Polish population. In: *Experimental and molecular pathology* 87 (3), S. 234–238. DOI: 10.1016/j.yexmp.2009.09.005.

Johnson, Elizabeth J. (2005): Obesity, lutein metabolism, and age-related macular degeneration: a web of connections. In: *Nutrition reviews* 63 (1), S. 9–15. DOI: 10.1111/j.1753-4887.2005.tb00105.x.

Johnson, L. V.; Leitner, W. P.; Staples, M. K.; Anderson, D. H. (2001): Complement activation and inflammatory processes in Drusen formation and age related macular degeneration. In: *Experimental eye research* 73 (6), S. 887–896. DOI: 10.1006/exer.2001.1094.

Jomary, C.; Thomas, M.; Grist, J.; Milbrandt, J.; Neal, M. J.; Jones, S. E. (1999): Expression patterns of neurturin and its receptor components in developing and degenerative mouse retina. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 40 (3), S. 568–574.

Jong, Paulus T. V. M. de (2006): Age-related macular degeneration. In: *The New England journal of medicine* 355 (14), S. 1474–1485. DOI: 10.1056/NEJMra062326.

Literaturverzeichnis

Kaarniranta, Kai; Tokarz, Paulina; Koskela, Ali; Paterno, Jussi; Blasiak, Janusz (2017): Autophagy regulates death of retinal pigment epithelium cells in age-related macular degeneration. In: *Cell biology and toxicology* 33 (2), S. 113–128. DOI: 10.1007/s10565-016-9371-8.

Kauppinen, Anu; Paterno, Jussi J.; Blasiak, Janusz; Salminen, Antero; Kaarniranta, Kai (2016): Inflammation and its role in age-related macular degeneration. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 73 (9), S. 1765–1786. DOI: 10.1007/s00018-016-2147-8.

Kaur, Inderjeet; Rathi, Sonika; Chakrabarti, Subhabrata (2010): Variations in TIMP3 are associated with age-related macular degeneration. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (28), E112-3. DOI: 10.1073/pnas.1007476107.

Keaney, John F.; Larson, Martin G.; Vasan, Ramachandran S.; Wilson, Peter W. F.; Lipinska, Izabella; Corey, Diane et al. (2003): Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 23 (3), S. 434–439. DOI: 10.1161/01.ATV.0000058402.34138.11.

Kenney, M. Cristina; Atilano, Shari R.; Boyer, David; Chwa, Marilyn; Chak, Garrick; Chinichian, Sahmon et al. (2010): Characterization of retinal and blood mitochondrial DNA from age-related macular degeneration patients. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 51 (8), S. 4289–4297. DOI: 10.1167/iovs.09-4778.

Khan, J. C.; Shahid, H.; Thurlby, D. A.; Bradley, M.; Clayton, D. G.; Moore, A. T. et al. (2006): Age related macular degeneration and sun exposure, iris colour, and skin sensitivity to sunlight. In: *British Journal of Ophthalmology* 90 (1), S. 29–32. DOI: 10.1136/bjo.2005.073825.

Kiffin, Roberta; Bandyopadhyay, Urmi; Cuervo, Ana Maria (2006): Oxidative stress and autophagy. In: *Antioxidants & redox signaling* 8 (1-2), S. 152–162. DOI: 10.1089/ars.2006.8.152.

Kim, Mihwa; Jung, Ji-Yeon; Choi, Seungho; Lee, Hyunseung; Morales, Liza D.; Koh, Jeong-Tae et al. (2017): GFRA1 promotes cisplatin-induced chemoresistance in

osteosarcoma by inducing autophagy. In: *Autophagy* 13 (1), S. 149–168. DOI: 10.1080/15548627.2016.1239676.

Kingsley, D. M. (1994): The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. In: *Genes & development* 8 (2), S. 133–146.

Kishan, Amar U.; Modjtahedi, Bobeck S.; Martins, Elisabeth N.; Modjtahedi, Sara P.; Morse, Lawrence S. (2011): Lipids and age-related macular degeneration. In: *Survey of ophthalmology* 56 (3), S. 195–213. DOI: 10.1016/j.survophthal.2010.08.008.

Kivinen, Niko (2018): The role of autophagy in age-related macular degeneration (AMD) - studies into the pathogenesis of AMD. In: *Acta ophthalmologica* 96 (5), S. 531–532. DOI: 10.1111/aos.13772.

Klein, Robert D.; Sherman, Daniel; Wei-Hsien Ho, Donna Stone, Gregory L. Bennett, Barbara Moffat, Richard Vandlen, Laura Simmons, Qimin Gu, Jo-Anne Hongo, Brigitte Devaux, Kris Poulsen, Mark Armanini, Chika Nozaki, Naoya Asai, Audrey Goddard, Heidi Phillips, Chris E. Henderson, Masahide Takahashi & Arnon Rosenthal (1997): A GPI-linked protein that interacts with Ret to form a candidate neurturin receptor. In: *Nature*.

Klein, Robert J.; Zeiss, Caroline; Chew, Emily Y.; Tsai, Jen-Yue; Sackler, Richard S.; Haynes, Chad et al. (2005): Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. In: *Science (New York, N. Y.)* 308 (5720), S. 385–389. DOI: 10.1126/science.1109557.

Klein, Ronald; Klein, Barbara E. K.; Knudtson, Michael D.; Meuer, Stacy M.; Swift, Maria; Gangnon, Ronald E. (2007): Fifteen-year cumulative incidence of age-related macular degeneration: the Beaver Dam Eye Study. In: *Ophthalmology* 114 (2), S. 253–262. DOI: 10.1016/j.ophtha.2006.10.040.

