

Aus dem Lehrstuhl für Humangenetik

Prof. Dr. rer. nat. Bernhard Weber

Der Fakultät für Medizin der Universität Regensburg

**„Funktionelle Untersuchungen zum AMD-assoziierten *NRTN*-Gen –
ein Beitrag zur Aufklärung der molekularen Pathogenese der alters-
abhängigen Makuladegeneration (AMD)“**

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Fakultät für Medizin

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Martin Zankel

2022

Aus dem Lehrstuhl für Humangenetik

Prof. Dr. rer. nat. Bernhard Weber

Der Fakultät für Medizin der Universität Regensburg

**„Funktionelle Untersuchungen zum AMD-assoziierten *NRTN*-Gen –
ein Beitrag zur Aufklärung der molekularen Pathogenese der alters-
abhängigen Makuladegeneration (AMD)“**

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Fakultät für Medizin

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Martin Zankel

2022

Dekan: Prof. Dr. med. Dipl. Phys. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Bernhard Weber

2. Berichterstatter: PD Dr. rer. nat. Melanie Werner-Klein

Tag der mündlichen Prüfung: 26.10.2022

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Altersabhängige Makuladegeneration	1
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Risikofaktoren	2
1.1.3	Krankheitsverlauf und molekulare Pathogenese	3
1.1.3.1	Krankheitsverlauf	3
1.1.3.2	Molekulare Pathogenese	4
1.1.4	Symptombild	7
1.1.5	Derzeitige und zukünftige Therapiekonzepte	8
1.2	Mögliche Einflüsse des Neurturin Proteins auf die AMD Pathogenese	8
1.2.1	Genetische Assoziation von Neurturin mit der AMD	8
1.2.2	Das NRTN-Protein	9
1.2.2.1	Proteineigenschaften	9
1.2.2.2	Molekulare Funktion von NRTN	10
1.2.2.3	Zelluläre Funktion von NRTN	11
1.2.2.4	Therapeutische Konzepte mit NRTN	12
1.3	Ziel der Arbeit	12
2	Material	13
2.1	Reagenzien und Chemikalien	13
2.2	Lösungen und Puffer	15
2.3	Verbrauchsmaterialien	17
2.4	Laborgeräte	18
2.5	Software	20
2.6	Kit-Systeme	21
2.7	Primäre Antikörper	21
2.8	Sekundäre Antikörper	23
2.9	Molekülmassenstandards	23

2.10	Zellen und Organismen	24
2.10.1	<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	24
2.10.2	Zelllinien	24
2.10.3	Gewebe	25
2.11	Zellkulturmedien und Supplements.....	25
2.12	Plasmide und Expressionsvektoren.....	26
2.13	Oligonukleotide	26
2.13.1	Verwendete Primer für die quantitative real-time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)	26
2.13.2	Verwendete Primer für die reverse Transkriptase- Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	27
2.14	Enzyme.....	27
3	Methoden	28
3.1	RNA-Isolierung	28
3.2	cDNA-Synthese	28
3.3	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese.....	29
3.4	Plasmid-Aufreinigung aus Bakterienkulturen	30
3.5	Western Blot – Semi Dry Verfahren.....	30
3.6	Kultivierung der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien	31
3.6.1	Hek293 Zellen	31
3.6.2	ARPE-19 Zellen.....	31
3.6.3	Weri-Rb1 Zellen.....	32
3.6.4	BV-2 Zellen.....	32
3.6.5	hiPSC-RPE Zellen	33
3.7	Untersuchung der endogenen NRTN-Expression in ausgewählten Zelllinien	33
3.7.1	Nachweis der Expression von NRTN durch RT-PCR	33
3.7.1.1	Durchführung der RT-PCR	33

3.7.1.2	Agarosegelelektrophorese.....	34
3.7.2	Nachweis von vorhandenem, produziertem NRTN Protein durch Western Blot Analysen	35
3.8	Aussäen von Zellen für funktionelle Assays	35
3.8.1	Aussaat von Hek293 Zellen.....	35
3.8.2	Aussaat von ARPE-19 Zellen	36
3.8.3	Aussaat von Weri-Rb1 Zellen	36
3.8.4	Aussaat von BV-2 Zellen	37
3.9	Transfektion von Zellen zur heterologen Proteinexpression	38
3.9.1	Transfektion von Hek293 Zellen	38
3.9.2	Transfektion von ARPE-19 Zellen	38
3.9.3	Transfektion von Weri-Rb1 Zellen	39
3.9.4	Transfektion von BV-2 Zellen	39
3.10	Untersuchung der Expression und Sekretion von NRTN in Hek293 Zellen.....	40
3.11	Untersuchung des Einflusses von NRTN auf die Differenzierung von Weri-Rb1 Zellen.....	41
3.12	Untersuchung der Induktion von Autophagie an ARPE-19 Zellen	41
3.13	Analyse der ECM Zusammensetzung von ARPE-19 Zellen	42
3.13.1	Vorbereitung der Zellen und Kultivierung	42
3.13.2	Transfer der Zellen auf Zellkultureinsätze	43
3.13.3	Western Blot Analyse der ECM auf den Filtern	43
3.13.4	Immunzytochemische (ICC) Analyse der ECM auf den Filter.....	44
3.14	Untersuchung des Einflusses von oxidativem Stress auf Zellen mittels qRT-PCR	45
3.14.1	Produktion NRTN-haltiger ECM mithilfe von Hek293 Zellen	45
3.14.1.1	Für Versuche an hiPSC-RPE-Zellen	45
3.14.1.2	Für Versuche an Weri-RB1 Zellen.....	46

3.14.2 Aussaat der hiPSC-RPE bzw. Weri-Rb1 Zellen auf die generierte NRTN-haltige ECM.....	47
3.14.2.1 Aussaat der hiPSC-RPE Zellen.....	47
3.14.2.2 Aussaat der Weri-Rb1 Zellen	47
3.14.3 Induktion von oxidativem Stress und Zellernte	48
3.14.4 qRT-PCR Analyse der Proben	48
3.15 Untersuchung des Einflusses von NRTN auf die Stickstoffmonooxid-Produktion in BV-2 Zellen	49
3.16 Statistik	49
4 Ergebnisse	51
4.1 Untersuchung der endogenen NRTN-Expression in ausgewählten Zelllinien	51
4.1.1 Expression von <i>NRTN</i> auf mRNA Ebene	51
4.1.2 Expression von NRTN auf Proteinebene.....	52
4.2 Einfluss von rs79744308 auf Expression, Sekretion und ECM-Ablagerung von NRTN.....	53
4.3 Einfluss von rs79744308 auf die Abspaltung des Propeptids von NRTN ...	55
4.4 Effekt von NRTN auf die Zusammensetzung der ECM.....	56
4.5 Effekte von NRTN auf oxidativen Stress induzierte Autophagie	61
4.6 Effekte von NRTN durch oxidativen Stress induzierte Signalwegsaktivierung	64
4.7 Effekte von NRTN auf oxidativen Stress induzierte Veränderung der Genexpression.....	66
4.7.1 In hiPSC-RPE Zellen als Modell für das RPE.....	67
4.7.2 Weri-Rb1 Zellen als Modell für Photorezeptorzellen.....	69
4.8 Effekte von NRTN auf die neuronale Differenzierung	71
4.9 Effekte von NRTN auf die Mikroglia-Aktivierung	73
5 Diskussion.....	75

5.1	Charakterisierung von verwendeten Modell-Zelllinien auf heterologe NRTN-Expression.....	75
5.2	Expression, Sekretion und ECM-Ablagerung von NRTN:G und NRTN:A nach heterologer Überexpression.....	77
5.3	Abspaltung des Propeptids bei heterolog exprimiertem NRTN.....	78
5.4	Effekte von NRTN auf die Zusammensetzung der ECM.....	79
5.5	Effekte von NRTN durch oxidativen Stress induzierte Autophagie und Signalwegsaktivierung in kultivierten RPE-Zellen.....	81
5.6	Effekte von NRTN durch oxidativen Stress induzierte Genexpressionsveränderung in kultivierten RPE- und Retinoblastomzellen	83
5.7	Effekte von NRTN auf die neuronale Differenzierung	85
5.8	Effekte von NRTN auf die Mikroglia-Aktivierung	86
5.9	Abschließende Betrachtung.....	87
6	Zusammenfassung.....	88
7	Abstract.....	90
8	Abkürzungsverzeichnis	92
9	Tabellenverzeichnis	94
10	Abbildungsverzeichnis	97
11	Literaturverzeichnis.....	99
12	Danksagung.....	133
13	Lebenslauf	134

1 Einleitung

1.1 Altersabhängige Makuladegeneration

Die altersabhängige Makuladegeneration (AMD) ist eine chronische Erkrankung der Netzhaut und des darunterliegenden retinalen Pigmentepithels (RPE). Meist ist isoliert der Bereich des schärfsten Sehens, die Makula (lat. *macula lutea*), betroffen (zusammengefasst in Bressler, Bressler and Fine, 1988; und Jager, Mieler and Miller, 2008; sowie Lim *et al.*, 2012). Die AMD wurde schon vor ca. 135 Jahren als spezifisches Krankheitsbild beschrieben (Haab, 1885). In den letzten Jahrzehnten hat sich die Forschung zu Ursachen und Behandlungsmöglichkeiten der AMD weiter intensiviert (zusammengefasst in Ramin *et al.*, 2015). Als Gründe für diese Entwicklung lassen sich zum Beispiel die hohe Prävalenz (Klein *et al.*, 2011; Rudnicka *et al.*, 2012; zusammengefasst in Taylor, 2016), die noch nicht vollständig geklärte Pathogenese (zusammengefasst in Ding, Patel and Chan, 2009; und Kauppinen *et al.*, 2016; sowie Mitchell *et al.*, 2018), der starke symptombezogene Leidensdruck (Rovner, 2002; Banerjee *et al.*, 2008; Cruess *et al.*, 2008), sowie noch nicht ausgereifte Therapiekonzepte (zusammengefasst in Van Lookeren Campagne *et al.*, 2014; und Al-Zamil W and Yassin S, 2017) anführen.

1.1.1 Epidemiologie

Die AMD stellt die führende Ursache für visuelle Einschränkungen und Erblindung der älteren (> 65 Jahre), europäisch stämmigen Bevölkerung dar (Klein *et al.*, 1995, 2011; Klaver *et al.*, 1998; Friedman *et al.*, 1999, 2004; Seddon *et al.*, 2005; Rudnicka *et al.*, 2012, zusammengefasst in Rudnicka *et al.*, 2015; und Taylor, 2016). Bei über 40-jährigen Amerikanern liegt die Prävalenz der späten Erkrankungsformen bereits bei 6,5% (Klein *et al.*, 2011). Dieses häufige Auftreten in der älteren Bevölkerung zeigten auch Wong und Kollegen in ihrer Metaanalyse von 39 Studien, in welcher die globale Prävalenz der AMD bei den 45-85 Jährigen 8,69% aufwies (Wong *et al.*, 2014). Auch wurden in dieser Analyse schon zuvor beschriebene Unterschiede zwischen Ethnien bestätigt (Friedman *et al.*, 1999; Klein *et al.*, 2011; Rudnicka *et al.*, 2012). So liegt die Prävalenz der AMD in der europäischen Bevölkerung bei 12,3%, bei Asiaten sowie Afrikanern jedoch nur bei 7,3% bzw. 7,4%.

Je höher das Alter der beobachteten Bevölkerungsgruppe, desto höher ist auch die Prävalenz der AMD (zusammengefasst in Wong *et al.*, 2008; und Kawasaki *et al.*, 2010; sowie Jonas, Cheung and Panda-Jonas, 2017). Diesen graduellen Anstieg kann man besonders an den über 80-Jährigen erkennen, dort beträgt die AMD-Prävalenz ca. 15 % (Friedman *et al.*, 2004). Bedingt durch die derzeitigen demographischen Verschiebungen in den Industrienationen lassen sich Vorhersagemodelle für zukünftige Jahrzehnte aufstellen (zusammengefasst in Jonas *et al.*, 2014). So berechnete die Arbeitsgemeinschaft unter Rein einen Anstieg der von der AMD betroffenen amerikanischen Bürger bis 2050 auf das doppelte der Zahl von 2009 (bei spätem Stadium der AMD von 1,7 Millionen auf 3,8 Millionen Betroffene) (Rein *et al.*, 2009). Dieser Trend wurde durch die später durchgeführte Metaanalyse von Wang und Kollegen bestätigt (Wong *et al.*, 2014). Aufgrund der steigenden Zahl der Fälle ist auch von einer Erhöhung der Belastungen auf das Gesundheitssystem auszugehen (Cruess *et al.*, 2008; Saxena *et al.*, 2016; zusammengefasst in The Lancet, 2018).

1.1.2 Risikofaktoren

Bei der AMD handelt es sich um eine multifaktorielle Erkrankung, deren einzelne Risikofaktoren untereinander kombinatorische Effekte auslösen können. Die bekannten Risikofaktoren lassen sich in endogene und exogene Noxen aufteilen.

Eine wichtige endogene Noxe ist das Alter. Wie schon im Namen der AMD angedeutet, ist steigendes Lebensalter sehr stark mit einem Auftreten der Krankheit assoziiert (R. Klein *et al.*, 1997; Age-Related Eye Disease Study Research Group, 2000; Buch *et al.*, 2005; zusammengefasst in Klein, 2007; Chakravarthy *et al.*, 2010). Des Weiteren spielt, wie in Abschnitt 1.1.1 beschrieben, die ethnische Herkunft eine Rolle (Bressler, 2008; zusammengefasst in Jager, Mieler and Miller, 2008; Wong *et al.*, 2014). Einen großen Einfluss hat außerdem die Genetik (zusammengefasst in Haddad *et al.*, 2006; Deangelis *et al.*, 2011; Fritsche *et al.*, 2013; und Ratnapriya and Chew, 2013), welcher ein Anteil von 46 bis 71% am AMD-Risiko zugeschrieben wird (Seddon *et al.*, 2005). In der neuesten und bislang größten Metaanalyse wurden 34 AMD assoziierte DNA-Loci identifiziert (Fritsche *et al.*, 2016). Unter diesen befanden sich bereits seit längerem bekannte Loci, wie z.B. der *ARMS2/HTRA1* (age-related maculopathy susceptibility protein 2/ high temperature requirement A serine peptidase 1) -Locus (Jakobsdottir *et al.*, 2005; Rivera *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2006; Fritsche *et al.*, 2008),

der *CFH* (Komplementfaktor H)-Locus (Edwards *et al.*, 2005; Hageman *et al.*, 2005; Haines, 2005; Klein *et al.*, 2005) oder der *CFI* (Komplementfaktor I) -Locus. (Fagerness *et al.*, 2009; van de Ven *et al.*, 2013). Zusätzlich wurden auch zuvor unbekannte DNA-Loci, wie der *VTN* (Vitronectin)-, der *PILRB/ PILRA* (Paired immunoglobulin like type 2 receptor alpha/ beta)- und der *ACAD10* (Acyl-CoA dehydrogenase family member 10) -Locus identifiziert (Fritsche *et al.*, 2016).

Auch verschiedene exogene Noxen spielen eine Rolle bei der Krankheitsentstehung. Negativen Einfluss haben Faktoren wie z.B. Rauchen (Paetkau *et al.*, 1978; Vinding *et al.*, 1992; Seddon *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 2001) und dadurch verursachte okuläre Hypoxie, Infarkte der Augengefäße, sowie oxidativer Stress in der Netzhaut (Hammond, Wooten and Snodderly, 1996; zusammengefasst in Klein *et al.*, 2004; und Ding, Patel and Chan, 2009). Auch Übergewicht, Hypertonus, vorausgegangene kardiovaskuläre Erkrankungen (Age-Related Eye Disease Study Research Group, 2000; Delcourt *et al.*, 2001; van Leeuwen *et al.*, 2003; zusammengefasst in Klein *et al.*, 2004; Hogg *et al.*, 2008; Chakravarthy *et al.*, 2010), oder Kataraktoperationen (Klein *et al.*, 2002; Cugati *et al.*, 2006) können die Entstehung der AMD begünstigen.

1.1.3 Krankheitsverlauf und molekulare Pathogenese

1.1.3.1 Krankheitsverlauf

Die AMD durchläuft in ihrer Progression mehrere Stadien (nach Age-Related Eye Disease Study Research Group, 2000, 2005). Im Anfangsstadium sind auf dem Augenhintergrund mittelgroße Drusen zu entdecken. Diese Drusen sind als abgegrenzte Aufhellungen in der Funduskopie erkennbar und charakterisiert durch Ablagerungen von Proteinen sowie Bestandteilen von extrazellulärer Matrix ("extracellular matrix", ECM) und Lipiden zwischen dem RPE und der Bruch'schen Membran (zusammengefasst in Jager, Mieler and Miller, 2008; Crabb, 2014). Da Drusen auch ohne Krankheitswert bei alternden Menschen auftreten können (Sarks *et al.*, 1999), gestaltet sich die Diagnose des Anfangsstadiums als schwierig.

Im weiteren Verlauf der AMD erfolgt eine Zunahme der Drusen in Größe und Anzahl. Dieses Zwischenstadium geht schließlich in eine der zwei Spätformen der AMD über (zusammengefasst in Ambati *et al.*, 2003; und Jager, Mieler and Miller, 2008; sowie Ding, Patel and Chan, 2009): Die geographische Atrophie (GA) oder die choroidale

Neovaskularisation (CNV), wobei die GA in eine CNV übergehen kann (zusammengefasst in Ambati *et al.*, 2003; und Jager, Mieler and Miller, 2008; sowie Ding, Patel and Chan, 2009). Die GA stellt sich als apoptotischer Prozess dar, welcher mit einer Atrophie des RPEs verbunden ist. Dieser Verlust an RPE-Zellen führt zu einer Degeneration der darüber liegenden Photorezeptorzellen (Dunaief *et al.*, 2002; zusammengefasst in Ambati *et al.*, 2003; und Ding, Patel and Chan, 2009). Demgegenüber wachsen im Fall der CNV Gefäße ausgehend von der Choroidea (Green, 1999) aber auch in selteneren Fällen von retinalen Blutgefäßen (Brancato *et al.*, 2002) in den Zwischenraum zwischen Photorezeptorzellen und Bruch'scher Membran aus (zusammengefasst in Liu and Xie, 2012; und Kent, 2014). Diese können durch den Austritt von Blut oder anderen Flüssigkeiten eine Ablösung des Pigmentepithels verursachen (zusammengefasst in Chen, Bedell and Zhang, 2010; und Lim *et al.*, 2012).

1.1.3.2 Molekulare Pathogenese

Verschiedene molekulare Mechanismen sind bekannt, welche in Zusammenhang mit der AMD-Pathogenese stehen.

Ein wichtiger Prozess ist eine Fehlregulation des Immunsystems, im speziellen des Komplementsystems, einem Teil der humoralen Immunantwort (Johnson *et al.*, 2000; zusammengefasst in Ding, Patel and Chan, 2009; und Geerlings, de Jong and den Hollander, 2017). Die Komplementkaskade dient im Normalfall der Abwehr exogener Gefahren (Lepow *et al.*, 1963; zusammengefasst in Porter and Reid, 1978; und Mitchell *et al.*, 2009). Es wurden Bestandteile des Komplementsystems, wie z.B. Vitronectin, Komplementfaktor 1 und Clusterin, an zentralen Stellen von AMD-Läsionsorten, z.B. in Drusen, gefunden (Hageman *et al.*, 1999, 2001; Johnson *et al.*, 2001; Anderson *et al.*, 2002; Crabb *et al.*, 2002). Von weiteren Teilen des Immunsystems wurden erhöhte Konzentrationen in Seren von AMD-Patienten gefunden und stehen somit unter Verdacht an der AMD Pathogenese beteiligt zu sein. Diese sind unter anderen sFasL (soluble Fas ligand), sICAM-1 (soluble intercellular adhesion molecule-1), sTNFRII (TNF- α receptor II), das C-reaktive Protein (zusammengefasst in Kauppinen *et al.*, 2016), Chemokine (zusammengefasst in Ding, Patel and Chan, 2009), Interleukine (IL-1 β ; IL-18), sowie Toll-ähnliche Rezeptoren (eng: *toll-like receptors*) (TLR) (zusammengefasst in Ambati, Atkinson and Gelfand, 2013). Bei den genetischen Ana-

lysen stachen ebenfalls Assoziationen mit Genen, welche für Bestandteile dieses Systems kodieren, hervor, wie z.B. das *CFH*-Gen, die Komplementkomponenten 3 und 2 (*C2* und *C3*), oder die Komplementfaktoren B und I (*CFB* und *CFI*) (zusammengefasst in Geerlings, de Jong and den Hollander, 2017).

Des Weiteren wird eine verstärkte Aktivierung von Mikroglia und Müller-Gliazellen, welche ebenfalls an immunregulatorischen Prozessen beteiligt sind, in der AMD Pathogenese beobachtet. So führt die Photorezeptordegeneration zu einer subretinalen Akkumulation (Combadière *et al.*, 2007), und der Aktivierung dieser Zellen (Gupta, Brown and Milam, 2003; Chang *et al.*, 2007; zusammengefasst in Ding, Patel and Chan, 2009). Diese Aktivierung kann ihrerseits zu einem Absterben weiterer Photorezeptorzellen führen (Roque *et al.*, 1999).

Zunehmend wird auch eine Fehlregulation von Signalwegen mit der AMD in Verbindung gebracht, insbesondere der der Mitogen-aktivierten Protein (MAP) Kinasen vermittelten Signalkaskaden. Der ERK (extracellular signal regulated) Signalweg ist eine Untergruppe der MAP Kinasen Signalwege und unter anderem an Prozessen der Zellproliferation, -differenzierung und dem Zelltod beteiligt (zusammengefasst in Pearson *et al.*, 2001; und Akins *et al.*, 2010). Durch die Hemmung der ERK Kinasen in degenerierendem RPE mit einem *Alu* RNA/DICER1 Ungleichgewicht konnte die Atrophie gestoppt werden (Dridi *et al.*, 2012). Weiterhin ist bekannt, dass eine Hemmung der ERK-Signalkaskade direkt (Curry *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2010; Hua *et al.*, 2011) und auch indirekt (Hollborn *et al.*, 2018; Messerschmidt *et al.*, 2019) zu einer erniedrigten Produktion von VEGF (vascular endothelial growth factor) führt, welches eng mit der Entstehung der CNV assoziiert ist (Stefánsson, Geirsdóttir and Sigurdsson, 2011). Einflüsse der ERK Kinasen konnten auch auf inflammatorische Prozesse nachgewiesen werden (Guo *et al.*, 2014; Tao *et al.*, 2016) und werden durch oxidativen Stress beeinflusst (Glotin *et al.*, 2006).

Oxidativer Stress wurde als weiterer Faktor in der AMD Pathogenese identifiziert (u.a. in Winkler *et al.*, 1999; zusammengefasst in Beatty *et al.*, 2000; Hollyfield *et al.*, 2008; zusammengefasst in Kauppinen *et al.*, 2016). Durch die hohe Stoffwechselaktivität und der daraus folgenden reichlichen Versorgung mit Sauerstoff gepaart mit häufiger Einwirkung von Licht, sind Photorezeptorzellen einer hohen Exposition an oxidativem Stress ausgesetzt, welcher unter anderem zur Degeneration mitochondrialer DNA führt (Yu-Wai-Man, Griffiths and Chinnery, 2011; Farrar *et al.*, 2013; zusammengefasst

in Lambert *et al.*, 2016; und Kaarniranta *et al.*, 2019). Zudem kann oxidativer Stress auch die Aktivierung von Komplementfaktoren, wie z.B. CFH und CFB, steigern und die Expression verschiedener Gene beeinflussen (zusammengefasst in Kauppinen *et al.*, 2016). Durch oxidativen Stress können auch in der Bruch'schen Membran abgelagerte Lipide oxidiert werden. Diese oxidierten Lipide sind schädlich für das RPE und können zu Entzündungsreaktionen führen (Gordiyenko *et al.*, 2004; Curcio *et al.*, 2011). Schließlich kann durch oxidativen Stress induzierte Autophagie die immunologische Aktivität der RPE Zellen erhöhen und somit zu einer Immunreaktion/Entzündung führen (Wang *et al.*, 2009).

Auch die Oxidation von Teilen der äußeren Photorezeptorsegmente stellt eine Form von Stress für das RPE dar. Wenn diese oxidierten Photorezeptorbestandteile von RPE-Zellen phagozytiert werden, kann das zu einer Akkumulation des nicht abbaubaren Abfallstoffs Lipofuscin führen (zusammengefasst in Beatty *et al.*, 2000; und Nowak, 2006; sowie Kauppinen *et al.*, 2016). Lipofuscin könnte wiederum durch die Behinderung zellulärer Prozesse zu AMD typischen Entzündungsreaktionen führen (Kaarniranta *et al.*, 2013; Ferrington, Sinha and Kaarniranta, 2016; zusammengefasst in Kauppinen *et al.*, 2016).

Als weiterer Einflussfaktor gilt ein Ungleichgewicht im Lipidhaushalt (Holz *et al.*, 1994; Curcio *et al.*, 2001; zusammengefasst in Handa *et al.*, 2017; und van Leeuwen *et al.*, 2018; sowie Xu *et al.*, 2018). Verschiedene Lipide, wie zum Beispiel Cholesterol (Curcio *et al.*, 2001), akkumulieren im Laufe des Alterns in der Bruch'schen Membran (zusammengefasst in Pikuleva and Curcio, 2014). Auch fettreiche Ernährung kann möglicherweise zu einer Lipidanreicherung führen (zusammengefasst in Kishan *et al.*, 2011). Durch den hohen Lipidaustausch zwischen Photorezeptorzellen und dem RPE ist diese Region vermutlich stärker von Ungleichgewichten im Lipidmetabolismus betroffen (Gordiyenko *et al.*, 2004; zusammengefasst in Handa *et al.*, 2017). Lipidanreicherungen in der Bruch'schen Membran können einen Vorläufer der basallaminären Ablagerungen und damit eine Vorstufe von Drusen darstellen (Curcio *et al.*, 2011). Demgegenüber wird bestimmten Lipoproteinen, wie Apolipoprotein E, ein protektiver Effekt hinsichtlich der AMD zugeschrieben (zusammengefasst in Curcio *et al.*, 2009).

Auch die Struktur der ECM wird mit der AMD-Pathogenese in Verbindung gebracht. So haben bereits 1999 Stone und KollegInnen zeigen können, dass eine Mutation in Fibulin-3, einem für den Aufbau der ECM wichtigen Protein, die Malattia leventinese,

eine im frühen Alter auftretende Makuladystrophie, verursacht (Stone *et al.*, 1999; zusammengefasst in Johnson and Anderson, 2004; Ratnapriya *et al.*, 2014). *In vitro* führen strukturelle Veränderungen der ECM, welche ähnlich zu denen sind, die bei der AMD entdeckt wurden, zu einer Aktivierung der Komplementkaskade (Fernandez-Godino, Bujakowska and Pierce, 2018). Des Weiteren führte eine fehlerhafte ECM-Struktur *in vitro* unter anderen zu erhöhter UPR (unfolded protein stress response) – Signalwegsinduktion oder zu einer Steigerung der VEGF-Produktion (Roybal *et al.*, 2005), sowie zu einer Aktivierung des Komplementsystems (Leivo and Engvall, 1986; Nilsson and Nilsson Ekdahl, 2012; zusammengefasst in Fernandez-Godino, 2018).

Trotz zahlreicher Erkenntnisse im Feld der molekularen Pathogenese der AMD verbleiben jedoch die genauen Zusammenhänge zwischen den bekannten Einflussfaktoren und den tatsächlichen Manifestationen der AMD (GA, CNV) ungeklärt.

1.1.4 Symptombild

Die Symptome der AMD beginnen meist schleichend und unbemerkt mit verringertem Visus, besonders beim Lesen und in schlechten Lichtverhältnissen. Im weiteren Fortschreiten treten meist Zentralskotome auf. Hinzukommen können auch Verschiebungen und Verzerrungen bestimmter Teile des Gesichtsfeldes, gut erkennbar durch die Anwendung eines Amsler Gitters (Abbildung 1) (zusammengefasst in Jager, Mieler and Miller, 2008; und Beckley, 2015).

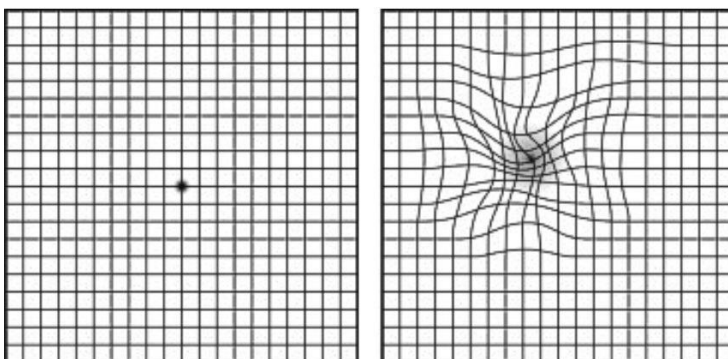


Abbildung 1: Visusvergleich zwischen Normalsichtigem und AMD Patienten veranschaulicht am Amsler Gitter.

Das Bild links zeigt das Amsler Gitter, wie es ein Normalsichtiger wahrnehmen würde. Dem ist eine simulierte Ansicht (Bild rechts) aus Sicht eines AMD Patienten gegenüber gestellt (modifiziert nach Beckley, 2015).

Das Sehvermögen kann sich bei der GA über Jahre hinweg graduell verschlechtern. Demgegenüber können bei einer CNV z.B. aufgrund von subretinalen Hämorrhagien abrupte Visusverluste und Skotome auftreten (zusammengefasst in Jager, Mieler and Miller, 2008).

Es entsteht ein großer Leidensdruck, da viele Patienten durch den fortschreitenden Visusverlust im Alltag stark eingeschränkt sind (Cruess *et al.*, 2008). Eine beträchtliche Anzahl der Betroffenen entwickelt eine Depression, welche eine Meisterung des täglichen Lebens zusätzlich erschwert (u.a. Rovner, 2002; Banerjee *et al.*, 2008).

1.1.5 Derzeitige und zukünftige Therapiekonzepte

Die Therapie einer fortgeschrittenen AMD gestaltet sich schwierig. Während bei der GA noch keine kausale Therapie existiert, finden sich bei der CNV therapeutische Optionen (zusammengefasst in Van Lookeren Campagne *et al.*, 2014; und Al-Zamil W and Yassin S, 2017). Zurzeit beschränkt sich die Behandlung der GA auf präventive Maßnahmen, wie Vitamin- und Zinkpräparate (Age-Related Eye Disease Study Research Group, 2001; zusammengefasst in Van Lookeren Campagne *et al.*, 2014; und Al-Zamil W and Yassin S, 2017). Auch eine zukünftige Anwendung medikamentöser Therapien wird derzeit diskutiert, z.B. in Form von Hemmstoffen spezifischer Immunkomponenten, wie der C3-Blocker APL-2, oder z.B. in Form von neuroprotektiven Wirkstoffen wie Brimonidin (Nebbioso *et al.*, 2019). Die Therapie der CNV besteht bis dato im Wesentlichen aus intravitreal injizierten VEGF-A (und teils auch VEGF-B) Hemmern (auch in Kombination mit Kortikosteroiden (zusammengefasst in Giancipoli *et al.*, 2018)), die ein weiteres Fortschreiten verzögern (Ba *et al.*, 2015; Park, Sun and Lee, 2017); in Kombination mit stereotaktischer Bestrahlung (Ranjbar *et al.*, 2016; zusammengefasst in Al-Zamil W and Yassin S, 2017). Nach derzeitigem Stand der Therapie ist jedoch weder die Heilung der GA, noch der CVN möglich.

1.2 Mögliche Einflüsse des Neurturin Proteins auf die AMD Pathogenese

1.2.1 Genetische Assoziation von Neurturin mit der AMD

In der Metaanalyse von Fritsche und KollegInnen aus dem Jahr 2016 wurden neue Genvarianten entdeckt, welche mit der AMD assoziiert sind (Fritsche *et al.*, 2016). Eine dieser neuen Varianten ist die im Intron 1 des *FUT6* (*Fucosyltransferase 6*) -Gens gelegene Variante rs12019136. Diese steht mit der AMD in einem protektiven Zusammenhang (bedingt durch eine beobachtete geringere Allelfrequenz des A-Allels in

AMD-Fällen) und befindet sich in einem nahezu vollständigen Kopplungsungleichgewicht mit der Variante rs79744308 ($D'=1,00$; $r^2=1$; (nach Machiela and Chanock, 2015)), welche im Exon 2 des *NRTN* (*Neurturin*)-Gens liegt.

1.2.2 Das NRTN-Protein

1.2.2.1 Proteineigenschaften

Erstmals wurde NRTN von Kotzbauer und KollegInnen im Jahr 1996 beschrieben. Ihre Analysen zeigten, dass NRTN in seiner AS-Sequenz eine 42-prozentige Übereinstimmung zu dem neuronalen Wachstumsfaktor Glial Cell Derived Neurotrophic Factor (GDNF) aufweist (Kotzbauer *et al.*, 1996). Aus diesem Grund wurde NRTN der GDNF-Familie zugeordnet. Weiter postulierten Kotzbauer und KollegInnen eine Zugehörigkeit von NRTN sowie der gesamten GDNF-Familie zur Obergruppe der Transforming Growth Factor- β (TGF- β) Proteine. Diese Zuordnung stützte sich weniger auf eine Übereinstimmung in der AS-Sequenz, welche weniger als 20% betrug, als auf sieben in GDNF-Proteinen vorhandene, konservierte Cysteinreste (Kotzbauer *et al.*, 1996), welche als charakteristisch für alle 33 Mitglieder der TGF- β Obergruppe gelten (Clark and Coker, 1998; Saarma and Sariola, 1999; zusammengefasst in Saarma, 2000).

Humanes NRTN besitzt eine Gesamtlänge von 197 AS (Fjord-Larsen *et al.*, 2005). Diese Sequenz ist unterteilt in ein 19 AS langes Signalepeptid, ein 76 AS langes Pro-peptid und eine aktive Kette bestehend aus 102 AS (Fjord-Larsen *et al.*, 2005) (Abbildung 2 A). Die AMD assoziierte Variante rs79744308 an AS Position 59 befindet sich im Pro-Peptid von NRTN und führt dort durch den Nukleotid-Austausch von Guanin zu Adenosin zu einem Aminosäure (AS) -Austausch von Alanin zu Tyrosin (Abbildung 2 A).

Nach der Sekretion liegt NRTN in Form eines Homodimers vor, welches über eine Disulfidbrücke an den Cysteinresten der AS-Position 164 zweier NRTN Monomere verknüpft wird (Abbildung 2 B), in welcher es auch mit Rezeptoren interagiert (Sandmark *et al.*, 2018). Die aktive Kette, nach physiologischer Faltung, weist mehrere β -Faltblatt Strukturen, sowie eine etwas ausgelagerte α -Helix auf (Abbildung 2 B) auf und ähnelt somit in ihrer Sekundärstruktur GDNF (nach Sandmark *et al.*, 2018).

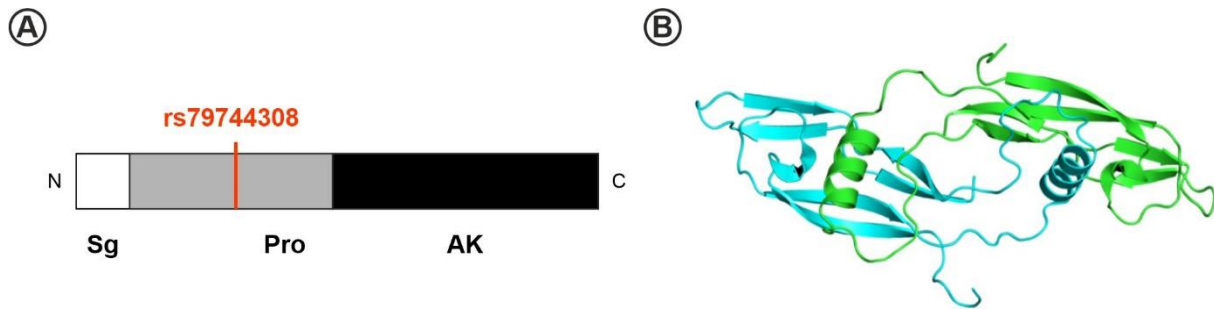


Abbildung 2: Darstellung des schematischen Aufbaus der Untereinheiten einschließlich der Position von Variante rs79744308 (A) und der 3D-Struktur des NRTN-Homodimers (B).

Zu A: Gezeigt ist der schematische Aufbau des gesamten NRTN-Proteins vom N-Terminus (N) zum C-Terminus (C). Mit aufgetragen sind Signalpeptid (Sg, weiß), Propeptid (Pro, grau), aktive Kette (AK, schwarz) und die Position der Variante rs79744308 (orange). (Grafik modifiziert nach Saarma and Sariola, 1999). Zu B: Gezeigt ist die Frontalansicht des NRTN-Homodimers in seiner dreidimensionalen Struktur, wobei die beiden NRTN-Monomere in grün bzw. türkis dargestellt sind. (Grafik modifiziert nach Sandmark *et al.*, 2018).

1.2.2.2 Molekulare Funktion von NRTN

NRTN bindet, wie andere Vertreter der GDNF-Familie, an die transmembran gelegene Rezeptor-Tyrosinkinase RET (*rearranged during transfection*) und induziert dadurch intrazelluläre Signalwege (Jing *et al.*, 1996; Trupp *et al.*, 1996; R. D. Klein *et al.*, 1997; zusammengefasst in Saarma and Sariola, 1999). Für die Aktivierung von RET durch NRTN wird zusätzlich der Rezeptorligand GFR α (GDNF-family receptor- α) benötigt (zusammengefasst in Airaksinen, Titievsky and Saarma, 1999; Saarma and Sariola, 1999; Saarma, 2000; Airaksinen and Saarma, 2002; sowie Arighi, Borrello and Sariola, 2005). NRTN nutzt hierbei vorwiegend die Rezeptorisoform GFR α 2 (Buj-Bello *et al.*, 1997). GFR α ist über einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker an der Zellmembran befestigt (zusammengefasst in Arighi, Borrello and Sariola, 2005), und bildet mit Mitgliedern der GDNF-Familie ein Heterodimer. Die Bindung dieses Heterodimers an RET induziert dessen Aktivierung (Jing *et al.*, 1996; zusammengefasst in Airaksinen, Titievsky and Saarma, 1999; Tansey *et al.*, 2000). Durch die Aktivierung von RET werden unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden, wie die ERK Signalkaskade, die AKT-Signalkaskade oder die JNK-Signalkaskade induziert (zusammengefasst in Saarma and Sariola, 1999; und Arighi, Borrello and Sariola, 2005). Interessanterweise kann der Komplex aus GDNF-Proteinen und GFR α auch ohne die Bindung an RET Signalwege aktivieren (Poteryaev *et al.*, 1999), der Mechanismus sowie die Rolle *in vivo* ist jedoch umstritten (Enomoto *et al.*, 2004; zusammengefasst in Arighi, Borrello

and Sariola, 2005). Bekannt ist außerdem, dass Proteine der GDNF-Familie an Heparin und Heparansulfat binden (Lin *et al.*, 1993; Davies, Yates and Turnbull, 2003; Bespalov *et al.*, 2011; Sandmark *et al.*, 2018), welche zentrale Bestandteile der ECM darstellen (zusammengefasst in Iozzo, 1998). Dabei wird ein Einfluss von Heparinen auf die Komplexbildung von NRTN und GFR α 2 vermutet (Parkash *et al.*, 2008). Weitere Studien deuten zudem eine Verbindung zwischen der ECM-Bindung von GDNF-Familienmitgliedern und der Aktivierung des RET Signalwegs an (Barnett *et al.*, 2002; Rickard *et al.*, 2003).