Klein, Ronald; Klein, Barbara E. K.; Knudtson, Michael D.; Wong, Tien Yin; Cotch, Mary Frances; Liu, Kiang et al. (2006): Prevalence of age-related macular degeneration in 4 racial/ethnic groups in the multi-ethnic study of atherosclerosis. In: *Ophthalmology* 113 (3), S. 373–380. DOI: 10.1016/j.ophtha.2005.12.013.

Klein, Ronald; Klein, Barbara E. K.; Wong, Tien Y.; Tomany, Sandra C.; Cruickshanks, Karen J. (2002): The association of cataract and cataract surgery with

the long-term incidence of age-related maculopathy: the Beaver Dam eye study. In: *Arch Ophthalmol* 120 (11), S. 1551–1558.

Klein, Ronald; Klein, Barbara E.K; Tomany, Sandra C.; Cruickshanks, Karen J. (2003): The association of cardiovascular disease with the long-term incidence of age-related maculopathy. In: *Ophthalmology* 110 (6), S. 1273–1280. DOI: 10.1016/S0161-6420(03)00599-2.

Klöcker, Nikolaj 1.; Bräunling, Frank 1.; Isenmann, Stefan 1.; Bähr, Mathias 1,2 (1997): In vivo neurotrophic effects of GDNF on axotomized retinal ganglion cells. In: *NeuroReport*.

Koeberle, Paulo D.; Ball, Alexander K. (1998): Effects of GDNF on retinal ganglion cell survival following axotomy. In: *Vision Research* 38 (10), S. 1505–1515. DOI: 10.1016/S0042-6989(97)00364-7.

Koeberle, Paulo D.; Ball, Alexander K. (2002): Neurturin enhances the survival of axotomized retinal ganglion cells in vivo: combined effects with glial cell line-derived neurotrophic factor and brain-derived neurotrophic factor. In: *Neuroscience* 110 (3), S. 555–567. DOI: 10.1016/S0306-4522(01)00557-7.

Kotzbauer, P. T.; Lampe, P. A.; Heuckeroth, R. O.; Golden, J. P.; Creedon, D. J.; Johnson, E. M.; Milbrandt, J. (1996): Neurturin, a relative of glial-cell-line-derived neurotrophic factor. In: *Nature* 384 (6608), S. 467–470. DOI: 10.1038/384467a0.

Kumar, Matam Vijay; Nagineni, Chandrasekharam N.; Chin, Marian S.; Hooks, John J.; Detrick, Barbara (2004): Innate immunity in the retina: Toll-like receptor (TLR) signaling in human retinal pigment epithelial cells. In: *Journal of neuroimmunology* 153 (1-2), S. 7–15. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2004.04.018.

Kyosseva, Svetlana V. (2016): Targeting MAPK Signaling in Age-Related Macular Degeneration. In: *Ophthalmology and eye diseases* 8, S. 23–30. DOI: 10.4137/OED.S32200.

Lambert, Nathan G.; ElShelmani, Hanan; Singh, Malkit K.; Mansergh, Fiona C.; Wride, Michael A.; Padilla, Maximilian et al. (2016): Risk factors and biomarkers of age-related macular degeneration. In: *Progress in retinal and eye research* 54, S. 64–102. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2016.04.003.

Lambris, John D.; Adamis, Anthony P.; Sparrow, Janet R. (Hg.) (2010): Bisretinoids of RPE Lipofuscin: Trigger for Complement Activation in Age-Related Macular Degeneration. *Inflammation and Retinal Disease: Complement Biology and Pathology*. New York, NY: Springer New York.

Lawrenson, John G.; Evans, Jennifer R. (2013): Advice about diet and smoking for people with or at risk of age-related macular degeneration: a cross-sectional survey of eye care professionals in the UK. *In: BMC public health* 13, S. 564. DOI: 10.1186/1471-2458-13-564.

Lee, M. K.; Lander, A. d. (1991): Analysis of affinity and structural selectivity in the binding of proteins to glycosaminoglycans: development of a sensitive electrophoretic approach. *In: Proceedings of the National Academy of Sciences* 88 (7), S. 2768–2772. DOI: 10.1073/pnas.88.7.2768.

Lim, Laurence S.; Mitchell, Paul; Seddon, Johanna M.; Holz, Frank G.; Wong, Tien Y. (2012): Age-related macular degeneration. *In: Lancet (London, England)* 379 (9827), S. 1728–1738. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)60282-7.

Lin, Jane-Ming; Wan, Lei; Tsai, Yi-Yu; Lin, Hui-Ju; Tsai, Yushin; Lee, Cheng-Chun et al. (2008): Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms in age-related macular degeneration. *In: American journal of ophthalmology* 145 (6), S. 1045–1051. DOI: 10.1016/j.ajo.2008.01.027.

Lin, L.; Doherty, D.; Lile, J.; Bektesh, S.; Collins, F. (1993): GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *In: Proceedings of the National Academy of Sciences* 260 (5111), S. 1130–1132. DOI: 10.1126/science.8493557.

Lindholm, Dan; Mäkelä, Johanna; Di Liberto, Valentina; Mudò, Giuseppa; Belluardo, Natale; Eriksson, Ove; Saarma, Mart (2016): Current disease modifying approaches to treat Parkinson's disease. *In: Cellular and molecular life sciences : CMLS* 73 (7), S. 1365–1379. DOI: 10.1007/s00018-015-2101-1.