1.2.2.3 Zelluläre Funktion von NRTN

Generell nehmen Liganden der GDNF-Familie Einfluss auf die Differenzierung, das Überleben und das Wachstum von Neuronen. Dies gilt für juveniles und adultes, zentrales sowie peripheres Nervensystem (Lin *et al.*, 1993; Arenas *et al.*, 1995; Buj-Bello *et al.*, 1995; Kotzbauer *et al.*, 1996; Horger *et al.*, 1998). NRTN wird in vielen Geweben des Körpers exprimiert, so auch in der Netzhaut (Widenfalk *et al.*, 1997; Jomary *et al.*, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass NRTN eine erhaltende und schützende Wirkung auf Photorezeptorzellen besitzt (Carwile *et al.*, 1998; Frasson *et al.*, 1999; Harada *et al.*, 2003). Dies kann auf direktem Wege (Harada *et al.*, 2000), synergetisch mit anderen Wachstumsfaktoren wie CTNF (Ciliary Neurotrophic Factor) (Ogilvie, Speck and Lett, 2000), oder auch indirekt über seinen Einfluss auf andere Zellen wie Müller-Glia geschehen (Harada *et al.*, 2002, 2003). Zudem wirkt NRTN protektiv und heilend auf beschädigte oder degenerierende Ganglienzellen in der Retina (Klöcker *et al.*, 1997; Koeberle and Ball, 1998, 2002; Hauck *et al.*, 2006). Auch die Entwicklung der Ganglienzellen beim Wachstum der Netzhaut wird durch NRTN beeinflusst (Wolf, Rothermel and Robitzki, 2008). Karlsson und KollgeInnen fanden 2002 heraus, dass der GFR α 2 Rezeptor in retinalem Gewebe exprimiert wird (Karlsson *et al.*, 2002). Dieser Erkenntnis folgend wurde gezeigt, dass NRTN und die dadurch angestoßene RET-Aktivierung wichtig für die Aufrechterhaltung der Funktionstüchtigkeit der Netzhaut ist (Brantley *et al.*, 2008).

1.2.2.4 Therapeutische Konzepte mit NRTN

Der neuroprotektive Effekt von NRTN gilt auch für Neuronen der Substantia nigra (Horger *et al.*, 1998; Rosenblad *et al.*, 1999; Biju *et al.*, 2013), einer Ansammlung von Nervenzellen, die bei der neurodegenerativen Krankheit Morbus Parkinson zu Grunde gehen. Zur Behandlung dieser Erkrankung wurden bereits erste gentherapeutische Versuche mittels heterologer NRTN-Expression mittels eines AAV2-Vektors im Gehirn von Ratten (Fjord-Larsen *et al.*, 2005; Gasmi *et al.*, 2007) und Primaten (Bartus *et al.*, 2011) durchgeführt. Diese zeigten einen revitalisierenden Effekt auf Neuronen und eine Verbesserung der Krankheitssymptome der Tiermodelle (Gasmi *et al.*, 2007; Bartus *et al.*, 2011). Darauf aufbauend wurden klinische Studien durchgeführt (Bartus *et al.*, 2015), die jedoch bis jetzt keine eindeutigen Ergebnisse vorweisen können (zusammengefasst in Kordower, 2016; Lindholm *et al.*, 2016; Axelsen and Woldbye, 2018; sowie Paul and Sullivan, 2019). Ausgehend von diesen Untersuchungen könnte eine Rolle von NRTN bei zukünftigen Therapiekonzepten zur Behandlung der AMD in Betracht gezogen werden.

1.3 Ziel der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine mögliche Rolle von NRTN in der molekularen Pathogenese der AMD überprüft werden. Hierbei wurden funktionelle Unterschiede zwischen der nicht AMD-assoziierten Variante (im Folgenden als NRTN:G bezeichnet) und der protektiven AMD-assoziierten NRTN-Varianten (im Folgenden als NRTN:A bezeichnet) untersucht. Zunächst wurden murine Netzhäute und verschiedene Zelllinien als Modellsysteme zur Untersuchung AMD-assoziiierter Prozesse auf endogene NRTN-Expression hin untersucht. Im Folgenden sollte ein Einfluss des AMD-assoziierten SNPs rs79744308 auf die Expression und Sekretion von NRTN ermittelt werden. Im Anschluss sollten funktionelle Analysen durchgeführt werden, die sich mit dem Einfluss von NRTN auf AMD-assoziierte Prozesse wie Autophagie, Reaktion auf erhöhten oxidativen Stress, ECM-Zusammensetzung, neuronale Differenzierung oder Mikroglia-Aktivierung beschäftigen. Aus dieser Arbeit gewonnene Erkenntnisse könnten einen Beitrag zur Aufklärung initialer Prozesse der AMD und dadurch zur Entwicklung innovativer Therapiestrategien der AMD leisten.

2 Material

2.1 Reagenzien und Chemikalien

Tabelle 1: Dargestellt sind die in der Arbeit verwendeten Reagenzien und Chemikalien, sowie ihre Herkunft.

Reagenz/ Chemikalie	Herkunft
1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-di-phenylformazan, MTT, $C_{18}H_{17}N_5S$	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, Deutschland
Agarose (Biozym LE)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Ammoniak-Lösung (25%), NH_3	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS), $(NH_4)_2S_2O_8$	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ampicillin Natriumsalz, $C_{16}H_{18}N_3NaO_4S$	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Bacto Agar	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Bacto Hefextrakt	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Bromphenolblau Natriumsalz, $C_{19}H_9Br_4O_5SNa$	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_2H_6OS	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	Genaxxon Bioscience, Ulm, Deutschland
Dithiothreitol (DTT), $C_4H_{10}O_2S_2$	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Essigsäure (100%), $C_2H_4O_2$	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Ethanol ($\geq 99,8\%$ p.a.) C_2H_6O	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), $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$	(Titriplex) Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Glycerin (99,5%), $C_3H_8O_3$	Chemikalienlager der Universität Regensburg

Glycin, $C_2H_5NO_2$	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Glycerin (87%), $C_3H_8O_3$	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Hefeextrakt	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
HEPES, $C_8H_{18}N_2O_4S$	VWR Life Sciences AMRESCO®, Radnor PA, USA
HiDi™ Formamid, CH_3NO	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Wasserstoffperoxid (34%), H_2O_2	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosid, $C_9H_{18}O_5S$ (IPTG)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol, C_3H_8O	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Kaliumchlorid, KCl	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Lipopolysaccharide (LPS) (1 mg/ml)	Institut für Humangenetik, Universität Regensburg, Deutschland
Magnesiumchlorid, $MgCl_2$	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Methanol, CH_3OH	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumacetat Trihydrat $CH_3COONa \cdot H_2O$	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Natriumcarbonat, $NaHCO_3$	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Natriumchlorid, NaCl	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat, NaH_2PO_4	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (Sodium dodecyl sulfate – SDS) ($\geq 99\%$), $C_{12}H_{25}NaO_4S$	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumthiosulfat Pentahydrat, $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Natriumcarbonat, Na_2CO_3	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Paraformaldehyde (PFA), $(CH_2O)_n$	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Pepton	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
PhosSTOP™ Phosphatase Inhibitor	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Rotiphorese Gel (40%) Acrylamid/ Bisacrylamid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Roti®-Quant 5x Konzentrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Salzsäure rauchend (37%), HCl	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
β -Mercaptoethanol, HSCH ₂ CH ₂ OH	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tetramethylethyldiamin (TEMED), (CH ₃) ₂ NCH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromid (98%), C ₁₈ H ₁₆ BrN ₅ S	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃	Affymetrix, Santa Clara, USA
Tris-HCl (1M), pH 6,8; pH 8,8	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland
Triton® X-100 (Octoxinol 9); C ₁₄ H ₂₂ O(C ₂ H ₄ O) _n mit $n = 9-10$	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Trypton	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Tween® 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ziegenserum	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich

2.2 Lösungen und Puffer

Tabelle 2: Dargestellt sind die in der Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen, deren Bestandteile, sowie die relative Menge.

Puffer/ Lösung	Bestandteile	relative Menge
Antikörper-Lösung für Western Blot	Milchpulver / BSA	5 % w/v
	1x TBS-T	
Blocklösung für Western Blot	Milchpulver	5 % w/v
	1x TBS-T	
Bromphenolblau DNA-Ladepuffer	Bromphenolblau	0,01 % w/v
	Glycerin 87%	40 % v/v
	H ₂ O dest.	
Chloroquin-Phosphat-Lösung	Chloroquin-Phosphat	0,025 M
	H ₂ O dest.	
2x HBS	NaCl	280 mM
	KCl	10 mM
	Na ₂ HPO ₄	1,5 mM
	HEPES	50 mM
	H ₂ O dest.	
Hellewell-Lsyereagenz	NH ₃ Lösung (25%)	57,4 % v/v
	Triton® X-100 (100%)	0,5 %v/v
	DPBS	
House Taq DNA Polymerase 10 x Puffer	KCl	500 mM
	Tris, pH 9,0	100 mM
	MgCl ₂	15 mM
	Triton X	1 % v/v
	H ₂ O dest.	
ICC Antikörperlösung	BSA Serum (1%) ODER goat serum (10%)	2,5 % v/v

	Triton® X-100 (20%)	0,5 % v/v
	PBS	
ICC Blocklösung	BSA Serum (1%)	10 % v/v
	Triton® X-100 (20%)	1,5 % v/v
	PBS	
Lysogeny Broth (LB) Agar	Trypton	1 % w/v
	Hefeextrakt	0,5 % w/v
	NaCl	1 % w/v
	Bacto-Agar	15 % w/v
	H ₂ O dest.	
LB-Medium	Pepton	1 % w/v
	Hefeextrakt	0,5 % w/v
	NaCl	1 % w/v
	H ₂ O dest.	
Lämmli-Puffer 5x	Bromphenolblau	0,01 % v/v
	Tris-HCl pH 6,8	60 mM
	β-Mercaptoethanol	5 % w/v
	SDS	2 % w/v
	Glycerin	10 % v/v
	H ₂ O dest.	
PB (pH 7,2)	Na ₂ HPO ₄	78 mM
	NaH ₂ PO ₄	26 mM
	H ₂ O dest.	
PBS (pH 7,4)	NaCl	137 mM
	KCl	0,27 mM
	Na ₂ HPO ₄	10 mM
	KH ₂ PO ₄	1,8 mM
	H ₂ O dest.	
PFA-Lösung	PFA	2 % w/v
	PBS	
Poly-L-Lysin-Lösung	Poly-L-Lysin (10 mg/ml)	1 % v/v
	Penicillin/Streptomycin	1 % v/v
	PBS	
SDS-Laufpuffer (pH 8,6)	Tris-HCl	0,25 mM
	Glycin	0,2 M
	SDS	1 % w/v
	H ₂ O dest.	
SOC Medium	Trypton	2 % w/v
	Hefeextrakt	0,5 % w/v
	NaCl	10 mM
	KCl	2,5 mM
	MgCl ₂	10 mM
	Glukose	20 mM
	H ₂ O dest.	
TBE (pH 8,0)	Tris	100 mM
	Borsäure	100 mM
	EDTA	1 mM
	H ₂ O dest.	

TBS (pH 7,5)	Tris	50 mM
	NaCl	150 mM
	H ₂ O dest.	
TBS-T	Tween® 20	0,1 % v/v
	TBS	
Towbin	Glycin	190 mM
	Tris	0,25 mM
	Methanol	20 % v/v
	H ₂ O dest.	
TritonX-100-Lösung	TritonX-100	1,5 % v/v
	H ₂ O dest.	

ICC: Immunozytochemie

2.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Dargestellt sind die in der Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien, sowie deren Herkunft.

Material	Herkunft
6-Well Zellkulturplatten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
12-Well Zellkulturplatten	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
24-Well Zellkulturplatten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
48-Well Zellkulturplatten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
96-Well Zellkulturplatten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
96-Well Zellkulturplatten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Deckgläschen (10 mm)	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland
Einwegpasteurpipetten (3ml)	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland
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
Filterspitzen (1000 µl)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Handschuhe Nitril blau	Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
Handschuhe Nitril grün	Kimberly-Clark Professional, Roswell, GA, USA
Küvetten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

MicroAmp™ Optical 8-Tube Strip with Attached Optical Caps, (0,2 ml)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
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, Schwalbach, Deutschland
Rührfisch	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Reagenz-Reservoir (25 ml)	(Moonlab®) neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
ThinCerts™ - TC Einsätze, transparent (Porengröße: 4 µm)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
serologische Pipette (10 ml) Greiner CELLSTAR®	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
serologische Pipette (25 ml) Greiner CELLSTAR®	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
serologische Pipette (50 ml) Greiner CELLSTAR®	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
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, Schwalbach, 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

2.4 Laborgeräte

Tabelle 4: Dargestellt sind die in der Arbeit verwendeten Laborgeräte, sowie ihre Herkunft.

Laborgeräte	Herkunft
Abzug	Wesemann GmbH – Zentrale, Syk, Deutschland
Autoklav V-150	Systec GmbH, Wettenberg, Deutschland
Axio Imager 2 Confocal-Mikroskop	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland

Bunsenbrenner Gasprofi1	WLD Tec, Göttingen, Deutschland
CASY Model TT – Cell Counter and Analyzer	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Duomax 1030 Rocking Platform Shaker	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, Deutschland
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
APT.line® CB CO ₂ incubators	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Kältemikrotom Leica CM1850	Leica, Solmis, Deutschland
Mikrowelle KOR-6D07	Daewoo, Seoul, Korea
Milli-Q-Synthesis Reinstwasseranlage	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland (Millipore)
Leica DM IL Kontrastmikroskop	Leica GmbH, Wetzlar, Deutschland
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 Falcon-tubes)	Phoenix Instrument, Garbsen, Deutschland
Schüttelinkubator Certomat R	B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Deutschland
Schüttelinkubationshaube TH15	Edmund Bühler GmbH, Bodelshausen, 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
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
Photometer Ultrospec 2100 pro	GE Healthcare (früher Amersham Biosciences), Chicago, Illinois, USA
Vakuumpumpe Vacusafe	INTEGRA Biosciences AG, Zizers, Schweiz
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

2.5 Software

Tabelle 5: Dargestellt ist die in der Arbeit verwendete Software, sowie ihre Herkunft.

Software	Herkunft
ApE - A Plasmid Editor	M.Wayne Davis, Department of Biology, University of Utah, UT, USA
AxioVision LE 4.8	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
CorelDRAW Graphicssuite 2019	Corel Corporation, Ottawa, Ontario, Kanada
Corel PHOTO-PAINT	Corel Corporation, Ottawa, Ontario, Kanada
ImageJ	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA
Image Studio	LI-COR Biosciences GmbH, Lincoln, NE, USA
Microsoft Office	Microsoft Cooperation, Redmond, WA, USA
Tecan SPARKCONTROL	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz

2.6 Kit-Systeme

Tabelle 6: Dargestellt sind die in der Arbeit verwendeten Kit-Systeme, sowie ihre Herkunft.

Kit-System	Herkunft
Clarity Max™ Western Blotting Substrate	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Clarity™ Western Blotting Substrate	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
GoTaq® Long PCR Master Mix	Promega Corporation, Madison, WI, USA
Griess Reagent System Kit	Promega Corporation, Madison, WI, USA
Lipofectamine™ 3000 Transfection Kit (enthält: Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent / P3000 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
PureLink™ RNA Mini Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
RNeasy Mini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
RevertAid RT Reverse Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
TransIT®-LT1 Transfektionsreagenz	Mirus Bio LLC, Madison, WI, USA

2.7 Primäre Antikörper

Tabelle 7: Dargestellt sind die in der Arbeit verwendeten primären Antikörper, sowie deren Typ, Spezies, Verdünnung, Verwendungszweck und Herkunft.

Antikörper gegen	Typ	Spezies	Verdünnung	Verwendungszweck	Herkunft
Collagen IV	mAK	Maus	1 : 100 in Ziegen serum	ICC	Rockland Immunochemicals Inc. Limerick, PA, USA
Collagen VI	pAK	Maus	1 : 100 in Ziegen serum	ICC	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Elastin	mAK	Kaninchen	1 : 100 in Ziegen serum	ICC	(Calbiochem) Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Fibronectin (ab6328)	mAK	Maus	1 : 100 in Ziegen serum	ICC	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Laminin (ab11575)	pAK	Kaninchen	1 : 100 in Ziegen serum	ICC	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH

					85386 Eching, Deutschland
NRTN (#MBS420928)	pAK	Ziege	1 : 100 in BSA	ICC	MyBioSource, Inc., San Diego, CA, USA
AKT (C67E7)	mAK	Kaninchen	1 : 1.000 in BSA	WB	Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA
Collagen IV	mAK	Maus	1 : 1.000 in Milch	WB	Rockland Immunochemicals Inc. Limerick, PA, USA
Collagen VI	pAK	Maus	1 : 1.000 in Milch	WB	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Elastin	mAK	Kaninchen	1 : 200 in Milch	WB	(Calbiochem) Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
GFP	pAK	Kaninchen	1 : 10.000 in Milch	WB	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA
JNK1 pan (#MBS5310061)	pAK	Kaninchen	1 : 1.000 in Milch	WB	MyBioSource, Inc., San Diego, CA, USA
Laminin (ab11575)	pAK	Kaninchen	1 : 200 in Milch	WB	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH 85386 Eching, Deutschland
LC3B (#4108)	pAK	Kaninchen	1 : 1.000 in BSA	WB	Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA
NRTN (#MBS420928)	pAK	Ziege	1 : 2.000 in Milch	WB	MyBioSource, Inc., San Diego, CA, USA
NRTN (#MBS420928)	pAK	Ziege	1 : 1.000 in Milch	WB	MyBioSource, Inc., San Diego, CA, USA
p44/42 MAPK (Erk1/2) (137F5)	mAK	Kaninchen	1 : 2.000 in BSA	WB	Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA
p-62 (SQSTM1)	mAK	Kaninchen	1 : 1.000 in BSA	WB	Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA
Phospho-AKT (S5473)	mAK	Kaninchen	1 : 1.000 in BSA	WB	Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204), (D.13.14.4 E) XP®	mAK	Kaninchen	1 : 2.000 in Milch	WB	Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA

p-SAPK / pJNK (T183 / Y185) (81E11)	mAK	Kanin- chen	1 : 1.000 in BSA	WB	Cell Signaling Technolo- gies, Danvers, MA, USA
β -Aktin (#A5441)	mAK	Maus	1 : 10.000 in Milch	WB	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

ICC: Immunocytochemie; mAK: monoklonaler Antikörper; pAK: polyklonaler Antikörper; WB: Western Blot

2.8 Sekundäre Antikörper

Tabelle 8: Dargestellt sind die in der Arbeit verwendeten sekundären Antikörper, sowie deren Verdünnung, Verwendungszweck und Herkunft.

Antikörper gegen	Verdün- nung	Ver- wen- dungs- zweck	Herkunft
Alexa Flour® anti-goat: grün ($\lambda = 488$ nm)	1 : 800	ICC	Thermo Fisher Scientific (Invi- trogen), Waltham, MA, USA
Alexa Flour® anti-mouse: rot ($\lambda = 594$ nm)	1 : 800	ICC	Thermo Fisher Scientific (Invi- trogen), Waltham, MA, USA
Alexa Flour® anti-rabbit: grün ($\lambda = 488$ nm)	1 : 800	ICC	Thermo Fisher Scientific (Invi- trogen), Waltham, MA, USA
DAPI (Housekeeper): blau ($\lambda = 461$ nm (RNA) bzw. 500 nm (dsDNA))	1 : 2.000	ICC	Thermo Fisher Scientific (Invi- trogen), Waltham, MA, USA
Ziege Anti-Kaninchen IgG, Peroxidase- Konjugat	1 : 10.000	WB	(Calbiochem) Merck Chemi- cals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Ziege Anti-Maus IgG, Per- oxidase-Konjugat	1 : 10.000	WB	(Calbiochem) Merck Chemi- cals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Ziege Anti-Ziege IgG, Per- oxidase-Konjugat	1 : 10.000	WB	(Calbiochem) Merck Chemi- cals GmbH, Schwalbach, Deutschland

ICC: Immunocytochemie; WB: Western Blot

2.9 Molekülmassenstandards

Tabelle 9: Dargestellt sind die in der Arbeit verwendeten Molekülmassenstandards, sowie deren Verwendungszweck und Herkunft

Standard	Verwendungszweck	Herkunft
GeneRuler™ DNA Ladder Mix	Molekularmassenstandard für die gel- elektrophoretische Auftrennung von DNA	Thermo Fisher Sci- entific, Waltham, MA, USA

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

2.10 Zellen und Organismen

2.10.1 *Escherichia coli* (*E. coli*)

Tabelle 10: Dargestellt sind die in der Arbeit verwendeten *E. coli* Stämme, sowie deren Herkunft.

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

2.10.2 Zelllinien

Tabelle 11: Dargestellt sind die in der Arbeit verwendeten Zelllinien, sowie deren Ursprungsorganismus, Ursprungszelltyp und Herkunft.

Zelllinie	Ursprungsorganismus	Ursprungszelltyp	Herkunft
661W	<i>Mus musculus</i> C57BL/6J	murine Photorezeptorzellen	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Al-Ubaidi University of Oklahoma Health Sciences, Department of Cell Biology
ARPE-19	<i>Homo sapiens</i>	RPE-Zellen	ATCC; LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland
BV-2	<i>Mus musculus</i>	Mikroglia-Zellen	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Thomas Langmann, Zentrum für Augenheilkunde, Universitätsklinikum Köln, Deutschland
Hek293 EBNA (Hek293)	<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>	Retinoblastom-Zellen	ATCC; LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland
Y-79	<i>Homo sapiens</i>	Retinoblastom-Zellen	ATCC; LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland

2.10.3 Gewebe

Tabelle 12: Dargestellt sind die in der Arbeit verwendeten Gewebe mit Ursprungsorganismus und Herkunft.

Gewebetyp	Ursprungsorganismus	Herkunft
Murine Netzhaut	<i>Mus musculus C57BL/6J</i>	Institut für Humangenetik, Universität Regensburg, Deutschland

2.11 Zellkulturmedien und Supplements

Tabelle 13: Dargestellt sind die in der Arbeit verwendeten Zellkulturmedien und Supplements, sowie deren Herkunft.

Medium/ Supplement	Herkunft
β -Mercaptoethanol, $\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ (100%)	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
Ethylendiamintetraacetat Dinatrium Dihydrat Salz (EDTA), $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	(Titriplex) Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Fetal Calf Serum Gold (FCS)	(Gibco) Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Geneticin (G418)-Sulfat-Lösung, $\text{C}_{20}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_{10} \cdot 2\text{H}_2\text{SO}_4$	(Gibco) Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Gentamycin (50 mg/ml)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Gibco™ MEM Non-Essential Amino Acids Solution	(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
N-2 Supplement (100x)	(Gibco) Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Nikotinamid, $\text{C}_6\text{H}_6\text{N}_2\text{O}$, 10 mM	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
OptiMEM™ Medium	RPMI 1640 Medium
Penicillin (10.000 Units)/ Streptomycin (10 mg/ml), (P/S)	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
TrypLE™ Select Enzyme (1X), no phenol red	Gibco) Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Trypsin (5 %) - EDTA (2 %) in 10x PBS	(PAA) GE Healthcare, Galfont St Giles, Vereinigtes Königreich

2.12 Plasmide und Expressionsvektoren

Tabelle 14: Dargestellt sind die in der Arbeit verwendeten Expressionsvektoren, sowie deren Verwendungszweck und Herkunft.

Vektor	Verwendungszweck	Herkunft
pcDNA4_GFP	Heterologe Expression von GFP	Institut für Humangenetik, Universität Regensburg
pcDNA4_GFP_NRTN:G	Heterologe Expression von NRTN:G und GFP	Institut für Humangenetik, Universität Regensburg
pcDNA4_GFP_NRTN:A	Heterologe Expression von NRTN:A und GFP	Institut für Humangenetik, Universität Regensburg

2.13 Oligonukleotide

2.13.1 Verwendete Primer für die quantitative real-time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Tabelle 15: Dargestellt sind die für qRT-PCR Versuche verwendeten Primer, sowie deren 5'-3'-Sequenz und Sondennummer.

Primernamen	5'-3'-Sequenz	Sondennummer
<i>CD46</i> -RT-F	AATTTGTGTTGTCCCGTACAGA	69
<i>CD46</i> -RT-R	TCTGTGGGTCTCATCAGTTAGG	69
<i>c-FOS</i> -qRT-F	ACTACCACTCACCCGCAGAC	67
<i>c-FOS</i> -qRT-R	CCAGGTCCGTGCAGAAGT	67
<i>HPRT1</i> -qRT-F	TGATAGATCCATTCTATGACTGTAGA	73
<i>HPRT1</i> -qRT-R	AAGACATTCTTTCCAGTTAAAGTTGAG	73
<i>P21</i> -qRT-F	TCACTGTCTTGTACCCTTGTGC	32
<i>P21</i> -qRT-R	GGCGTTTGGAGTGGTAGAAA	32
<i>VEGF</i> -qRT-F	GCAGCTTGAGTTAAACGAACG	12
<i>VEGF</i> -qRT-R	GGTCCCGAAACCCTGAG	12

2.13.2 Verwendete Primer für die reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Tabelle 16: Dargestellt sind die für RT-PCR Versuche verwendeten Primer und ihre 5'-3'-Sequenz

Primername	5'-3'-Sequenz
<i>GUSB</i> -Ex11-12-RT-F	GGTTGGAGAGCTCATTTGGA
<i>GUSB</i> -Ex11-12-RT-R	CACGCAGGTGGTATCAGTCTT
<i>NRTN</i> -RT-F	TGCTGTCCATCTGGATGTGTCGAG
<i>NRTN</i> -RT-R	AGCTCGTGACCGTGTGGTA
<i>Nrtn</i> -RT-F	TGCTATCTGTCTGGATGTGCCAGG
<i>Nrtn</i> -RT-R	CAGCTCTTGACGCGTGTGGTAG
<i>Sdha</i> _Ex11-RT-F	AAGTTGAGATTTGCCGATGG
<i>Sdha</i> _Ex15-RT-R	GCACAGTCAGCCTCATTCAA

2.14 Enzyme

Tabelle 17: Dargestellt sind die in der Arbeit verwendeten Enzyme, sowie deren Herkunft.

Enzym	Herkunft
GoTaq® DNA Polymerase	Promega Corporation, Madison, WI, USA
RNase free DNase Set	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland

3 Methoden

3.1 RNA-Isolierung

Zur RNA-Isolierung wurden die Zellpellets mit 700 µl Lyse-Puffer versetzt. Restliche Zellbestandteile wurden durch die Anwendung von Schredder-Säulen der Firma QIAGEN (Zentrifugation bei 12.000 rpm für 2 min in der Zentrifuge Biofuge pico) zerkleinert. Danach erfolgte die RNA-Isolierung und Aufreinigung mit dem PureLink™ RNA Mini Kit der Firma Thermo Fisher Scientific nach Herstellerangaben. Diese Anleitung wurde dahingehend abgeändert, dass zum Einen während des ersten Waschschruttes dem Waschpuffer I 70 µl RDD Puffer und 10 µl DNase beigefügt wurden (RNase free DNase Set von QIAGEN, Inkubationszeit 15 min bei RT). Des Weiteren wurde die RNA in 35 µl RNase freiem H₂O eluiert. Die finale Ausbeute wurde durch Spektrophotometrie am NanoDrop® ND1000 ermittelt. Abschließend wurden die RNA-Proben entweder gleich in der cDNA-Synthese eingesetzt oder bei -80°C gelagert.

3.2 cDNA-Synthese

Die Herstellung der cDNA wurde mit dem RevertAid RT Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Das vom Hersteller vorgegebene Protokoll wurde wie folgt modifiziert:

Da für verschiedene Versuche unterschiedliche Mengen an RNA aufgereinigt wurden, wurde pro Ansatz eine spezifische angegliche Menge von 250-1.000 ng RNA umgeschrieben. Hierzu wurden RNA und RNase freies H₂O in einem solchen Volumenverhältnis zueinander auf 11,5 µl aufgefüllt, dass in jedem der 8-Tube Strips (0,2 ml) die gleiche RNA Konzentration (6,25 – 25 ng/µl, je nach Ansatz) vorherrschte. Dazu wurde je 1 µl Random Hexamer Primer (100 µM) gegeben; der Ansatz gründlich gevortext und zentrifugiert (Zentrifuge Biofuge pico (Tischzentrifuge)). Anschließend erfolgte die Erstellung des Mastermix für die Synthese und Amplifikation der cDNA. Die Bestandteile und einzelnen Volumina an Mastermix für eine Probe sind Tabelle 18 zu entnehmen.

Tabelle 18: Dargestellt sind die Bestandteile und Volumina für einen cDNA-Synthese-Ansatz.

Bestandteile	Volumen
5x Reaction Buffer	4 µl

dNTPs (1,25 mM)	2 µl
Revert Aid: Reverse Transskriptase	1 µl
RNase freies H ₂ O	0,5 µl

Sowohl Mastermix als auch die Proben wurden währenddessen auf Eis gelagert. Die Proben wurden zunächst ohne den cDNA-Synthese Mastermix im Thermocycler peqSTAR platziert und es erfolgte der Annealing-Schritt (Tabelle 19). Darauf wurden je 7,5 µl des Mastermix zugegeben und die Ansätze in den Thermocycler zurückgestellt. Es schlossen sich die weiteren in Tabelle 19 genannten Schritte an.

Tabelle 19: Dargestellt sind die Schritte der cDNA Synthese.

Bezeichnung	Temperatur	Zeitdauer
Annealing (noch ohne Mastermix)	65°C	5 min
Konvertierung der RNA zu cDNA	25°C	10 min
	42°C	60 min
Hitzeinaktivierung	70°C	10 min

Die synthetisierte cDNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

3.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die zu untersuchenden Proteine wurden mittels Elektrophorese in SDS-Polyacrylamid Gelen ihrer Masse nach aufgetrennt. Die Gele setzten sich aus dem Sammelgel mit 3% Acrylamidgehalt und dem Trenngel mit unterschiedlicher Acrylamidkonzentration (siehe Tabelle 20) zusammen.

Tabelle 20: Dargestellt sind die Bestandteile der SDS-Polyacrylamid Gele (je 10 ml) mit Trenngel (8%, 12,5%, 15%, 17,5%), sowie Sammelgel (3%).

Bestandteil	Sammelgel (3%)	Trenngel (8%)	Trenngel (12,5%)	Trenngel (15%)	Trenngel (17,5%)
1M Tris/HCl (pH 6,8)	5,5 ml	-	-	-	-
1M Tris/HCl (pH 8,8)	-	3,8 ml	3,8 ml	3,8 ml	3,83 ml
H ₂ O dest.	3,4 ml	3,7 ml	3,0 ml	2,4 ml	1,795 ml
Acrylamid Lsg. (40%)	1,1 ml	2,5 ml	3,1 ml	3,8 ml	4,375 ml
SDS (20%)	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
APS (10%)	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	20 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

Die Dicke des Rahmens, in den die Gele gegossen wurden, betrug 1,5 cm. Nachdem die aus den Versuchen gewonnen Proben mit 5x Lämmli-Puffer versetzt und für 3-5

min auf 95°C aufgeheizt worden waren, wurden die auspolymerisierten Gele mit diesen beladen. Zur Orientierung wurden 2,5 µl PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10-170 kDa, Thermo Fisher Scientific) als Massenstandard hinzugegeben. Die beladenen Gele wurden in Gelkammern platziert, diese mit 1x SDS-Laufpuffer aufgefüllt und einer Gleichspannung ausgesetzt. Die Gleichspannung betrug 50 mV bis die Proben vom Sammelgel in das Trenngel eingelaufen waren, danach wurde die Spannung auf 150 mV angehoben.

3.4 Plasmid-Aufreinigung aus Bakterienkulturen

Für die Synthese und Vervielfachung der später benutzten Plasmid-DNA wurde der Bakterienstamm *E. coli* strain DH5α, welcher bereits das entsprechende Plasmid (generiert und bereitgestellt vom Institut für Humangenetik, Regensburg) integriert hatte, verwendet. Eine Pipettenspitze der Bakterien wurde aus der bei -80°C gekühlten Glycerolkultur entnommen und mit 100 ml LB-Medium inklusive 100 µg/ml Ampicillin angeimpft. Nach einer Inkubation über Nacht bei wurde das NucleoBond® XtraMidi Kit der MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG zur Plasmidaufreinigung nach Anleitung des Herstellers verwendet. Die Elution erfolgte in 25-100 µl H₂O_{reinst}. Abschließend wurde die DNA-Massenbestimmung mittels NanoDrop® ND1000 Spektrophotometer durchgeführt, sowie die Verdünnung mit H₂O_{reinst} auf eine Konzentration von 1 µg/µl vorgenommen.

3.5 Western Blot – Semi Dry Verfahren

Nach der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine vom Gel auf eine PVDF Membran transferiert. Hierzu wurde die PVDF Membran zuerst kurz in Methanol und 1x Towbin eingelegt. Daraufhin wurden Membran und Gel zwischen zwei mit Towbin getränkten Whatman Papierstücken (3 mm) in einer Kassette des Trans-Blot® Turbo™ Transfer Systems platziert. Zum Elektrotransfer wurde eine Spannung von 24 mV über einen Zeitraum von 25 – 40 min verwendet. Anschließend wurden die PVDF Membranen in die Blocklösung für Western Blot eingelegt und für 1 h auf dem Duomax 1030 Rocking Platform Shaker geschwenkt. Daraufhin wurden die Membranen in Falcontu-

bes (50 ml) platziert und die primäre Antikörper-Lösung für Western Blot mit zugesetztem primärem Antikörper (Verdünnungen siehe Tabelle 7) zugegeben. Nach der Inkubation über Nacht bei 3 – 5°C auf dem RM5 Rollschüttler, wurde die primäre Antikörperlösung durch TBS-T ersetzt. Es folgte eine 5-minütige Inkubation auf dem RS-TR5 Rollenmischer. Dieser Waschschrift wurde noch 2 weitere Male wiederholt. Im Anschluss erfolgte die Zugabe der sekundären Antikörper-Lösung für Western Blot mit zugesetztem sekundärem Antikörper (Verdünnungen siehe Tabelle 8) und eine 1-stündige Inkubation. Darauf folgten, wie zuvor, 3 weitere Waschschriffe mit TBS-T. Die PVDF Membranen wurden zur Entwicklung mit Clarity™ Western Blotting Substrate bzw. Clarity Max™ Western Blotting Substrate gründlich befeuchtet. Abschließend erfolgte die Signaldetektion mithilfe des Odyssey® Fc Imagers. Die Signalintensität wurde mit der Software Image Studio Software vermessen.

3.6 Kultivierung der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien

3.6.1 Hek293 Zellen

Hek293 Zellen wurden auf Zellkulturschalen (10 cm) in DMEM Medium mit den Zusätzen FCS (10%), P/S (1%) und G418 (1%) bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt kultiviert.

Die Vermehrung erfolgte im Verhältnis 1 : 10 auf Zellkulturschalen (10 cm). Hierzu wurden bei einer Konfluenz von etwa 90 % die Zellen in neuem Medium durch Auf- und Abpipettieren vom Boden gelöst und je 1 ml der Suspension mit 9 ml frischem Medium auf eine neue Zellkulturschale (10 cm) ausgebracht. Die Zellen wurden anschließend durch Schwenken gleichmäßig verteilt und alle 2 Tage unter dem Mikroskop kontrolliert.

3.6.2 ARPE-19 Zellen

ARPE-19 Zellen wurden auf Zellkulturschalen (10 cm) in DMEM F12 Medium mit den Zusätzen FCS (10%) und P/S (1%), bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt kultiviert.

Die Vermehrung erfolgte im Verhältnis 1 : 3 auf Zellkulturschalen (10 cm). Hierzu wurden die Zellen bei einer Konfluenz von etwa 90 % mit ca. 5 ml Dulbecco's PBS (DPBS) einmal gewaschen. Es folgte die Dissoziation mittels Zugabe von 2 ml Trypsin (0,5%)

– EDTA (0,2%) in PBS unter einer Inkubationszeit von 10 min (37°C). Die Reaktion wurde durch 10 ml frisches Medium gestoppt, die Zellen resuspendiert und je 4 ml auf neue Zellkulturschalen (10 cm) ausgebracht. 6 ml Medium wurden zugegeben, um auf 10 ml aufzufüllen. Die Zellen wurden anschließend durch Schwenken gleichmäßig verteilt und alle 2 Tage unter dem Mikroskop kontrolliert.

3.6.3 Weri-Rb1 Zellen

Weri-Rb1 Zellen wurden in Suspension in Zellkulturflaschen T25 (10 ml) in RPMI 1640 Medium mit den Zusätzen FCS (10%) und P/S (1%) bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt kultiviert.

Die Vermehrung erfolgte 1x pro Woche im Verhältnis ca. 1 : 3 in neue Zellkulturflaschen (10 ml). Hierzu wurden die Zellen in vorhandenem Medium durch Auf- und Abpipettieren aus ihren Zellverbänden gelöst und je 3 ml der Suspension in neue Flaschen gegeben. Danach wurde mit 7 ml frischem Medium aufgefüllt. Die Zellen wurden anschließend durch Schwenken gleichmäßig verteilt und alle 2 Tage unter dem Mikroskop kontrolliert.

3.6.4 BV-2 Zellen

BV-2 Zellen wurden auf Zellkulturschalen (10 cm) in DMEM F12 Medium mit den Zusätzen FCS (5%), P/S (1%) und 195 nM β -Mercaptoethanol (BME) (100%) bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt kultiviert.

Die Vermehrung erfolgte einmal pro Woche im Verhältnis 1 : 10 in 10 ml Zellkulturflaschen (T25). Hierzu wurden die Zellen mit ca. 5 ml DPBS einmal gewaschen. Es folgte die Ablösung der Zellen mittels Zugabe von 2 ml 0,4 mM EDTA in PBS und einer Inkubation von 60 min bei 37°C. Dann wurden noch ca. 5 ml DPBS hinzugefügt, die Zellen vom Boden gelöst, in ein 50 ml Falcontube überführt und für 5 min bei 1.000 rpm zentrifugiert (Zentrifuge Sigma 2-5). Es folgte ein Waschschrift mit DPBS und eine erneute Zentrifugation (Zentrifuge Sigma 2-5). Das Pellet wurde anschließend in 10 ml Medium resuspendiert, je 1 ml auf neue Zellkulturflaschen (10 ml) gegeben und diese mit 9 ml Medium auf 10 ml Endvolumen befüllt. Die Zellen wurden anschließend durch Schwenken gleichmäßig verteilt und alle 2 Tage unter dem Mikroskop kontrolliert.

3.6.5 hiPSC-RPE Zellen

Dem Protokoll von Brandl und KollegInnen (Brandl *et al.*, 2014) folgend wurden am Institut für Humangenetik hiPSC-RPE Zellen aus Fibroblastenzellen ausdifferenziert und kultiviert. Dieser Schritt und der Transfer der Zellen vom Matrigel auf Transwell Filter wurde freundlicherweise von Nico Hertel am Institut für Humangenetik übernommen.

Die hiPSC-RPE Zellen wurden auf Zellkultureinsätzen (12 Well Zellkulturplatten) in KnockOut™ DMEM Medium mit 2 mM L-Glutamin, KnockOut™ Serum Replacement (5 % v/v), 0,1 mM Gibco™ MEM Non-Essential Amino Acids Solution, 0,1 mM BME, 5 µg/ml Gentamycin und 10 mM Nicotinamid bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt kultiviert. Alle 2 Tage wurden die Zellen unter dem Mikroskop kontrolliert und ein Mediumwechsel durchgeführt.

3.7 Untersuchung der endogenen NRTN-Expression in ausgewählten Zelllinien

Die NRTN-Expression wurde in folgenden retinalen und nicht-retinalen Zelllinien untersucht: 661W, BV-2, ARPE-19, hiPSC-RPE-Zellen, Y79, Weri-Rb1, HUVEC und Hek293. Als Positivkontrolle für murine Zelllinien wurde murine Netzhaut eingesetzt. Als Positivkontrolle bei Überprüfung der mRNA-Expression in humanen Zelllinien wurde in die PCR das Plasmid pcDNA4-GFP-NRTN:G eingesetzt. Als Positivkontrolle bei Überprüfung der Protein-Expression in humanen Zelllinien wurden Hek293 Zellen, mit pcDNA4-GFP-NRTN:G transfiziert worden waren und somit heterolog NRTN:G exprimierten, eingesetzt.

3.7.1 Nachweis der Expression von NRTN durch RT-PCR

3.7.1.1 Durchführung der RT-PCR

Zur Überprüfung der endogenen *NRTN*-Expression in Zelllinien wurde zunächst eine RNA-Isolierung (siehe 3.1) gefolgt von einer cDNA-Synthese (siehe 3.2) durchgeführt. Die cDNA wurde auf eine Konzentration von 25 ng/µl mit H₂O_{reinst} verdünnt. 2 µl dieser

cDNA Proben wurden jeweils in die Taschen der 8-Tube Strips (0,2 ml) vorgelegt und dazu 23 µl des in Tabelle 21 aufgeführten Mastermixes gegeben.

Tabelle 21: Dargestellt sind die Bestandteile und Volumina für eine Probe des RT-PCR Mastermixes.

Bestandteile	Volumen
5x Green GoTaq® Reaction Buffer	5 µl
Primer forward (10 µM)	1 µl
Primer reverse (10 µM)	1 µl
dNTPs (1,25 mM)	1 µl
GoTaq® DNA Polymerase	0,25 µl
Dimethylsulfoxid (DMSO) NUR bei Ansätzen für <i>NRTN</i> / <i>Nrtn</i>	1 µl
H ₂ O _{reinst}	14,75 µl bzw. 13,75 µl

Anschließend wurden unterschiedliche, auf die jeweiligen Primerkombinationen abgestimmte PCR Programme durchgeführt (Tabelle 22).

Tabelle 22: Dargestellt sind die Reaktionsschritte der RT-PCR für unterschiedliche Primer.

Bezeichnung	Temperatur	Zeitdauer	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	95°C	3-5 min *	
Schritt 1: Denaturierung	95°C	30 s	35
Schritt 2: Annealing	59-64°C **	30 s	
Schritt 3: Elongation	72°C	20-60 s ***	
Finale Elongation	72°C	5 min	
Pause	4-10°C	∞ min	

* für *GUSB* und *Sdha* 3 min; für *NRTN* und *Nrtn* 5 min; - für *Nrtn* Primer 65°C

** für *GUSB* und *Sdha* 59°C; für *NRTN* 64°C; für *Nrtn* 65°C

*** für *GUSB* und *Sdha* 60 s; für *NRTN* 40 s; für *Nrtn* 20 s

3.7.1.2 Agarosegelelektrophorese

Die Ansätze wurden nach der RT-PCR auf 1,75-prozentige Agarosegele (150 ml TBE; 2,625 g Agarose; ca. 20 µl Ethidiumbromid-Lösung (0,07%)) geladen und bei 200 V aufgetrennt. Abschließend wurden die DNA-Banden im Transilluminator UST-30_M-8R visualisiert.

3.7.2 Nachweis von vorhandenem, produziertem NRTN Protein durch Western Blot Analysen

Für den NRTN-Nachweis mittels Western Blot wurden die vorhandenen Zellpellets zunächst in 100-300 µl PBS gelöst. Danach erfolgte die Zerstörung der Zellen durch Ultraschall (Ultraschallgerät Vibra Cell VCX400; Amplitude: 38%; Zeitdauer: 15 s). Die Proteinkonzentrationen der Zelllysate wurden mithilfe der Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976) unter Verwendung von Roti®-Quant ermittelt. Die Absorption der Proben wurde im Photometer Ultrospec 2100 pro gemessen. Von den Proben wurden gleiche Proteinmengen in die folgende Western Blot Analyse eingesetzt. Es wurden, gemäß der ermittelten Proteinkonzentrationen, 5-20 µl Probe jeweils mit 1,2-5 µl 5x Lämmli Puffer versetzt und für 5 min auf 93-95°C erhitzt. Im Anschluss wurden die Proben wie unter Punkt 3.3 erwähnt, gelelektrophoretisch aufgetrennt und daraufhin einer Western Blot Analyse (3.4) mit Antikörpern gegen ACTB und NRTN unterzogen.

3.8 Aussäen von Zellen für funktionelle Assays

3.8.1 Aussaat von Hek293 Zellen

Von Hek293 Zellen, welche in 10 cm Zellkulturschalen eine Konfluenz von ca 90% erreicht hatten, wurde das Medium entfernt und durch 10-12 ml neues DMEM Medium mit den Zusätzen FCS (10%), P/S (1%) und G418 (1%) ersetzt. Die Zellen wurden darin durch Auf- und Abpipettieren vom Boden der Platte gelöst. Im nächsten Schritt wurde das Verdünnungsverhältnis 1 : 18 bis 1 : 40 der Zellsuspension in die entsprechenden Wells der Zellkulturplatten gegeben (Tabelle 23). Danach wurde mit DMEM Medium; FCS (10%), P/S (1%) und G418 (1%) auf die in Tabelle 23 gezeigten Volumina aufgefüllt. Nach dem Aussäen wurden die Zellen bis zur Transfektion für 24 h bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt bebrütet.

Tabelle 23: Dargestellt sind jeweiligen Verdünnungsverhältnisse für unterschiedliche Wellformate bei Hek293 Zellen.

Wellformat	Anteil der Zellen einer 10 cm Zellkulturschale	Füllvolumen
6-Well Zellkultur-Platte	1 : 18	2 ml
12-Well Zellkultur-Platte	1 : 30 – 1 : 40	1 ml

3.8.2 Aussaat von ARPE-19 Zellen

Von ARPE-19 Zellen, welche in 10 cm Zellkulturschalen eine Konfluenz von ca 90 % erreicht hatten, wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 5 ml DPBS gewaschen. Nach diesem Waschvorgang wurde das DPBS durch 2 ml Trypsin-Lösung (0,5% Trypsin, 0,2% EDTA, in PBS) ersetzt und die Zellen für 10 min bei 37°C inkubiert. Die Ablösung der ARPE-19 Zellen wurde unter dem Mikroskop kontrolliert. Um die Reaktion des Trypsins zu stoppen, wurden 8-10 ml DMEM-F12 Medium mit FCS (10%) und P/S (1%) hinzugegeben. Durch Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen vollständig vom Boden der Platte gelöst und in Suspension gebracht. Schließlich wurde das Verdünnungsverhältnis 1 : 6 bis 1 : 14 der Zellsuspension in die entsprechenden Wells der Zellkulturplatten gegeben (siehe Tabelle 24). Danach wurde mit DMEM-F12 Medium inklusive FCS (10%) und P/S (1%) auf die in Tabelle 24 gezeigten Volumina aufgefüllt und die Zellen bis zur Transfektion für 24 h bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt inkubiert.

Tabelle 24: Dargestellt sind jeweiligen Verdünnungsverhältnisse für unterschiedliche Wellformate bei ARPE-19 Zellen.

Wellformat	Anteil der Zellen einer 10 cm Zellkulturschale	Füllvolumen
6-Well Zellkultur-Platte	1 : 6	2 ml
12-Well Zellkultur-Platte	1 : 10 – 1 : 14	1 ml

3.8.3 Aussaat von Weri-Rb1 Zellen

Um Weri-Rb1 Zellen für funktionelle Versuche auszusäen, wurden zunächst Zellkulturplatten (10 cm) mit Poly-L-Lysin beschichtet, indem 5 ml Poly-L-Lysin-Lösung eingefüllt und diese für 1 h in den Platten belassen wurde. In der Zwischenzeit wurden die Zellsuspensionen aus je 3-4 Zellkulturflaschen T25 (10 ml) mit Weri-Rb1 Zellen in einem Falcontube (50 ml) vereinigt. Daraufhin wurden die Zellen in der Zentrifuge Sigma 2-5 bei 1.000 rpm für 5 min abzentrifugiert (Zentrifuge Sigma 2-5). Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in 10 ml RPMI 1640 Medium mit FCS (10%) und P/S (1%) suspendiert. Im nächsten Schritt wurde die Poly-L-Lysin-Lösung aus den Zellkulturplatten (10 cm) entfernt und die gesamte Zellsuspension eines Falcontubes (50 ml) auf jeweils eine der nun beschichteten Platten gegeben. Daraufhin wurden die Zellen über Nacht bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt inkubiert. Am nächsten Tag wurde

das Medium abgezogen, die nun adhären Weri-Rb1 Zellen mit 5 ml DPBS gewaschen und darauf mit 3 ml Trypsin (0,5% Trypsin, 0,2% EDTA, in PBS) versetzt. Nach 10 min Inkubation bei 37°C wurden die Weri-Rb1 Zellen in 10 ml RPMI 1640 Medium mit FCS (10%) und P/S (1%) resuspendiert. Im Anschluss wurde die Zellsuspension für 5 min bei 1.000 rpm zentrifugiert (Zentrifuge Sigma 2-5) und anschließend wieder in ca. 6 ml RPMI 1640 Medium mit P/S (1%) gelöst. Die Zellen wurden darauf mithilfe des CASY Model TT – Cell Counter and Analyzer gezählt und definierte Zellzahlen in die spezifischen Wellformate ausgesät (Tabelle 25). Abschließend erfolgte die Inkubation bis zu Transfektion (Differenzierungsversuch) oder Versuchsdurchführung (oxidativer Stress-Versuch) für 24 h bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt.

Tabelle 25: Dargestellt sind, bezogen auf die unterschiedlichen funktionellen Versuche, die jeweiligen Zellzahlen für unterschiedliche Wellformate bei Weri-Rb1 Zellen.

Versuchstyp	Wellformat	Zellzahl	Füllvolumen
Versuche zur Differenzierung (3.11)	12 Well Zellkultur-Platte	6-8*10 ⁵	1 ml
Versuche zur Induktion von oxidativem Stress (3.14)	12 Well Zellkultur-Platte	2*10 ⁶	1 ml

3.8.4 Aussaat von BV-2 Zellen

Das Vorgehen bei Ablösung der Zellen, Zentrifugation und sich anschließenden Waschschritten ist in Punkt 3.6.4 beschrieben. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in DMEM F12 Medium mit den Zusätzen FCS (5%), P/S (1%) und 195 nM BME in Suspension gebracht. Schließlich wurde ein Verhältnis von 1 : 28 der Zellsuspension in die entsprechenden Wells der 48-Well Zellkulturplatten gegeben. Danach wurde mit DMEM-F12 Medium inklusive FCS (5%), P/S (1%) und 195 nM BME auf 250 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und die Zellen bis zur Transfektion für 24 h bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt inkubiert.

3.9 Transfektion von Zellen zur heterologen Proteinexpression

3.9.1 Transfektion von Hek293 Zellen

Die Transfektion von Hek293 Zellen wurde mit dem TransIT®-LT1 Transfektionsreagenz der Firma Thermo Fisher Scientific durchgeführt. Zuerst wurde der Transfektionsansatz in Reaktionsgefäßen (1,5 ml) vorbereitet. Die Zusammensetzung des Ansatzes ist in Tabelle 26 gezeigt.

Tabelle 26: Dargestellt sind die Bestandteile und deren Volumina der Transfektionsansätze für unterschiedliche Zellkulturplattenformate.

Bestandteil	6-Well Zellkultur-Platte	12-Well Zellkultur-Platte	24-Well Zellkultur-Platte
DMEM Medium mit (P/S) (1%) und G418 (1%)	250 µl	100 µl	50 µl
TransIT®-LT1 Transfektionsreagenz	7,5 µl	3 µl	1,5 µl
Plasmidpräparation (1 µg/ml)	2,5 µl	1 µl	0,5 µl

Nachdem die einzelnen Reagenzien zusammengemischt worden waren, wurde der Ansatz für 20 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen für die Transfektion vorbereitet, indem das Kultivierungsmedium durch dieselbe Menge an FCS-freiem Medium ersetzt wurde. Nach Verstreichen der Inkubationszeit wurde der Transfektionsansatz tropfenweise in das jeweilige Well pipettiert. Daraufhin wurden die Zellen wieder bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt im Brutschrank bebrütet.

3.9.2 Transfektion von ARPE-19 Zellen

Die Transfektion von ARPE-19 Zellen erfolgte mit dem Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent Kit der Firma Thermo Fisher Scientific. Zu Beginn wurden in Reaktionsgefäßen (1,5 ml) jeweils 2 Transfektionsansätze pro zu transfizierendes Well angesetzt. In Tabelle 27 ist die Zusammensetzung dieser Ansätze aufgelistet.

Tabelle 27: Dargestellt sind die Bestandteile und deren Volumina der 2 Transfektionsansätze für das 6-Well und 12-Well Zellkulturplattenformat.

Ansatz-Nr.	Bestandteil	6-Well Zellkultur-Platte	12-Well Zellkultur-Platte
1	DMEM-F12 Medium mit P/S (1%)	125 µl	50 µl
	Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent	10 µl	1,5 µl

2	DMEM-F12 Medium mit P/S (1%) oder OptiMEM™ Medium	125 µl	50 µl
	P3000 Reagent	10 µl	4 µl
	Plasmidpräparation (1 µg/ml)	2,5 µl	2 µl

Anschließend wurden beide Ansätze in einem gemeinsamen Reaktionsgefäß (1,5 ml) vereinigt und gut durchmischt. Diese Mischung wurde daraufhin für 20 min bei RT inkubiert. Die ARPE-19 Zellen wurden vorbereitet, indem das vorhandene Kultivierungsmedium durch dieselbe Menge an FCS-freiem Medium ersetzt wurde (Tabelle 24). Abschließend wurde der Transfektionsansatz tröpfchenweise zupipettiert und die Zellen wieder bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt inkubiert.

3.9.3 Transfektion von Weri-Rb1 Zellen

Die Transfektion von Weri-Rb1 Zellen erfolgte mit dem Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent Kit der Firma Thermo Fisher Scientific, wie in Abschnitt 3.9.2 für ARPE-19 Zellen erläutert, jedoch unter Verwendung von RPMI 1640 Medium. Auch hier erfolgte vor der Transfektion der Zellen ein Mediumwechsel in FCS freies Kultivierungsmedium. Für den Differenzierungsassay (siehe 3.11), wurde jedem Well 30 µl N-2 Supplement (100x) beigelegt (Hirooka *et al.*, 2002).

3.9.4 Transfektion von BV-2 Zellen

Die Transfektion von BV-2 Zellen wurden mit dem TransIT®-LT1 Transfektionsreagenz der Firma Thermo Fisher Scientific durchgeführt. Zuerst wurde der Transfektionsansatz in Reaktionsgefäßen (0,5 ml) vorbereitet. Die Zusammensetzung des Ansatzes pro Well bestand aus 26 µl OptiMEM™ Medium mit P/S (1%) und 195 nM BME, 1,02 µl TransIT®-LT1 Transfektionsreagenz und 0,26 µl Plasmidpräparation (1 µg/ml). Nachdem die einzelnen Reagenzien zusammengemischt worden waren, wurde der Ansatz für 20 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen für die Transfektion vorbereitet, indem das Kultivierungsmedium durch ca. 230 µl an FCS freiem Medium ersetzt wurde. Nach Verstreichen der Inkubationszeit wurde der Transfektionsansatz tropfenweise in das jeweilige Well pipettiert. Daraufhin wurden die Zellen wieder bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt im Brutschrank bebrütet.

3.10 Untersuchung der Expression und Sekretion von NRTN in Hek293 Zellen

Untersuchungen zur NRTN Expression und Sekretion in transfizierten Hek293 Zellen erfolgten auf 6-Well Zellkulturplatten (Aussäen siehe Punkt 3.8.1). Nach einer Inkubation der ausgesäten Zellen für 18 – 24 h erfolgte die Transfektion (3.9.1) mit NRTN-Expressionsvektoren pcDNA4-GFP-NRTN:G und pcDNA4-GFP-NRTN:A, sowie mit dem Kontrollvektor pcDNA4-GFP. Darauf wurden die Zellen für 3 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Um sowohl Expression als auch Sekretion von NRTN beurteilen zu können, wurden Zellpellet, ECM und Überstand analysiert. Zunächst erfolgte die Abnahme des Überstandes und Überführung in Reaktionsgefäße (2 ml). Um noch vorhandenes Zellmaterial zu entfernen, wurde der Überstand bei 2.000 rpm für 3 min zentrifugiert (Zentrifuge Biofuge fresco) und daraufhin in ein neues Reaktionsgefäß (2 ml) überführt. Hieraus wurden 100 µl Überstand entnommen, 20 µl 5x Lämmli-Puffer hinzugegeben und für 5 min bei 95°C erhitzt. Der verbliebene Überstand konnte bei -20°C aufbewahrt werden. Die anhaftenden Zellen wurden in 500 µl PBS suspendiert und diese Suspension in Reaktionsgefäße (1,5 ml) gefüllt. Nach der Zentrifugation bei 2.000 rpm für 3 min (Zentrifuge Biofuge fresco) wurde das PBS abpipettiert und das Pellet erneut in 200 µl PBS suspendiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Sonifizierung der Zellen mit einer Amplitude von 38% für 15 s mithilfe des Ultraschallgeräts Vibra Cell VCX400. Die Zellysate wurden mit 50 µl 5x Lämmli-Puffer versetzt und für 5 min bei 95°C aufgekocht. Die in den Wells verbliebene ECM wurde zunächst 5-mal mit 1 ml H₂O_{reinst} gewaschen. Anschließend wurde die verbleibende Flüssigkeit aus den Wells entfernt und 50 µl heißer 1x Lämmli-Puffer inklusive 100 mM DTT (Zusammensetzung siehe Tabelle 28) aufpipettiert. Die ECM wurde durch gründliches Schaben mit einem Zellschaber von der Welloberfläche gelöst (nach Hellewell, Rosini and Adams, 2017) und im 1x Lämmli Puffer inklusive 100 mM DTT in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss wurden die gewonnen ECM Proben bei 95°C für 5 min geheizt.

Tabelle 28: Dargestellt ist die Herstellung von 10 ml 1x Lämmli Puffer inklusive 100 mM DTT.

Bestandteile	Volumen
H ₂ O	8 ml
Lämmli-Puffer 5x	2 ml
DTT	154 mg

Alle Proben wurden bis zum Aufkochen mit Lämmli Puffer auf Eis gelagert und darauf bis zur Western Blot Analyse bei 20 °C eingefroren.

Die Proben wurden auf 12,5-prozentigen SDS-Polyacrylamidgele (Herstellung siehe Tabelle 20) aufgetragen und in Western Blot Analysen mit Antikörpern gegen NRTN und ACTB eingesetzt.

Ein Teil des Überstandes wurde zur besseren Visualisierung möglicher Spaltprodukte bzw. des aktiven Proteins vor der Western Blot Analyse in 15-prozentigen SDS-Polyacrylamidgele (Herstellung siehe Tabelle 20) aufgetrennt.

3.11 Untersuchung des Einflusses von NRTN auf die Differenzierung von Weri-Rb1 Zellen

$6 \cdot 10^5$ – $8 \cdot 10^5$ Zellen wurden nach dem in Abschnitt 3.8.3 beschriebenen Vorgehen in Poly-L-Lysin beschichtete 12-Well Zellkulturplatten ausgesät, für 18-24 h inkubiert und anschließend, wie in Punkt 3.9.3 erläutert, mit den Vektoren pcDNA4-GFP-NRTN:G, pcDNA4-GFP-NRTN:A und dem Kontrollvektor pcDNA4-GFP transfiziert. Darauf wurden die Zellen für 5 Tage in Medium mit N-2 Supplement (siehe Punkt 3.9.3) kultiviert (Hirooka *et al.*, 2002). Mithilfe des Nikon Eclipse TE2000-S wurden Aufnahmen bei 40-facher Vergrößerung unter UV-Fluoreszenz zur Visualisierung transfizierter Zellen (enthalten GFP) und unter Weißlicht mit Phasenkontrast zur Visualisierung der Morphologie angefertigt. Daraufhin wurde von den transfizierten (= GFP-gefärbten) Zellen die Anzahl der Zellfortsätze ermittelt. Die Ergebnisse aus insgesamt fünf unabhängigen Experimenten wurden zusammengefasst, wobei eines dieser Experimente von Franziska Groß im Rahmen ihrer medizinischen Dissertation durchgeführt wurde.

3.12 Untersuchung der Induktion von Autophagie an ARPE-19 Zellen

Zu Beginn wurden ARPE-19 Zellen wie in Abschnitt 3.8.2 erläutert, im Verhältnis 1 : 10 auf zwölf 12-Well Zellkulturplatten ausgebracht. Nach einer Inkubation von 18 - 24 h erfolgte die Transfektion der Zellen (siehe 3.9.2) mit den Vektoren pcDNA4-GFP-NRTN:G, pcDNA4-GFP-NRTN:A und dem Kontrollvektor pcDNA4-GFP (jeweils 4 Wells). Darauf wurden die Zellen für 2 Tage bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt inkubiert.

Zwei der 4 je gleich transfizierten Wells wurden mit H₂O₂ behandelt, zwei blieben unbehandelt. Für die H₂O₂ Behandlung wurde das vorhandene OptiMEM™ Medium abgesaugt, die Zellen 1x mit 500 µl PBS gewaschen und 1 ml DMEM-F12 mit P/S (1%) zugefügt. Danach erfolgte die Zugabe von 1 mM H₂O₂ (0,1 µl aus einer 34-prozentigen H₂O₂-Lösung) in diese Wells, gefolgt von einer 2-stündigen Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ (nach Szatmári-Tóth *et al.*, 2016). Darauf wurde der Überstand von allen Wells entfernt und die Zellkulturplatte auf Eis gestellt. Nun wurden in die Wells 500 µl PBS gegeben und die ARPE-19 Zellen mechanisch unter Verwendung eines Zellschabers vom Boden der Wells abgelöst und in Suspension gebracht. Die Zellsuspensionen wurden in Reaktionsgefäße (1,5 ml) überführt und anschließend für 5 min bei 4.000 rpm zentrifugiert (Zentrifuge Biofuge fresco). Das PBS wurde abpipettiert und das Zellpellet in 120 µl neuem PBS resuspendiert. Dann erfolgte die Sonifizierung der Zellen bei einer Amplitude von 38% für 15 s. Alle Proben wurden bis zur Zugabe von Lämmli-Puffer auf Eis gelagert. Abschließend wurden die Proben mit 30 µl 5x Lämmli Puffer versetzt und bei 95°C für 3-5 min aufgekocht. Die wie oben erläutert gewonnenen Proben wurden mithilfe des unter Punkt 3.4 aufgeführten Western Blot Verfahrens analysiert.

3.13 Analyse der ECM Zusammensetzung von ARPE-19 Zellen

3.13.1 Vorbereitung der Zellen und Kultivierung

Im ersten Schritt wurden ARPE-19 Zellen, wie in 3.8.2 beschrieben, auf 6-Well Zellkulturplatten ausgebracht. Nach einer Inkubationszeit von 18-24 h wurden die Zellen, wie unter Punkt 3.9.2 erläutert, mit den Plasmiden pcDNA4-GFP-NRTN:G, pcDNA4-GFP-NRTN:A und dem Kontrollvektor pcDNA4-GFP transfiziert. Am nächsten Tag erfolgte eine Überprüfung der Transfektionseffizienz anhand der Visualisierung GFP-fluoreszierender Zellen mit dem Nikon Eclipse TE2000-S (Abbildung 3).

Sofern eine vergleichbare Transfektionseffizienz für die Plasmide pcDNA4-GFP-NRTN:G und pcDNA4-GFP-NRTN:A gegeben war, erfolgte der Transfer der Zellen auf Filter.

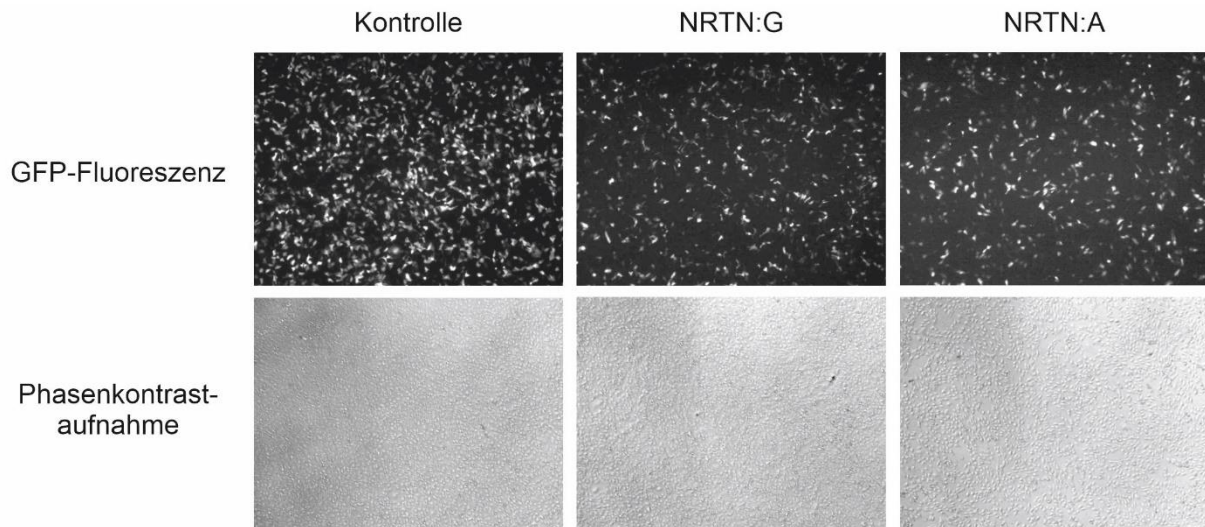


Abbildung 3: Fluoreszenzmikroskopische Kontrolle der Transfektionseffizienz nach Transfektion von ARPE-19 mit den Plasmiden pcDNA4-GFP-NRTN:G, pcDNA4-GFP-NRTN:A und dem Kontrollvektor pcDNA4-GFP.

ARPE-19 Zellen wurden mit den oben genannten Vektoren transfiziert. Am Folgetag wurde die Transfektionseffizienz anhand der GFP-Fluoreszenz in einem inversen Epifluoreszenzmikroskop im Vergleich mit den zugehörigen Phasenkontrastbildern ermittelt. Eine 10-fache Vergrößerung wurde verwendet; Belichtungszeit GFP-Fluoreszenz:1,5 s.

3.13.2 Transfer der Zellen auf Zellkultureinsätze

Die Zellen wurden, wie unter Punkt 3.8.2 beschrieben, vom Boden der Wells abgelöst. Darauf wurden die Zellkonzentrationen in je 60 µl der Zellsuspensionen im CASY Model TT ermittelt. Auf jeden Filter wurden $1,0-1,5 \cdot 10^5$ Zellen ausgesät. Darauf wurden die Filter auf 1 ml und das Well darunter auf 1,5 ml mit DMEM-F12 Medium inklusive FCS (10%) und P/S (1%) aufgefüllt. Die Zellen wurden anschließend für 4 Wochen auf den Filtern kultiviert, wobei alle 2-3 Tage ein Mediumwechsel mit DMEM-F12 inklusive P/S (1%) erfolgte.

3.13.3 Western Blot Analyse der ECM auf den Filtern

Für Western Blot Analysen der ECM erfolgte ein Dezellularisierungsschritt (nach Hellewell, Rosini and Adams, 2017). Hierzu wurde zunächst der Überstand entfernt und die Zellen auf dem Filter mit DPBS gewaschen. Nach Absaugen des DPBS wurden die Zellen lysiert, indem Hellewell-Lysereagenz auf Filter (0,5 ml) und Boden (1,5

ml) gegeben und für 5 min bei 37°C inkubiert wurde. Darauf wurde das Reagenz abgesaugt und Rückstände durch 3-maliges Waschen mit DBPS von der Platte entfernt. Zur Erstellung der Proben für den Western Blot wurde das DPBS aus den Filtern abgesaugt, die Filter vorsichtig mit einer Pinzette aus der Halterung gelöst und jeweils in einer 24-Well Zellkulturplatte positioniert. Die Filter wurden 5-mal mit 300 µl PBS gewaschen und mikroskopisch auf Zellen kontrolliert. War kein Zellmaterial mehr zu entdecken, wurde die Flüssigkeit aus den Wells abgenommen. Es folgte die Ablösung der ECM vom Filter und Fixierung der Proteine in 50 µl heißem 1x Lämmli Puffer mit 100 mM DTT, wie in Abschnitt 3.10 beschrieben. Nach Aufheizen der Proben auf 95°C für 5 min wurden die Proben mithilfe des unter Punkt 3.4 aufgeführten Western Blot Verfahrens analysiert.

3.13.4 Immunzytochemische (ICC) Analyse der ECM auf den Filter

Wie in Punkt 3.13.3 beschrieben, wurde zunächst das DPBS abgesaugt und die Filter in Wells einer 24-Well Zellkulturplatte transferiert. Es schlossen sich 2 Waschschrte mit 300 µl PBS und jeweils 1-2 min Inkubationszeit an. Die nun gereinigten Filter wurden für 10 min durch Zugabe von 300 µl PFA-Lösung fixiert (nach Hellewell, Rosini and Adams, 2017). Die PFA-Lösung wurde anschließend abgenommen und die Wells 3-mal mit PBS gewaschen, wobei jedes Mal die Waschlösung 5 min auf den Filtern belassen wurde. Danach erfolgte das Blocken der Filter unter Verwendung von je 300 µl der ICC-Blocklösung (Tabelle 2) für eine halbe Stunde.

Nach dem Blocken wurden die Filter aus den Wells herausgenommen und in 3 oder 4 gleich große Teile geschnitten. Dieser Schritt ermöglichte es, mehrere Proteine auf nur einem Filter zu färben. Jedes der Filterstücke wurde anschließend wieder in ein Well der 24-Well Zellkulturplatte gelegt. Dann erfolgte die Zugabe von 300 µl der ICC-Antikörperlösung (Tabelle 2) inklusive primärer Antikörper (Antikörperverdünnungen siehe Tabelle 7).

Es folgte eine Inkubationszeit auf dem Duomax 1030 Rocking Platform Shaker für mindestens 1 h. Im Anschluss wurden 3 Waschschrte mit jeweils 300 µl PBS und einer jeweiligen Inkubationszeit von 5 min durchgeführt. Daraufhin wurde im Dunkeln die Färbung mit den sekundären Antikörpern durchgeführt. Hierfür wurden 300 µl der ICC-

Antikörperlösung inklusive sekundärer Antikörper (Antikörperversdünnungen siehe Tabelle 8) inklusive DAPI (1 : 2000 aus der DAPI-Lösung) zugegeben und für 30 min inkubiert.

Danach folgten wiederum 3 Waschschrirte wie zuvor beschrieben. Die gewaschenen Filterstücke wurden eingebettet. Hierzu wurden sowohl Deckgläschen als auch Objektträger mit Dako Eindeckmedium beträufelt und die Filter anschließend möglichst ohne Luft einzuschließen zwischen beiden konserviert. Daraufhin wurden die Objektträger mindestens einen Tag lichtgeschützt bei 4°C gelagert. Die Auswertung erfolgte durch Fluoreszenzmikroskopie mithilfe des Axio Imager 2 Confocal-Mikroskop (Carl Zeiss AG) und 20-facher Vergrößerung.

3.14 Untersuchung des Einflusses von oxidativem Stress auf Zellen mittels qRT-PCR

Dieser Versuch erfolgte an hiPSC-RPE/ Weri-Rb1 Zellen, die auf NRTN-haltiger ECM kultiviert worden waren. In Vorversuchen am Institut für Humangenetik wurde gezeigt, dass Hek293 Zellen, die mit NRTN-Expressionsvektoren transfiziert worden waren, nach 3 Tagen Inkubation NRTN-haltige ECM produzieren.

Nach Ablösung der Hek293 Zellen von der ECM wurden hiPSC-RPE- bzw- Weri-Rb1 Zellen auf diese aufgebracht und oxidativem Stress unterzogen. Im Anschluss erfolgte eine Untersuchung der Veränderung der Genexpression spezifischer Zielgene mittels qRT-PCR.

3.14.1 Produktion NRTN-haltiger ECM mithilfe von Hek293 Zellen

3.14.1.1 Für Versuche an hiPSC-RPE-Zellen

Zur Herstellung der ECM für hiPSC-RPE-Zellen wurden Hek293 Zellen wie unter Punkt 3.8.1 beschrieben auf 12-Well Zellkulturplatten ausgebracht und nach 18-24 h mit den Vektoren pcDNA4-GFP-NRTN:G, pcDNA4-GFP-NRTN:A und dem Kontrollvektor pcDNA4-GFP transfiziert (siehe 3.9.1). Nach 3 Tagen wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen geerntet, indem sie mithilfe von 300-400 µl DPBS vom Boden gespült wurden. Die so entstandenen Zellsuspensionen wurden in Reaktionsgefäße (1,5 ml)

überführt und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert. Zur sicheren Entfernung aller zellulären Rückstände erfolgte die Behandlung der Wells mit jeweils 200 µl steril filtriertem Hellewell-Lysereagenz. Das Reagenz wurde 5 min unter Schwenken auf der ECM belassen und anschließend abgesaugt. Darauf erfolgten 5 Waschschrte mit 1 ml H₂O_{reinst.} Auf die so gewonnen NRTN-haltige ECM konnten nun hiPSC-RPE Zellen ausgesät werden.

Um die Transfektionseffizienz und heterologe NRTN-Expression durch die transfizierten Hek293 Zellen zu testen, wurden die zuvor geernteten Zellen Western Blot Analysen unterzogen. Hierzu wurden die geernteten Hek293 Zellen bei 4000 rpm abzentrifugiert (Zentrifuge Biofuge fresco (Tischzentrifuge)) und in 200 µl PBS suspendiert. Danach folgte die Sonifizierung (Amplitude: 38%; Zeit: 15 s) und die Zugabe von 50 µl 5x Lämmli Puffer. Die Proben wurden anschließend auf 95°C für 3-5 min erhitzt und in Western Blot Analysen mit Antikörpern gegen NRTN, GFP und ACTB eingesetzt. Dies ist in Abbildung 4 beispielhaft für einen Versuch gezeigt. In den pcDNA4-GFP-NRTN:G und pcDNA4-GFP-NRTN:A transfizierten Zellen wurde eine vergleichbar starke heterologe NRTN Expression nachgewiesen.

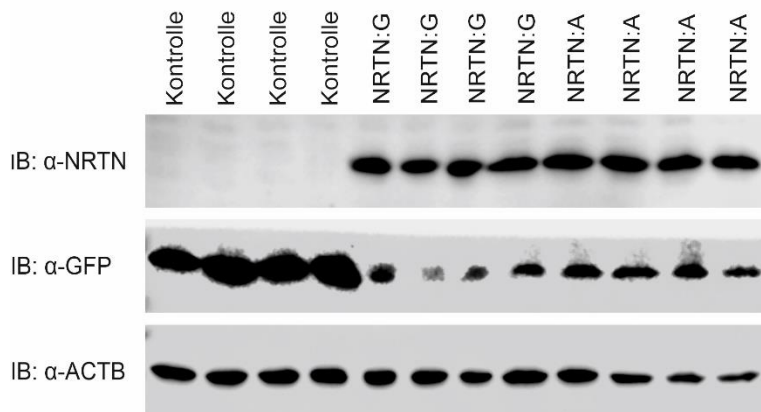


Abbildung 4: Western Blot Analyse zur Kontrolle der erfolgreichen Transfektion der Hek293 EBNA Zellen.

Hek293 EBNA Zellen wurden mit den Vektoren pcDNA4-GFP-NRTN:G, pcDNA4-GFP-NRTN:A und dem Kontrollvektor pcDNA4-GFP transfiziert, für 3 Tage inkubiert und anschließend mit Antikörpern gegen ACTB (Kontrollprotein), GFP und NRTN gefärbt.

3.14.1.2 Für Versuche an Weri-RB1 Zellen

Zur Herstellung der ECM für Weri-Rb1 Zellen wurden die Hek293 Zellen wie unter Punkt 3.14.1.1 beschrieben ausgesät und transfiziert, das Aussäen erfolgte jedoch auf auf Poly-Lysin-beschichtete 12-Well Zellkulturplatten. Nach 3 Tagen wurde der Überstand abgesaugt. Da die Zellen von den Poly-L-beschichteten Zellkulturplatten nicht

abgespült werden konnten, wurden direkt 200 µl steril filtriertem Hellewell-Lysereagenz aufpipettiert. Das Reagenz wurde 5 min unter Schwenken auf der ECM belassen. Das so entstandene Zelllysate wurde abpipettiert, mit 50 µl 5x Lämmli Puffer versetzt und direkt zur Western Blot Analyse zur Überprüfung der heterologen NRTN-Expression eingesetzt (siehe 3.14.1.1). Die ECM wurde 5-mal mit 1 ml H₂O_{reinst} gewaschen und stand nun für die Aussaat von Weri-Rb1 Zellen zur Verfügung.

3.14.2 Aussaat der hiPSC-RPE bzw. Weri-Rb1 Zellen auf die generierte NRTN-haltige ECM

3.14.2.1 Aussaat der hiPSC-RPE Zellen

Um die hiPSC-RPE Zellen (zuvor kultiviert im 12-Well Format) auf die ECM zu überführen, wurde bei diesen Zellen das Medium von Filter und Boden entfernt und die Zellen einmalig mit DPBS gewaschen. Anschließend wurde je 700 µl TrypLE™ Select Enzyme (1X) auf die Filter aufgebracht. Nach einer Inkubationszeit von 20 min bei 37°C wurden die Zellen in der vorhandenen Flüssigkeit durch Spülen von ihrem Filter abgelöst und die so erhaltenen Suspensionen einer Zellkulturplatte in einem Falcon-tube (50 ml) vereinigt. Die hiPSC-RPE Zellen wurden im nächsten Arbeitsschritt 5 min bei 1.200 rpm zentrifugiert (Zentrifuge Sigma 2-5). Nach dem Abpipettieren des TrypLE™ folgte die Resuspension des Pellets in 12 ml KnockOut™ DMEM Medium inklusive Gibco™ MEM Non-Essential Amino Acids Solution (1%), L-Glutamin 200 mM (100x) (1%), Gentamycin (50 mg/ml) (0,05%), BME ($7 \cdot 10^{-4}\%$) und 600 mg Nikotinamid 10 mM. Je 1 ml Zellsuspension wurde auf ein ECM haltiges Well aufpipettiert. Nach der Aussaat der Zellen folgte eine Inkubation von 6 h, bei welcher die Zellen sich auf der ECM absetzten.

3.14.2.2 Aussaat der Weri-Rb1 Zellen

In jedes Well wurden, wie in Absatz 3.8.3 beschrieben, $2 \cdot 10^6$ Weri-Rb1 Zellen ausgesät (vgl. Tabelle 25). Die Zellen wurden auf der NRTN-haltigen ECM für 72 h in RPMI 1640 Medium plus P/S (1%) bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt inkubiert.

3.14.3 Induktion von oxidativem Stress und Zellernte

Bei den auf die NRTN haltige ECCM aufgebrauchten hiPSC-RPE und Weri-Rb1 Zellen wurde oxidativer Stress induziert, indem die Zellen mit 1 mM (hiPSC-RPE) oder 0,1 mM (Weri-Rb1) H₂O₂ für 24 h behandelt wurden. Die Zellen wurden daraufhin geerntet, indem der Mediumüberstand abgezogen wurde und die Zellen mit je 700 µl Lysepuffer (enthalten im PureLink™ RNA Mini Kit) und BME (1%) versetzt wurden. Um Zellrückstände zu lösen, wurde der Boden der Wells mit Zellschabern gründlich gesäubert und das Lysat in Reaktionsgefäße (1,5 ml) gefüllt. Zum Erhalt der Proben bis zur Weiterverarbeitung wurden diese eingefroren (-80°C).