Liu, Shumei; Yang, Pengyuan; Kang, Hui; Lu, Ling; Zhang, Yuefan; Pan, Jingwei; Rui, Yao-Cheng (2010): NDRG2 induced by oxidized LDL in macrophages antagonizes growth factor productions via selectively inhibiting ERK activation. *In:*

Literaturverzeichnis

Biochimica et biophysica acta 1801 (2), S. 106–113. DOI:
10.1016/j.bbalip.2009.09.022.

Liu, Y.; Guyton, K. Z.; Gorospe, M.; Xu, Q.; Lee, J. C.; Holbrook, N. J. (1996): Differential activation of ERK, JNK/SAPK and P38/CSBP/RK map kinase family members during the cellular response to arsenite. In: *Free radical biology & medicine* 21 (6), S. 771–781.

Liu, Ying; Hu, Huiling; Liang, Meixin; Xiong, Yunfan; Li, Kang; Chen, Mengfei et al. (2017): Regulated differentiation of WERI-Rb-1 cells into retinal neuron-like cells. In: *International journal of molecular medicine* 40 (4), S. 1172–1184. DOI:
10.3892/ijmm.2017.3102.

Ma, Wenxin; Zhao, Lian; Fontainhas, Aurora M.; Fariss, Robert N.; Wong, Wai T. (2009): Microglia in the mouse retina alter the structure and function of retinal pigmented epithelial cells: a potential cellular interaction relevant to AMD. In: *PloS one* 4 (11), e7945. DOI: 10.1371/journal.pone.0007945.

Machiela, Mitchell J.; Chanock, Stephen J. (2015): LDlink: a web-based application for exploring population-specific haplotype structure and linking correlated alleles of possible functional variants. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 31 (21), S. 3555–3557. DOI: 10.1093/bioinformatics/btv402.

Maller, Julian B.; Fagerness, Jesen A.; Reynolds, Robyn C.; Neale, Benjamin M.; Daly, Mark J.; Seddon, Johanna M. (2007): Variation in complement factor 3 is associated with risk of age-related macular degeneration. In: *Nature genetics* 39 (10), S. 1200–1201. DOI: 10.1038/ng2131.

Marazita, Mariela C.; Dugour, Andrea; Marquioni-Ramella, Melisa D.; Figueroa, Juan M.; Suburo, Angela M. (2016): Oxidative stress-induced premature senescence dysregulates VEGF and CFH expression in retinal pigment epithelial cells: Implications for Age-related Macular Degeneration. In: *Redox biology* 7, S. 78–87. DOI: 10.1016/j.redox.2015.11.011.

Marks, W. J.; Bartus, Raymond T.; Siffert, Joao; Davis, Charles S.; Lozano, Andres; Boulis, Nicholas et al. (2010): Gene delivery of AAV2-neurturin for Parkinson's disease: a double-blind, randomised, controlled trial. In: *The Lancet Neurology* 9 (12), S. 1164–1172. DOI: 10.1016/S1474-4422(10)70254-4.

Literaturverzeichnis

Massagué, J. (1990): The transforming growth factor-beta family. In: *Annual review of cell biology* 6, S. 597–641. DOI: 10.1146/annurev.cb.06.110190.003121.

McFall, R. C.; Sery, T. W.; Makadon, M. (1977): Characterization of a new continuous cell line derived from a human retinoblastoma. In: *Cancer research* 37 (4), S. 1003–1010.

McKay, Gareth J.; Patterson, Chris C.; Chakravarthy, Usha; Dasari, Shilpa; Klaver, Caroline C.; Vingerling, Johannes R. et al. (2011): Evidence of association of APOE with age-related macular degeneration: a pooled analysis of 15 studies. In: *Human mutation* 32 (12), S. 1407–1416. DOI: 10.1002/humu.21577.

Meyers, Emily A.; Kessler, John A. (2017): TGF- β Family Signaling in Neural and Neuronal Differentiation, Development, and Function. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 9 (8). DOI: 10.1101/cshperspect.a022244.

Miguel, O.; Campos, N. de; Meyer-Rochow, V. B.; Allodi, S. (2003): A structural study of the retinal photoreceptor, plexiform and ganglion cell layers following exposure to UV-B and UV-C radiation in the albino rat. In: *Micron* 34 (8), S. 395–404. DOI: 10.1016/S0968-4328(03)00081-7.

Mitter, Sayak K.; Rao, Haripriya Vittal; Qi, Xiaoping; Cai, Jun; Sugrue, Andrew; Dunn, William A. et al. (2012): Autophagy in the retina: a potential role in age-related macular degeneration. In: *Advances in experimental medicine and biology* 723, S. 83–90. DOI: 10.1007/978-1-4614-0631-0_12.

Mitter, Sayak K.; Song, Chunjuan; Qi, Xiaoping; Mao, Haoyu; Rao, Haripriya; Akin, Debra et al. (2014): Dysregulated autophagy in the RPE is associated with increased susceptibility to oxidative stress and AMD. In: *Autophagy* 10 (11), S. 1989–2005. DOI: 10.4161/auto.36184.

Moschos, Marilita M.; Laios, Konstantinos; Androudi, Sofia; Ladas, Dimitrios S.; Chatziralli, Irini P. (2018): Anti-platelet effects of vitamin supplements in age-related macular degeneration: an in vitro study. In: *Cutaneous and ocular toxicology* 37 (3), S. 207–209. DOI: 10.1080/15569527.2017.1409754.