3.14.4 qRT-PCR Analyse der Proben

Für die qRT-PCR Analyse wurden zunächst RNA und cDNA der Proben hergestellt (siehe Unterpunkte 3.1 und 3.2). Daraufhin wurde die cDNA mit H₂O_{reinst} auf eine Konzentration von 10-20 ng/µl verdünnt. Danach erfolgte die Erstellung von Mastermixen für die zu untersuchenden Gene. Die Zusammensetzung und Volumina für einen Mastermix sind in Tabelle 29 aufgelistet.

Tabelle 29: Dargestellt sind die Bestandteile und Volumina für einen qRT-PCR Mastermix.

Bestandteile	Volumen
2x TaqMan™ Gene Expression Mastermix	5 µl
Primer (des jeweiligen Gens) forward (50 µM)	1 µl
Primer (des jeweiligen Gens) reverse (50 µM)	1 µl
H ₂ O _{reinst}	0,375 µl
primerspezifische Sonde	0,125 µl

Im Anschluss wurde die cDNA jeder Probe in Triplets mit jeweils 2,5 µl Volumen in Wells einer 384-Well Platte einpipettiert und dann je 7,5 µl des entsprechenden Mastermixes beigefügt. Die Platte wurde kurz bei unter 1.000 rpm zentrifugiert (Zentrifuge Megafuge 1.0R). Im letzten Schritt wurden die Proben im QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (384-Well Format) analysiert. Bei der qRT-PCR durchliefen die Proben mehrere Reaktionsschritte, welche in Tabelle 30 aufgezeigt sind.

Tabelle 30: Dargestellt sind die Reaktionsschritte der qRT-PCR.

Bezeichnung	Temperatur	Zeitdauer	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	95°C	10 min	

Schritt 1: Denaturierung	95°C	40 s	40
Schritt 2: Annealing	60°C	1 min	
Schritt 3: Elongation	72°C	2 min	

3.15 Untersuchung des Einflusses von NRTN auf die Stickstoffmonooxid-Produktion in BV-2 Zellen

BV-2 Zellen wurden, wie in Abschnitt 3.8.4 beschrieben, auf 48-Well Zellkulturplatten ausgesät, für 18-24 h inkubiert und anschließend, wie in Punkt 3.9.4 erläutert, mit den Vektoren pcDNA4-GFP-NRTN:G, pcDNA4-GFP-NRTN:A und dem Kontrollvektor pcDNA4-GFP transfiziert. Je Replikat (insgesamt 8 Wells, 2 Wells pro Vektor) wurden 2 Wells als Kontrolle untransfiziert belassen. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 24 h wurde ein Mediumwechsel in 250 µl DMEM F12 inklusive P/S (1%) und 195 nM BME durchgeführt. Diesem wurden 0 oder 0,05 µg Lipopolysaccharide (LPS, am Institut für Humangenetik Regensburg aus *E. coli* isoliert, (Rezania *et al.*, 2011)) je Well beigelegt. Es schloss sich eine Inkubation von 20 h an.

Anschließend wurde der Überstand abgenommen, in Reaktionsgefäße (0,5 ml) überführt, und bei 2.000 rpm für 5 min zentrifugiert (Zentrifuge Biofuge fresco). Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und in neue Reaktionsgefäße (0,5 ml) überführt. Daraufhin erfolgte die Vorbereitung zur Messung der Stickstoffmonooxid (NO)-Produktion über den Nitritgehalt im Überstand mithilfe des Griess Reagent System Kits der Promega Cooperation. Hierzu wurden zunächst, dem vom Hersteller vorgeschlagenen Protokoll folgend, 3 Eichkurven auf einer 96-Well Zellkultur-Platte angelegt. Danach wurde der Überstand aus jedem Reaktionsgefäß in Triplets á 50 µl daneben auf die 96-Well Zellkultur-Platte aufgetragen. In einem weiteren Schritt wurden unter licht-reduzierten Bedingungen zuerst je 50 µl Sulfonamid und dann 50 µl NED zugegeben, jeweils gut durchmischt und dann 5-10 min inkubiert. Abschließend erfolgte die Auswertung photometrisch über den Plate Reader Tecan Spark® ($\lambda = 540 \text{ nm}$).

3.16 Statistik

Die statistische Evaluierung der Ergebnisse erfolgte mit der Excel Statistik Software "XL STAT". Zuerst wurde die Normalverteilung der Proben über den Shapiro-Wilks

Test untersucht. Daten, die normalverteilt waren, wurden darauf entweder mit dem Zweistichproben-t-Test (für den Vergleich von 2 Gruppen) oder dem ANOVA Test mit Tukey's multiple comparison correction Test (> 2 Gruppen) untersucht. Daten, die keine Normalverteilung aufwiesen, wurden entweder mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney Test (für den Vergleich von 2 Gruppen) oder dem Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Modification und Bonferroni Korrektur (> 2 Gruppen) untersucht. Der Fischers Exact Test wurde für die Untersuchung von Signifikanzniveaus verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung der endogenen NRTN-Expression in ausgewählten Zelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit sollten funktionelle Analysen an NRTN-Varianten durchgeführt werden, um einen Einfluss des AMD assoziierten SNPs rs79744308 auf definierte zelluläre Prozesse zu überprüfen. Im ersten Schritt dieser Arbeit erfolgte hierfür zunächst eine Charakterisierung verschiedener zellulärer Modellsysteme hinsichtlich ihrer endogenen NRTN-Expression. Folgende Zelllinien, welche schon in zahlreichen Studien als Modellsysteme zur Untersuchung molekularer Pathomechanismen der AMD herangezogen wurden (u.a. Du *et al.*, 2016; Marazita *et al.*, 2016; Shen *et al.*, 2016; Pujol-Lereis *et al.*, 2018; Dalvi *et al.*, 2019; Leclaire *et al.*, 2019), wurden ausgewählt: 661W, BV-2, ARPE-19, hiPSC-RPE, Y79, Weri-Rb1, HUVEC und Hek293.

4.1.1 Expression von *NRTN* auf mRNA Ebene

Zunächst wurde die endogene Expression von *NRTN* auf RNA Ebene untersucht. Hierzu wurde aus den Zelllinien RNA isoliert, mit welcher eine RT-PCR zur Detektion von *NRTN*-Transkripten durchgeführt wurde. Als Positivkontrolle für die murinen Zelllinien wurde cDNA aus muriner Netzhaut verwendet, als Positivkontrolle für humane Zelllinien diente das Plasmid pcDNA4-GFP-NRTN:G, welches die kodierende Sequenz für humanes NRTN (nicht AMD-assoziierte Variante) enthält.

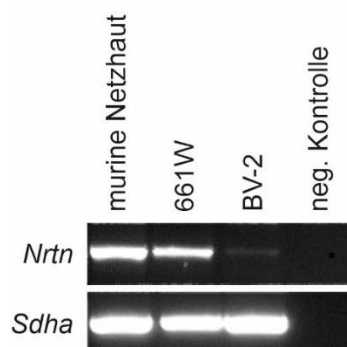


Abbildung 5: Untersuchung der endogenen *Nrtn*-Expression in murinen Zelllinien mittels RT-PCR.

Aus muriner Netzhaut, 661W Zellen und BV-2 Zellen wurde RNA isoliert und mit dieser eine RT-PCR mit Primern gegen *Nrtn* und *Sdha* als Housekeeper durchgeführt. Als Negativkontrolle (neg. Kontrolle) diente H₂O_{reinst.} Nach Agarosegelelektrophorese wurde das Ethidiumbromid gefärbte Amplifikat unter dem UV-Schirm detektiert.

Abbildung 5 zeigt die RT-PCR Analyse muriner Zelllinien. Der Housekeeper *Sdha* (Succinate dehydrogenase complex subunit A flavoprotein variant) zeigte bei allen Ansätzen eine vergleichbare Intensität. *Nrtn* wies starke Signale in der murinen Netzhaut sowie in 661W Zellen auf, schwache Signale wurden für BV-2 Zellen erhalten.

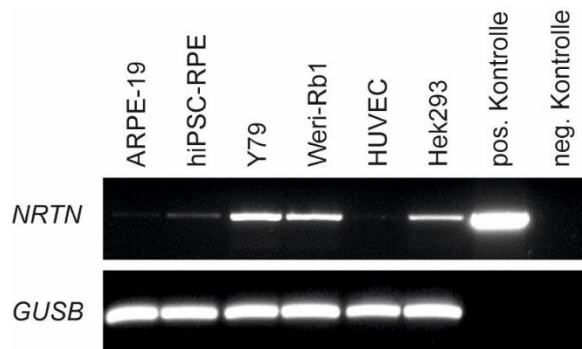


Abbildung 6: Untersuchung der endogenen *NRTN*-Expression in humanen Zelllinien mittels RT-PCR.

Aus ARPE-19, hiPSC-RPE, Y79, Weri-Rb1, HUVEC und Hek293 Zellen wurde RNA isoliert und mit dieser eine RT-PCR mit Primern gegen *NRTN* und *GUSB* als Housekeeper durchgeführt. Als Positivkontrolle (pos. Kontrolle) diente das pcDNA4-GFP-NRTN:G, als Negativkontrolle (neg. Kontrolle) H₂O_{reinst}. Nach Agarosegelelektrophorese wurde das Ethidiumbromid gefärbte Amplifikat unter dem UV-Schirm detektiert.

Bei der Auswertung der RT-PCR für die humanen Zelllinien (Abbildung 6) zeigten sich Signale vergleichbarer Intensität für den Housekeeper *GUSB* (Glucuronidase beta). Mit der Positivkontrolle pcDNA4-GFP-NRTN:G als Template wurde ein äußerst starkes PCR-Produkt für *NRTN* erhalten. Für die Zelllinien Y79, Weri-Rb1 und Hek293 wurden gut ausgeprägte *NRTN*-Signale detektiert, bei hiPSC-RPE Zellen ein deutlich schwächeres Signal. ARPE-19 und HUVEC Zellen wiesen ein kaum erkennbares *NRTN* Signal auf.

4.1.2 Expression von *NRTN* auf Proteinebene

Im nächsten Schritt erfolgte die Analyse der endogenen *NRTN*-Expression auf Proteinebene. Hierfür wurden Zelllysate aus den Zelllinien hergestellt und einer Western Blot Analyse mit Antikörpern gegen *NRTN* und ACTB (Beta-actin) als Housekeeper unterzogen (Abbildung 7). Als Positivkontrolle dienten Hek293 Zellen, die heterolog *NRTN* überexprimierten.

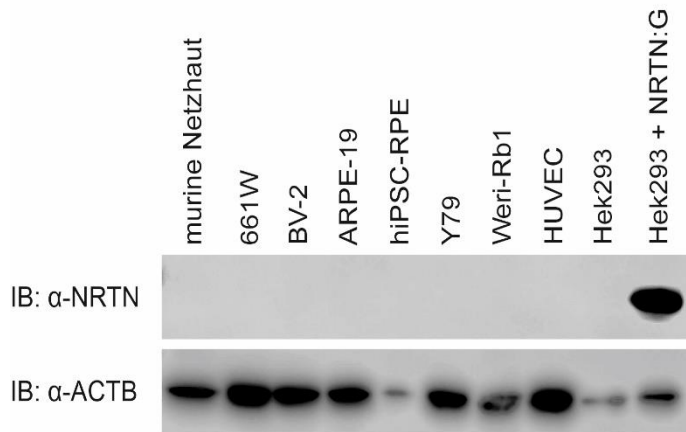


Abbildung 7: Untersuchung der endogenen NRTN-Expression in murinen und humanen Zelllinien mittels Western Blot.

Aus muriner Netzhaut, 661W, BV-2, ARPE-19, hiPSC-RPE, Y79, Weri-Rb1, HUVEC und Hek293 Zellen wurden Zelllysate hergestellt und in Western Blot Analysen mit Antikörpern gegen NRTN und ACTB als Housekeeper eingesetzt. Als Positivkontrolle dienten Hek293 Zellen die nach Transfektion mit pcDNA4-GFP-NRTN:G heterolog NRTN exprimierten (Hek293+NRTN:G).

ACTB zeigte in allen Zelllinien, mit Ausnahme von hiPSC-RPE und Hek293 Zellen vergleichbar starke Signale. Bei der Färbung gegen NRTN ließ sich in mehreren Experimenten trotz sehr langer Expositionszeiten und Verwendung des hochsensitiven Clarity Max™ Western Blotting Substrate jedoch nur ein Signal in Hek293 Zellen, die heterolog die normale NRTN-Variante NRTN:G überexprimierten, erkennen. Endogen exprimiertes NRTN-Protein konnte also in keiner der verwendeten Modell-Zelllinien nachgewiesen werden.

Da in allen Zelllinien NRTN nicht auf Proteinebene nachgewiesen werden konnte, wurden funktionelle Versuche durchgeführt, in welchen NRTN in den verwendeten Modell-Zelllinien entweder heterolog überexprimiert oder extern zugeführt wurde. Dabei wurde auch auf mögliche Unterschiede zwischen der NRTN:G und der protektiven Variante NRTN:A geachtet, um so einen möglichen Effekt von rs79744308 auf die NRTN-Funktion und dessen Beteiligung an AMD-assoziierten Prozessen zu adressieren.

4.2 Einfluss von rs79744308 auf Expression, Sekretion und ECM-Ablagerung von NRTN

In den folgenden Teilprojekten wurde der Einfluss von rs79744308 auf Expression, Sekretion und ECM-Ablagerung von NRTN untersucht. Hierfür wurden Hek293 Zellen mit den Vektoren pcDNA4-GFP-NRTN:G und pcDNA4-GFP-NRTN:A, sowie dem Kontrollvektor pcDNA4-GFP transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 3 Tagen wurden Pellet, Überstand und ECM geerntet und Western Blot Analysen mit Antikörpern gegen

NRTN, GFP und ACTB unterzogen. Anschließend wurden die erhaltenen Signale densitometrisch quantifiziert.

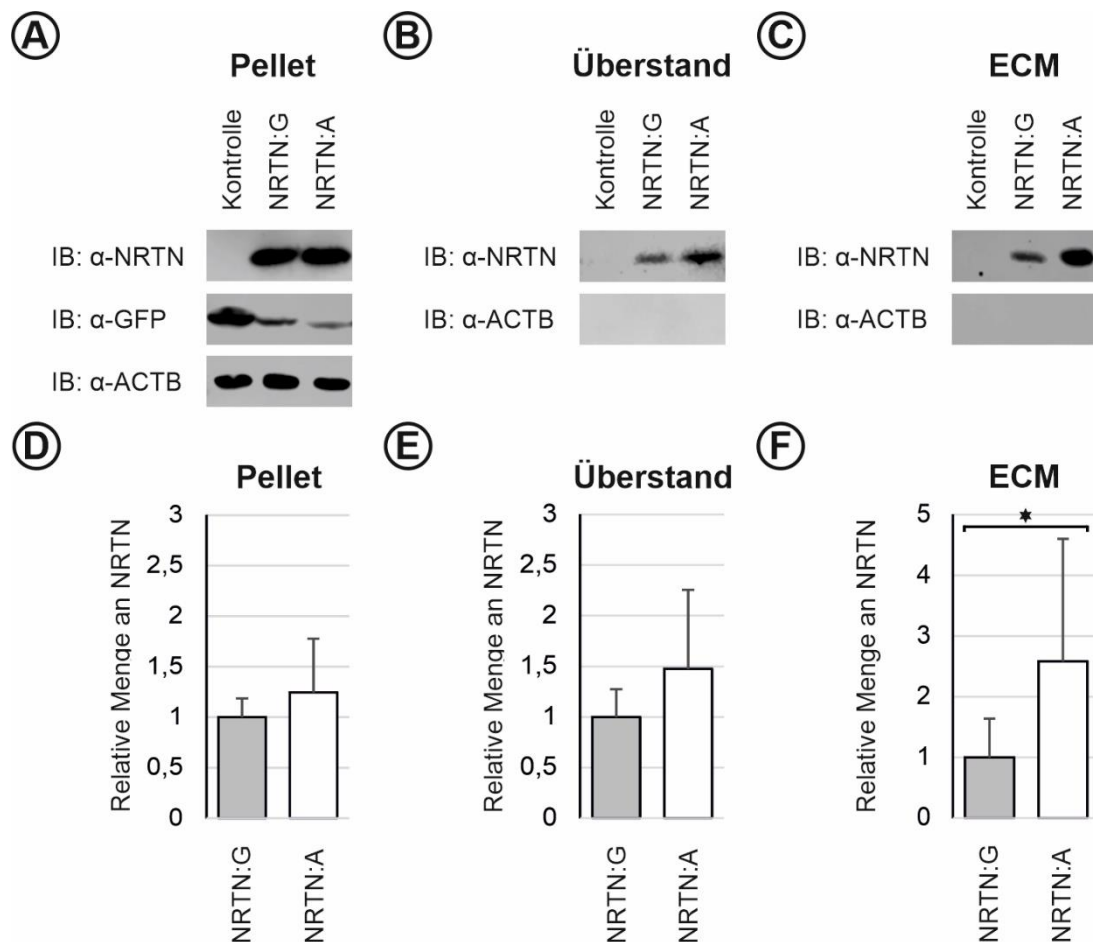


Abbildung 8: Einfluss von rs79744308 auf Expression, Sekretion und ECM-Ablagerung von NRTN.

Hek293 Zellen wurden mit den Vektoren pcDNA4-GFP (Kontrolle), pcDNA4-GFP-NRTN:G und pcDNA4-GFP-NRTN:A transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 3 Tagen wurden Pellet, Überstand und ECM geerntet. Es folgten Western Blot Analysen der drei Fraktionen mit Antikörpern gegen ACTB (A-C), GFP (A) und NRTN (A-C). Anschließend erfolgte die densitometrische Auswertung der erhaltenen Western Blot Signale. Die Signale für NRTN wurden dabei gegen die Signale von GFP normalisiert und auf NRTN:G kalibriert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus 12 unabhängigen Replikaten. Eine statistische Evaluierung erfolgte mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test. Der Stern zeigt einen signifikanten Unterschied an ($p < 0,05$).

Auf den Western Blots für das Pellet (Abbildung 8 A) sind in den mit pcDNA4-GFP-NRTN:G, pcDNA4-GFP-NRTN:A und pcDNA4-GFP transfizierten Hek293 Zellen vergleichbare Banden beim Housekeeper ACTB zu erkennen. Dies lässt auf vergleichbare Zellzahlen der verschiedenen transfizierten Zellen schließen. Im Überstand (Abbildung 8 B) und in der ECM (Abbildung 8 C) fanden sich keine ACTB Signale,

wodurch eine nennenswerte Kontamination dieser beiden Fraktionen durch Zellen ausgeschlossen werden kann.

Weiterhin fällt auf, dass das Signal von GFP in den pcDNA4-GFP transfizierten Kontrollzellen deutlich stärker ausgeprägt ist als bei den mit bicistronischen GFP- und NRTN-Expressionsvektoren. Dies könnte daran liegen, dass kleinere Vektoren wie pcDNA4-GFP effektiver von Zellen aufgenommen werden (Lukacs *et al.*, 2000; McLenachan, Sarsero and Ioannou, 2007), oder dass durch die heterologe Expression von zwei Proteinen im bicistronischen Vektor die Produktion beider Proteine geringer ausfällt, im Vergleich zur heterologen Expression eines Proteins (Mizuguchi *et al.*, 2000). Die mit pcDNA4-GFP-NRTN:G und pcDNA4-GFP-NRTN:A transfizierten Zellen wiesen eine vergleichbare GFP-Expression und somit eine vergleichbare Transfektionseffizienz auf.

Bei den mit pcDNA-GFP transfizierten Kontrollzellen wurden weder im Pellet (Abbildung 8 A) noch im Überstand (Abbildung 8 B) oder in der ECM (Abbildung 8 C) Signale für NRTN detektiert. Im Gegenzug wurden in den mit pcDNA4-GFP-NRTN:G oder pcDNA4-GFP-NRTN:A transfizierten Zellen deutliche Signale für NRTN erhalten. Diese waren im Pellet (Abbildung 8 A) von vergleichbarer Intensität, im Überstand (Abbildung 8 B) hingegen zeigte sich eine leichte Verstärkung des Signals bei mit pcDNA4-GFP-NRTN:A transfizierten Zellen, was auch in den densitometrischen Auswertungen (Abbildung 8 D und E) ersichtlich wurde. In der ECM wurde im Gegenzug eine um 2,5-fach erhöhte, statistisch signifikante Anreicherung von NRTN:A gegenüber NRTN:G gezeigt (Abbildung 8 C und F, $p=0,012$).

4.3 Einfluss von rs79744308 auf die Abspaltung des Propeptids von NRTN

In einem weiteren Teilversuch wurde der Einfluss von rs79744308 auf die Abspaltung des Propeptids untersucht, welche die Interaktion oder Aktivität des NRTNs beeinflussen kann (Fjord-Larsen *et al.*, 2005). Hierzu wurden NRTN-haltige Überstände, welche nach 3 Tage zurückliegender Transfektion von Hek293 Zellen mit pcDNA4-GFP-NRTN:G und pcDNA4-GFP-NRTN:A erhalten worden waren, auf höherprozentigen (15%) Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt. Im Falle einer Abspaltung des Propeptids

kann die aktive Kette mit einem Molekulargewicht von ca. 12 kDa in Western Blot Analysen mit dem Antikörper gegen NRTN (welcher gegen die aktive Kette gerichtet ist) nachgewiesen werden.

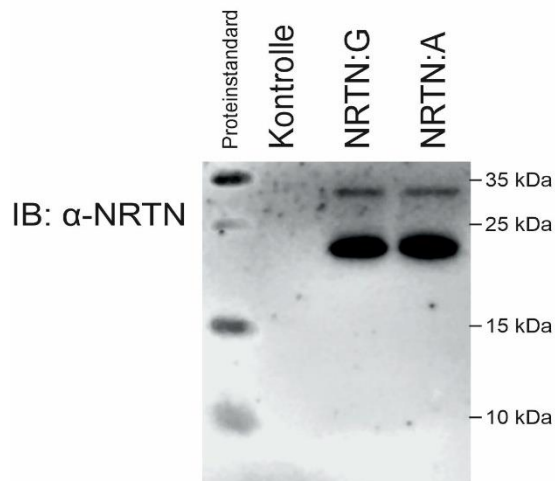


Abbildung 9: Einfluss von NRTN:A auf die Abspaltung von Proteinuntereinheiten im Vergleich zu NRTN:G.

Hek293 Zellen wurden mit den Vektoren pcDNA4-GFP (Kontrolle), pcDNA4-GFP-NRTN:G und pcDNA4-GFP-NRTN:A transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 3 Tagen wurde der Überstand auf einem 15-prozentigen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Anschluss einer Western Blot Analyse mit dem Antikörper gegen NRTN, welcher gegen die aktive Kette des NRTN-Proteins gerichtet ist, unterzogen.

Die Western Blots der Überstände (Abbildung 9) zeigten für NRTN:G und NRTN:A eine deutliche Bande mit einem Molekulargewicht von unter 25 kDa, welche dem erwarteten Molekulargewicht des reifen, ungespaltenen NRTNs (22,5 kDa) (Kotzbauer *et al.*, 1996) entspricht. Des Weiteren waren schwache Banden mit einem Molekulargewicht zwischen 25 kDa und 35 kDa zu erkennen, deren Herkunft ungeklärt ist. Banden mit einem Molekulargewicht von 10-15 kDa, und somit die abgespaltene aktive Kette, konnten in dieser Analyse nicht detektiert werden.

4.4 Effekt von NRTN auf die Zusammensetzung der ECM

Bereits länger bekannt ist, dass die Struktur der ECM einen möglichen Einfluss auf die Pathogenese der AMD haben könnte (Stone *et al.*, 1999; Ratnapriya *et al.*, 2014; Fernandez-Godino, Bujakowska and Pierce, 2018). Heparine und Heparansulfat sind häufige Bestandteile einer physiologischen ECM (zusammengefasst in Iozzo, 1998) und NRTN hat eine hohe Affinität zu diesen Komponenten (Lin *et al.*, 1993; Davies, Yates and Turnbull, 2003; Beshpalov *et al.*, 2011; Sandmark *et al.*, 2018). Im folgenden Projekt wurde mittels immunzytochemischer Analysen an von ARPE-19 Zellen produzierter ECM untersucht (nach Fernandez-Godino, Bujakowska and Pierce, 2018), ob

die heterologe Expression von NRTN:G oder NRTN:A einen Einfluss auf die Zusammensetzung der ECM hat.

Hierfür wurden ARPE-19 Zellen auf 6-Well Zellkulturplatten ausgesät und nach 18-24 h mit den Vektoren pcDNA4-GFP, pcDNA4-GFP-NRTN:G und pcDNA4-GFP-NRTN:A transfiziert. Am nächsten Tag wurde die Transfektionseffizienz überprüft (siehe Abbildung 3). War diese bei den mit pcDNA4-GFP-NRTN:G und pcDNA4-GFP-NRTN:A transfizierten Zellen vergleichbar, wurden die Zellen abgelöst und auf die Filter von 12-Well Zellkultureinsätzen transferiert. Hierbei wurde darauf geachtet, dass gleiche Zellzahlen für die drei unterschiedlich transfizierten Ansätze ausgebracht wurden (je nach Versuchsansatz $1-1,5 \cdot 10^5$ Zellen). Die Zellen wurden (nach Hellewell, Rosini and Adams, 2017) für 4 Wochen auf den Filtern inkubiert, wobei alle 2-3 Tage ein Mediumwechsel erfolgte. Nach 4 Wochen wurden die Zellen abgelöst und die auf den Filtern abgelagerte ECM mittels Western Blot oder immunzytochemischer Färbungen analysiert (nach Hellewell, Rosini and Adams, 2017).

In der Western Blot Analyse (Abbildung 10) sollte die NRTN Ablagerung in der ECM überprüft werden. Zusätzlich wurde mit einem Antikörper gegen Elastin als charakteristischen ECM-Marker (Vierkotten, Muether and Fauser, 2011; McLenachan *et al.*, 2017) gefärbt. Dabei wurden Signale für Elastin (ca. 60 kDa) erhalten, wobei sich die Signalintensität zwischen den verschiedenen transfizierten Proben unterschied. In 3 Versuchen konnte jedoch kein Einfluss der unterschiedlichen Transfektionen auf die Elastinmenge gezeigt werden. Schwankungen in der Elastinmenge waren unabhängig von der Art der Transfektion. Im Gegenzug wurden keine Signale für NRTN detektiert. Ob das von den Filtern geerntete ECM-Material für eine Western Blot-Detektion von NRTN nicht ausreichend war oder ob NRTN sich zu diesem Zeitpunkt nicht (mehr) in ausreichenden Mengen auf der ECM befunden hatte, kann mit dieser Analyse nicht geklärt werden.

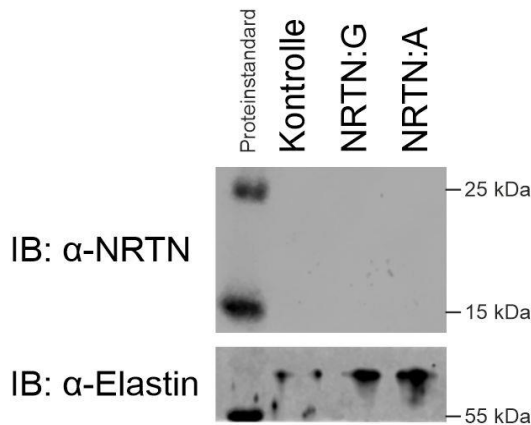


Abbildung 10: Nachweis von NRTN in von ARPE-19 Zellen generierter ECM.

ARPE-19 Zellen wurden mit den Vektoren pcDNA4-GFP (Kontrolle), pcDNA4-GFP-NRTN:G und pcDNA4-GFP-NRTN:A transfiziert. Nach 18-24 h wurden je nach Versuch $1-1,5 \cdot 10^5$ Zellen auf die Filter von 12-Well Zellkultureinsätzen transferiert. Nach 4 Wochen wurde die auf den Filtern abgelagerte ECM in Western Blot Analysen mit Antikörpern gegen NRTN und Elastin eingesetzt.

Mittels immunzytochemischer Färbung sollte nun in einem alternativen Ansatz die NRTN-Ablagerung nach heterologer Expression in ARPE-19 Zellen überprüft werden. Des Weiteren sollte der Effekt der heterologen NRTN-Expression auf die ECM-Struktur untersucht werden. Hierfür wurden die Filter nach 4-wöchiger Inkubation immunzytochemisch mit Antikörpern gegen NRTN sowie gegen die charakteristischen ECM-Komponenten Elastin, Fibronectin, Laminin, Kollagen IV und Kollagen VI (nach Fernandez-Godino, Bujakowska and Pierce, 2018) gefärbt. Eine Kontrollfärbung mit DAPI zum Ausschluss noch vorhandener Zellen wurde parallel durchgeführt (nicht gezeigt). Die Auswertung erfolgte fluoreszenzmikroskopisch (siehe Abbildung 11).

Die Färbung gegen NRTN zeigte für alle unterschiedlich transfizierten Zellen schwache, punktförmige Signale. Ob es sich bei den Signalen jedoch um unspezifische Färbungen, oder tatsächlich um spezifische NRTN Signale handelt (im Falle der Kontrolle dann um endogen exprimiertes NRTN) ist unklar. In den mit NRTN-Expressionsvektoren transfizierten Zellen waren die NRTN-Signale leicht stärker als in der Kontrolle, was auf eine heterologe NRTN-Expression schließen lassen könnte. (Abbildung 11 A-C).

Die Elastin-Färbung zeigte fibrilläre Strukturen in allen Ansätzen, welche ungleichmäßig über die Filter verteilt waren (Abbildung 11 D-F). In der Kontrolle (Abbildung 11 D) waren neben Bereichen mit geringer Fluoreszenz teils ausgedehnte Netzstrukturen zu erkennen. Zusätzlich wurden in den Ansätzen, die mit pcDNA4-GFP-NRTN:G (Abbildung 11 E) und pcDNA4-GFP-NRTN:A (Abbildung 11 F) transfiziert worden waren, vereinzelte Akkumulationen von Elastin beobachtet. Diese Unterschiede zwischen Kontroll- und NRTN-Expressionsvektor transfizierten Zellen wurden in 4 unabhängigen Versuchsansätzen beobachtet.

Fibronectin wies ebenfalls netzartige, ungleichmäßig über den Filter verteilte Strukturen in allen Proben auf (Abbildung 11 G-I). In den Proben, welche mit pcDNA4-GFP-NRTN:G transfiziert worden waren, konnten dabei in 4 unabhängigen Versuchen stärkere Fibronectin-Akkumulationen beobachtet werden.

Die Laminin-Färbung ergab punktförmige Signale in allen Proben, welche erste Ansätze der Ausbildung von Netzstrukturen aufwiesen. Es bestand kein sichtbarer Unterschied zwischen Kontrolle (Abbildung 11 J), mit pcDNA4-GFP-NRTN:G (Abbildung 11 K) und mit pcDNA4-GFP-NRTN:A (Abbildung 11 L) transfizierten Ansätzen.

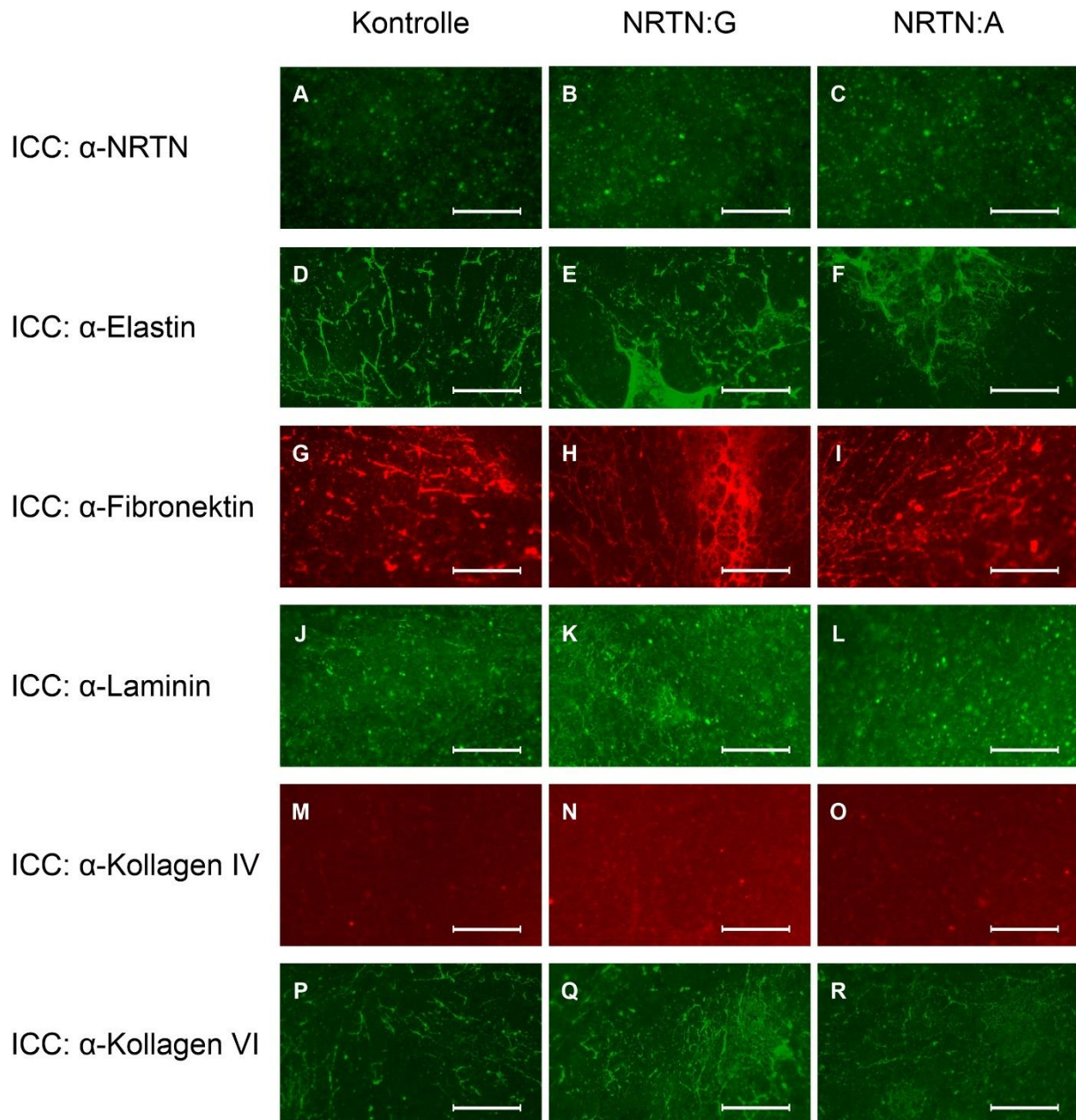


Abbildung 11: ICC Färbungen zur Untersuchung des Effekts von heterolog exprimiertem NRTN:G und NRTN:A auf den Aufbau der von ARPE-19 Zellen generierten ECM.

ARPE-19 Zellen, welche mit pcDNA4 (Kontrolle) pcDNA4-GFP-NRTN:G und pcDNA4-GFP-NRTN:A transfiziert worden waren, wurden für 4 Wochen auf Zellkultureinsätzen inkubiert. Im Anschluss wurden die Filter, auf welchen sich die ECM abgelagert hatte in immunzytochemischen Analysen mit Antikörpern gegen NRTN (A-C), Elastin (D-F), Fibronectin (G-I), Laminin (J-L), Kollagen IV (M-O) und Kollagen VI (P-R) eingesetzt. Hierbei wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen unter 20-facher Vergrößerung bei einer Belichtungszeit von 800 ms durchgeführt. Standard: 200 μ m.

Die Färbungen gegen Kollagen IV (Abbildung 11 M-O) zeigten nur schwache, punktförmige Signale. Ob diese spezifischer oder unspezifischer Natur waren, ist unklar. Auch hier bestand kein erkennbarer Unterschied zwischen Kontrolle (Abbildung 11 M)

und den mit pcDNA4-GFP-NRTN:G (Abbildung 11 N) oder pcDNA4-GFP-NRTN:A (Abbildung 11 O) transfizierten Ansätzen.

Netzwerkartige Strukturen von Kollagen VI waren auf dem gesamten Filter nachweisbar. Bei der Kontrolle (Abbildung 11 P) waren vereinzelt kleine, zusammenhängende Netzstrukturen zu erkennen. Im Gegensatz dazu waren die Netze bei den mit pcDNA4-GFP-NRTN:G (Abbildung 11 Q) und pcDNA4-GFP-NRTN:A (Abbildung 11 R) transfizierten Ansätzen (in allen 4 unabhängigen Versuchen) ausgeprägter.

4.5 Effekte von NRTN auf oxidativen Stress induzierte Autophagie

Oxidativer Stress ist ein zu der Entstehung der AMD beitragender Faktor (Winkler *et al.*, 1999; zusammengefasst in Beatty *et al.*, 2000; Hollyfield *et al.*, 2008; zusammengefasst in Kauppinen *et al.*, 2016) und kann zur Autophagie-Induktion in RPE-Zellen führen (zusammengefasst in Kiffin, Bandyopadhyay and Cuervo, 2006; und Mitter *et al.*, 2014; sowie Filomeni, De Zio and Cecconi, 2015). Fehlfunktionen bei der Autophagie konnten ebenfalls mit der AMD assoziiert werden (Wang *et al.*, 2009; Mitter *et al.*, 2012; zusammengefasst in Kaarniranta *et al.*, 2013; Szatmári-Tóth *et al.*, 2016). Schließlich wurde gezeigt, dass der RET Signalweg, welcher unter anderem durch NRTN induziert wird, einen hemmenden Einfluss auf die Autophagie in Plattenepithelkarzinomzellen und myeloischen Leukämiezellen nimmt (Sandilands *et al.*, 2012; zusammengefasst in Mulligan, 2018; Rudat *et al.*, 2018).

Um nun einen möglichen Einfluss von NRTN:G und NRTN:A auf die Autophagie-Induktion in RPE-Zellen zu überprüfen, wurden ARPE-19 Zellen mit den Vektoren pcDNA4-GFP sowie pcDNA4-GFP-NRTN:G und pcDNA4-GFP-NRTN:A transfiziert. Nach 48 h erfolgte die Induktion von oxidativem Stress durch Zugabe von 1 mM H₂O₂. Nach 2-stündiger Inkubation wurden die Zellen geerntet.

Im Anschluss wurden die Proben in Western Blot Analysen zunächst auf die heterologe NRTN-Expression hin überprüft (Abbildung 12 A). Dabei wurden Antikörper gegen GFP zur Kontrolle der Transfektionseffizienz, gegen NRTN und gegen ACTB als Housekeeper eingesetzt. Im Anschluss erfolgte eine densitometrische Quantifizierung der erhaltenen Signale. GFP zeigte dabei erneut (vergleiche Abschnitt 4.2) deutlich stärker

kere Signale in den Zellen, die mit pcDNA4-GFP transfiziert worden waren, als in Zellen, die mit pcDNA4-GFP-NRTN:G oder pcDNA4-GFP-NRTN:A transfiziert worden waren, welche ihrerseits vergleichbare GFP-Intensitäten aufwiesen (Abbildung 12 B). NRTN:G und NRTN:A wurden in den Ansätzen mit vergleichbar starker Intensität exprimiert (Abbildung 12 C).

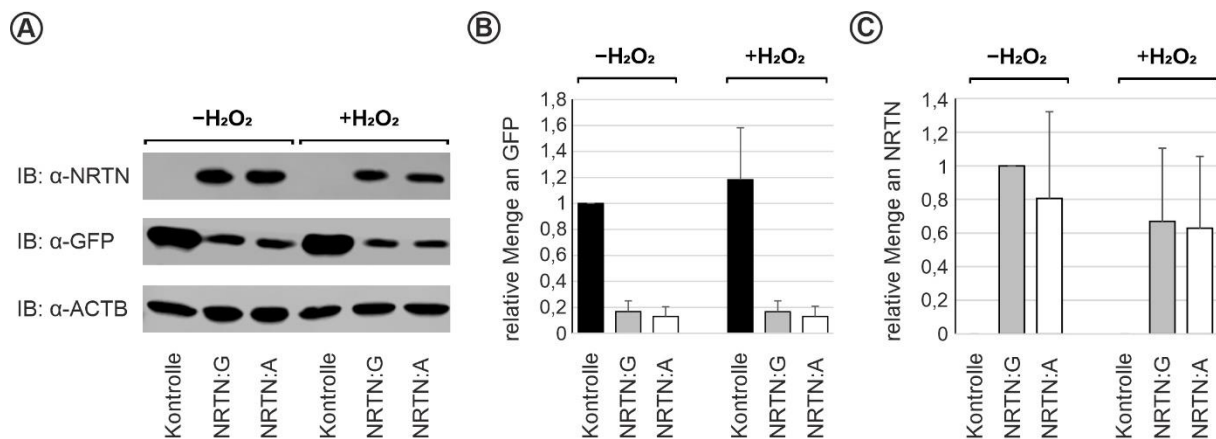


Abbildung 12: Transfektionseffizienz und heterologe NRTN-Expression in ARPE-19 Zellen, welche Versuchen mit oxidativem Stress (H_2O_2) unterzogen wurden.

ARPE-19 Zellen wurden mit pcDNA4 (Kontrolle), pcDNA4-GFP-NRTN:G oder pcDNA4-GFP-NRTN:A transfiziert. Nach 48h wurden die Zellen mit 0 bzw 1 mM H_2O_2 für 2 h inkubiert und im Anschluss in Western Blot Analysen mit Antikörpern gegen GFP, NRTN und ACTB eingesetzt (A). Es erfolgte eine densitometrische Auswertung (B, C). Die Signale für GFP (B) wurden gegen den Housekeeper ACTB normalisiert und auf die unbehandelte Kontrolle kalibriert, die Signale für NRTN (C) wurden auf GFP normalisiert und auf die unbehandelten, pcDNA4-GFP-NRTN:G transfizierte Probe kalibriert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus 7 unabhängigen Replikaten.

Im nächsten Schritt wurden Western Blot Analysen mit Antikörpern gegen die Autophagiemarker LC3 (Tanida, Ueno and Kominami, 2008; Tanida and Waguri, 2010) und p62 (Bjørkøy *et al.*, 2009) durchgeführt (Abbildung 13). Bei erfolgreicher Autophagie-Induktion sollte eine Abnahme des LC3 (I) zu LC3 (II) Verhältnisses sowie eine Abnahme der p62 Menge zu beobachten sein (Tanida, Ueno and Kominami, 2008; Bjørkøy *et al.*, 2009; Tanida and Waguri, 2010). Tatsächlich zeigte sich eine deutliche Abnahme des LC3 (I) zu LC3 (II) Verhältnisses in den H_2O_2 behandelten Proben im Vergleich zu den unbehandelten Proben (Abbildung 13 A-C). Für alle unbehandelten und behandelten Proben gemittelt, wurde dabei das LC3 (I) zu LC3 (II) Verhältnis von 0,32 bei unbehandelten Proben auf 0,05 bei behandelten Proben reduziert ($p < 0,001$). Weder bei unbehandelten noch bei H_2O_2 -behandelten Proben wurde ein Einfluss von NRTN:G oder NRTN:A auf das LC3 (I) zu LC3 (II) Verhältnis beobachtet.

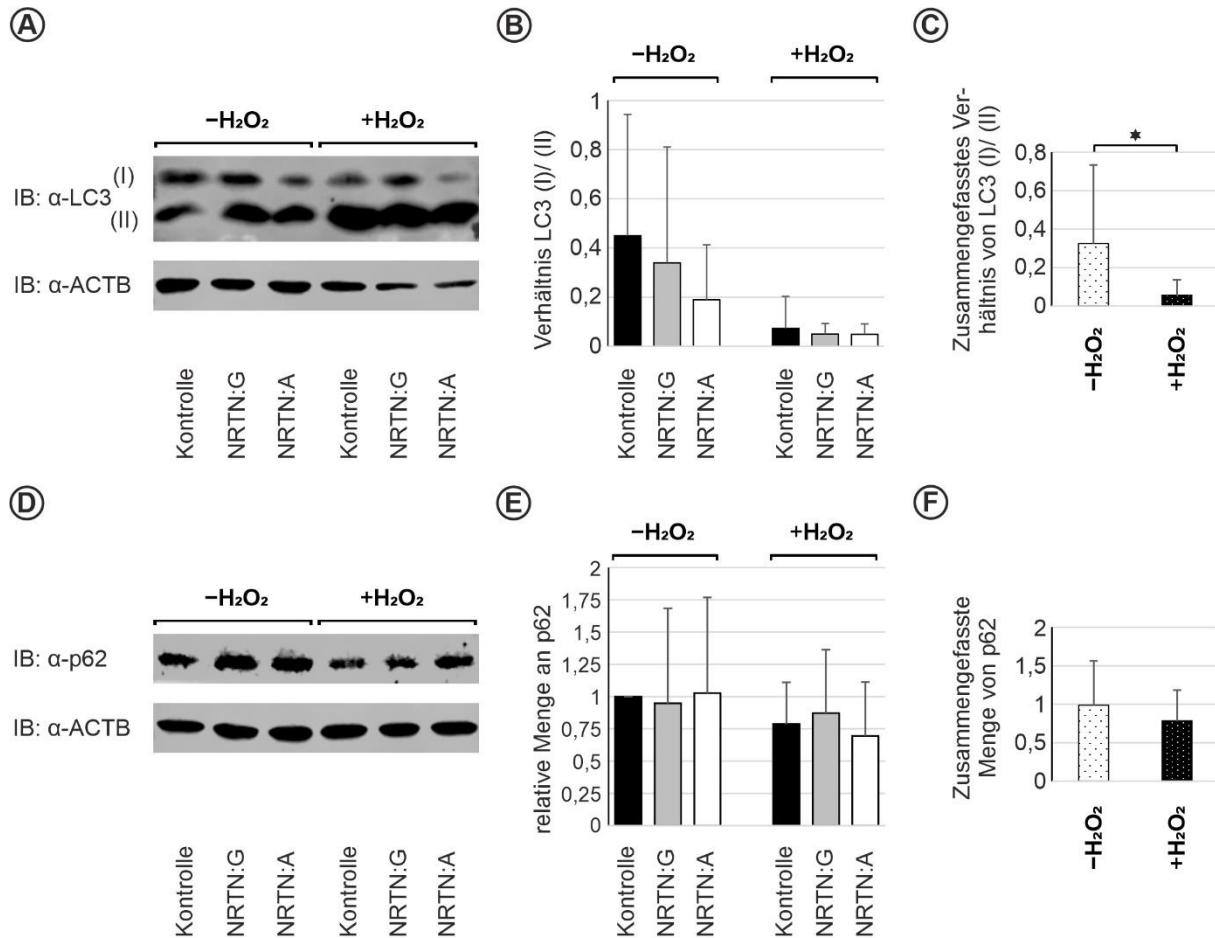


Abbildung 13: Einfluss von NRTN:G und NRTN:A auf die Einleitung von Autophagie in ARPE-19 Zellen mit und ohne Induktion von oxidativem Stress im Vergleich.

ARPE-19 Zellen wurden mit pcDNA4-GFP (Kontrolle), pcDNA4-GFP-NRTN:G oder pcDNA4-GFP-NRTN:A transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen mit 0 bzw. 1 mM H₂O₂ für 2 h inkubiert und im Anschluss in Western Blot Analysen mit Antikörpern gegen LC3 (I) und (II) (A), p62 (D), sowie dem Housekeeper ACTB eingesetzt. Anschließend erfolgte eine densitometrische Auswertung (B, E). Im Falle von LC3 wurde das Verhältnis der absoluten Signale von LC3 (I) und LC3 (II) gebildet (B). In (C) wurden die Verhältnisse für unbehandelte und mit H₂O₂ behandelte Proben zusammengefasst (C). Die Signale für p62 (E) wurden gegen den Housekeeper ACTB normalisiert und auf die unbehandelte Kontrolle kalibriert. In (F) wurden die Werte für unbehandelte und mit H₂O₂ behandelte Proben zusammengefasst. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus 7 unabhängigen Replikaten. Die statistische Evaluierung von (B) und (D) erfolgte mittels Kruskal-Wallis Test mit anschließender Bonferroni-Korrektur. Die statistische Evaluierung von (E) und (F) erfolgte mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test. Der Stern zeigt einen signifikanten Unterschied an ($p < 0,05$).

Bei p62 war in den H₂O₂ behandelten Proben im Vergleich zu den unbehandelten Proben eine leichte Abnahme zu erkennen (Abbildung 13 D-F), die jedoch auch bei einer Mittelung der Resultate für behandelte und unbehandelte Proben keine statistische Signifikanz erreichte. Dabei wurde weder bei unbehandelten noch bei H₂O₂-behandelten Proben ein Einfluss von NRTN:G oder NRTN:A auf die p62 Menge verzeichnet.

4.6 Effekte von NRTN durch oxidativen Stress induzierte Signalwegsaktivierung

Durch oxidativen Stress werden in den Zellen verschiedene Signalwege, wie MAP Kinasen Signalwege, oder der PI3K-AKT Signalweg aktiviert (z.B. Ito *et al.*, 2006; Le Belle *et al.*, 2011; zusammengefasst in Schieber and Chandel, 2014). Über die Bindung an GFR α 2 kann NRTN den RET Signalweg aktivieren (Jing *et al.*, 1996; Trupp *et al.*, 1996; R. D. Klein *et al.*, 1997; zusammengefasst in Saarma and Sariola, 1999), welcher die Phosphorylierung tiefer liegender MAP Kinasen und PI3K Kinasen induziert (zusammengefasst in Saarma and Sariola, 1999; und Arighi, Borrello and Sariola, 2005). Um einen Einfluss von NRTN auf die durch oxidativen Stress induzierte intrazelluläre Signalwegs-Aktivierung zu überprüfen, wurden deshalb die unterschiedlich transfizierten und oxidativem Stress ausgesetzten ARPE-19 Zellen aus Abschnitt 4.5 in Western Blot Analysen gegen Markerproteine für die verschiedenen mit RET oder oxidativem Stress assoziierten Signalwege eingesetzt. Hierfür wurde die Phosphorylierung und damit Aktivierung von ERK1/2 (ERK Signalweg), AKT (PI3K-AKT Signalweg) und JNK (JNK Signalweg) verfolgt (Chiariello *et al.*, 1998; Segouffin-Cariou and Billaud, 2000; zusammengefasst in Pitt and Chen, 2008).

Gesamtes ERK1/2 zeigte sowohl in den Blots als auch in der densitometrischen Auswertung aus 5 Replikaten keine, durch unterschiedliche Transfektion oder H₂O₂-Behandlung hervorgerufene Veränderungen in der Gesamtmenge (Abbildung 14 A und B). Die phosphorylierte Form von ERK1/2 hingegen wies tendenziell eine Steigerung bei den mit pcDNA4-GFP-NRTN:A transfizierten Zellen gegenüber den mit pcDNA4-GFP oder pcDNA4-GFP-NRTN:G transfizierten Zellen auf. (Abbildung 14 A und C). Die statistische Auswertung aus 5 unabhängigen Replikaten zeigte jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den Proben.

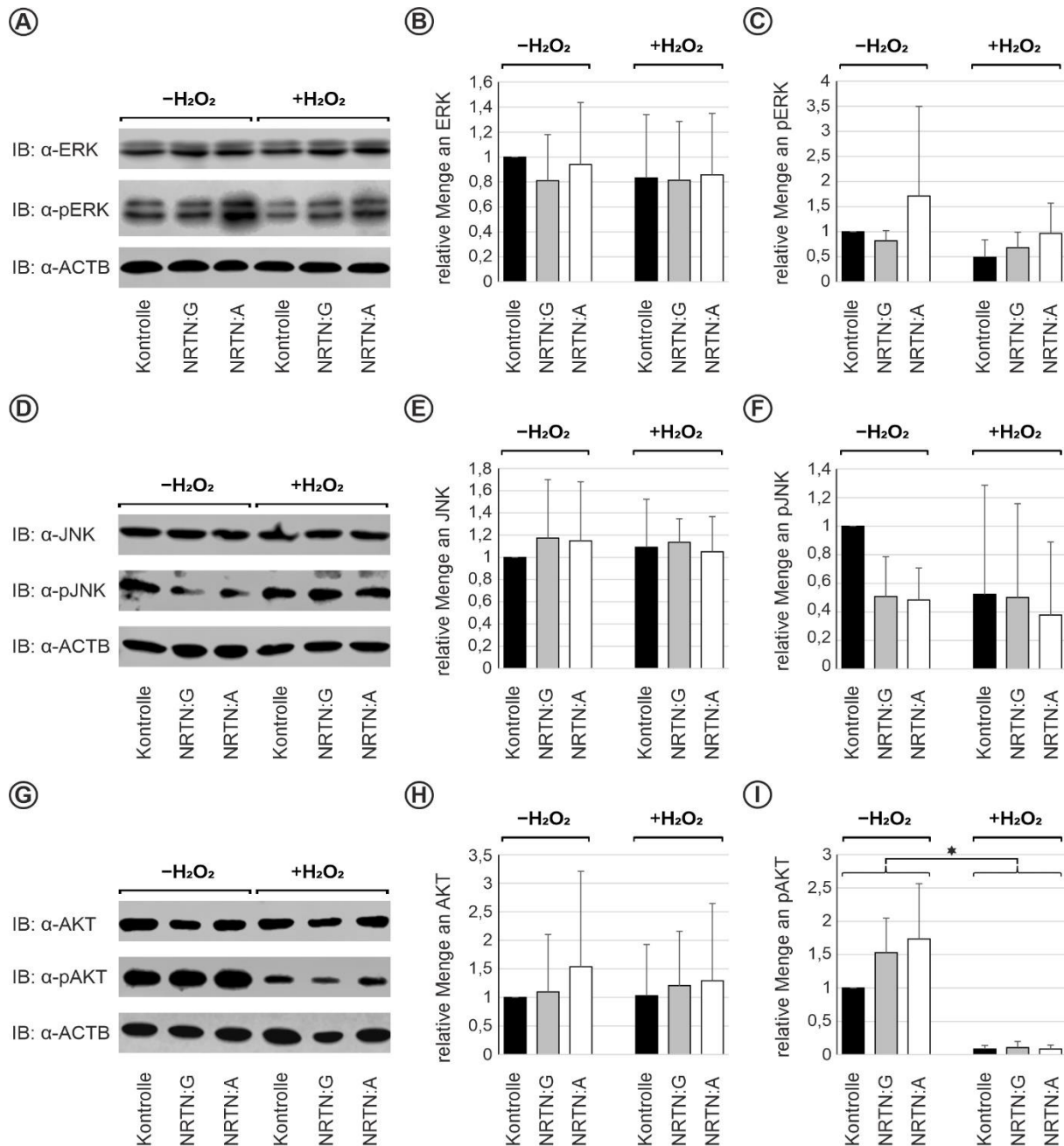


Abbildung 14: Einfluss von NRTN:G und NRTN:A auf die Einleitung von Autophagie in ARPE-19 Zellen und die Aktivierung von damit verbundenen Signalwegen mit und ohne Induktion von oxidativem Stress im Vergleich.

ARPE-19 Zellen wurden mit pcDNA4 (Kontrolle), sowie pcDNA4-GFP-NRTN:G und pcDNA4-GFP-NRTN:A transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen mit 0 bzw. 1 mM H_2O_2 für 2 h inkubiert und danach in Western Blot Analysen mit Antikörpern gegen gesamtes und phosphoryliertes ERK1/2 (ERK1/2 und pERK1/2) (A), gegen gesamtes und phosphoryliertes JNK (JNK und pJNK) (D), gegen gesamtes und phosphoryliertes AKT (AKT und pAKT) (G), sowie gegen den Housekeeper ACTB (A, D, G) eingesetzt. Anschließend erfolgte eine densitometrische Auswertung. Die Signale wurden gegen den jeweiligen Housekeeper ACTB normalisiert und auf die pcDNA4-GFP transfizierte Kontrolle ohne H_2O_2 -Behandlung kalibriert (B, C, E, F, H, I). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus 5 unabhängigen Replikaten bei ERK/pERK (A-C), 3 unabhängigen Replikaten bei JNK/ pJNK (D-F) und 4 unabhängigen Replikaten bei AKT/ pAKT (G-I). Die Evaluierung zur Überprüfung statistisch signifikanter Differenzen zwischen allen Proben zueinander erfolgte mittels Kurskall-Wallis Test mit anschließender Bonferroni-Korrektur. Die statistische Evaluierung zwischen den gesamten unbehandelten und den gesamten H_2O_2 -behandelten Proben in (I) erfolgte mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test. Der Stern zeigt einen signifikanten Unterschied an ($p < 0,05$).

Ebenso wie bei gesamtem ERK1/2 waren auch bei gesamtem JNK keine Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Proben, sowie zwischen den unterschiedlich transfizierten Proben zu erkennen (Abbildung 14 D und E). Die phosphorylierte Form von JNK zeigte in den nicht H₂O₂ gestressten Zellen eine Abnahme des Signals bei den mit pcDNA4-GFP-NRTN:G oder pcDNA4-GFP-NRTN:A transfizierten Proben im Vergleich zur pcDNA4-GFP transfizierten Kontrolle (Abbildung 14 D und F). Ein vergleichbar starker Rückgang an phosphoryliertem JNK wurde bei allen H₂O₂ behandelten Proben im Vergleich zur unbehandelten, mit pcDNA4-GFP transfizierten Kontrolle beobachtet. Da für diese Messung jedoch nur 3 Replikate zur Verfügung standen und hohe Standardabweichungen auftraten, ist eine Wiederholung unabdingbar. Die statistische Auswertung der 3 unabhängigen Replikate zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen Proben.

Bei der Messung gesamten AKTs wurden große Standardabweichungen erhalten, die Gesamtauswertung zeigte jedoch weder eine Beeinflussung durch die Transfektion noch durch die H₂O₂ Behandlung (Abbildung 14 G und H). Bei der phosphorylierten Form von AKT wurde bei nicht oxidativ gestressten Zellen durch die Transfektion mit den NRTN-Expressionsvektoren ein ca. 1,5-facher Anstieg beobachtet ($p > 0,05$ bei 4 unabhängigen Proben, Abbildung 14 G und I). Zudem war ein deutlicher, ca. 10-facher Rückgang der Menge an phosphoryliertem AKT bei den mit H₂O₂ behandelten Proben zu erkennen (Abbildung 14 G und H). Der Vergleich aller unbehandelten mit allen H₂O₂ behandelten Zellen zeigte eine hohe statistische Signifikanz zwischen diesen Werten ($p < 0,0001$, Abbildung 14 H).

4.7 Effekte von NRTN auf oxidativen Stress induzierte Veränderung der Genexpression

Oxidativer Stress führt durch die Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalwege zu einer Veränderung der Expression verschiedenster Gene (zusammengefasst in Allen and Tresini, 2000; und Martindale and Holbrook, 2002). In diesem Projekt wurden daher mittels qRT-PCR die Auswirkungen von NRTN:G sowie NRTN:A auf die Expression bestimmter, für die AMD Pathologie relevanter Gene, in Zellen unter oxidativen Stress verfolgt. Hierzu zählen *CD46* (*Cluster of differentiation 46*) als Komplementkomponente (Fields *et al.*, 2015), *cFOS* (*FBJ murine osteosarcoma viral oncogene*

homologue) als Zielgen des MAP Kinasen Signalwegs (zusammengefasst in Hazzalin and Mahadevan, 2002; und Whitmarsh, 2007), der Seneszenzmarker *P21* (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 1*) (Yu et al., 2009), sowie dem mit der CNV in Verbindung gebrachten *VEGF* (Fields et al., 2015). Als Housekeeper diente das Gen *HPRT1* (*Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1*). Als Modellsystem für das RPE wurden hiPSC-RPE Zellen eingesetzt. Weri-Rb1 Zellen wurden als Modellsystem für Photorezeptorzellen verwendet.

4.7.1 In hiPSC-RPE Zellen als Modell für das RPE

HiPSC-RPE Zellen wurden auf NRTN:G-haltige, NRTN:A-haltige und Kontroll-ECM, welche zuvor von transfizierten Hek293 Zellen gebildet worden war, gesät. Nach 6-stündiger Inkubation, in der die Zellen auf der Matrix adhärten, erfolgte bei einem Teil der Zellen eine Induktion von oxidativem Stress durch Zugabe von 1 mM H₂O₂ für 24 h, der andere Teil blieb unbehandelt. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet, RNA isoliert und eine cDNA Synthese durchgeführt. Mit dieser erfolgte eine qRT-PCR gegen die Transkripte von *CD46*, *cFOS*, *P21*, *VEGF* und *HPRT1* (Abbildung 15).

Bei *CD46* (Abbildung 15 A) war ein deutlicher Rückgang um ca. 50 % in der Expression bei den behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten zu erkennen ($p < 0,0001$). Die Kultivierung auf NRTN:G- oder NRTN:A-haltiger ECM hatte jedoch keinen differentiellen Effekt auf die *CD46*-Expression.

Bei *cFOS* (Abbildung 15 B) wurde ein statistisch signifikanter Anstieg in der Genexpression um das 4- bis 8-fache durch oxidativen Stress induziert ($p < 0,001$). Hierbei erschien es, als ob die Kultivierung auf NRTN:G oder NRTN:A-haltiger ECM einen etwas stärkeren Anstieg im Vergleich zur Kultivierung auf Kontroll-ECM hervorrief; jedoch konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen diesen Proben festgestellt werden.

P21 (Abbildung 15 C) zeigte einen mehr als 20-fachen Anstieg in der Expression durch die H₂O₂ Behandlung der hiPSC-RPE Zellen ($p < 0,0001$). Die Kultivierung auf NRTN-haltiger ECM hatte keinen Einfluss auf die *P21* Expression.

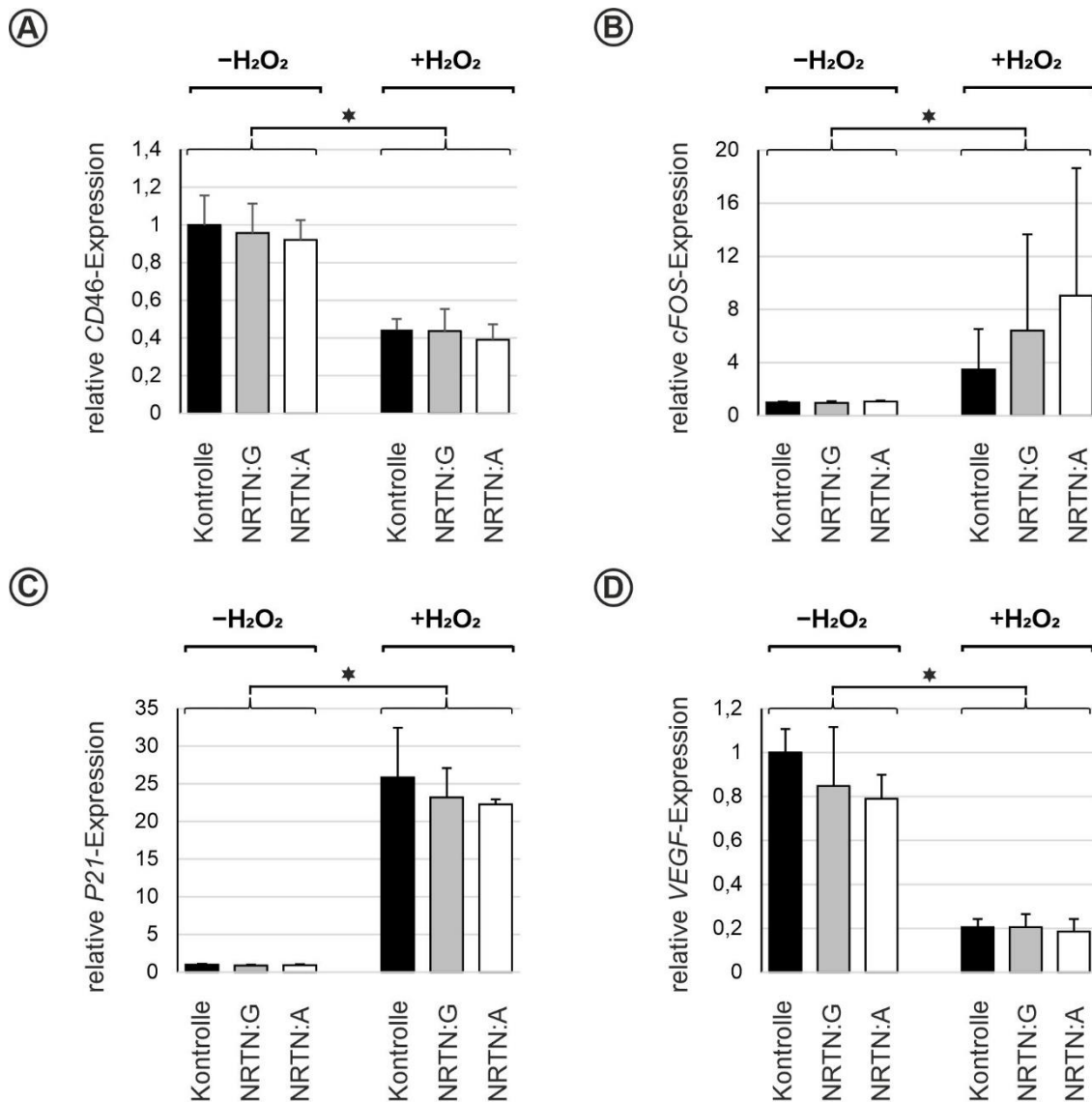


Abbildung 15: Einfluss von NRTN:G und NRTN:A auf die Expression von CD46, cFOS, P21 und VEGF in hiPSC-RPE Zellen nach Induktion von oxidativem Stress.

HiPSC-RPE Zellen, welche auf NRTN:G-haltiger, NRTN:A-haltiger oder Kontroll-ECM aufgebracht waren, wurden für 24 h mit 0 oder 1 mM H₂O₂ inkubiert. Nach Zellernte, RNA-Isolierung und cDNA-Synthese erfolgte eine qRT-PCR Analyse mit Primern gegen CD46 (A), cFOS (B), P21 (C), und VEGF (D). Die qRT-PCR mit Primern gegen den Housekeeper *HPRT1* diente zur Normalisierung. Die Signale wurden gegen *HPRT1* normalisiert und auf die Signale, welche für die nicht H₂O₂ behandelte Kontrolle erhalten worden waren, kalibriert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus 4 unabhängigen Replikaten. Die Evaluierung zur Überprüfung statistisch signifikanter Differenzen zwischen allen Ansätzen zueinander erfolgte mittels Kruskal-Wallis Test mit anschließender Bonferroni-Korrektur. Die statistische Evaluierung zwischen den gesamten unbehandelten und den gesamten H₂O₂-behandelten Proben erfolgte mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test oder Zweistichproben-t-Test. Sterne zeigen statistisch signifikante Unterschiede an ($p < 0,05$).

Bei *VEGF* führte oxidativer Stress zu einer deutlichen Abnahme der Genexpression um das ca. 5-fache (Abbildung 15 D, $p < 0,0001$). Auch hier hatte die Kultivierung auf NRTN-haltiger ECM keinen Einfluss auf die Genexpression.

4.7.2 Weri-Rb1 Zellen als Modell für Photorezeptorzellen

Weri-Rb1 Zellen wurden auf NRTN:G-haltige, NRTN:A-haltige und Kontroll-ECM, welche zuvor von transfizierten Hek293 Zellen gebildet worden war, gesät. Nach 72-stündiger Inkubation auf der jeweiligen ECM erfolgte bei einem Teil der Zellen eine Induktion von oxidativem Stress durch Zugabe von 1 mM H₂O₂, der andere Teil blieb unbehandelt. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet, cDNA über aus den Zellen gewonnene RNA hergestellt und eine qRT-PCR gegen die Gene *CD46*, *cFOS*, *P21*, *VEGF* und *HPRT1* durchgeführt (Abbildung 16).

Bei *CD46* war ein leichter Rückgang der Expression im Vergleich zu den mit H₂O₂ behandelten Proben zu erkennen, der statistische Signifikanz erreichte (Abbildung 16 A, $p < 0,001$). Kein Unterschied war durch die Kultivierung auf den verschiedenen, NRTN-haltigen oder –freien ECMs zu erkennen.

Demgegenüber zeigte *cFOS* starken (ca. 10- bis 28-fachen) Expressionsanstieg nach der Induktion von oxidativem Stress (Abbildung 16 B, p-Wert: $p < 0,0001$). Dieser Anstieg erschien in den auf NRTN:G-haltiger ECM kultivierten Zellen reduziert (10-facher Anstieg im Vergleich zu >20-fachem Anstieg bei Kontroll- oder NRTN:A-haltiger ECM). Dieser Unterschied erreichte jedoch keine statistische Signifikanz.

Die Genexpression von *P21* wies nach der Behandlung mit H₂O₂ eine ca. 4-fache Steigerung auf (Abbildung 16 C, p-Wert: $p < 0,001$). Kein Unterschied war durch die Kultivierung auf den verschiedenen, NRTN-haltigen oder –freien ECMs zu erkennen

Auch die *VEGF*-Expression zeigte nach H₂O₂-Behandlung eine Steigerung um das ca. 4-fache (Abbildung 16 D, $p < 0,0001$). Wie für *cFOS* erschien dieser Anstieg in den auf NRTN:G-haltiger ECM kultivierten Zellen reduziert (2,5-facher Anstieg im Vergleich zu 5-fachem Anstieg bei Kontroll- oder NRTN:A-haltiger ECM), wobei auch hier dieser Unterschied keine statistische Signifikanz erreichte.

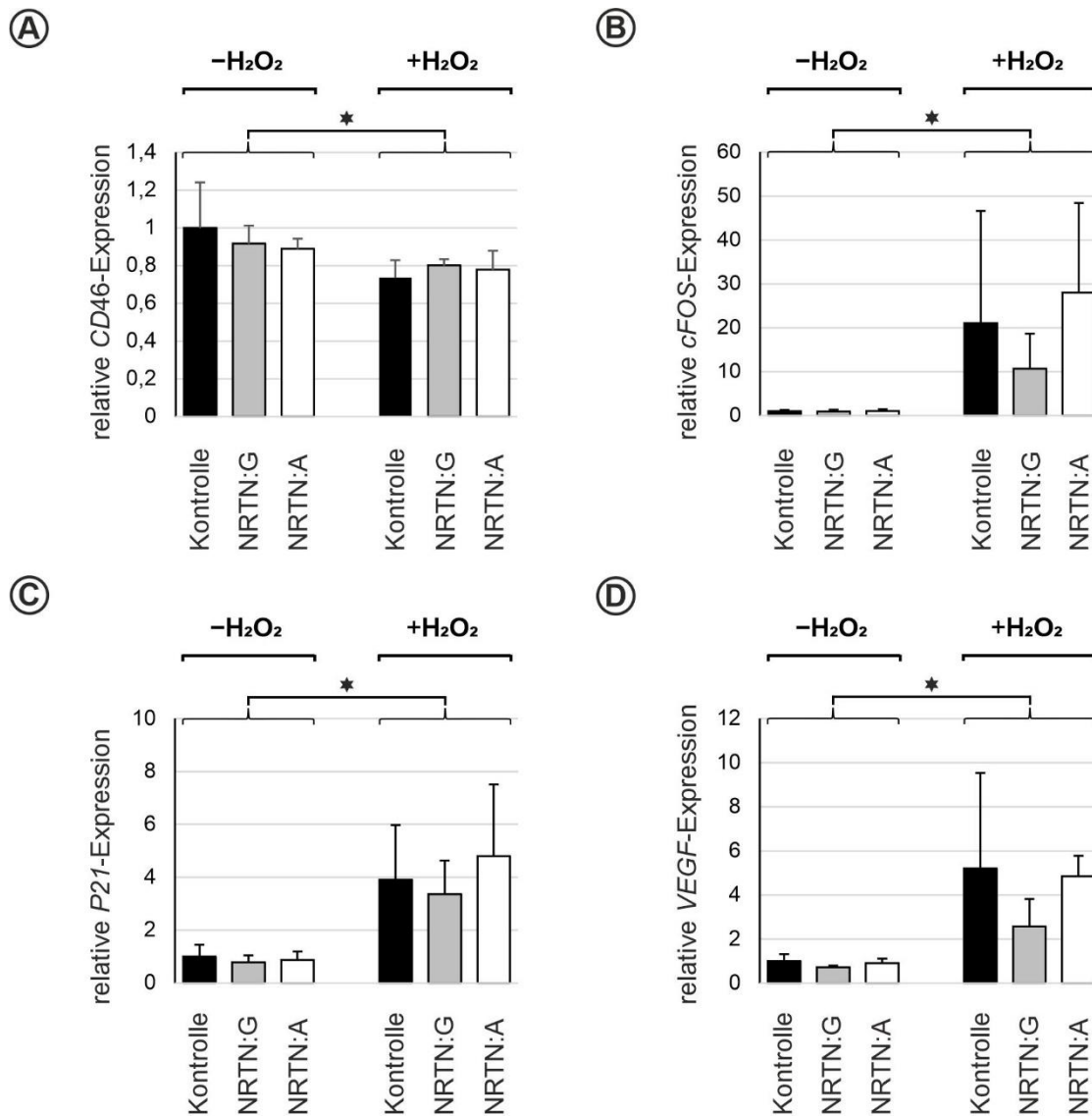


Abbildung 16: Einfluss von NRTN:G und NRTN:A auf die Genexpression von CD46, cFOS, P21 und VEGF in auf NRTN-haltiger ECM kultivierten Weri-Rb1 Zellen mit und ohne Induktion von oxidativem Stress im Vergleich.

Weri-Rb1 Zellen wurden auf NRTN:G-haltige, NRTN:A-haltige und Kontroll-ECM gesät und 72 h inkubiert. Dann erfolgte bei der Hälfte der Zellen eine Induktion von oxidativem Stress durch Zugabe von 0,1 mM H_2O_2 , sowie Inkubation für 24 h. Nach Zellernte, RNA-Isolierung und cDNA-Synthese erfolgte eine qRT-PCR Analyse mit Primern gegen CD46 (A), cFOS (B), P21 (C), und VEGF (D). Die qRT-PCR mit Primern gegen den Housekeeper *HPRT1* diente zur Normalisierung. Die Signale wurden gegen *HPRT1* normalisiert und auf die Signale, welche für die nicht H_2O_2 behandelte Kontrolle erhalten worden waren, kalibriert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus 4 unabhängigen Replikaten. Die Evaluierung zur Überprüfung statistisch signifikanter Differenzen zwischen allen Ansätzen zueinander erfolgte mittels Kruskal-Wallis Test mit anschließender Bonferroni-Korrektur. Die statistische Evaluierung zwischen den gesamten unbehandelten und den gesamten H_2O_2 -behandelten Proben erfolgte mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test oder Zweistichproben-t-Test. Sterne zeigen statistisch signifikante Unterschiede an ($p < 0,05$).

4.8 Effekte von NRTN auf die neuronale Differenzierung

NRTN ist ein Mitglied der Familie der GDNF Proteine (Kotzbauer *et al.*, 1996). Es konnte gezeigt werden, dass Proteine dieser Familie eine Rolle bei der Differenzierung zu neuronalen Zellen spielen (Mount *et al.*, 1995; zusammengefasst in Meyers and Kessler, 2017) und, insbesondere NRTN, auch die Differenzierung retinaler Zellen entscheidend prägt (Wolf, Rothermel and Robitzki, 2008). In diesem Teilprojekt wurde deswegen ein Effekt von NRTN:G und NRTN:A auf die neuronale Differenzierung der Weri-Rb1 Zellen untersucht.

Hierfür wurden Weri-Rb1 Zellen in Poly-L-Lysin beschichteten Wells ausgesät und mit den Vektoren pcDNA4, pcDNA4-GFP-NRTN:G, und pcDNA4-GFP-NRTN:A transfiziert. Es folgte eine Inkubationszeit von 5 Tagen in Gegenwart des N-2 Supplements (100x), welches zusätzlich zur Poly-L-Lysinierung die neuronale Differenzierung stimuliert (Hirooka *et al.*, 2002). Darauf wurden Phasenkontrast-Mikroskopaufnahmen von transfizierten Zellen (erkennbar durch GFP-Fluoreszenz) angefertigt. Das Vorhandensein von Zellfortsätzen wurde als Zeichen einer stattgefundenen Differenzierung gewertet (nach Sainath and Gallo, 2015). Beispiele für eine differenzierte und eine undifferenzierte Zelle sind in Abbildung 17 dargestellt. Die weißen Pfeile im Bild oben links und rechts zeigen auf Zellfortsätze der differenzierten Zelle, welche teils auch in der Fluoreszenzaufnahme (Bild rechts oben) zu erkennen waren.

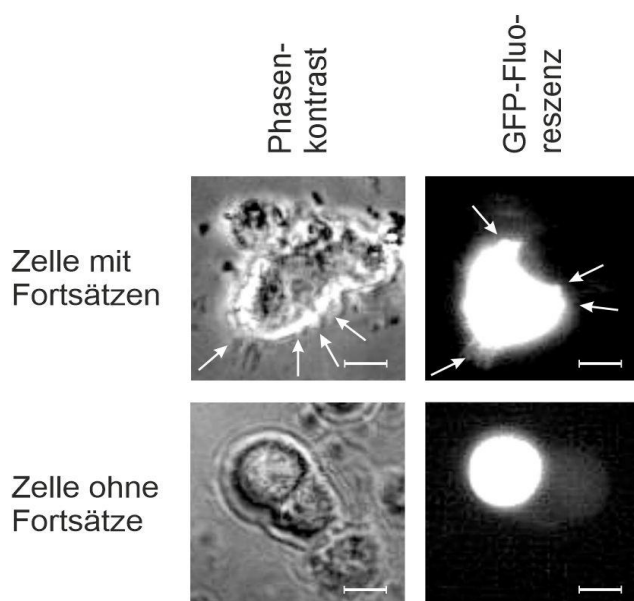


Abbildung 17: Aufnahmen differenzierter und undifferenzierter Weri-Rb1 Zellen mittels Phasenkontrast und Fluoreszenzmikroskopie.

Weri-Rb1 Zellen wurden auf Poly-L-lysinisierten Platten ausgesät und mit pcDNA4-GFP-NRTN:G, pcDNA4-GFP-NRTN:A oder dem Kontrollvektor pcDNA4-GFP transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 5 Tagen in Gegenwart von N2-Supplement wurden Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen unter 40-facher Vergrößerung erstellt. Die weißen Pfeile zeigen Zellfortsätze, an denen differenzierte Zellen zu erkennen sind. Standard: 25 µm.

In 5 unabhängigen Experimenten wurde die Anzahl der transfizierten, differenzierten und undifferenzierten Zellen bestimmt (Tabelle 31). Während in den mit pcDNA4-GFP transfizierten Zellen 50,0 % der Zellen undifferenziert (und somit 50,0 % differenziert) waren, sank der Anteil der undifferenzierten Zellen in den mit pcDNA4-GFP-NRTN:G und pcDNA4-GFP-NRTN:A transfizierten Zellen auf 34,7 % bzw. 33,0 % ab (Tabelle 31).

Tabelle 31: Anzahl und Prozentsätze der differenzierten und undifferenzierten Weri-Rb1 Zellen nach der Transfektion mit pcDNA4-GFP (Kontrolle), pcDNA4-GFP-NRTN:G und pcDNA4-GFP-NRTN:A.