Mosmann, Tim (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. In: *Journal of Immunological Methods* 65 (1-2), S. 55–63. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.

Literaturverzeichnis

Mount, H. T.; Dean, D. O.; Alberch, J.; Dreyfus, C. F.; Black, I. B. (1995): Glial cell line-derived neurotrophic factor promotes the survival and morphologic differentiation of Purkinje cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 (20), S. 9092–9096. DOI: 10.1073/pnas.92.20.9092.

Mousa, Shaker A.; Mousa, Shaymaa S. (2010): Current status of vascular endothelial growth factor inhibition in age-related macular degeneration. In: *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy* 24 (3), S. 183–194. DOI: 10.2165/11318550-000000000-00000.

Müller-Eberhard, Hans J. (1988): MOLECULAR ORGANIZATION AND FUNCTION OF THE COMPLEMENT SYSTEM. In: *Annual Review Biochemistry*.

Mullins, R. F.; Russell, S. R.; Anderson, D. H.; Hageman, G. S. (2000): Drusen associated with aging and age-related macular degeneration contain proteins common to extracellular deposits associated with atherosclerosis, elastosis, amyloidosis, and dense deposit disease. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 14 (7), S. 835–846.

Nicolas, Caroline M.; Robman, Luba D.; Tikellis, Gabriella; Dimitrov, Peter N.; Dowrick, Adam; Guymer, Robyn H.; McCarty, Catherine A. (2003): Iris colour, ethnic origin and progression of age-related macular degeneration. In: *Clinical & experimental ophthalmology* 31 (6), S. 465–469.

Nita, Małgorzata; Grzybowski, Andrzej (2016): The Role of the Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in the Pathomechanism of the Age-Related Ocular Diseases and Other Pathologies of the Anterior and Posterior Eye Segments in Adults. In: *Oxidative medicine and cellular longevity* 2016, S. 3164734. DOI: 10.1155/2016/3164734.

Nosrat, Christopher A.; Tomac, Andreas; Lindqvist, Eva; Lindskog, Sven; Humpel, Christian; Strömberg, Ingrid et al. (1996): Cellular expression of GDNF mRNA suggests multiple functions inside and outside the nervous system. In: *Cell and Tissue Research* 286 (2), S. 191–207. DOI: 10.1007/s004410050688.

Oh-hashii, Kentaro; Ito, Masatoshi; Tanaka, Tatsuhide; Hirata, Yoko; Kiuchi, Kazutoshi (2009): Biosynthesis, processing, and secretion of glial cell line-derived

Literaturverzeichnis

neurotrophic factor in astroglial cells. In: *Molecular and cellular biochemistry* 323 (1-2), S. 1–7. DOI: 10.1007/s11010-008-9958-3.

Oosthuysen, B.; Moons, L.; Storkebaum, E.; Beck, H.; Nuyens, D.; Brusselmans, K. et al. (2001): Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. In: *Nature genetics* 28 (2), S. 131–138. DOI: 10.1038/88842.

Pauleikhoff, D.; Harper, C. A.; Marshall, J.; Bird, A. C. (1990): Aging changes in Bruch's membrane. A histochemical and morphologic study. In: *Ophthalmology* 97 (2), S. 171–178.

Pearson, Thomas A.; Manolio, Teri A. (2008): How to interpret a genome-wide association study. In: *JAMA* 299 (11), S. 1335–1344. DOI: 10.1001/jama.299.11.1335.

Pennington, Katie L.; DeAngelis, Margaret M. (2016): Epidemiology of age-related macular degeneration (AMD): associations with cardiovascular disease phenotypes and lipid factors. In: *Eye and vision (London, England)* 3, S. 34. DOI: 10.1186/s40662-016-0063-5.

Plowey, Edward d.; Cherra, Salvatore J.; Liu, Yong-Jian; Chu, Charleen T. (2008): Role of autophagy in G2019S-LRRK2-associated neurite shortening in differentiated SH-SY5Y cells. In: *Journal of neurochemistry* 105 (3), S. 1048–1056. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2008.05217.x.

Pozas, Esther; Ibáñez, Carlos F. (2005): GDNF and GFRalpha1 promote differentiation and tangential migration of cortical GABAergic neurons. In: *Neuron* 45 (5), S. 701–713. DOI: 10.1016/j.neuron.2005.01.043.

Ramrattan, R. S.; Schaft, T L van der; Mooy, C. M.; Bruijn, W. C. de; Mulder, P. G.; Jong, P. T. de (1994): Morphometric analysis of Bruch's membrane, the choriocapillaris, and the choroid in aging. In: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35 (6), S. 2857–2864. Online verfügbar unter https://iovs.arvojournals.org/arvo/content_public/journal/iovs/933404/2857.pdf.

Richardson, Andrea J.; Islam, F. M. Amirul; Guymer, Robyn H.; Cain, Melinda; Baird, Paul N. (2007): A tag-single nucleotide polymorphisms approach to the vascular

endothelial growth factor-A gene in age-related macular degeneration. In: *Molecular vision* 13, S. 2148–2152.

Rider, Chris C.; Mulloy, Barbara (2017): Heparin, Heparan Sulphate and the TGF- β Cytokine Superfamily. In: *Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry* 22 (5). DOI: 10.3390/molecules22050713.

Rivera, Andrea; Fisher, Sheila A.; Fritsche, Lars G.; Keilhauer, Claudia N.; Lichtner, Peter; Meitinger, Thomas; Weber, Bernhard H. F. (2005): Hypothetical LOC387715 is a second major susceptibility gene for age-related macular degeneration, contributing independently of complement factor H to disease risk. In: *Human molecular genetics* 14 (21), S. 3227–3236. DOI: 10.1093/hmg/ddi353.