	Kontrolle		NRTN:G		NRTN:A		Summe
	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent	Anzahl
Undifferenzierte Zellen	53	50,00	34	34,68	32	32,99	119
Differenzierte Zellen	53	50,00	64	65,32	65	67,01	182
Summe*	106	100,00	98	100,00	97	100,00	301

* Die transfizierten Zellen wurden in insgesamt 5 unabhängigen Versuchen ausgezählt. Einer dieser Versuche wurde dabei von Franziska Groß im Rahmen ihrer medizinischen Dissertation durchgeführt.

Mit den erhaltenen Daten wurde ein Fishers Exact Test durchgeführt, wobei ein statistisch signifikanter Unterschied von $p=0,024$ errechnet wurde. Tabelle 32 zeigt die durch den exakten Fisher Test ermittelten Signifikanzniveaus in den einzelnen Gruppen. Erkennbar ist der statistisch signifikante Unterschied zwischen Kontrolle und den mit pcDNA4-GFP-NRTN:G bzw. pcDNA4-GFP-NRTN:A transfizierten Proben.

Tabelle 32: Dargestellt sind die mithilfe des Fisher Exact Tests ermittelten Signifikanzniveaus zwischen den mit pcDNA4-GFP (Kontrolle), pcDNA4-GFP-NRTN:G und pcDNA4-GFP-NRTN:A transfizierten Zellen. In den mit einem Sternchen gekennzeichneten Zellen liegt das Signifikanzniveau über $\alpha=0,05$.

	Kontrolle	NRTN:G	NRTN:A
Undifferenzierte Zellen	< *	>	>
Differenzierte Zellen	> *	<	<

4.9 Effekte von NRTN auf die Mikroglia-Aktivierung

Die Aktivierung von Mikroglia zählt zu den Vorgängen, die bei der Entwicklung einer AMD beobachtet werden konnten (Gupta, Brown and Milam, 2003; Chang *et al.*, 2007; Combadière *et al.*, 2007; zusammengefasst in Ding, Patel and Chan, 2009). Außerdem wurde vermutet, dass auch NRTN mit Mikroglia Zellen der Retina interagiert (Harada *et al.*, 2000, 2002, 2003). Deswegen wurde im letzten Teilprojekt dieser Arbeit der Effekt von NRTN:G und NRTN:A auf die Mikroglia-Aktivierung untersucht. Als Modellsystem für Mikroglia wurden murine, immortalisierte Mikroglia (BV-2) Zellen verwendet. Die Aktivierung der BV-2 Zellen erfolgte durch LPS (zusammengefasst in Zielasek and Hartung, 1996) und wurde durch die Verfolgung der Stickstoffmonoxid-Produktion, welche mit der Mikroglia-Aktivierung einhergeht (zusammengefasst in Bredt and Snyder, 1994; und Lowenstein, Dinerman and Snyder, 1994; sowie Dawson and Dawson, 1995), untersucht.

Hierfür wurden BV-2 Zellen auf 48-Well Zellkulturplatten ausgesät und mit pcDNA4, pcDNA4-GFP-NRTN:G oder pcDNA4-GFP-NRTN:A transfiziert. Nach 24 h erfolgte die Aktivierung eines Teils der Zellen durch Zugabe von 0,2 µg/ml LPS, während dem anderen Teil der Zellen dieselbe Menge an normalem Kulturmedium hinzugefügt wurde. Nach 20 h wurde die Menge an produziertem NO bestimmt. Abbildung 18 zeigt die Ergebnisse dieser Messungen:

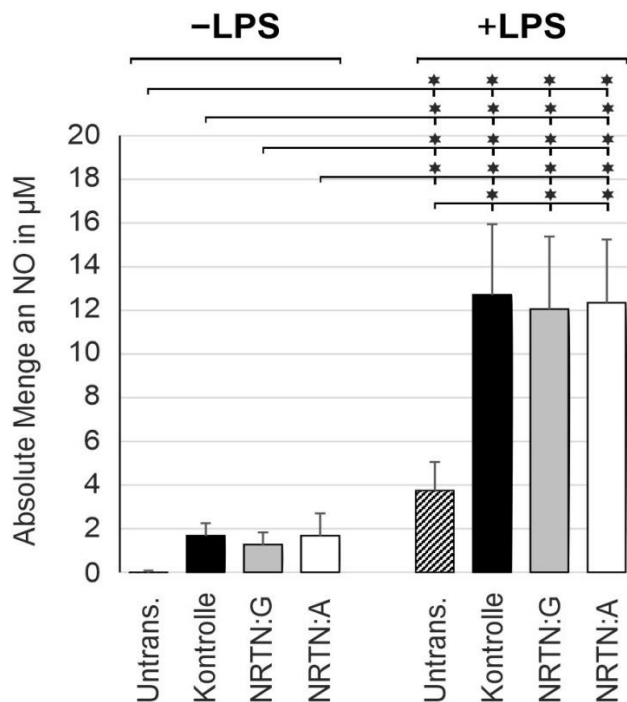


Abbildung 18: Einfluss von NRTN:G und NRTN:A auf die Mikroglia-Aktivierung in BV-2 Zellen mit und ohne Induktion von immunogenem Stress im Vergleich.

BV-2 Zellen wurden mit pcDNA4 (Kontrolle, pcDNA4-GFP-NRTN:G oder pcDNA4-GFP-NRTN:A transfiziert. Zusätzlich blieben Zellen untransfiziert (untrans.). Nach 24 h erfolgte die Zugabe von 0 oder 0,2 µg/ml LPS. Nach weiteren 20 h wurde der Überstand abgenommen und die produzierte NO-Menge bestimmt. Gezeigt sind absolute NO-Mengen (µM) aus 9 unabhängigen Replikaten. Eine statistische Evaluierung erfolgte mittels einfaktoriellen ANOVA Tests mit Tukeys multiple comparison Test. Sterne zeigen einen signifikanten Unterschied an ($p < 0,05$).

Untransfizierte, nicht mit LPS gestresste Zellen produzierten nahezu kein NO. Demgegenüber war bei den transfizierten Zellen bereits eine leichte ($< 2 \mu\text{M}$) stressbedingte NO-Produktion zu ermitteln. Dabei war kein Unterschied zwischen pcDNA4-GFP, pcDNA4-GFP-NRTN:G und pcDNA4-GFP-NRTN:A transfizierten Zellen zu erkennen. Wurden die Zellen mit LPS behandelt, so fanden sich deutlich höhere Konzentrationen an NO im Überstand, wobei auch hier ein Unterschied zwischen untransfizierten (ca $4 \mu\text{M}$ NO-Produktion) und transfizierten Zellen (ca $12 \mu\text{M}$ NO-Produktion) ersichtlich wurde. Erneut war kein Unterschied zwischen pcDNA4-GFP, pcDNA4-GFP-NRTN:G und pcDNA4-GFP-NRTN:A transfizierten Zellen zu erkennen.

Zahlreiche dieser oben genannten Unterschiede erreichten statistische Signifikanz. So waren alle LPS-freien Proben zu allen LPS-behandelten Proben statistisch signifikant unterschiedlich ($p < 0,0001$). Auch zwischen den mit LPS-behandelten untransfizierten und transfizierten Zellen wurden p-Werte von $p < 0,0001$ erhalten.

5 Diskussion

SNP rs79744308 im *NRTN*-Gen weist eine protektive AMD-Assoziation auf und führt zu einem Aminosäureaustausch im entstehenden NRTN-Propeptid. Im Rahmen dieser Arbeit wurden funktionelle Untersuchungen an zwei verschiedenen Varianten des NRTN-Proteins, der Normalform NRTN:G und der AMD-assoziierten Form NRTN:A, durchgeführt, um eine mögliche Beteiligung von NRTN an der AMD Pathogenese zu überprüfen.

Eine Analyse verwendeter Modell-Zelllinien zeigte deutliche *NRTN*-mRNA-Expression in 661W-, Y79- und Hek293 Zellen, schwächere NRTN-mRNA-Expression in BV-2- und hiPSC-RPE Zellen sowie kaum nachzuweisende NRTN-Signale in ARPE-19- und HUVEC Zellen. In keiner dieser Zelllinien konnte jedoch endogene NRTN-Proteinexpression detektiert werden. Nach heterologer Überexpression der NRTN-Varianten in Hek293 Zellen war eine signifikant gesteigerte ECM-Ablagerung von NRTN:A im Vergleich zu NRTN:G zu beobachten, wobei die Menge an intrazellulärem und sezerniertem NRTN bei beiden Varianten annähernd vergleichbar war. Eine NRTN-Spaltung und somit Freisetzung der aktiven Kette von NRTN konnte in Western Blot Analysen nicht nachgewiesen werden. Funktionelle Analysen ließen auf einen Effekt von heterolog exprimiertem NRTN auf die ECM-Zusammensetzung von ARPE-19 Zellen sowie auf die Differenzierung von Weri-Rb1 Zellen schließen. Kein Einfluss von rekombinantem NRTN konnte demgegenüber auf die durch oxidativen Stress induzierte Autophagieinduktion und Signalwegsaktivierung in ARPE-19 Zellen, sowie die durch oxidativen Stress induzierte Veränderung der Genexpression in hiPSC-RPE- und Weri-Rb1 Zellen festgestellt werden. Auch die Aktivierung von Mikroglia wurde nicht von NRTN beeinflusst.

5.1 Charakterisierung von verwendeten Modell-Zelllinien auf heterologe NRTN-Expression

Zuerst wurden Vorversuche angestellt, um Zelllinien, welche in späteren Versuchen für die funktionelle Charakterisierung der NRTN-Varianten eingesetzt werden sollten, auf endogene NRTN-Expression hin zu überprüfen. In RT-PCR Analysen wurde eine deutliche *NRTN*-mRNA-Expression in 661W-, Y79-, Weri-Rb1- und Hek293 Zellen de-

tektiert. Vergleichbare Ergebnisse wurden in Studien mit ähnlichen Zellsystemen erhalten: So wurde, wie für die aus embryonaler Niere abgeleiteten Hek293 Zellen, eine Expression von *NRTN* in der Niere (Widenfalk *et al.*, 1997; Xian, Huang and Zhou, 1999; Camassei *et al.*, 2003) und in Nephroblastomzellen (Camassei *et al.*, 2003) detektiert. Auch in Y79 Zellen, die ähnlich wie Weri-Rb1 Zellen immortalisierte Retinoblastomzellen darstellen, wurde eine *NRTN*-mRNA-Expression nachgewiesen (Poulaki *et al.*, 2007). Für 661W Zellen konnten keine Daten zur *NRTN*-Expression gefunden werden, jedoch ist bekannt, dass *NRTN* in der gesamten Retina, somit auch in Photorezeptorzellen, von Ratten exprimiert wird (Harada *et al.*, 2003; Jomary *et al.*, 2004). Etwas schwächere *NRTN*-Expressionssignale zeigten sich bei BV-2 und hiPSC-RPE Zellen, bei HUVEC und ARPE-19 Zellen fand sich eine kaum darstellbare *NRTN*-Expression. Auch dies steht im Einklang mit vorhandenen Studien an ähnlichen Zellsystemen: So fanden Igarashi und KollegInnen heraus, dass GFAP (Glial fibrillary acidic protein)-positive Gliazellen (ähnlich zu den BV-2 Zellen) der Retina *NRTN* exprimierten (Igarashi *et al.*, 2000). In Bezug auf RPE Zellkulturmodelle (ARPE-19 und hiPSC-RPE) konnten Analysen an murinem RPE *NRTN*-Transkription auf mRNA Ebene zeigen (Widenfalk *et al.*, 1997; Jomary *et al.*, 1999). Auch im Choroid, das ebenso wie HUVEC Zellen aus Endothelzellen besteht, wurde eine mRNA-Expression von *NRTN* nachgewiesen (Jomary *et al.*, 2004). Dem sehr schwachen Signal bei ARPE-19- und HUVEC Zellen könnte eine kulturbedingte Veränderung des Expressionsmusters zu Grunde liegen. So führt die Immortalisierung von Zellen oder schon ihre Entnahme aus dem Gewebsverband häufig zu einer Expressionsveränderung, wodurch gewebs- oder zellspezifische Gene ausgeschaltet und im Gegenzug andere Gene, welche zum Beispiel mit verstärkter Proliferation assoziiert sind, angeschaltet werden (Chang-Liu and Woloschak, 1997; Joosten and Shuler, 2003; Januszyk *et al.*, 2015). In Western Blot Analysen wurde in keiner der untersuchten Zelllinien *NRTN*-Protein detektiert. Diskrepanzen zwischen der Expression der mRNA und der tatsächlich produzierten Proteinmenge sind bekannt (Vogel *et al.*, 2010) und können unterschiedliche Ursachen haben, wie alternative Polyadenylierung, alternatives Splicing, Regulation der Translation (zusammengefasst in Licatalosi and Darnell, 2010; und de Klerk and 't Hoen, 2015), oder verstärkte intrazelluläre Ubiquitinierung (Sarkar *et al.*, 2012). Aufgrund der *NRTN*-Proteindefizienz in den verwendeten Zellkultur-Modellen wurden, für die sich anschließenden funktionellen Analysen, das *NRTN*-Protein heterolog in Zellen überexprimiert oder die Zellen auf *NRTN*-haltiger ECM kultiviert.

5.2 Expression, Sekretion und ECM-Ablagerung von NRTN:G und NRTN:A nach heterologer Überexpression

Nach heterologer Expression der NRTN Varianten in Hek293 Zellen wurde kein Effekt von rs79744308 auf die Expression und Sekretion der NRTN-Isoformen detektiert. Jedoch wurde ein signifikanter Unterschied in der ECM-Ablagerung von NRTN:G und der protektiven Variante NRTN:A detektiert, wobei NRTN:A eine etwa 2,5-fach stärkere Anreicherung in der ECM im Vergleich zu NRTN:G aufwies. Dem könnten verschiedene Ursachen zugrunde liegen. So ist es möglich, dass die rs79744308 assoziierte Veränderung des Codons (GCA → ACA) zu einer erhöhten Translationsgeschwindigkeit führt (Elf *et al.*, 2003; zusammengefasst in Plotkin and Kudla, 2011; und Quax *et al.*, 2015; sowie Schuller and Green, 2018). GCA mit einer Häufigkeit von 17,05 je 1.000 Codons und ACA mit einer Häufigkeit von 16,54 je 1.000 Codons weisen jedoch eine sehr ähnliche Frequenz auf (nach Athey *et al.*, 2017 unter Verwendung der dort vorgeschlagenen Website: <https://hive.biochemistry.gwu.edu>). Dennoch könnte die Veränderung des Codons eine Abwandlung der mRNA-Sekundärstruktur zur Folge haben (zusammengefasst in Shabalina, Ogurtsov and Spiridonov, 2006) und sich so wiederum auf die Geschwindigkeit und Effizienz der Translation auswirken (zusammengefasst in Pop *et al.*, 2014; und Rodnina, 2016). Die gesteigerte Translationsgeschwindigkeit könnte zu größeren Mengen an sezerniertem Protein führen, welches schließlich in der ECM abgelagert werden würde. Dies könnte sich in einem leichten (statistisch nicht signifikanten) Anstieg der Menge an NRTN:A im Überstand widerspiegeln. Veränderte Translationsgeschwindigkeiten könnten jedoch auch die Faltung der neu gebildeten Polypeptidkette beeinflussen (Komar, Lesnik and Reiss, 1999; Kimchi-Sarfaty *et al.*, 2007), ebenso wie der Aminosäureaustausch selbst die Faltung des Proteins verändern kann (zusammengefasst in Matthews, 1987; Perry *et al.*, 1987). Die Faltung eines Proteins kann ebenfalls dessen Sekretion beeinflussen, indem z.B. der transmembrane Transport erleichtert wird (zusammengefasst in Demidyuk *et al.*, 2010). Auch ein direkter Effekt einer veränderten Faltung auf die Bindungsaffinität von NRTN an die ECM könnte der gesteigerten ECM-Ablagerung von NRTN:A zugrunde liegen. Schließlich liegt der AMD assoziierte SNP rs79744308 in der Propeptidregion von NRTN. Propeptidregionen spielen bei Proteinen eine wichtige Rolle für die korrekte Faltung der aktiven Kette (u.a. zusammengefasst in Eder and

Fersht, 1995; Yabuta *et al.*, 2001; zusammengefasst in Demidyuk *et al.*, 2010). Dies gilt auch für GDNF (Gray and Mason, 1990), welches strukturelle Ähnlichkeiten mit NRTN aufweist (Kotzbauer *et al.*, 1996; Sandmark *et al.*, 2018). Zwar vermuteten Fjord-Larsen und KollegInnen, dass die Propeptidregion bei NRTN keinen Einfluss auf die Faltung hat, dies wurde aber nur unter dem Aspekt der Bindung zu GFR α 2 betrachtet (Fjord-Larsen *et al.*, 2005) und schließt eine veränderte Faltung an anderen Stellen der aktiven Kette nicht aus. Da NRTN an Heparine und Heparansulfate in der ECM bindet (Lin *et al.*, 1993; Davies, Yates and Turnbull, 2003; Bessalov *et al.*, 2011; Sandmark *et al.*, 2018) könnte eine veränderte Tertiärstruktur in NRTN:A diese Bindestellen folglich leichter zugänglich machen. Nicht zuletzt ist eine faltungsbedingte Veränderung der Stabilität gegenüber proteolytischem Abbau des Proteins denkbar (Zhou, Kay and Hodges, 1994; zusammengefasst in Shortle, 1996; und Elcock, 2006). So könnte eine verringerte Suszeptibilität gegenüber extrazellulärem Abbau die effektive Menge an extrazellulär vorhandenem NRTN-Protein der Variante rs79744308 erhöhen.

Die signifikant verstärkte Anreicherung von NRTN:A in der ECM bedeutet in Konsequenz eine erhöhte NRTN-Exposition der angrenzenden Zellen, welche zu einer verstärkten Aktivierung des NRTN-assoziierten RET Signalwegs (Jing *et al.*, 1996; zusammengefasst in Airaksinen, Titievsky and Saarma, 1999; Tansey *et al.*, 2000) führen könnte. Eine möglicherweise erhöhte Affinität von NRTN:A zur ECM-Komponente Heparin, welches als relevant für die NRTN-Bindung an GFR α 2 und somit für die RET-Aktivierung beschrieben wurde (Parkash *et al.*, 2008), könnte die Induktion von RET zusätzlich verstärken. Da NRTN über die Aktivierung von RET einen neuroprotektiven Effekt in der Retina ausübt (u.a. Klöcker *et al.*, 1997; Koeberle and Ball, 1998; Frasson *et al.*, 1999; Harada *et al.*, 2000, 2003; Brantley *et al.*, 2008), könnte eine verstärkte ECM-Akkumulation der NRTN:A-Variante einen Erklärungsansatz für die protektive AMD-Assoziation dieser Variante darstellen.

5.3 Abspaltung des Propeptids bei heterolog exprimiertem NRTN

Im Rahmen der hier durchgeführten Western Blot Analysen mit NRTN-haltigem Überstand (aber auch in der ECM oder an Zellen) konnte nur die vollständige NRTN-Form (die aktive Kette verbunden mit dem Propeptid) nachgewiesen werden. Dies wurde auch von anderen Arbeitsgruppen nach heterologer NRTN-Expression beobachtet

(Fjord-Larsen *et al.*, 2005). Fjord-Larsen und KollegInnen vermuteten deshalb, dass *in vivo* andere Bedingungen herrschen könnten, die eine Abspaltung des Propeptids begünstigen (Fjord-Larsen *et al.*, 2005). Alternativ könnte die aktive Kette auch verstärktem proteolytischem Abbau unterliegen, wodurch eine Detektion mit Western Blot Analysen nicht möglich ist. So ist der Abbau vieler signalinduzierender Proteine beschleunigt, indem sie schnell durch zirkulierende Peptidasen abgebaut werden, wie im Falle von Endothelin (Pérez-Vizcaíno *et al.*, 1995) oder pankreatischem Polypeptid (Cuenco *et al.*, 2017). Interessanterweise wurde auch eine Internalisierung von GDNF nach Bindung an GRF α 1 gezeigt (Vieira, Thomas-Crusells and Vieira, 2003). Für NRTN gibt es hierfür keine Studien, jedoch könnte die schnelle Internalisierung der aktiven NRTN-Kette gefolgt von intrazellulärem Abbau der endozytierten Proteine ebenfalls zur fehlenden Detektion der aktiven Kette beitragen.

Im Überstand wurde in Western Blot Analysen nach heterologer NRTN-Expression nicht nur eine Bande mit der passenden Größe für reifes NRTN (22,5 kDa) sondern auch eine größere Bande mit einem Molekulargewicht zwischen 25 und 35 kDa angefärbt. Eine mögliche Erklärung stellen posttranslationale Modifikationen am NRTN-Protein dar. So können z.B. Glykosylierungen das Molekulargewicht von Proteinen vergrößern (Segrest *et al.*, 1971; zusammengefasst in Wen, Arakawa and Philo, 1996; Wang *et al.*, 2017). Auch eine kovalente Bindung von NRTN an andere Moleküle z.B. Lipide oder Ubiquitin-ähnliche Peptide (zusammengefasst in Wang, Peterson and Loring, 2014; und Audagnotto and Dal Peraro, 2017) wäre eine mögliche Erklärung. Jedoch sind für NRTN keine Glykosylierungsstellen oder extrazelluläre kovalente Interaktionspartner bekannt (Sandmark *et al.*, 2018). Die Herkunft dieser Bande ist also unklar.

5.4 Effekte von NRTN auf die Zusammensetzung der ECM

Nicht nur die extrazelluläre Verteilung von NRTN (Hamilton *et al.*, 2001; Besspalov *et al.*, 2011; zusammengefasst in Runeberg-Roos *et al.*, 2016), auch die Aktivierung von Rezeptoren ist eng mit der ECM verknüpft (Parkash *et al.*, 2008; Sandmark *et al.*, 2018). Die Struktur der ECM steht aber auch mit pathologischen Prozessen in Verbindung, wie sie bei der AMD vorkommen (Leivo and Engvall, 1986; Roybal *et al.*, 2005; Nilsson and Nilsson Ekdahl, 2012; zusammengefasst in Fernandez-Godino, Pierce

and Garland, 2016; und Fernandez-Godino, 2018). Schließlich ist bekannt, dass bestimmte Proteine einen Effekt auf die Struktur der gebildeten ECM, sowie damit verbundene zelluläre Vorgänge haben (zusammengefasst in Bornstein and Sage, 2002; Fernandez-Godino, Bujakowska and Pierce, 2018; zusammengefasst in Riley and Bradshaw, 2019). So zeigte eine kürzlich publizierte Studie von Fernandez-Godino und Arbeitsgruppe einen negativen Einfluss des mit früher Makuladegeneration assoziierten EFEMP1-Proteins auf die ECM-Struktur. Diese fehlerhaft gebildete ECM bewirkte in primären humanen fetalen RPE Zellen eine Aktivierung des Komplementsystems (Fernandez-Godino, Bujakowska and Pierce, 2018). Im Rahmen dieser Arbeit wurde, entsprechend den von Fernandez-Godino und KollegInnen beschriebenen Experimenten, nach 4 Wochen heterologer Überexpression von NRTN in ARPE-19 Zellen der Einfluss von NRTN auf die Struktur der ECM untersucht. Die mittels ICC und Western Blot adressierten Proteine stellen zentrale Bestandteile der ECM dar (zusammengefasst in Yue, 2014).

Die Detektion von NRTN auf der von ARPE-19 Zellen gebildeten ECM gelang in diesem Versuch weder in den Western Blot noch in den ICC-Analysen, obwohl zuvor nach kurzzeitiger heterologer Überexpression heterologe NRTN-Expression in ARPE-19 Zellen gezeigt werden konnte (siehe Abbildung 3 und Abbildung 12). Gründe hierfür könnten zum einen z.B. ein Verlust des Plasmids aus den zuvor erfolgreich transfizierten Zellen (Abbildung 3) sein, welcher häufiger bei Langzeitkultivierungen transfizierter Zellen beobachtet wird (zusammengefasst in Summers, 1991; und Lau, Malkus and Paulsson, 2013; sowie Stepanenko and Heng, 2017). Auch ein Abbau externen NRTNs nach GRF α vermittelter Internalisierung durch ARPE-19 Zellen (Vieira, Thomas-Crusells and Vieira, 2003) könnte die Menge ECM-gebundenen NRTNs deutlich reduzieren.

In der ECM von Kontroll-transfizierten und den mit NRTN-Expressionsvektoren transfizierten Zellen ergaben sich in den immunzytochemischen Analysen keine Unterschiede in der Verteilung von Laminin und Kollagen IV. Bei Kollagen VI und Fibronectin hingegen wurden Unterschiede sichtbar: so fanden sich nach Transfektion mit NRTN:G-Expressionsvektoren ausgeprägte Netze und Anhäufungen, die sich in diesem Maße nicht bei den mit Kontrollvektoren bzw. NRTN:A-Expressionsvektoren transfizierten Zellen zeigten. Elastin wies bei den mit NRTN:G und NRTN:A-Expressionsvektoren transfizierten Zellen eine erhöhte Anhäufung im Vergleich zu den

mit Kontrollvektoren transfizierten Zellen auf. Somit lassen diese ersten Versuche tatsächlich auf einen Effekt von NRTN auf die ECM-Struktur schließen, welche somit die Komplementaktivierung (Fernandez-Godino, Bujakowska and Pierce, 2018) aber auch die Bindung von Wachstumsfaktoren wie VEGF (zusammengefasst in Teti, 1992; und Bornstein and Sage, 2002), die Hemmung von extrazellulären Proteasen (zusammengefasst in Bornstein and Sage, 2002) oder Entzündungsreaktionen (zusammengefasst in Sorokin, 2010) beeinflussen könnten. Hierbei gilt jedoch zu bedenken, dass für die ICC-Analysen zwar 4 Replikate zur Verfügung standen, in welchen dieselben Beobachtungen gemacht wurden, jedoch die ECM-Struktur in den ICC-Analysen sehr ungleichmäßig auf den Filtern verteilt war, wodurch auch zufällige Anreicherungen das Gesamtbild beeinflusst haben könnten. Schließlich wurde in den ECMs kein NRTN detektiert. Die hier beobachteten Ergebnisse sind vielversprechend, erfordern jedoch eine umfängliche Validierung durch weitere Versuche. So zeigte ein neues Verfahren unter der Verwendung sogenannter "Crowder" eine deutlich gleichmäßigere Verteilung der von ARPE-19 Zellen produzierten ECM (McLenachan *et al.*, 2017). Zeitreihen-Analysen könnten zusätzlich den Verlauf der heterologen NRTN-Expression und ECM-Ablagerung nach Transfektion der ARPE-19 Zellen klären.

5.5 Effekte von NRTN durch oxidativen Stress induzierte Autophagie und Signalwegsaktivierung in kultivierten RPE-Zellen

Nicht nur die Strukturveränderungen in der ECM, sondern auch die fehlerhafte Induktion von Autophagie gilt als AMD-assoziiertes Prozess (Mitter *et al.*, 2012, 2014; zusammengefasst in Kaarniranta *et al.*, 2013; Szatmári-Tóth *et al.*, 2016). Besonders prädestiniert hierfür sind RPE Zellen, da sie große Mengen an oxidiertem Material von den Photorezeptorzellen aufnehmen und über lysosomale Prozesse, welche der Autophagie ähnlich sind, abbauen (zusammengefasst in Kiffin, Bandyopadhyay and Cuervo, 2006; Wang *et al.*, 2009; Szatmári-Tóth *et al.*, 2016). Dies kann zusätzlich zu einer übermäßigen Akkumulation von schädlichem Lipofuszin führen (Sparrow *et al.*, 2003; Bergmann *et al.*, 2004; zusammengefasst in Zarbin, 2004; und Kiffin, Bandyopadhyay and Cuervo, 2006). NRTN könnte über die Aktivierung des RET Signalweges hemmenden Einfluss auf die Autophagie (Sandilands *et al.*, 2012; zusammengefasst in Mulligan, 2018; Rudat *et al.*, 2018) nehmen. In den hier durchgeführten Versuchen gelang in ARPE-19 Zellen die Induktion der Autophagie nach der

Einleitung von oxidativem Stress durch H_2O_2 , ersichtlich anhand des reduzierten LC3 (I) zu LC3 (II) Verhältnisses. Dies steht im Einklang mit anderen Publikationen (Mitter *et al.*, 2014; Szatmári-Tóth *et al.*, 2016). Es zeigte sich jedoch kein Effekt von NRTN auf die Stärke der Autophagie-Induktion.

Die mit dem RET Signalweg verknüpften ERK-, JNK- und PI3K-AKT-Signalkaskaden (Chiariello *et al.*, 1998; zusammengefasst in Saarma and Sariola, 1999; und Arighi, Borrello and Sariola, 2005; Plössl *et al.*, 2017) wurden unterschiedlich von oxidativem Stress beeinflusst. Kein Effekt des oxidativen Stresses zeigte sich bei der Aktivierung der ERK-Kaskade (mit ERK1/2 als Marker) sowie der JNK-Kaskade (mit JNK als Marker), konträr zu bestehender Literatur, die eine Aktivierung durch oxidativen Stress beschreibt (zusammengefasst in Zhang *et al.*, 2016). Im Gegensatz dazu wurde die Phosphorylierung von AKT als Marker für die PI3K-AKT-Kaskase stark durch H_2O_2 -Zugabe reduziert. Dies steht im Einklang mit Daten anderer Arbeitsgruppen (u.a. Tang *et al.*, 2014; Ding *et al.*, 2017; Su *et al.*, 2017), welche eine reduzierte Aktivierung des PI3K-AKT Weges nach oxidativem Stress verzeichneten. Es zeigte sich in diesen Versuchen kein statistisch signifikanter Effekt von NRTN:G oder NRTN:A auf die untersuchten Signalwege. Dies könnte auch den fehlenden Effekt von NRTN auf die Autophagie-Induktion erklären. Unterschiedliche Umstände könnten dem zu Grunde liegen. So könnte der zuvor bereits angeführten Beobachtung, dass NRTN in den Western Blot Analysen nur in Verbindung mit dem Propeptid detektiert wurde (vgl. Fjord-Larsen *et al.*, 2005), und somit eventuell inaktiv ist (Yabuta *et al.*, 2001), die fehlende Wirkung heterolog exprimierten NRTNs erklären. Darüber hinaus könnten methodische Änderungen erforderlich sein. So ist für viele Signalwege eine nur vorübergehende Rezeptor-induzierte Aktivierung bekannt, welche nach längerer Inkubation nicht mehr detektiert werden kann (z.B. di Mari, Davis and Safirstein, 1999; zusammengefasst in Haas, 2001; Chen *et al.*, 2003). Es könnte also eine Änderung der Inkubationszeiten erforderlich sein, um mögliche Effekte von NRTN nachweisen zu können. Auch die Konzentration an zugegebenem H_2O_2 könnte das Ausmaß der Aktivierung von Signalkaskaden wie ERK und JNK verändern (Kurata, 2000). Schließlich beeinflusst die Transfektion selbst stark die intrazelluläre Signalwegsaktivierung (zusammengefasst in Rodriguez and Flemington, 1999) und könnte somit den Einfluss von NRTN überlagern.

5.6 Effekte von NRTN durch oxidativen Stress induzierte Genexpressionsveränderung in kultivierten RPE- und Retinoblastomzellen

Oxidativer Stress betrifft sowohl Photorezeptorzellen, als auch das RPE (Wang *et al.*, 2009; Curcio *et al.*, 2011; Yu-Wai-Man, Griffiths and Chinnery, 2011; Farrar *et al.*, 2013; zusammengefasst in Mitter *et al.*, 2014; und Kaarniranta *et al.*, 2019). Im folgenden Teilprojekt wurde deswegen der Einfluss von oxidativem Stress auf die Expression charakteristischer, mit pathologischen Prozessen der AMD assoziierter Gene in Weri-Rb1 (als Modellsystem für retinale neuronale Zellen) und hiPSC-RPE Zellen (als Modellsystem für RPE) untersucht. Zusätzlich wurde der Einfluss von NRTN:G und NRTN:A auf die Expressionsveränderungen betrachtet.

CD46, ein Gen, dessen Genprodukt die Aktivierung des Komplementsystems anzeigt (zusammengefasst in Russell, 2004; Elward *et al.*, 2005), ist mit der GA assoziiert (Vogt *et al.*, 2011; zusammengefasst in Whitmore *et al.*, 2015; und Datta *et al.*, 2017). Im Einklang zur bestehenden Literatur (Thurman *et al.*, 2009; Ebrahimi *et al.*, 2013; Carver and Yang, 2016) wurde hier nach oxidativem Stress sowohl bei Weri-Rb1 als auch bei hiPSC-RPE Zellen eine deutliche Abnahme der Expression von *CD46* unter oxidativem Stress detektiert. NRTN hatte keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Expression dieses Gens.

Die Transkription von *cFOS* gilt als Marker für die Aktivierung des MAP Kinasen Signalweges (u.a. Gao *et al.*, 2004; O'Donnell, Yang and Sharrocks, 2008). Veränderungen der Regulation bei den MAP Kinasen Signalwegen konnten mit der AMD in Verbindung gebracht werden (Dridi *et al.*, 2012; SanGiovanni and Lee, 2013; Pyakurel *et al.*, 2017). Vorhergehende Versuche verschiedener Arbeitsgruppen zeigten eine Hochregulierung des MAP Kinasen Systems unter oxidativem Stress (Glotin *et al.*, 2006; Busch *et al.*, 2018). Dies wurde in den hier durchgeführten Versuchen ebenfalls, sowohl bei Weri-RB1 als auch bei hiPSC-RPE Zellen, beobachtet.

P21, ein Seneszenz-Marker (Stein *et al.*, 1999; Althubiti *et al.*, 2014), wird bei oxidativem Stress in retinalen Zellen stärker exprimiert (Yu *et al.*, 2009; Marazita *et al.*, 2016). Dies wurde auch in den hier durchgeführten Versuchen an Weri-Rb1 und hiPSC-RPE Zellen gezeigt. Bei hiPSC-RPE und Weri-Rb1 Zellen fand sich erneut kein Unterschied zwischen Zellen, die auf NRTN:G-haltiger oder Kontroll-ECM kultiviert worden waren.

Als mit der CNV assoziiertes Gen (zusammengefasst in Ding, Patel and Chan, 2009; und Lim *et al.*, 2012) wurde die Expression von *VEGF* untersucht. Bei Weri-Rb1 Zellen fand sich nach oxidativem Stress, ein Anstieg in der Expression. Dies wurde auch schon zuvor für ARPE-19 Zellen nach oxidativem Stress beschrieben (Byeon *et al.*, 2010; Marazita *et al.*, 2016). HiPSC-RPE Zellen zeigten im Gegenzug jedoch einen deutlichen Abfall der *VEGF* Produktion nach oxidativem Stress. Gründe für diesen gegensätzlichen Befund könnten die Veränderung der Genexpression in kultivierten Zellen (Chang-Liu and Woloschak, 1997; Joosten and Shuler, 2003; Januszyk *et al.*, 2015), oder auch die Verwendung einer anderer Methodik für die Versuchsdurchführung (andere Inkubationszeiten, z.T. andere H_2O_2 -Konzentrationen) sein. Ein statistisch signifikanter Effekt von NRTN wurde weder in unbehandelten noch in oxidativ gestressten Zellen beobachtet.

Gründe für den fehlenden Effekt von NRTN auf die Genexpressionsveränderung nach oxidativem Stress könnten, wie schon unter Punkt 5.5 diskutiert, in der möglicherweise fehlenden Aktivität der vorliegenden Propeptid-gebundenen NRTN-Variante liegen (Yabuta *et al.*, 2001; Fjord-Larsen *et al.*, 2005), oder auf erforderliche methodische Änderungen, wie zum Beispiel bezüglich einer Änderung der Inkubationszeiträume (z.B. di Mari, Davis and Safirstein, 1999; zusammengefasst in Haas, 2001; Chen *et al.*, 2003) hinweisen.

Erste Tendenzen, die einen Effekt von NRTN auf Genexpressionsveränderungen nach oxidativem Stress andeuten, wurden jedoch erhalten. So wurde zum Beispiel nach oxidativem Stress eine tendenzielle, jedoch statistisch nicht signifikante Steigerung der *cFOS*-Expression in Weri-Rb1 und hiPSC-RPE-Zellen, die auf NRTN:A haltiger EC kultiviert worden waren, im Vergleich zu Zellen, die auch Kontroll-ECM oder NRTN:G haltiger ECM kultiviert worden waren, beobachtet. Sollte sich nach Durchführung weiterer Replikate ein signifikanter Unterschied herausbilden, könnte dieser auf eine durch NRTN:A vermittelte Steigerung der MAP Kinasen Aktivität unter oxidativem Stress hindeuten. Spekulationen über die Wirkung dieses Anstiegs auf die AMD Pathogenese lassen sich jedoch nur schwer erstellen, da widersprüchliche Ergebnisse zum positiven bzw. negativen Einfluss der MAP Kinasen auf die AMD und auf das Überleben von Zellen existieren (zusammengefasst in Lu and Xu, 2006; und Sawe, Steinberg and Zhao, 2008; Dridi *et al.*, 2012; Pyakurel *et al.*, 2017). Auffallend war des Weiteren nach oxidativem Stress eine (statistisch nicht signifikante) Verringerung der Expression von *cFOS*, *P21* und *VEGF* in den auf NRTN:G haltiger Matrix kultivierten

Weri-Rb1 Zellen im Vergleich zu den auf Kontroll- oder NRTN:A haltiger ECM kultivierten Zellen. Dies könnte auf eine durch NRTN:G vermittelte, höhere Resistenz gegenüber oxidativem Stress hindeuten, wie sie schon bei Neuronen und Gliazellen von galizischen Sumpfkrebsen (*Astacus leptodactylus*) (Uzdensky *et al.*, 2013) und enterischen Neuronen von Ratten (Korsak *et al.*, 2012) beobachtet wurde. Erklärbar wäre dies zum Beispiel durch den Befund, dass oxidativer Stress die PI3K-AKT Aktivierung reduziert (Ding *et al.*, 2017; Su *et al.*, 2017) wohingegen NRTN die PI3K-AKT Aktivierung induziert. Weitere Replikate sind jedoch auch hier erforderlich, um diese Beobachtungen zu validieren.

5.7 Effekte von NRTN auf die neuronale Differenzierung

Mitglieder der GDNF-Familie, insbesondere auch NRTN, fördern die neuronale Differenzierung (Mount *et al.*, 1995; zusammengefasst in Meyers and Kessler, 2017), auch von retinalen Zellen (Hishiki *et al.*, 1998; Wolf, Rothermel and Robitzki, 2008). In der hier durchgeführten Studie wurde deswegen der Effekt von NRTN auf die neuronale Differenzierung von Weri-Rb1 Zellen untersucht. Hierbei zeigte sich eine deutliche Stimulierung der Differenzierung in Zellen, die mit NRTN transfiziert worden waren, im Vergleich zur Kontrolle. Unterschiede nach Transfektion mit den Vektoren pcDNA4-GFP-NRTN:G und pcDNA4-GFP-NRTN:A wurden jedoch nicht verzeichnet. Ein direkter Effekt von NRTN auf die AMD-Pathogenese über die Differenzierung neuronaler Zellen ist nicht direkt einsichtig, da im höheren Alter die Zellen der Netzhaut bereits ausdifferenziert sind. Wenige Monate postnatal ist beim Menschen die Differenzierung und neuronale Verknüpfung weitestgehend abgeschlossen, ein Abschluss der Entwicklung findet im Kindesalter statt (Hendrickson and Yuodelis, 1984; Vajzovic *et al.*, 2012). Jedoch könnten sich frühe Defekte in der Entwicklung der neuronalen Netzhautzellen auch auf spätere AMD-bezogene, pathologische Prozesse auswirken (zusammengefasst in Jeffery and Sivaprasad, 2019). Der Effekt von NRTN auf die Differenzierung der Weri-Rb1 Zellen könnte allerdings auch ein Hinweis darauf sein, dass NRTN in diesen Zellen auch andere zelluläre Funktionen einnehmen kann, wie z.B der Schutz vor neuronaler Degeneration oder Regeneration beschädigter Neuronen (Harada *et al.*, 2003; Jomary *et al.*, 2004; Hoover *et al.*, 2014). Somit wäre nicht nur ein Effekt auf die Differenzierung, sondern auch ein generell protektiver Effekt von NRTN bezüglich degenerativer Prozesse der Retina (AMD) denkbar.

5.8 Effekte von NRTN auf die Mikroglia-Aktivierung

Im letzten Teilprojekt wurde der Effekt von NRTN auf die Aktivierung von Mikroglia untersucht, welche ebenfalls im Zusammenhang mit der AMD-Pathogenese steht (Gupta, Brown and Milam, 2003; Chang *et al.*, 2007; Combadière *et al.*, 2007; zusammengefasst in Ding, Patel and Chan, 2009). Dabei wurde nach Aktivierung der kultivierten Mikroglia (BV-2 Zellen) durch LPS (zusammengefasst in Zielasek and Hartung, 1996), ein deutlicher Anstieg der NO-Produktion, eine charakteristische Reaktion der Mikroglia-Aktivierung (zusammengefasst in Bredt and Snyder, 1994; und Lowenstein, Dinerman and Snyder, 1994; sowie Dawson and Dawson, 1995), beobachtet. Jedoch konnte kein Unterschied zwischen kontrolltransfizierten BV-2 Zellen und Zellen, die heterolog NRTN:G oder NRTN:A exprimierten, verzeichnet werden. Auffallend war ein Anstieg der NO-Menge in transfizierten Zellen auch ohne LPS-Behandlung. Grund hierfür ist wahrscheinlich der durch die Transfektion entstandene Stress. Diese Beobachtung steht im Einklang mit anderen publizierten Daten (Adami *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2004). Durch diese schon gesteigerte Aktivierung könnte der Effekt des heterolog produzierten NRTNs überlagert werden.

Eine frühere Studie konnte einen hemmenden Einfluss von NRTN auf die Mikroglia-Aktivierung nach LPS-Stress in mesenzephalen Mikroglia von Ratten feststellen (Rickert *et al.*, 2014). Ein Grund für den in diesem Experiment fehlenden Effekt von NRTN auf die Mikroglia-Aktivierung könnten, wie bereits in 5.5 und 5.6 diskutiert, in der möglicherweise fehlenden Aktivität der vorliegenden NRTN-Variante liegen (vgl. Yabuta *et al.*, 2001; und Fjord-Larsen *et al.*, 2005). Außerdem könnte die Verwendung eines anderen Zellmodells, sowie anderer Methoden einen Einfluss haben. Methodische Modifikationen, wie zum Beispiel eine Änderung der Inkubationszeiträume könnten sich daher als sinnvoll erweisen. Auch eine andere Art der NRTN-Exposition, z.B. durch Kultivierung der BV-2 Zellen auf NRTN-haltiger ECM statt Transfektion der BV-2 Zellen, könnte sich als hilfreich erweisen, da hierdurch die negativen Effekte der Transfektion auf die Mikroglia-Aktivierung umgangen werden könnten. Schließlich ist die Produktion von Botenstoffen nicht die einzige Art, wie sich eine Aktivierung von Mikroglia-Zellen äußert (zusammengefasst in Kettenmann *et al.*, 2011). Alternativ könnte zum Beispiel auch das veränderte Migrationsverhalten (z.B. in Kittl *et al.*, 2018),

sowie Morphologie (zusammengefasst in Kreutzberg, 1996; z.B. in Jacobowitz *et al.*, 2012) oder die Genexpression (z.B. in Kim *et al.*, 2013) untersucht werden.

5.9 Abschließende Betrachtung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass heterolog exprimiertes NRTN der protektiven AMD-assoziierten Varianten (NRTN:A) eine verstärkte Anreicherung in der ECM im Vergleich zur nicht AMD-assoziierten NRTN:G Varianten aufweist. Dies könnte auf eine funktionelle Konsequenz für rs79744308 schließen lassen, indem ECM-Strukturen oder intrazelluläre Signalwege durch eine Anreicherung der NRTN:A Isoform beeinflusst würden. Erste Experimente lassen bereits auf Effekte von NRTN auf die ECM-Struktur sowie auf die neuronale Differenzierung schließen, erfordern jedoch weitere Versuche zur Bestätigung dieser Befunde. Auch die Überprüfung weiterer funktioneller Konsequenzen, wie ein möglicher Einfluss auf Autophagie oder intrazelluläre Signalwege sollte fortgesetzt werden. Erkenntnisse aus diesen Versuchen könnten dann nicht nur die Aufklärung der Krankheitsentstehung der AMD begünstigen, sondern möglicherweise auch Türen für neuartige Therapiekonzepte mit NRTN, ähnlich zu der für Morbus Parkinson geplanten therapeutischen Anwendung von NRTN (zusammengefasst in Axelsen and Woldbye, 2018), öffnen.

6 Zusammenfassung

Die altersabhängige Makuladegeneration (AMD) ist eine komplexe Erkrankung, die zu einer Degeneration retinaler Strukturen führt. Besonders betroffen sind die Photorezeptorzellen und das retinale Pigmentepithel (RPE) der Makula (*macula lutea*), was zu einem Verlust des zentralen Visus und damit zu einer großen Einschränkung der Lebensqualität betroffener Patienten führt. (zusammengefasst in Jager, Mieler and Miller, 2008). Die AMD ist die dabei häufigste Ursache für visuelle Einschränkungen und Erblindung der älteren europäisch-stämmigen Bevölkerung (zusammengefasst in Rudnicka *et al.*, 2015). Die vielschichtige molekulare Pathogenese der AMD ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Sie weist auf verschiedene fehlregulierte Prozesse hin, wie zum Beispiel das Immunsystem (Komplementsystem und Mikroglia-Aktivierung), Entzündungsreaktionen, Autophagie oder gestörte Signalwege (zusammengefasst in Ding, Patel and Chan, 2009; und Akins *et al.*, 2010). Auch die Genetik hat einen großen Einfluss auf die Pathogenese dieser multifaktoriellen Erkrankung (Seddon *et al.*, 2005).

Durch GWAS-Analysen (Fritsche *et al.*, 2016) konnte die Variante rs79744308, welche in der kodierenden Sequenz des *NRTN*-Gens liegt und einen Aminosäureaustausch an Position 59 des NRTN-Proteins bewirkt, in einem protektiven Zusammenhang mit der AMD assoziiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Konsequenzen dieser Varianten auf das NRTN-Protein und seiner Beteiligung an AMD assoziierten Prozessen untersucht. Nach heterologer Überexpression in Hek293 Zellen wurde kein Effekt von rs79744308 auf Expression und Sekretion von NRTN festgestellt. Dafür wurde ein deutlicher Anstieg bei der Anlagerung der protektiven NRTN-Varianten (NRTN:A) im Vergleich zur normalen (NRTN:G) Varianten in der extrazellulären Matrix (ECM) festgestellt. Erste immunozytochemische Versuche, die charakteristische Proteine der ECM analysierten, ließen außerdem auf einen möglichen Effekt von heterolog exprimiertem NRTN bei der Ausbildung und Zusammensetzung der ECM-Struktur in ARPE-19 Zellen schließen, erfordern jedoch weiterer Modifikationen und Replikationen, um eine klare Quantifizierung und Bestätigung dieser Beobachtungen zu erreichen. In Experimenten zum Einfluss von NRTN auf die Induktion von Autophagie und intrazellulären Signalwegen in ARPE-19 Zellen, getestet in Western Blot Analysen durch die Verfolgung spezifischer Markerproteine für diese zellulären Prozesse, konnte kein Effekt von NRTN verzeichnet werden. Auch auf die durch Lipopolysaccharid-Zufuhr sti-

multierte Aktivierung von Mikroglia, welche durch die Messung der NO-Produktion verfolgt wurde, hatte NRTN keinen Einfluss. Jedoch lassen erste Versuche auf einen Einfluss von NRTN in der durch oxidativen Stress modifizierten Genexpression von kultivierten Retinoblastomzellen als Modellsystem für neuronale retinale Zellen schließen. Replikationsstudien sind auch hier erforderlich, um eine (statistische) Signifikanz zu belegen. Schließlich zeigten Experimente an Retinoblastomzellen, dass die heterologe NRTN-Expression die neuronale Differenzierung fördert.

Weitere funktionelle Analysen sind erforderlich, um einen Einfluss von rs79744308 auf die AMD Pathogenese zu belegen. Sie könnten letzten Endes einen Beitrag von NRTN zur Therapie der AMD eröffnen, wie das bereits bei Morbus Parkinson der Fall ist (zusammengefasst in Axelsen and Woldbye, 2018).

7 Abstract

Age-related macular degeneration (AMD) is a complex disease leading to degeneration of vital retinal structures. In particular, it affects photoreceptor cells and the retinal pigment epithelium (RPE) in the macula. As a consequence, a loss of central vision occurs, strongly decreasing quality of life in AMD patients (reviewed in Jager, Mieler and Miller, 2008). AMD is the leading factor for visual impairment and loss of vision in the elderly population of European decent (reviewed in Rudnicka *et al.*, 2015). So far, its complex molecular pathogenesis is not fully understood. It reveals several dysregulated cellular processes like the immune system (complement system and microglial activation), inflammation, autophagy, or signaling pathways (reviewed in Ding, Patel and Chan, 2009; and Akins *et al.*, 2010). Furthermore, genetics also has a great impact on disease development (Seddon *et al.*, 2005).

GWAS conducted by Fritsche and colleagues (Fritsche *et al.*, 2016) identified rs79744308, which is located in the coding sequence of the *NRTN* gene and leads to an amino acid exchange at amino acid position 59 in the translated protein, as being protectively associated with AMD. In this thesis, consequences of this genetic variation of the NRTN-protein and its involvement in AMD-associated processes were investigated. Heterologous overexpression in Hek293 cells showed no effect of rs79744308 on NRTN expression or secretion. However a significant increase in the deposition of the protective NRTN variant (NRTN:A) in the extracellular matrix (ECM) compared to the normal variant (NRTN:G) was observed. First immunocytochemical stainings addressing characteristic ECM components indicated a possible effect of heterologously expressed NRTN on ECM formation and composition by ARPE-19 cells. However, methodological modifications and additional replicates are mandatory for a better quantification and thus validation of these observations. No effect of NRTN was detected on the induction of autophagy and the activation of intracellular signaling pathways in ARPE-19 cells, applying Western Blot analyses for specific marker proteins of these cellular processes. Also, no influence of NRTN on lipopolysaccharide induced activation of microglial cells, followed by measuring nitric oxide production, was observed. However, first experiments indicated an effect of NRTN on oxidative stress induced changes in gene expression in cultivated retinoblastoma cells, a model system

for retinal cells. Additional replications are also required to support a (statistical) significance of these results. Finally, experiments on retinoblastoma cells demonstrated the capacity of NRTN to facilitate neuronal differentiation.

Further functional analyzes are needed to delineate an influence of rs79744308 on AMD pathogenesis. Ultimately, these results could contribute to the development of novel therapeutic approaches involving NRTN, as already tested for Parkinson's disease (reviewed in Axelsen and Woldbye, 2018).

8 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
(D)PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Saline)
°C	Grad Celsius
μ	Mikro
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
AMD	Altersabhängige Maculadegeneration
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BME	β-Mercaptoethanol
BSA	Bovines Serum Albumin
cDNA	Complementary DNA (komplementäre DNA)
cm	Zentimeter
CNV	Choroidale Neovaskularisation
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Nukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et aliter (und andere)
FBS/ FCS	Fetal bovine/ calf serum (Fötales Kälberserum)
g	Gramm
G-418	Geneticin
GA	Geografische Atrophie
GFP	Green fluorescent protein (Grün fluoreszierendes Protein)
h	Stunde
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide (Wasserstoffperoxid)
H ₂ O _{reinst}	Reinstwasser
IB	Immunoblot
ICC	Immunocytochemie
kDA	Kilodalton
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharide
m	Milli
M	Molar
mAK	Monoklonaler Antikörper
min	Minute

Abkürzungsverzeichnis

ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
ms	Millisekunden
mV	Millivolt
n	Nano
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NO	Stickstoffmonooxid
NRTN	Neurturin
NRTN:A	Mit einem protektiven Effekt assoziierte Variante (rs79744398)
NRTN:G	Normalform von NRTN
P/S	Penicillin/ Streptomycin
pAK	Polyklonaler Antikörper
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	Quantitative Realtime Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonucleic acid (Ribonucleinsäure)
RPE	Retinales Pigmentepithel
rpm	Rotation per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transscriptase Polymerasekettenreaktion
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TBE	Tris Borat EDTA
TBS	Tris-buffered saline (Tris gepufferte Saline)
Temed	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
V	Volt

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Dargestellt sind die in der Arbeit verwendeten Reagenzien und Chemikalien, sowie ihre Herkunft.	13
Tabelle 2: Dargestellt sind die in der Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen, deren Bestandteile, sowie die relative Menge.	15
Tabelle 3: Dargestellt sind die in der Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien, sowie deren Herkunft.....	17
Tabelle 4: Dargestellt sind die in der Arbeit verwendeten Laborgeräte, sowie ihre Herkunft.	18
Tabelle 5: Dargestellt ist die in der Arbeit verwendete Software, sowie ihre Herkunft.	20
Tabelle 6: Dargestellt sind die in der Arbeit verwendeten Kit-Systeme, sowie ihre Herkunft.	21
Tabelle 7: Dargestellt sind die in der Arbeit verwendeten primären Antikörper, sowie deren Typ, Spezies, Verdünnung, Verwendungszweck und Herkunft.	21
Tabelle 8: Dargestellt sind die in der Arbeit verwendeten sekundären Antikörper, sowie deren Verdünnung, Verwendungszweck und Herkunft.....	23
Tabelle 9: Dargestellt sind die in der Arbeit verwendeten Molekülmassenstandards, sowie deren Verwendungszweck und Herkunft.....	23
Tabelle 10: Dargestellt sind die in der Arbeit verwendeten <i>E. coli</i> Stämme, sowie deren Herkunft.	24
Tabelle 11: Dargestellt sind die in der Arbeit verwendeten Zelllinien, sowie deren Ursprungsorganismus, Ursprungszelltyp und Herkunft.	24
Tabelle 12: Dargestellt sind die in der Arbeit verwendeten Gewebe mit Ursprungsorganismus und Herkunft.	25
Tabelle 13: Dargestellt sind die in der Arbeit verwendeten Zellkulturmedien und Supplements, sowie deren Herkunft.	25
Tabelle 14: Dargestellt sind die in der Arbeit verwendeten Expressionsvektoren, sowie deren Verwendungszweck und Herkunft.	26
Tabelle 15: Dargestellt sind die für qRT-PCR Versuche verwendeten Primer, sowie deren 5'-3'-Sequenz und Sondennummer.....	26
Tabelle 16: Dargestellt sind die für RT-PCR Versuche verwendeten Primer und ihre 5'-3'-Sequenz.....	27

Tabelle 17: Dargestellt sind die in der Arbeit verwendeten Enzyme, sowie deren Herkunft.	27
Tabelle 18: Dargestellt sind die Bestandteile und Volumina für einen cDNA-Synthese-Ansatz.	28
Tabelle 19: Dargestellt sind die Schritte der cDNA Synthese.	29
Tabelle 20: Dargestellt sind die Bestandteile der SDS-Polyacrylamid Gele (je 10 ml) mit Trenngel (8%, 12,5%, 15%, 17,5%), sowie Sammelgel (3%).	29
Tabelle 21: Dargestellt sind die Bestandteile und Volumina für eine Probe des RT-PCR Mastermixes.	34
Tabelle 22: Dargestellt sind die Reaktionsschritte der RT-PCR für unterschiedliche Primer.	34
Tabelle 23: Dargestellt sind jeweiligen Verdünnungsverhältnisse für unterschiedliche Wellformate bei Hek293 Zellen.	35
Tabelle 24: Dargestellt sind jeweiligen Verdünnungsverhältnisse für unterschiedliche Wellformate bei ARPE-19 Zellen.	36
Tabelle 25: Dargestellt sind, bezogen auf die unterschiedlichen funktionellen Versuche, die jeweiligen Zellzahlen für unterschiedliche Wellformate bei Weri-Rb1 Zellen.	37
Tabelle 26: Dargestellt sind die Bestandteile und deren Volumina der Transfektionsansätze für unterschiedliche Zellkulturplattenformate.	38
Tabelle 27: Dargestellt sind die Bestandteile und deren Volumina der 2 Transfektionsansätze für das 6-Well und 12-Well Zellkulturplattenformat.	38
Tabelle 28: Dargestellt ist die Herstellung von 10 ml 1x Lämmli Puffer inklusive 100 mM DTT.	40
Tabelle 29: Dargestellt sind die Bestandteile und Volumina für einen qRT-PCR Mastermix.	48
Tabelle 30: Dargestellt sind die Reaktionsschritte der qRT-PCR.	48
Tabelle 31: Anzahl und Prozentsätze der differenzierten und undifferenzierten Weri-Rb1 Zellen nach der Transfektion mit pcDNA4-GFP (Kontrolle), pDNA4-GFP-NRTN:G und pcDNA4-GFP-NRTN:A.	72
Tabelle 32: Dargestellt sind die mithilfe des Fisher Exact Tests ermittelten Signifikanzniveaus zwischen den mit pcDNA4-GFP (Kontrolle), pDNA4-GFP-NRTN:G und pcDNA4-GFP-NRTN:A transfizierten Zellen. In den mit einem Sternchen gekennzeichneten Zellen liegt das Signifikanzniveau über $\alpha=0,05$	72

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Visusvergleich zwischen Normalsichtigem und AMD Patienten veranschaulicht am Amsler Gitter.....	7
Abbildung 2: Darstellung des schematischen Aufbaus der Untereinheiten einschließlich der Position von Variante rs79744308 (A) und der 3D-Struktur des NRTN-Homodimers (B).	10
Abbildung 3: Fluoreszenzmikroskopische Kontrolle der Transfektionseffizienz nach Transfektion von ARPE-19 mit den Plasmiden pcDNA4-GFP-NRTN:G, pcDNA4-GFP-NRTN:A und dem Kontrollvektor pcDNA4-GFP.....	43
Abbildung 4: Western Blot Analyse zur Kontrolle der erfolgreichen Transfektion der Hek293 EBNA Zellen.....	46
Abbildung 5: Untersuchung der endogenen <i>Nrtn</i> -Expression in murinen Zelllinien mittels RT-PCR.....	51
Abbildung 6: Untersuchung der endogenen <i>NRTN</i> -Expression in humanen Zelllinien mittels RT-PCR.....	52
Abbildung 7: Untersuchung der endogenen NRTN-Expression in murinen und humanen Zelllinien mittels Western Blot.....	53
Abbildung 8: Einfluss von rs79744308 auf Expression, Sekretion und ECM-Ablagerung von NRTN.....	54
Abbildung 9: Einfluss von NRTN:A auf die Abspaltung von Proteinuntereinheiten im Vergleich zu NRTN:G.	56
Abbildung 10: Nachweis von NRTN in von ARPE-19 Zellen generierter ECM.	58
Abbildung 11: ICC Färbungen zur Untersuchung des Effekts von heterolog exprimiertem NRTN:G und NRTN:A auf den Aufbau der von ARPE-19 Zellen generierten ECM.	60
Abbildung 12: Transfektionseffizienz und heterologe NRTN-Expression in ARPE-19 Zellen, welche Versuchen mit oxidativem Stress (H ₂ O ₂) unterzogen wurden.....	62
Abbildung 13: Einfluss von NRTN:G und NRTN:A auf die Einleitung von Autophagie in ARPE-19 Zellen mit und ohne Induktion von oxidativem Stress im Vergleich.....	63
Abbildung 14: Einfluss von NRTN:G und NRTN:A auf die Einleitung von Autophagie in ARPE-19 Zellen und die Aktivierung von damit verbundenen Signalwegen mit und ohne Induktion von oxidativem Stress im Vergleich.	65

Abbildung 15: Einfluss von NRTN:G und NRTN:A auf die Expression von <i>CD46</i> , <i>cFOS</i> , <i>P21</i> und <i>VEGF</i> in hiPSC-RPE Zellen nach Induktion von oxidativem Stress.	68
Abbildung 16: Einfluss von NRTN:G und NRTN:A auf die Genexpression von <i>CD46</i> , <i>cFOS</i> , <i>P21</i> und <i>VEGF</i> in auf NRTN-haltiger ECM kultivierten Weri-Rb1 Zellen mit und ohne Induktion von oxidativem Stress im Vergleich.	70
Abbildung 17: Aufnahmen differenzierter und undifferenzierter Weri-Rb1 Zellen mittels Phasenkontrast und Fluoreszenzmikroskopie.	71
Abbildung 18: Einfluss von NRTN:G und NRTN:A auf die Mikroglia-Aktivierung in BV-2 Zellen mit und ohne Induktion von immunogenem Stress im Vergleich.....	74

11 Literaturverzeichnis

Adami, C. *et al.* (2004) 'S100B-stimulated NO production by BV-2 microglia is independent of RAGE transducing activity but dependent on RAGE extracellular domain.', *Biochimica et biophysica acta*, 1742(1–3), pp. 169–77. doi: 10.1016/j.bbamcr.2004.09.008.

Age-Related Eye Disease Study Research Group (2000) 'Risk factors associated with age-related macular degeneration. A case-control study in the age-related eye disease study: Age-Related Eye Disease Study Report Number 3.', *Ophthalmology*, 107(12), pp. 2224–32.

Age-Related Eye Disease Study Research Group (2001) 'A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report no. 8.', *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, 119(10), pp. 1417–36. doi: 10.1001/archopht.119.10.1417.

Age-Related Eye Disease Study Research Group (2005) 'A simplified Severity Scale for AMD', *Arch Ophthalmol.*, 44(11), pp. 1570–1574. doi: 10.1001/archopht.123.11.1570.A.

Airaksinen, M. S. and Saarma, M. (2002) 'The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value.', *Nature reviews. Neuroscience*, 3(5), pp. 383–94. doi: 10.1038/nrn812.

Airaksinen, M. S., Titievsky, A. and Saarma, M. (1999) 'GDNF family neurotrophic factor signaling: four masters, one servant?', *Molecular and cellular neurosciences*, 13(5), pp. 313–25. doi: 10.1006/mcne.1999.0754.

Akins, E. J. *et al.* (2010) 'In situ vaccination combined with androgen ablation and regulatory T-cell depletion reduces castration-resistant tumor burden in prostate-specific pten knockout mice.', *Cancer research*, 70(9), pp. 3473–82. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2490.

Al-Zamil W and Yassin S (2017) 'Recent developments in age-related macular degeneration: a review', *Clinical Interventions in Aging*, (12), pp. 1313–1330. doi: 10.2147/CIA.S143508.

Allen, R. G. and Tresini, M. (2000) 'Oxidative stress and gene regulation.', *Free radical*

biology & medicine, 28(3), pp. 463–99. doi: 10.1016/s0891-5849(99)00242-7.

Althubiti, M. et al. (2014) 'Characterization of novel markers of senescence and their prognostic potential in cancer', *Cell Death & Disease*. Nature Publishing Group, 5(11), pp. e1528–e1528. doi: 10.1038/cddis.2014.489.

Ambati, J. et al. (2003) 'Age-Related Macular Degeneration: Etiology, Pathogenesis, and Therapeutic Strategies', *Survey of Ophthalmology*, 48(3), pp. 257–293. doi: 10.1016/S0039-6257(03)00030-4.

Ambati, J., Atkinson, J. P. and Gelfand, B. D. (2013) 'Immunology of age-related macular degeneration.', *Nature reviews. Immunology*, 13(6), pp. 438–51. doi: 10.1038/nri3459.

Anderson, D. H. et al. (2002) 'A role for local inflammation in the formation of drusen in the aging eye', *American Journal of Ophthalmology*, 134(3), pp. 411–431. doi: 10.1016/S0002-9394(02)01624-0.

Arenas, E. et al. (1995) 'GDNF prevents degeneration and promotes the phenotype of brain noradrenergic neurons in vivo.', *Neuron*, 15(6), pp. 1465–73. doi: 10.1016/0896-6273(95)90024-1.

Arighi, E., Borrello, M. G. and Sariola, H. (2005) 'RET tyrosine kinase signaling in development and cancer.', *Cytokine & growth factor reviews*, 16(4–5), pp. 441–67. doi: 10.1016/j.cytogfr.2005.05.010.

Athey, J. et al. (2017) 'A new and updated resource for codon usage tables.', *BMC bioinformatics*. BMC Bioinformatics, 18(1), p. 391. doi: 10.1186/s12859-017-1793-7.

Audagnotto, M. and Dal Peraro, M. (2017) 'Protein post-translational modifications: In silico prediction tools and molecular modeling.', *Computational and structural biotechnology journal*. The Authors, 15, pp. 307–319. doi: 10.1016/j.csbj.2017.03.004.

Axelsen, T. M. and Woldbye, D. P. D. (2018) 'Gene Therapy for Parkinson's Disease, An Update.', *Journal of Parkinson's disease*, 8(2), pp. 195–215. doi: 10.3233/JPD-181331.

Ba, J. et al. (2015) 'Intravitreal anti-VEGF injections for treating wet age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis.', *Drug design, development and therapy*, 9, pp. 5397–405. doi: 10.2147/DDDT.S86269.

- Banerjee, A. *et al.* (2008) 'Prevalence of depression and its effect on disability in patients with age-related macular degeneration.', *Indian journal of ophthalmology*, 56(6), pp. 469–74. doi: 10.4103/0301-4738.42643.
- Barnett, M. W. *et al.* (2002) 'Signalling by glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) requires heparan sulphate glycosaminoglycan.', *Journal of cell science*, 115(Pt 23), pp. 4495–503. doi: 10.1242/jcs.00114.
- Bartus, R. T. *et al.* (2011) 'Bioactivity of AAV2-neurturin gene therapy (CERE-120): differences between Parkinson's disease and nonhuman primate brains.', *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 26(1), pp. 27–36. doi: 10.1002/mds.23442.
- Bartus, R. T. *et al.* (2015) 'Post-mortem assessment of the short and long-term effects of the trophic factor neurturin in patients with α -synucleinopathies.', *Neurobiology of disease*. Elsevier Inc., 78, pp. 162–71. doi: 10.1016/j.nbd.2015.03.023.
- Beatty, S. *et al.* (2000) 'The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration.', *Survey of ophthalmology*, 45(2), pp. 115–34. doi: 10.1016/S0039-6257(00)00140-5.
- Beckley, M. N. (2015) *Occupational therapy interventions for older adults with low vision*. 1st edn, *Occupational Therapy with Aging Adults: Promoting Quality of Life through Collaborative Practice*. 1st edn. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-323-06776-8.00019-0.
- Le Belle, J. E. *et al.* (2011) 'Proliferative neural stem cells have high endogenous ROS levels that regulate self-renewal and neurogenesis in a PI3K/Akt-dependant manner.', *Cell stem cell*, 8(1), pp. 59–71. doi: 10.1016/j.stem.2010.11.028.
- Bergmann, M. *et al.* (2004) 'Inhibition of the ATP-driven proton pump in RPE lysosomes by the major lipofuscin fluorophore A2-E may contribute to the pathogenesis of age-related macular degeneration.', *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18(3), pp. 562–4. doi: 10.1096/fj.03-0289fje.
- Bespalov, M. M. *et al.* (2011) 'Heparan sulfate proteoglycan syndecan-3 is a novel receptor for GDNF, neurturin, and artemin', *Journal of Cell Biology*, 192(1), pp. 153–169. doi: 10.1083/jcb.201009136.

- Biju, K. C. *et al.* (2013) 'Bone marrow-derived microglia-based neurturin delivery protects against dopaminergic neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease.', *Neuroscience letters*, 535(1), pp. 24–9. doi: 10.1016/j.neulet.2012.12.034.
- Bjørkøy, G. *et al.* (2009) 'Chapter 12 Monitoring Autophagic Degradation of p62/SQSTM1', in *Methods in enzymology*, pp. 181–197. doi: 10.1016/S0076-6879(08)03612-4.
- Bornstein, P. and Sage, E. H. (2002) 'Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function.', *Current opinion in cell biology*, 14(5), pp. 608–16. doi: 10.1016/S0955-0674(02)00361-7.
- Bradford, M. M. (1976) 'A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.', *Analytical biochemistry*, 72(1–2), pp. 248–54. doi: 10.1006/abio.1976.9999.
- Brancato, R. *et al.* (2002) 'Optical coherence tomography (OCT) in retinal angiomatous proliferation (RAP).', *European journal of ophthalmology*, 12(6), pp. 467–472. doi: 10.5301/EJO.2008.2283.
- Brandl, C. *et al.* (2014) 'In-depth characterisation of retinal pigment epithelium (RPE) cells derived from human induced pluripotent stem cells (hiPSC)', *NeuroMolecular Medicine*, 16(3), pp. 551–564. doi: 10.1007/s12017-014-8308-8.
- Brantley, M. A. *et al.* (2008) 'Neurturin-Mediated Ret Activation Is Required for Retinal Function', *Journal of Neuroscience*, 28(16), pp. 4123–4135. doi: 10.1523/jneurosci.0249-08.2008.
- Bredt, D. S. and Snyder, S. H. (1994) 'Nitric oxide: a physiologic messenger molecule.', *Annual review of biochemistry*, 63(2), pp. 175–95. doi: 10.1146/annurev.bi.63.070194.001135.
- Bressler, N. M., Bressler, S. B. and Fine, S. L. (1988) 'Age-related macular degeneration', *Survey of Ophthalmology*, 32(6), pp. 375–413. doi: 10.1016/0039-6257(88)90052-5.
- Bressler, S. B. (2008) 'Racial Differences in the Prevalence of Age-Related Macular Degeneration', *Archives of Ophthalmology*, 126(2), p. 241. doi: 10.1001/archophthalmol.2007.53.

- Buch, H. *et al.* (2005) 'Risk factors for age-related maculopathy in a 14-year follow-up study: the Copenhagen City Eye Study.', *Acta ophthalmologica Scandinavica*, 83(4), pp. 409–18. doi: 10.1111/j.1600-0420.2005.00492.x.
- Buj-Bello, A. *et al.* (1995) 'GDNF is an age-specific survival factor for sensory and autonomic neurons.', *Neuron*, 15(4), pp. 821–8. doi: 10.1016/0896-6273(95)90173-6.
- Buj-Bello, A. *et al.* (1997) 'Neurturin responsiveness requires a GPI-linked receptor and the Ret receptor tyrosine kinase.', *Nature*, 387(6634), pp. 721–4. doi: 10.1038/42729.
- Busch, M. *et al.* (2018) 'Activation of the ERK1/2-MAPK Signaling Pathway by Complement Serum in UV-POS-Pretreated ARPE-19 Cells.', *Ophthalmologica. Journal internationale d'ophtalmologie. International journal of ophthalmology. Zeitschrift für Augenheilkunde*, 239(4), pp. 215–224. doi: 10.1159/000486404.
- Byeon, S. H. *et al.* (2010) 'Vascular endothelial growth factor as an autocrine survival factor for retinal pigment epithelial cells under oxidative stress via the VEGF-R2/PI3K/Akt.', *Investigative ophthalmology & visual science*, 51(2), pp. 1190–7. doi: 10.1167/iovs.09-4144.
- Camassei, F. D. *et al.* (2003) 'Expression of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor and Neurturin in Mature Kidney, Nephrogenic Rests, and Nephroblastoma: Possible Role as Differentiating Factors', *Pediatric and Developmental Pathology*, 6(6), pp. 511–519. doi: 10.1007/s10024-003-2013-1.
- Carver, K. A. and Yang, D. (2016) 'N-Acetylcysteine Amide Protects Against Oxidative Stress-Induced Microparticle Release From Human Retinal Pigment Epithelial Cells.', *Investigative ophthalmology & visual science*, 57(2), pp. 360–71. doi: 10.1167/iovs.15-17117.
- Carwile, M. E. *et al.* (1998) 'Rod outer segment maintenance is enhanced in the presence of bFGF, CNTF and GDNF.', *Experimental eye research*, 66(6), pp. 791–805. doi: 10.1006/exer.1998.0488.
- Chakravarthy, U. *et al.* (2010) 'Clinical risk factors for age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis.', *BMC ophthalmology*. BioMed Central Ltd, 10(1), p. 31. doi: 10.1186/1471-2415-10-31.
- Chang-Liu, C. M. and Woloschak, G. E. (1997) 'Effect of passage number on cellular

response to DNA-damaging agents: cell survival and gene expression.', *Cancer letters*, 113(1–2), pp. 77–86. doi: 10.1016/s0304-3835(97)04599-0.

Chang, M.-L. *et al.* (2007) 'Reactive changes of retinal astrocytes and Müller glial cells in kainate-induced neuroexcitotoxicity.', *Journal of anatomy*, 210(1), pp. 54–65. doi: 10.1111/j.1469-7580.2006.00671.x.

Chen, C.-J. *et al.* (2004) 'Inhibition of inducible nitric oxide synthase expression by baicalein in endotoxin/cytokine-stimulated microglia.', *Biochemical pharmacology*, 67(5), pp. 957–65. doi: 10.1016/j.bcp.2003.10.010.

Chen, Y. *et al.* (2003) 'Acute p38 MAPK activation decreases force development in ventricular myocytes', *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 285(6), pp. H2578–H2586. doi: 10.1152/ajpheart.00365.2003.

Chen, Y., Bedell, M. and Zhang, K. (2010) 'Age-related Macular Degeneration: Genetic and Environmental Factors of Disease', *Molecular Interventions*, 10(5), pp. 271–281. doi: 10.1124/mi.10.5.4.

Chiariello, M. *et al.* (1998) 'Signalling of the Ret receptor tyrosine kinase through the c-Jun NH₂-terminal protein kinases (JNKs): evidence for a divergence of the ERKs and JNKs pathways induced by Ret.', *Oncogene*, 16(19), pp. 2435–45. doi: 10.1038/sj.onc.1201778.

Clark, D. A. and Coker, R. (1998) 'Molecules in focus Transforming growth factor-beta (TGF- β)', *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 30(3), pp. 293–298. doi: 10.1016/S1357-2725(97)00128-3.

Combadière, C. *et al.* (2007) 'CX3CR1-dependent subretinal microglia cell accumulation is associated with cardinal features of age-related macular degeneration.', *The Journal of clinical investigation*, 117(10), pp. 2920–8. doi: 10.1172/JCI31692.

Crabb, J. W. *et al.* (2002) 'Drusen proteome analysis: an approach to the etiology of age-related macular degeneration.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(23), pp. 14682–7. doi: 10.1073/pnas.222551899.

Crabb, J. W. (2014) 'The proteomics of drusen', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 4(7), pp. 1–14. doi: 10.1101/cshperspect.a017194.

- Cruess, A. F. *et al.* (2008) 'Economic Burden of Bilateral Neovascular Age-Related Macular Degeneration', *PharmacoEconomics*, 26(1), pp. 57–73. doi: 10.2165/00019053-200826010-00006.
- Cuenca, J. *et al.* (2017) 'Degradation Paradigm of the Gut Hormone, Pancreatic Polypeptide, by Hepatic and Renal Peptidases.', *Endocrinology*, 158(6), pp. 1755–1765. doi: 10.1210/en.2016-1827.
- Cugati, S. *et al.* (2006) 'Cataract surgery and the 10-year incidence of age-related maculopathy: the Blue Mountains Eye Study.', *Ophthalmology*, 113(11), pp. 2020–5. doi: 10.1016/j.optha.2006.05.047.
- Curcio, C. A. *et al.* (2001) 'Accumulation of cholesterol with age in human Bruch's membrane.', *Investigative ophthalmology & visual science*, 42(1), pp. 265–74.
- Curcio, C. A. *et al.* (2009) 'Apolipoprotein B-containing lipoproteins in retinal aging and age-related macular degeneration', *Journal of Lipid Research*, 51(3), pp. 451–467. doi: 10.1194/jlr.r002238.
- Curcio, C. A. *et al.* (2011) 'The oil spill in ageing Bruch membrane.', *The British journal of ophthalmology*, 95(12), pp. 1638–45. doi: 10.1136/bjophthalmol-2011-300344.
- Curry, J. M. *et al.* (2008) 'M-CSF signals through the MAPK/ERK pathway via Sp1 to induce VEGF production and induces angiogenesis in vivo.', *PloS one*, 3(10), p. e3405. doi: 10.1371/journal.pone.0003405.
- Dalvi, S. *et al.* (2019) 'Environmental stress impairs photoreceptor outer segment (POS) phagocytosis and degradation and induces autofluorescent material accumulation in hiPSC-RPE cells.', *Cell death discovery*. Springer US, 5(1), p. 96. doi: 10.1038/s41420-019-0171-9.
- Datta, S. *et al.* (2017) 'The impact of oxidative stress and inflammation on RPE degeneration in non-neovascular AMD.', *Progress in retinal and eye research*, 60, pp. 201–218. doi: 10.1016/j.preteyeres.2017.03.002.
- Davies, J. A., Yates, E. A. and Turnbull, J. E. (2003) 'Structural determinants of heparan sulphate modulation of GDNF signalling.', *Growth factors (Chur, Switzerland)*, 21(3–4), pp. 109–19. doi: 10.1080/08977190310001621005.
- Dawson, T. M. and Dawson, V. L. (1995) 'Review ■ Nitric Oxide: Actions and

Pathological Roles', *The Neuroscientist*, 1(1), pp. 7–18. doi: 10.1177/107385849500100103.

Deangelis, M. M. *et al.* (2011) 'Genetics of age-related macular degeneration: Current concepts, future directions', *Seminars in Ophthalmology*, 26(3), pp. 77–93. doi: 10.3109/08820538.2011.577129.

Delcourt, C. *et al.* (2001) 'Associations of cardiovascular disease and its risk factors with age-related macular degeneration: the POLA study.', *Ophthalmic epidemiology*, 8(4), pp. 237–49.

Demidyuk, I. V. *et al.* (2010) 'Propeptides as modulators of functional activity of proteases.', *Biomolecular concepts*, 1(3–4), pp. 305–22. doi: 10.1515/bmc.2010.025.

Ding, R. *et al.* (2017) 'ROS-AKT-mTOR axis mediates autophagy of human umbilical vein endothelial cells induced by cooking oil fumes-derived fine particulate matters in vitro.', *Free radical biology & medicine*, 113, pp. 452–460. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.10.386.

Ding, X., Patel, M. and Chan, C.-C. (2009) 'Molecular pathology of age-related macular degeneration.', *Progress in retinal and eye research*, 28(1), pp. 1–18. doi: 10.1016/j.preteyeres.2008.10.001.

Dridi, S. *et al.* (2012) 'ERK1/2 activation is a therapeutic target in age-related macular degeneration.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(34), pp. 13781–6. doi: 10.1073/pnas.1206494109.

Du, Z. *et al.* (2016) 'Oxidative damage induces MCP-1 secretion and macrophage aggregation in age-related macular degeneration (AMD).', *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie*. Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology, 254(12), pp. 2469–2476. doi: 10.1007/s00417-016-3508-6.

Dunaief, J. L. *et al.* (2002) 'The role of apoptosis in age-related macular degeneration', *Archives of Ophthalmology*, 120(11), pp. 1435–1442. doi: 10.1001/archophth.120.11.1435.

Ebrahimi, K. B. *et al.* (2013) 'Decreased membrane complement regulators in the retinal pigmented epithelium contributes to age-related macular degeneration.', *The Journal of pathology*, 229(5), pp. 729–42. doi: 10.1002/path.4128.