Roduit, Raphaël; Schorderet, Daniel F. (2008): MAP kinase pathways in UV-induced apoptosis of retinal pigment epithelium ARPE19 cells. In: *Apoptosis* 13 (3), S. 343–353. DOI: 10.1007/s10495-008-0179-8.

Rosenfeld, Philip J.; Brown, David M.; Heier, Jeffrey S.; Boyer, David S.; Kaiser, Peter K.; Chung, Carol Y.; Kim, Robert Y. (2006): Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. In: *The New England journal of medicine* 355 (14), S. 1419–1431. DOI: 10.1056/NEJMoa054481.

Roskoski, Robert (2012): ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. In: *Pharmacological research* 66 (2), S. 105–143. DOI: 10.1016/j.phrs.2012.04.005.

Rudat, S.; Pfaus, A.; Cheng, Y. Y.; Holtmann, J.; Ellegast, J. M.; Bühler, C. et al. (2018): RET-mediated autophagy suppression as targetable co-dependence in acute myeloid leukemia. In: *Leukemia* 32 (10), S. 2189–2202. DOI: 10.1038/s41375-018-0102-4.

Runeberg-Roos, Pia; Piccinini, Elisa; Penttinen, Anna-Maija; Mätlik, Kert; Heikkinen, Hanna; Kuure, Satu et al. (2016): Developing therapeutically more efficient Neurturin variants for treatment of Parkinson's disease. In: *Neurobiology of disease* 96, S. 335–345. DOI: 10.1016/j.nbd.2016.07.008.

Russell, S. R.; Mullins, R. F.; Schneider, B. L.; Hageman, G. S. (2000): Location, substructure, and composition of basal laminar drusen compared with drusen associated with aging and age-related macular degeneration. In: *American journal of ophthalmology* 129 (2), S. 205–214.

Literaturverzeichnis

Saarma, Mart; Rider CC FMulloy, Barbara; Mulloy B (2000): GDNF – a stranger in the TGF- β superfamily? In: *European Journal of Biochemistry* 267 (24), S. 6968–6971. DOI: 10.1046/j.1432-1327.2000.01826.x.

Saarma, Mart; Sariola, Hannu (1999): Other neurotrophic factors: Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF). In: *MICROSCOPY RESEARCH AND TECHNIQUE*.

Sacconi, Riccardo; Corbelli, Eleonora; Querques, Lea; Bandello, Francesco; Querques, Giuseppe (2017): A Review of Current and Future Management of Geographic Atrophy. In: *Ophthalmology and therapy* 6 (1), S. 69–77. DOI: 10.1007/s40123-017-0086-6.

Sainath, Rajiv; Gallo, Gianluca (2014): Cytoskeletal and Signaling Mechanisms of Neurite Formation. In: *Cell and Tissue Research* 359 (1), S. 267–278. DOI: 10.1007/s00441-014-1955-0.

Salcedo, Rosalba; Wasserman, Ken; Young, Howard A.; Grimm, Michael C.; Howard, O. M. Zack; Anver, Miriam R. et al. (1999): Vascular Endothelial Growth Factor and Basic Fibroblast Growth Factor Induce Expression of CXCR4 on Human Endothelial Cells : In Vivo Neovascularization Induced by Stromal-Derived Factor-1 α . In: *The American Journal of Pathology* 154 (4), S. 1125–1135.

Samanta, Sujon; Perkinson, Michael S.; Morgan, Michael; Williams, Robert J. (1998): Hydrogen Peroxide Enhances Signal-Responsive Arachidonic Acid Release from Neurons: Role of Mitogen-Activated Protein Kinase. In: *Journal of neurochemistry* 70 (5), S. 2082–2090. DOI: 10.1046/j.1471-4159.1998.70052082.x.

Sandberg, M. A.; Gaudio, A. R.; Miller, S.; Weiner, A. (1994): Iris pigmentation and extent of disease in patients with neovascular age-related macular degeneration. In: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35 (6), S. 2734–2740. Online verfügbar unter https://iovs.arvojournals.org/arvo/content_public/journal/iovs/933404/2734.pdf.

Sandilands, Emma; Serrels, Bryan; Wilkinson, Simon; Frame, Margaret C. (2012): Src-dependent autophagic degradation of Ret in FAK-signalling-defective cancer cells. In: *EMBO reports* 13 (8), S. 733–740. DOI: 10.1038/embor.2012.92.

Sandmark, Jenny; Dahl, Göran; Öster, Linda; Xu, Bingze; Johansson, Patrik; Akerud, Tomas et al. (2018): Structure and biophysical characterization of the human full-

Literaturverzeichnis

length heparin-GFRA2 complex: A role for heparan sulfate in signaling. In: *The Journal of biological chemistry* 293 (15), S. 5492–5508. DOI: 10.1074/jbc.RA117.000820.

SanGiovanni, John Paul; Lee, Phil H. (2013): AMD-associated genes encoding stress-activated MAPK pathway constituents are identified by interval-based enrichment analysis. In: *PloS one* 8 (8), e71239. DOI: 10.1371/journal.pone.0071239.

Sarrazin, Stephane; Lamanna, William C.; Esko, Jeffrey D. (2011): Heparan sulfate proteoglycans. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3 (7). DOI: 10.1101/cshperspect.a004952.

Schmitz-Valckenberg, S.; Mössner, A.; Fleckenstein, M.; Wiedemann, P.; Holz, F. G. (2010): Therapieansätze bei geographischer Atrophie. In: *Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft* 107 (11), S. 1016–1019. DOI: 10.1007/s00347-010-2160-5.

Scholl, Hendrik P. N.; Charbel Issa, Peter; Walier, Maja; Janzer, Stefanie; Pollok-Kopp, Beatrix; Borncke, Florian et al. (2008): Systemic complement activation in age-related macular degeneration. In: *PloS one* 3 (7), e2593. DOI: 10.1371/journal.pone.0002593.

Seddon, J. M.; Ajani, U. A.; Sperduto, R. D.; Hiller, R.; Blair, N.; Burton, T. C. et al. (1994): Dietary carotenoids, vitamins A, C, and E, and advanced age-related macular degeneration. Eye Disease Case-Control Study Group. In: *JAMA* 272 (18), S. 1413–1420.

Seddon, Johanna M.; Cote, Jennifer; Davis, Nancy; Rosner, Bernard (2003): Progression of Age-Related Macular Degeneration: Association With Body Mass Index, Waist Circumference, and Waist-Hip Ratio. In: *Arch Ophthalmol* 121 (6), S. 785–792. DOI: 10.1001/archopht.121.6.785.

Seddon, Johanna M.; Cote, Jennifer; Page, William F.; Aggen, Steven H.; Neale, Michael C. (2005): The US twin study of age-related macular degeneration: relative roles of genetic and environmental influences. In: *Archives of ophthalmology* 123 (3), S. 321–327. DOI: 10.1001/archopht.123.3.321.

Literaturverzeichnis

Seger, R.; Krebs, E. G. (1995): The MAPK signaling cascade. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 9 (9), S. 726–735. DOI: 10.1096/fasebj.9.9.7601337.

Sivaprasad, S.; Chong, N. V. (2006): The complement system and age-related macular degeneration. In: *Eye (London, England)* 20 (8), S. 867–872. DOI: 10.1038/sj.eye.6702176.

Smith, W.; Assink, J.; Klein, R.; Mitchell, P.; Klaver, C. C.; Klein, B. E. et al. (2001): Risk factors for age-related macular degeneration: Pooled findings from three continents. In: *Ophthalmology* 108 (4), S. 697–704.

Soboleva, Galina; Geis, Birgit; Schrewe, Heinrich; Weber, Bernhard H. F. (2003): Sorsby fundus dystrophy mutation Timp3(S156C) affects the morphological and biochemical phenotype but not metalloproteinase homeostasis. In: *Journal of cellular physiology* 197 (1), S. 149–156. DOI: 10.1002/jcp.10361.

Solberg, Y.; Rosner, M.; Belkin, M. (1998): The association between cigarette smoking and ocular diseases. In: *Survey of ophthalmology* 42 (6), S. 535–547.

Sridharan, Savitha; Jain, Kirti; Basu, Alakananda (2011): Regulation of autophagy by kinases. In: *Cancers* 3 (2), S. 2630–2654. DOI: 10.3390/cancers3022630.

Stangos, N.; Voutas, S.; Topouzis, F.; Karampatakis, V. (1995): Contrast sensitivity evaluation in eyes predisposed to age-related macular degeneration and presenting normal visual acuity. In: *Ophthalmologica. Journal internationale d'ophtalmologie. International journal of ophthalmology. Zeitschrift für Augenheilkunde* 209 (4), S. 194–198. DOI: 10.1159/000310612.

Storkebaum, Erik; Carmeliet, Peter (2004): VEGF: a critical player in neurodegeneration. In: *The Journal of clinical investigation* 113 (1), S. 14–18. DOI: 10.1172/JCI20682.

Swaroop, Anand; Chew, Emily Y.; Rickman, Catherine Bowes; Abecasis, Gonçalo R. (2009): Unraveling a multifactorial late-onset disease: from genetic susceptibility to disease mechanisms for age-related macular degeneration. In: *Annual review of genomics and human genetics* 10, S. 19–43. DOI: 10.1146/annurev.genom.9.081307.164350.

Literaturverzeichnis

Swaroop, Anand; Kim, Douglas; Forrest, Douglas (2010): Transcriptional regulation of photoreceptor development and homeostasis in the mammalian retina. In: *Nature reviews. Neuroscience* 11 (8), S. 563–576. DOI: 10.1038/nrn2880.

Szatmári-Tóth, M.; Kristóf, E.; Veréb, Z.; Akhtar, S.; Facskó, A.; Fésüs, L. et al. (2016): Clearance of autophagy-associated dying retinal pigment epithelial cells - a possible source for inflammation in age-related macular degeneration. In: *Cell death & disease* 7 (9), e2367. DOI: 10.1038/cddis.2016.133.

Takahashi, Masahide (2001): The GDNF/RET signaling pathway and human diseases. In: *Cytokine & Growth Factor Reviews* 12 (4), S. 361–373. DOI: 10.1016/S1359-6101(01)00012-0.

Tan, Jennifer S. L.; Mitchell, Paul; Smith, Wayne; Wang, Jie Jin (2007): Cardiovascular risk factors and the long-term incidence of age-related macular degeneration: the Blue Mountains Eye Study. In: *Ophthalmology* 114 (6), S. 1143–1150. DOI: 10.1016/j.ophtha.2006.09.033.

Tanida, Isei; Ueno, Takashi; Kominami, Eiki (2008): LC3 and Autophagy. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 445, S. 77–88. DOI: 10.1007/978-1-59745-157-4_4.

Tanida, Isei; Waguri, Satoshi (2010): Measurement of autophagy in cells and tissues. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 648, S. 193–214. DOI: 10.1007/978-1-60761-756-3_13.

Thibault, Richard A.; Scott Baggett, L.; Mikos, Antonios G.; Kasper, F. Kurtis (2010): Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells on pregenerated extracellular matrix scaffolds in the absence of osteogenic cell culture supplements. In: *Tissue engineering. Part A* 16 (2), S. 431–440. DOI: 10.1089/ten.TEA.2009.0583.

Thurman, Joshua M.; Renner, Brandon; Kunchithapautham, Kannan; Ferreira, Viviana P.; Pangburn, Michael K.; Ablonczy, Zsolt et al. (2009): Oxidative Stress Renders Retinal Pigment Epithelial Cells Susceptible to Complement-mediated Injury*. In: *The Journal of biological chemistry* 284 (25), S. 16939–16947. DOI: 10.1074/jbc.M808166200.

Trupp, M.; Raynoschek, C.; Belluardo, N.; Ibáñez, C. F. (1998): Multiple GPI-anchored receptors control GDNF-dependent and independent activation of the c-Ret

Literaturverzeichnis

receptor tyrosine kinase. In: *Molecular and cellular neurosciences* 11 (1-2), S. 47–63. DOI: 10.1006/mcne.1998.0667.

van de Ven, Johannes P. H.; Nilsson, Sara C.; Tan, Perciliz L.; Buitendijk, Gabriëlle H. S.; Ristau, Tina; Mohlin, Frida C. et al. (2013): A functional variant in the CFI gene confers a high risk of age-related macular degeneration. In: *Nature genetics* 45 (7), S. 813–817. DOI: 10.1038/ng.2640.

Vinding, T.; Appleyard, M.; Nyboe, J.; Jensen, G. (1992): Risk factor analysis for atrophic and exudative age-related macular degeneration. In: *Acta ophthalmologica* 70 (1), S. 66–72. DOI: 10.1111/j.1755-3768.1992.tb02093.x.

Vingerling, J. R.; Hofman, A.; Grobbee, D. E.; Jong, P. T. de (1996): Age-related macular degeneration and smoking. The Rotterdam Study. In: *Archives of ophthalmology* 114 (10), S. 1193–1196.

Vogt, Susan D.; Curcio, Christine A.; Wang, Lan; Li, Chuan-Ming; McGwin, Gerald; Medeiros, Nancy E. et al. (2011): Retinal pigment epithelial expression of complement regulator CD46 is altered early in the course of geographic atrophy. In: *Experimental eye research* 93 (4), S. 413–423. DOI: 10.1016/j.exer.2011.06.002.

Wada, Teiji; Penninger, Josef M. (2004): Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. In: *Oncogene* 23 (16), S. 2838–2849. DOI: 10.1038/sj.onc.1207556.

Walport, Mark J. (2001): Complement. In: *New England Journal of Medicine* 344 (14), S. 1058–1066. DOI: 10.1056/NEJM200104053441406.

Wang, Jie Jin; Klein, Ronald; Smith, Wayne; Klein, Barbara E.K; Tomany, Sandy; Mitchell, Paul (2003): Cataract surgery and the 5-year incidence of late-stage age-related maculopathy. In: *Ophthalmology* 110 (10), S. 1960–1967. DOI: 10.1016/S0161-6420(03)00816-9.

Wang, Jie Jin; Rochtchina, Elena; Lee, Anne J.; Chia, Ee-Munn; Smith, Wayne; Cumming, Robert G.; Mitchell, Paul (2007): Ten-year incidence and progression of age-related maculopathy: the blue Mountains Eye Study. In: *Ophthalmology* 114 (1), S. 92–98. DOI: 10.1016/j.ophtha.2006.07.017.

Literaturverzeichnis

Wang, Lan; Clark, Mark E.; Crossman, David K.; Kojima, Kyoko; Messinger, Jeffrey D.; Mobley, James A.; Curcio, Christine A. (2010): Abundant lipid and protein components of drusen. In: *PloS one* 5 (4), e10329. DOI: 10.1371/journal.pone.0010329.

Wang, X.; Martindale, J. L.; Liu, Y.; Holbrook, N. J. (1998): The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival. In: *Biochemical Journal* 333 (Pt 2), S. 291–300.

Weiter, John J.; Delori, Francois C.; Wing, Glenn L.; Fitch, Karlotta A. (1985): Relationship of Senile Macular Degeneration to Ocular Pigmentation. In: *American journal of ophthalmology* 99 (2), S. 185–187. DOI: 10.1016/0002-9394(85)90230-2.

Whitmarsh, Alan J. (2007): Regulation of gene transcription by mitogen-activated protein kinase signaling pathways. In: *Biochimica et biophysica acta* 1773 (8), S. 1285–1298. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2006.11.011.

Widenfalk, Johan; Nosrat, Christopher; Tomac, Andreas; Westphal, Heiner; Hoffer, Barry; Olson, Lars (1997): Neurturin and Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Receptor- β (GDNFR- β), Novel Proteins Related to GDNF and GDNFR- α with Specific Cellular Patterns of Expression Suggesting Roles in the Developing and Adult Nervous System and in Peripheral Organs. In: *J. Neurosci.* 17 (21), S. 8506–8519. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.17-21-08506.1997.

Wolf, Christina; Rothermel, Andrée; Robitzki, Andrea A. (2008): Neurturin, a member of the glial cell line-derived neurotrophic factor family, affects the development of acetylcholinesterase-positive cells in a three-dimensional model system of retinogenesis. In: *Journal of neurochemistry* 107 (1), S. 96–104. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2008.05594.x.

Wong, Wan Ling; Su, Xinyi; Li, Xiang; Cheung, Chui Ming G.; Klein, Ronald; Cheng, Ching-Yu; Wong, Tien Yin (2014): Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. In: *The Lancet. Global health* 2 (2), e106-16. DOI: 10.1016/S2214-109X(13)70145-1.

Literaturverzeichnis

- Xiao, Nan; Le, Quynh-Thu (2016): Neurotrophic Factors and Their Potential Applications in Tissue Regeneration. In: *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis* 64 (2), S. 89–99. DOI: 10.1007/s00005-015-0376-4.
- Xie, Ping; Kamei, Motohiro; Suzuki, Mihoko; Matsumura, Nagakazu; Nishida, Kentaro; Sakimoto, Susumu et al. (2011): Suppression and regression of choroidal neovascularization in mice by a novel CCR2 antagonist, INCB3344. In: *PloS one* 6 (12), e28933. DOI: 10.1371/journal.pone.0028933.
- Xu, Qinyuan; Cao, Sijia; Rajapakse, Sanjeeva; Matsubara, Joanne A. (2018): Understanding AMD by analogy: systematic review of lipid-related common pathogenic mechanisms in AMD, AD, AS and GN. In: *Lipids in health and disease* 17 (1), S. 3. DOI: 10.1186/s12944-017-0647-7.
- Yates, John R. W.; Sepp, Tiina; Matharu, Baljinder K.; Khan, Jane C.; Thurlby, Deborah A.; Shahid, Humma et al. (2007): Complement C3 variant and the risk of age-related macular degeneration. In: *The New England journal of medicine* 357 (6), S. 553–561. DOI: 10.1056/NEJMoa072618.
- Youn, H. Y.; Cullen, A. P.; Chou, B.R. and Sivak, J.G. (2010): Phototoxicity of Ultraviolet (UV) Radiation: Evaluation of UV-Blocking Efficiency of Intraocular Lens (IOL) Materials Using Retinal Cell Culture and in vitro Bioassays. In: *The Open Toxicology Journal*.
- Zhang, Qian-Yu; Tie, Li-Jun; Wu, Shan-Shan; Lv, Pei-Lin; Huang, Hong-Wei; Wang, Wei-Qing et al. (2016): Overweight, Obesity, and Risk of Age-Related Macular Degeneration. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 57 (3), S. 1276–1283. DOI: 10.1167/iovs.15-18637.
- Zhao, Junli; Liao, Yi; Chen, Jingmeng; Dong, Xinran; Gao, Zhan; Zhang, Houjian et al. (2017): Aberrant Buildup of All-Trans-Retinal Dimer, a Nonpyridinium Bisretinoid Lipofuscin Fluorophore, Contributes to the Degeneration of the Retinal Pigment Epithelium. In: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 58 (2), S. 1063–1075. DOI: 10.1167/iovs.16-20734.
- Zhao, Xinyu; Li, Guoshun; Liang, Shufang (2013): Several affinity tags commonly used in chromatographic purification. In: *Journal of analytical methods in chemistry* 2013, S. 581093. DOI: 10.1155/2013/581093.

12 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die mich im Rahmen dieser Doktorarbeit begleitet haben.

Zunächst gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. rer. nat. Bernhard Weber für die Möglichkeit, diese interessante Promotionsarbeit an seinem Lehrstuhl mit optimalen Arbeitsbedingungen und unter seiner Leitung und sehr guten Betreuung durchführen zu dürfen. Danke für die förderlichen Ratschläge und Kommentare.

Des Weiteren danke ich meiner Arbeitsgruppenleiterin Frau Dr. rer. nat. Ulrike Friedrich für die Hilfe und das unermüdliche Verständnis für all meine Fragen. Mit ihrem umfassenden fachlichen Wissen war sie eine große Unterstützung, um aus der oftmals unüberschaubaren Vielzahl an Fragen, Theorien und Versuchen die für meine Arbeit geeignete Variante zu finden.

Vielen Dank auch an die Arbeitsgruppe für die angenehme und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre. Fabiola Biasella, Verena Schmid und Martina Esser haben mich nicht nur in die Arbeit im Labor eingeführt und jederzeit Hilfe angeboten, sondern sind in dieser Zeit auch zu Freundinnen geworden. Danke!

Ein weiterer Dank gilt Dr. rer. physiol. Karolina Plössl für die Unterstützung bei den MTT Assays und ebenfalls die Hilfsbereitschaft bei jeglichen Fragen. Auch die weiteren Kollegen am Institut haben mir die Arbeit mit ihrer Hilfe sehr erleichtert.

Meinen Freunden, die mich bei kleinen Rückschritten immer wieder aufgebaut haben, für mich da waren und Zuspruch leisteten, muss ich ebenfalls meinen großen Dank aussprechen.

Zu guter Letzt danke ich nun ganz besonders meinen Eltern und Geschwistern für das Verständnis, die Geduld und die liebevolle Begleitung auf dem gesamten Weg meines Studiums und dieser Arbeit. Ohne eure Unterstützung, Ermutigung und guten Gedanken wäre diese Arbeit so nicht möglich gewesen!

13 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ort, Datum

Franziska Groß