- Eder, J. and Fersht, A. R. (1995) 'Pro-sequence-assisted protein folding.', *Molecular microbiology*, 16(4), pp. 609–14. doi: 10.1111/j.1365-2958.1995.tb02423.x.
- Edwards, A. O. *et al.* (2005) 'Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration', *Science*, 308(5720), pp. 421–424. doi: 10.1126/science.1110189.
- Elcock, A. H. (2006) 'Molecular simulations of cotranslational protein folding: fragment stabilities, folding cooperativity, and trapping in the ribosome.', *PLoS computational biology*, 2(7), p. e98. doi: 10.1371/journal.pcbi.0020098.eor.
- Elf, J. *et al.* (2003) 'Selective charging of tRNA isoacceptors explains patterns of codon usage.', *Science (New York, N.Y.)*, 300(5626), pp. 1718–22. doi: 10.1126/science.1083811.
- Elward, K. *et al.* (2005) 'CD46 plays a key role in tailoring innate immune recognition of apoptotic and necrotic cells.', *The Journal of biological chemistry*, 280(43), pp. 36342–54. doi: 10.1074/jbc.M506579200.
- Enomoto, H. *et al.* (2004) 'GFR α 1 Expression in Cells Lacking RET Is Dispensable for Organogenesis and Nerve Regeneration', *Neuron*, 44(4), pp. 623–636. doi: 10.1016/j.neuron.2004.10.032.
- Fagerness, J. A. *et al.* (2009) 'Variation near complement factor I is associated with risk of advanced AMD.', *European journal of human genetics : EJHG*, 17(1), pp. 100–4. doi: 10.1038/ejhg.2008.140.
- Farrar, G. J. *et al.* (2013) 'Mitochondrial disorders: aetiologies, models systems, and candidate therapies.', *Trends in genetics : TIG*. Elsevier Ltd, 29(8), pp. 488–97. doi: 10.1016/j.tig.2013.05.005.
- Fernandez-Godino, R. (2018) 'Alterations in Extracellular Matrix/Bruch's Membrane Can Cause the Activation of the Alternative Complement Pathway via Tick-Over.', *Advances in experimental medicine and biology*, 1074, pp. 29–35. doi: 10.1007/978-3-319-75402-4_4.
- Fernandez-Godino, R., Bujakowska, K. M. and Pierce, E. A. (2018) 'Changes in extracellular matrix cause RPE cells to make basal deposits and activate the alternative complement pathway', *Human Molecular Genetics*, 27(1), pp. 147–159. doi: 10.1093/hmg/ddx392.

- Fernandez-Godino, R., Pierce, E. A. and Garland, D. L. (2016) 'Extracellular Matrix Alterations and Deposit Formation in AMD', in *Advances in experimental medicine and biology*, pp. 53–58. doi: 10.1007/978-3-319-17121-0_8.
- Ferrington, D. A., Sinha, D. and Kaarniranta, K. (2016) 'Defects in retinal pigment epithelial cell proteolysis and the pathology associated with age-related macular degeneration.', *Progress in retinal and eye research*, 51(6188), pp. 69–89. doi: 10.1016/j.preteyeres.2015.09.002.
- Fields, M. A. et al. (2015) 'Nitrite Modification of Extracellular Matrix Alters CD46 Expression and VEGF Release in Human Retinal Pigment Epithelium.', *Investigative ophthalmology & visual science*, 56(8), pp. 4231–8. doi: 10.1167/iov.15-16438.
- Filomeni, G., De Zio, D. and Cecconi, F. (2015) 'Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs.', *Cell death and differentiation*. Nature Publishing Group, 22(3), pp. 377–88. doi: 10.1038/cdd.2014.150.
- Fjord-Larsen, L. et al. (2005) 'Efficient in vivo protection of nigral dopaminergic neurons by lentiviral gene transfer of a modified Neurturin construct.', *Experimental neurology*, 195(1), pp. 49–60. doi: 10.1016/j.expneurol.2005.03.006.
- Frasson, M. et al. (1999) 'Glial cell line-derived neurotrophic factor induces histologic and functional protection of rod photoreceptors in the rd/rd mouse.', *Investigative ophthalmology & visual science*, 40(11), pp. 2724–34.
- Friedman, D. S. et al. (1999) 'Racial differences in the prevalence of age-related macular degeneration', *Ophthalmology*, 106(6), pp. 1049–1055. doi: 10.1016/S0161-6420(99)90267-1.
- Friedman, D. S. et al. (2004) 'Prevalence of Age-Related Macular Degeneration in the United States', *Archives of Ophthalmology*, 122(4), pp. 564–572. doi: 10.1001/archoph.122.4.564.
- Fritsche, L. G. et al. (2008) 'Age-related macular degeneration is associated with an unstable ARMS2 (LOC387715) mRNA', *Nature Genetics*, 40(7), pp. 892–896. doi: 10.1038/ng.170.
- Fritsche, L. G. et al. (2013) 'Seven new loci associated with age-related macular degeneration.', *Nature genetics*, 45(4), pp. 433–9, 439e1–2. doi: 10.1038/ng.2578.

- Fritsche, L. G. *et al.* (2016) 'A large genome-wide association study of age-related macular degeneration highlights contributions of rare and common variants.', *Nature genetics*, 48(2), pp. 134–43. doi: 10.1038/ng.3448.
- Gao, R. *et al.* (2004) 'Connective tissue growth factor induces c-fos gene activation and cell proliferation through p44/42 MAP kinase in primary rat hepatic stellate cells.', *Journal of hepatology*, 40(3), pp. 431–8. doi: 10.1016/j.jhep.2003.11.012.
- Gasmi, M. *et al.* (2007) 'Striatal delivery of neurturin by CERE-120, an AAV2 vector for the treatment of dopaminergic neuron degeneration in Parkinson's disease.', *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*. The American Society of Gene Therapy, 15(1), pp. 62–8. doi: 10.1038/sj.mt.6300010.
- Geerlings, M. J., de Jong, E. K. and den Hollander, A. I. (2017) 'The complement system in age-related macular degeneration: A review of rare genetic variants and implications for personalized treatment', *Molecular Immunology*. Elsevier Ltd, 84, pp. 65–76. doi: 10.1016/j.molimm.2016.11.016.
- Giancipoli, E. *et al.* (2018) 'Intravitreal Dexamethasone in Patients with Wet Age-Related Macular Degeneration Resistant to Anti-VEGF: A Prospective Pilot Study', *Journal of Ophthalmology*. Hindawi, 2018, pp. 10–17. doi: 10.1155/2018/5612342.
- Glotin, A.-L. *et al.* (2006) 'Sustained versus transient ERK1/2 signaling underlies the anti- and proapoptotic effects of oxidative stress in human RPE cells.', *Investigative ophthalmology & visual science*, 47(10), pp. 4614–23. doi: 10.1167/iovs.06-0297.
- Gordiyenko, N. *et al.* (2004) 'RPE Cells Internalize Low-Density Lipoprotein (LDL) and Oxidized LDL (oxLDL) in Large Quantities In Vitro and In Vivo', *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 45(8), p. 2822. doi: 10.1167/iovs.04-0074.
- Gray, A. M. and Mason, A. J. (1990) 'Requirement for activin A and transforming growth factor--beta 1 pro-regions in homodimer assembly.', *Science (New York, N.Y.)*, 247(4948), pp. 1328–30. doi: 10.1126/science.2315700.
- Green, W. R. (1999) 'Histopathology of age-related macular degeneration.', *Molecular vision*, 5(May), p. 27.
- Guo, X. J. *et al.* (2014) 'Dysregulation of neurotrophic and inflammatory systems accompanied by decreased CREB signaling in ischemic rat retina.', *Experimental eye research*. Elsevier Ltd, 125, pp. 156–63. doi: 10.1016/j.exer.2014.06.003.

- Gupta, N., Brown, K. E. and Milam, A. H. (2003) 'Activated microglia in human retinitis pigmentosa, late-onset retinal degeneration, and age-related macular degeneration.', *Experimental eye research*, 76(4), pp. 463–71. doi: 10.1016/s0014-4835(02)00332-9.
- Haab, O. (1885) 'Erkrankungen der Macula lutea.', *Centralblatt für praktische Augenheilkunde*, 9, pp. 383–384.
- Haas, K. (2001) 'MAPing the path from neuronal activity to spine motility.', *Trends in neurosciences*, 24(5), pp. 256–7. doi: 10.1016/s0166-2236(00)01839-7.
- Haddad, S. et al. (2006) 'The genetics of age-related macular degeneration: a review of progress to date.', *Survey of ophthalmology*, 51(4), pp. 316–63. doi: 10.1016/j.survophthal.2006.05.001.
- Hageman, G. S. et al. (1999) 'Vitronectin is a constituent of ocular drusen and the vitronectin gene is expressed in human retinal pigmented epithelial cells.', *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 13(3), pp. 477–84. doi: 10.1096/fasebj.13.3.477.
- Hageman, G. S. et al. (2001) 'An integrated hypothesis that considers drusen as biomarkers of immune-mediated processes at the RPE-Bruch's membrane interface in aging and age-related macular degeneration.', *Progress in retinal and eye research*, 20(6), pp. 705–32. doi: 10.1016/S1350-9462(01)00010-6.
- Hageman, G. S. et al. (2005) 'From The Cover: A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(20), pp. 7227–7232. doi: 10.1073/pnas.0501536102.
- Haines, J. L. (2005) 'Complement Factor H Variant Increases the Risk of Age-Related Macular Degeneration', *Science*, 308(5720), pp. 419–421. doi: 10.1126/science.1110359.
- Hamilton, J. F. 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.', *Experimental neurology*, 168(1), pp. 155–61. doi: 10.1006/exnr.2000.7571.
- Hammond, B. R., Wooten, B. R. and Snodderly, D. M. (1996) 'Cigarette smoking and retinal carotenoids: implications for age-related macular degeneration.', *Vision*

research, 36(18), pp. 3003–9. doi: 10.1016/0042-6989(96)00008-9.

Handa, J. T. *et al.* (2017) 'Lipids, oxidized lipids, oxidation-specific epitopes, and Age-related Macular Degeneration.', *Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids*, 1862(4), pp. 430–440. doi: 10.1016/j.bbalip.2016.07.013.

Harada, C. *et al.* (2003) 'Potential role of glial cell line-derived neurotrophic factor receptors in Müller glial cells during light-induced retinal degeneration.', *Neuroscience*, 122(1), pp. 229–35. doi: 10.1016/s0306-4522(03)00599-2.

Harada, T. *et al.* (2000) 'Modification of glial-neuronal cell interactions prevents photoreceptor apoptosis during light-induced retinal degeneration.', *Neuron*, 26(2), pp. 533–41. doi: 10.1016/s0896-6273(00)81185-x.

Harada, T. *et al.* (2002) 'Microglia–Müller Glia Cell Interactions Control Neurotrophic Factor Production during Light-Induced Retinal Degeneration', *The Journal of Neuroscience*, 22(21), pp. 9228–9236. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-21-09228.2002.

Hauck, S. M. *et al.* (2006) 'GDNF family ligands trigger indirect neuroprotective signaling in retinal glial cells.', *Molecular and cellular biology*, 26(7), pp. 2746–57. doi: 10.1128/MCB.26.7.2746-2757.2006.

Hazzalin, C. A. and Mahadevan, L. C. (2002) 'MAPK-regulated transcription: a continuously variable gene switch?', *Nature reviews. Molecular cell biology*, 3(1), pp. 30–40. doi: 10.1038/nrm715.

Hellewell, A. L., Rosini, S. and Adams, J. C. (2017) 'A Rapid, Scalable Method for the Isolation, Functional Study, and Analysis of Cell-derived Extracellular Matrix', *Journal of Visualized Experiments*, (119), pp. 3–11. doi: 10.3791/55051.

Hendrickson, A. E. and Yuodelis, C. (1984) 'The Morphological Development of the Human Fovea', *Ophthalmology*, 91(6), pp. 603–612. doi: 10.1016/S0161-6420(84)34247-6.

Hirooka, K. *et al.* (2002) 'T-Type Calcium Channel $\alpha 1G$ and $\alpha 1H$ Subunits in Human Retinoblastoma Cells and Their Loss After Differentiation', *Journal of Neurophysiology*, 88(1), pp. 196–205. doi: 10.1152/jn.2002.88.1.196.

Hishiki, T. *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 alpha-1, and GFR alpha-2.', *Cancer research*, 58(10), pp. 2158–65.

Hogg, R. E. *et al.* (2008) 'Cardiovascular disease and hypertension are strong risk factors for choroidal neovascularization.', *Ophthalmology*, 115(6), p. 1046–1052.e2. doi: 10.1016/j.ophtha.2007.07.031.

Hollborn, M. *et al.* (2018) 'Osmotic and hypoxic induction of the complement factor C9 in cultured human retinal pigment epithelial cells: Regulation of VEGF and NLRP3 expression.', *Molecular vision*, 24(July), pp. 518–535.

Hollyfield, J. G. *et al.* (2008) 'Oxidative damage-induced inflammation initiates age-related macular degeneration.', *Nature medicine*, 14(2), pp. 194–8. doi: 10.1038/nm1709.

Holz, F. G. *et al.* (1994) 'Analysis of lipid deposits extracted from human macular and peripheral Bruch's membrane.', *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, 112(3), pp. 402–6. doi: 10.1001/archopht.1994.01090150132035.

Hoover, J. L. *et al.* (2014) 'Effect of neurturin deficiency on cholinergic and catecholaminergic innervation of the murine eye.', *Experimental eye research*. Elsevier Ltd, 122, pp. 32–9. doi: 10.1016/j.exer.2014.03.002.

Horger, B. A. *et al.* (1998) 'Neurturin Exerts Potent Actions on Survival and Function of Midbrain Dopaminergic Neurons', *The Journal of Neuroscience*, 18(13), pp. 4929–4937. doi: 10.1523/jneurosci.18-13-04929.1998.

Hua, J. *et al.* (2011) 'Resveratrol inhibits pathologic retinal neovascularization in Vldlr(-/-) mice.', *Investigative ophthalmology & visual science*, 52(5), pp. 2809–16. doi: 10.1167/iovs.10-6496.

Igarashi, Y. *et al.* (2000) 'Expression of receptors for glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and neurturin in the inner blood-retinal barrier of rats.', *Cell structure and function*, 25(4), pp. 237–41. doi: 10.1247/csf.25.237.

Iozzo, R. V. (1998) 'Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function.', *Annual review of biochemistry*, 67(1), pp. 609–52. doi: 10.1146/annurev.biochem.67.1.609.

Ito, K. *et al.* (2006) 'Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan

of hematopoietic stem cells.', *Nature medicine*, 12(4), pp. 446–51. doi: 10.1038/nm1388.

Jacobowitz, D. M. *et al.* (2012) 'Microglia activation along the corticospinal tract following traumatic brain injury in the rat: A neuroanatomical study', *Brain Research*, 1465, pp. 80–89. doi: 10.1016/j.brainres.2012.05.008.

Jager, R. D., Mieler, W. F. and Miller, J. W. (2008) 'Age-Related Macular Degeneration', *New England Journal of Medicine*, 358(Supplement), pp. 2606–2617. doi: 10.1097/IAE.0b013e3181ad255f.

Jakobsdottir, J. *et al.* (2005) 'Susceptibility genes for age-related maculopathy on chromosome 10q26', *American Journal of Human Genetics*, 77(3), pp. 389–407. doi: 10.1086/444437.

Januszyk, M. *et al.* (2015) 'Evaluating the Effect of Cell Culture on Gene Expression in Primary Tissue Samples Using Microfluidic-Based Single Cell Transcriptional Analysis.', *Microarrays (Basel, Switzerland)*, 4(4), pp. 540–50. doi: 10.3390/microarrays4040540.

Jeffery, G. and Sivaprasad, S. (2019) 'A hidden footprint: embryological origins of age related macular degeneration.', *Eye (London, England)*. Springer US, pp. 2015–2016. doi: 10.1038/s41433-019-0444-9.

Jing, S. *et al.* (1996) 'GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF.', *Cell*, 85(7), pp. 1113–24. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81311-2.

Johnson, L. V. *et al.* (2001) 'Complement Activation and Inflammatory Processes in Drusen Formation and Age Related Macular Degeneration', *Experimental Eye Research*, 73(6), pp. 887–896. doi: 10.1006/exer.2001.1094.

Johnson, L. V. and Anderson, D. H. (2004) 'Age-related macular degeneration and the extracellular matrix', *New England Journal of Medicine*, 351(4), pp. 320–322. doi: 10.1056/NEJMp048131.

Johnson, L. V. *et al.* (2000) 'A potential role for immune complex pathogenesis in drusen formation.', *Experimental eye research*, 70(4), pp. 441–9. doi: 10.1006/exer.1999.0798.

- Jomary, C. *et al.* (1999) 'Expression patterns of neurturin and its receptor components in developing and degenerative mouse retina.', *Investigative ophthalmology & visual science*, 40(3), pp. 568–74.
- Jomary, C. *et al.* (2004) 'Expression of Neurturin, Glial Cell Line–Derived Neurotrophic Factor, and Their Receptor Components in Light-Induced Retinal Degeneration', *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 45(4), p. 1240. doi: 10.1167/iovs.03-1122.
- Jonas, J. B. *et al.* (2014) 'Visual impairment and blindness due to macular diseases globally: A systematic review and meta-analysis', *American Journal of Ophthalmology*. Elsevier Inc., 158(4), pp. 808–815. doi: 10.1016/j.ajo.2014.06.012.
- Jonas, J. B., Cheung, C. M. G. and Panda-Jonas, S. (2017) 'Updates on the epidemiology of age-related macular degeneration', *Asia-Pacific Journal of Ophthalmology*, 6(6), pp. 493–497. doi: 10.22608/APO.2017251.
- Joosten, C. E. and Shuler, M. L. (2003) 'Effect of culture conditions on the degree of sialylation of a recombinant glycoprotein expressed in insect cells.', *Biotechnology progress*, 19(3), pp. 739–49. doi: 10.1021/bp0201049.
- Kaarniranta, K. *et al.* (2013) 'Autophagy and heterophagy dysregulation leads to retinal pigment epithelium dysfunction and development of age-related macular degeneration', *Autophagy*, 9(7), pp. 973–984. doi: 10.4161/auto.24546.
- Kaarniranta, K. *et al.* (2019) 'Role of Mitochondrial DNA Damage in ROS-Mediated Pathogenesis of Age-Related Macular Degeneration (AMD).', *International journal of molecular sciences*, 20(10). doi: 10.3390/ijms20102374.
- Karlsson, M. *et al.* (2002) 'Overlapping and specific patterns of GDNF, c-ret and GFR alpha mRNA expression in the developing chicken retina.', *Mechanisms of development*, 114(1–2), pp. 161–5. doi: 10.1016/S0925-4773(02)00045-X.
- Kauppinen, A. *et al.* (2016) 'Inflammation and its role in age-related macular degeneration.', *Cellular and molecular life sciences: CMLS*. Springer International Publishing, 73(9), pp. 1765–86. doi: 10.1007/s00018-016-2147-8.
- Kawasaki, R. *et al.* (2010) 'The Prevalence of Age-Related Macular Degeneration in Asians. A Systematic Review and Meta-Analysis', *Ophthalmology*. Elsevier Inc., 117(5), pp. 921–927. doi: 10.1016/j.opthta.2009.10.007.

- Kent, D. L. (2014) 'Age-related macular degeneration: Beyond anti-angiogenesis', *Molecular vision*, 20(January), pp. 46–55.
- Kettenmann, H. et al. (2011) 'Physiology of microglia.', *Physiological reviews*, 91(2), pp. 461–553. doi: 10.1152/physrev.00011.2010.
- Kiffin, R., Bandyopadhyay, U. and Cuervo, A. M. (2006) 'Oxidative Stress and Autophagy', *Antioxidants & Redox Signaling*, 8(1–2), pp. 152–162. doi: 10.1089/ars.2006.8.152.
- Kim, B.-W. et al. (2013) 'Regulation of microglia activity by glaucocalyxin-A: attenuation of lipopolysaccharide-stimulated neuroinflammation through NF- κ B and p38 MAPK signaling pathways.', *PloS one*. Edited by M. L. Block, 8(2), p. e55792. doi: 10.1371/journal.pone.0055792.
- Kimchi-Sarfaty, C. et al. (2007) 'A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity.', *Science (New York, N.Y.)*, 315(5811), pp. 525–8. doi: 10.1126/science.1135308.
- Kishan, A. U. et al. (2011) 'Lipids and age-related macular degeneration.', *Survey of ophthalmology*, 56(3), pp. 195–213. doi: 10.1016/j.survophthal.2010.08.008.
- Kittl, M. et al. (2018) 'Glycine Induces Migration of Microglial BV-2 Cells via SNAT-Mediated Cell Swelling.', *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 50(4), pp. 1460–1473. doi: 10.1159/000494646.
- Klaver, C. C. et al. (1998) 'Genetic risk of age-related maculopathy. Population-based familial aggregation study.', *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, 116(12), pp. 1646–51.
- Klein, R. et al. (1995) 'The relationship of age-related maculopathy, cataract, and glaucoma to visual acuity.', *Investigative ophthalmology & visual science*, 36(1), pp. 182–91.
- Klein, R. et al. (1997) 'The Five-year Incidence and Progression of Age-related Maculopathy', *Ophthalmology*, 104(1), pp. 7–21. doi: 10.1016/S0161-6420(97)30368-6.
- Klein, R. et al. (2002) 'The association of cataract and cataract surgery with the long-

term incidence of age-related maculopathy: the Beaver Dam eye study.', *Archives of ophthalmology* (Chicago, Ill. : 1960), 120(11), pp. 1551–8.

Klein, R. *et al.* (2004) 'The epidemiology of age-related macular degeneration.', *American journal of ophthalmology*, 137(3), pp. 486–95. doi: 10.1016/j.ajo.2003.11.069.

Klein, R. (2007) 'Overview of progress in the epidemiology of age-related macular degeneration', *Ophthalmic Epidemiology*, 14(4), pp. 184–187. doi: 10.1080/09286580701344381.

Klein, R. *et al.* (2011) 'Prevalence of Age-Related Macular Degeneration in the US Population', *Archives of Ophthalmology*, 129(1), p. 75. doi: 10.1001/archophthalmol.2010.318.

Klein, R. D. *et al.* (1997) 'A GPI-linked protein that interacts with Ret to form a candidate neurturin receptor.', *Nature*, 387(6634), pp. 717–21. doi: 10.1038/42722.

Klein, R. J. *et al.* (2005) 'Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration.', *Science* (New York, N.Y.), 308(5720), pp. 385–9. doi: 10.1126/science.1109557.

de Klerk, E. and 't Hoen, P. A. C. (2015) 'Alternative mRNA transcription, processing, and translation: insights from RNA sequencing.', *Trends in genetics : TIG*. Elsevier Ltd, 31(3), pp. 128–39. doi: 10.1016/j.tig.2015.01.001.

Klöcker, N. *et al.* (1997) 'In vivo neurotrophic effects of GDNF on axotomized retinal ganglion cells', *NeuroReport*, 8(16), pp. 3439–3442. doi: 10.1097/00001756-199711100-00005.

Koeberle, P. D. and Ball, A. K. (1998) 'Effects of GDNF on retinal ganglion cell survival following axotomy', *Vision Research*, 38(10), pp. 1505–1515. doi: 10.1016/S0042-6989(97)00364-7.

Koeberle, P. D. and Ball, A. 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', *Neuroscience*, 110(3), pp. 555–567. doi: 10.1016/S0306-4522(01)00557-7.

Komar, A. A., Lesnik, T. and Reiss, C. (1999) 'Synonymous codon substitutions affect

ribosome traffic and protein folding during in vitro translation.', *FEBS letters*, 462(3), pp. 387–91. doi: 10.1016/s0014-5793(99)01566-5.

Kordower, J. H. (2016) 'AAV2-Neurturin for Parkinson's Disease: What Lessons Have We Learned?', in *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), pp. 485–490. doi: 10.1007/978-1-4939-3271-9_32.

Korsak, K. et al. (2012) 'Ageing of enteric neurons: oxidative stress, neurotrophic factors and antioxidant enzymes.', *Chemistry Central journal*. Chemistry Central Journal, 6(1), p. 80. doi: 10.1186/1752-153X-6-80.

Kotzbauer, P. T. et al. (1996) 'Neurturin, a relative of glial-cell-line-derived neurotrophic factor.', *Nature*, 384(6608), pp. 467–70. doi: 10.1038/384467a0.

Kreutzberg, G. W. (1996) 'Microglia: a sensor for pathological events in the CNS.', *Trends in neurosciences*, 19(8), pp. 312–8. doi: 10.1016/0166-2236(96)10049-7.

Kurata, S. (2000) 'Selective activation of p38 MAPK cascade and mitotic arrest caused by low level oxidative stress.', *The Journal of biological chemistry*, 275(31), pp. 23413–6. doi: 10.1074/jbc.C000308200.

Lambert, N. G. et al. (2016) 'Risk factors and biomarkers of age-related macular degeneration.', *Progress in retinal and eye research*, 54, pp. 64–102. doi: 10.1016/j.preteyeres.2016.04.003.

Lau, B. T. C., Malkus, P. and Paulsson, J. (2013) 'New quantitative methods for measuring plasmid loss rates reveal unexpected stability.', *Plasmid*, 70(3), pp. 353–61. doi: 10.1016/j.plasmid.2013.07.007.

Leclaire, M. D. et al. (2019) 'Lipofuscin-dependent stimulation of microglial cells.', *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie*. Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology, 257(5), pp. 931–952. doi: 10.1007/s00417-019-04253-x.

van Leeuwen, E. M. et al. (2018) 'A new perspective on lipid research in age-related macular degeneration.', *Progress in retinal and eye research*, 67(May), pp. 56–86. doi: 10.1016/j.preteyeres.2018.04.006.

van Leeuwen, R. et al. (2003) 'Blood pressure, atherosclerosis, and the incidence of

- age-related maculopathy: the Rotterdam Study.', *Investigative ophthalmology & visual science*, 44(9), pp. 3771–7. doi: 10.1167/iovs.03-0121.
- Leivo, I. and Engvall, E. (1986) 'C3d fragment of complement interacts with laminin and binds to basement membranes of glomerulus and trophoblast.', *The Journal of cell biology*, 103(3), pp. 1091–100. doi: 10.1083/jcb.103.3.1091.
- Lepow, I. H. et al. (1963) 'Chromatographic resolution of the first component of human complement into three activities.', *The Journal of experimental medicine*, 117, pp. 983–1008. doi: 10.1084/jem.117.6.983.
- Licatalosi, D. D. and Darnell, R. B. (2010) 'RNA processing and its regulation: global insights into biological networks.', *Nature reviews. Genetics*, 11(1), pp. 75–87. doi: 10.1038/nrg2673.
- Lim, L. S. et al. (2012) 'Age-related macular degeneration', *The Lancet*. Elsevier Ltd, 379(9827), pp. 1728–1738. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60282-7.
- Lin, L. F. et al. (1993) 'GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons.', *Science (New York, N.Y.)*, 260(5111), pp. 1130–2. doi: 10.1126/science.8493557.
- Lindholm, D. et al. (2016) 'Current disease modifying approaches to treat Parkinson's disease.', *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 73(7), pp. 1365–79. doi: 10.1007/s00018-015-2101-1.
- Liu, K. and Xie, B. (2012) 'Today and Future of Age-Related Macular Degeneration', *ISRN Ophthalmology*, 2012, pp. 1–9. doi: 10.5402/2012/480212.
- Liu, S. et al. (2010) 'NDRG2 induced by oxidized LDL in macrophages antagonizes growth factor productions via selectively inhibiting ERK activation.', *Biochimica et biophysica acta*, 1801(2), pp. 106–13. doi: 10.1016/j.bbalip.2009.09.022.
- Van Lookeren Campagne, M. et al. (2014) 'Mechanisms of age-related macular degeneration and therapeutic opportunities', *Journal of Pathology*, 232(2), pp. 151–164. doi: 10.1002/path.4266.
- Lowenstein, C. J., Dinerman, J. L. and Snyder, S. H. (1994) 'Nitric oxide: a physiologic messenger.', *Annals of internal medicine*, 120(3), pp. 227–37. doi: 10.7326/0003-4819-120-3-199402010-00009.

- Lu, Z. and Xu, S. (2006) 'ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis.', *IUBMB life*, 58(11), pp. 621–31. doi: 10.1080/15216540600957438.
- Lukacs, G. L. *et al.* (2000) 'Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus.', *The Journal of biological chemistry*, 275(3), pp. 1625–9. doi: 10.1074/jbc.275.3.1625.
- Machiela, M. J. and Chanock, S. J. (2015) 'LDlink: a web-based application for exploring population-specific haplotype structure and linking correlated alleles of possible functional variants.', *Bioinformatics (Oxford, England)*, 31(21), pp. 3555–7. doi: 10.1093/bioinformatics/btv402.
- Marazita, M. C. *et al.* (2016) 'Oxidative stress-induced premature senescence dysregulates VEGF and CFH expression in retinal pigment epithelial cells: Implications for Age-related Macular Degeneration.', *Redox biology*. Elsevier, 7, pp. 78–87. doi: 10.1016/j.redox.2015.11.011.
- di Mari, J. F., Davis, R. and Safirstein, R. L. (1999) 'MAPK activation determines renal epithelial cell survival during oxidative injury', *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 277(2), pp. F195–F203. doi: 10.1152/ajprenal.1999.277.2.F195.
- Martindale, J. L. and Holbrook, N. J. (2002) 'Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival.', *Journal of cellular physiology*, 192(1), pp. 1–15. doi: 10.1002/jcp.10119.
- Matthews, C. R. (1987) '[26] Effect of point mutations of the folding of globular proteins', in *Methods in enzymology*, pp. 498–511. doi: 10.1016/0076-6879(87)54092-7.
- McLenachan, S. *et al.* (2017) 'Bioengineered Bruch's-like extracellular matrix promotes retinal pigment epithelial differentiation.', *Biochemistry and biophysics reports*. Elsevier B.V., 10(February), pp. 178–185. doi: 10.1016/j.bbrep.2017.03.008.
- McLenachan, S., Sarsero, J. P. and Ioannou, P. A. (2007) 'Flow-cytometric analysis of mouse embryonic stem cell lipofection using small and large DNA constructs.', *Genomics*, 89(6), pp. 708–20. doi: 10.1016/j.ygeno.2007.02.006.
- Messerschmidt, L. *et al.* (2019) 'Osmotic induction of cyclooxygenase-2 in RPE cells: Stimulation of inflammasome activation.', *Molecular vision*, 25(October 2018), pp. 329–344.
- Meyers, E. A. and Kessler, J. A. (2017) 'TGF- β Family Signaling in Neural and

Neuronal Differentiation, Development, and Function.’, *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 9(8), p. a022244. doi: 10.1101/cshperspect.a022244.

Mitchell, D. A. *et al.* (2009) ‘Paths reunited: Initiation of the classical and lectin pathways of complement activation’, *Immunobiology*, 215(1), pp. 1–11. doi: 10.1016/j.imbio.2009.08.006.

Mitchell, P. *et al.* (2018) ‘Age-related macular degeneration’, *The Lancet*. Elsevier Ltd, 392(10153), pp. 1147–1159. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31550-2.

Mitter, S. K. *et al.* (2012) ‘Autophagy in the retina: a potential role in age-related macular degeneration.’, *Advances in experimental medicine and biology*, 723, pp. 83–90. doi: 10.1007/978-1-4614-0631-0_12.

Mitter, S. K. *et al.* (2014) ‘Dysregulated autophagy in the RPE is associated with increased susceptibility to oxidative stress and AMD.’, *Autophagy*, 10(11), pp. 1989–2005. doi: 10.4161/auto.36184.

Mizuguchi, H. *et al.* (2000) ‘IRES-dependent second gene expression is significantly lower than cap-dependent first gene expression in a bicistronic vector.’, *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*. American Society for Gene Therapy, 1(4), pp. 376–82. doi: 10.1006/mthe.2000.0050.

Mount, H. T. *et al.* (1995) ‘Glial cell line-derived neurotrophic factor promotes the survival and morphologic differentiation of Purkinje cells.’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(20), pp. 9092–6. doi: 10.1073/pnas.92.20.9092.

Mulligan, L. M. (2018) ‘GDNF and the RET Receptor in Cancer: New Insights and Therapeutic Potential.’, *Frontiers in physiology*, 9(JAN), p. 1873. doi: 10.3389/fphys.2018.01873.

Nebbioso, M. *et al.* (2019) ‘Therapeutic Approaches with Intravitreal Injections in Geographic Atrophy Secondary to Age-Related Macular Degeneration: Current Drugs and Potential Molecules.’, *International journal of molecular sciences*, 20(7). doi: 10.3390/ijms20071693.

Nilsson, B. and Nilsson Ekdahl, K. (2012) ‘The tick-over theory revisited: is C3 a contact-activated protein?’, *Immunobiology*, 217(11), pp. 1106–10. doi: 10.1016/j.imbio.2012.07.008.

- Nowak, J. Z. (2006) 'Age-related macular degeneration (AMD): pathogenesis and therapy.', *Pharmacological reports : PR*, 58(3), pp. 353–63.
- O'Donnell, A., Yang, S.-H. and Sharrocks, A. D. (2008) 'MAP kinase-mediated c-fos regulation relies on a histone acetylation relay switch.', *Molecular cell*. Elsevier Inc., 29(6), pp. 780–5. doi: 10.1016/j.molcel.2008.01.019.
- Ogilvie, J. M., Speck, J. D. and Lett, J. M. (2000) 'Growth factors in combination, but not individually, rescue rd mouse photoreceptors in organ culture.', *Experimental neurology*, 161(2), pp. 676–85. doi: 10.1006/exnr.1999.7291.
- Paetkau, M. E. et al. (1978) 'Senile disciform macular degeneration and smoking.', *Canadian journal of ophthalmology. Journal canadien d'ophtalmologie*, 13(2), pp. 67–71.
- Park, D. H., Sun, H. J. and Lee, S. J. (2017) 'A comparison of responses to intravitreal bevacizumab, ranibizumab, or aflibercept injections for neovascular age-related macular degeneration.', *International ophthalmology*. Springer Netherlands, 37(5), pp. 1205–1214. doi: 10.1007/s10792-016-0391-4.
- Parkash, V. et al. (2008) 'The structure of the glial cell line-derived neurotrophic factor-coreceptor complex: insights into RET signaling and heparin binding.', *The Journal of biological chemistry*, 283(50), pp. 35164–72. doi: 10.1074/jbc.M802543200.
- Paul, G. and Sullivan, A. M. (2019) 'Trophic factors for Parkinson's disease: Where are we and where do we go from here?', *The European journal of neuroscience*, 49(4), pp. 440–452. doi: 10.1111/ejn.14102.
- Pearson, G. et al. (2001) 'Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions.', *Endocrine reviews*, 22(2), pp. 153–83. doi: 10.1210/edrv.22.2.0428.
- Pérez-Vizcaíno, F. et al. (1995) 'Rapid degradation of endothelin-1 by an enzyme released by the rat isolated perfused mesentery.', *British journal of pharmacology*, 114(4), pp. 867–71. doi: 10.1111/j.1476-5381.1995.tb13284.x.
- Perry, K. M. et al. (1987) 'Effect of single amino acid replacements on the folding and stability of dihydrofolate reductase from *Escherichia coli*.', *Biochemistry*, 26(10), pp. 2674–82. doi: 10.1021/bi00384a004.

- Pikuleva, I. A. and Curcio, C. A. (2014) 'Cholesterol in the retina: the best is yet to come.', *Progress in retinal and eye research*, 41(1), pp. 64–89. doi: 10.1016/j.preteyeres.2014.03.002.
- Pitt, S. C. and Chen, H. (2008) 'The phosphatidylinositol 3-kinase/akt signaling pathway in medullary thyroid cancer.', *Surgery*, 144(5), pp. 721–4. doi: 10.1016/j.surg.2008.06.028.
- Plössl, K. *et al.* (2017) 'Retinoschisin is linked to retinal Na/K-ATPase signaling and localization.', *Molecular biology of the cell*, 28(16), pp. 2178–2189. doi: 10.1091/mbc.E17-01-0064.
- Plotkin, J. B. and Kudla, G. (2011) 'Synonymous but not the same: the causes and consequences of codon bias.', *Nature reviews. Genetics*, 12(1), pp. 32–42. doi: 10.1038/nrg2899.
- Pop, C. *et al.* (2014) 'Causal signals between codon bias, mRNA structure, and the efficiency of translation and elongation.', *Molecular systems biology*, 10(12), p. 770. doi: 10.15252/msb.20145524.
- Porter, R. R. and Reid, K. B. (1978) 'The biochemistry of complement.', *Nature*, 275(5682), pp. 699–704. doi: 10.1038/275699a0.
- Poteryaev, D. *et al.* (1999) 'GDNF triggers a novel ret-independent Src kinase family-coupled signaling via a GPI-linked GDNF receptor alpha1.', *FEBS letters*, 463(1–2), pp. 63–6. doi: 10.1016/s0014-5793(99)01590-2.
- Poulaki, V. *et al.* (2007) 'The proteasome inhibitor bortezomib induces apoptosis in human retinoblastoma cell lines in vitro', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 48(10), pp. 4706–4719. doi: 10.1167/iovs.06-1147.
- Pujol-Lereis, L. M. *et al.* (2018) 'Evaluation of serum sphingolipids and the influence of genetic risk factors in age-related macular degeneration.', *PloS one*, 13(8), p. e0200739. doi: 10.1371/journal.pone.0200739.
- Pyakurel, A. *et al.* (2017) 'Loss of Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 in the Retinal Pigment Epithelium Leads to RPE65 Decrease and Retinal Degeneration.', *Molecular and cellular biology*, 37(24), pp. 1–19. doi: 10.1128/MCB.00295-17.
- Quax, T. E. F. *et al.* (2015) 'Codon Bias as a Means to Fine-Tune Gene Expression.',

Molecular cell, 59(2), pp. 149–61. doi: 10.1016/j.molcel.2015.05.035.

Ramin, S. et al. (2015) 'Age-Related Macular Degeneration: A Scientometric Analysis.', *Medical hypothesis, discovery & innovation ophthalmology journal*, 4(2), pp. 39–49.

Ranjbar, M. et al. (2016) 'Stereotactic radiotherapy in neovascular age-related macular degeneration: Real-life efficacy and morphological evaluation of the outer retina-choroid complex.', *Medicine*, 95(52), p. e5729. doi: 10.1097/MD.00000000000005729.

Ratnapriya, R. et al. (2014) 'Rare and common variants in extracellular matrix gene Fibrillin 2 (FBN2) are associated with macular degeneration', *Human Molecular Genetics*, 23(21), pp. 5827–5837. doi: 10.1093/hmg/ddu276.

Ratnapriya, R. and Chew, E. Y. (2013) 'Age-related macular degeneration-clinical review and genetics update', *Clinical Genetics*, 84(2), pp. 160–166. doi: 10.1111/cge.12206.

Rein, D. B. et al. (2009) 'Forecasting age-related macular degeneration through the year 2050: the potential impact of new treatments.', *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, 127(4), pp. 533–40. doi: 10.1001/archophthalmol.2009.58.

Rezania, S. et al. (2011) 'Extraction, Purification and Characterization of Lipopolysaccharide from Escherichia coli and Salmonella typhi.', *Avicenna journal of medical biotechnology*, 3(1), pp. 3–9.

Rickard, S. M. et al. (2003) 'The binding of human glial cell line-derived neurotrophic factor to heparin and heparan sulfate: importance of 2-O-sulfate groups and effect on its interaction with its receptor, GFRalpha1.', *Glycobiology*, 13(6), pp. 419–26. doi: 10.1093/glycob/cwg046.

Rickert, U. et al. (2014) 'Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Family Members Reduce Microglial Activation via Inhibiting p38MAPKs-Mediated Inflammatory Responses.', *Journal of neurodegenerative diseases*, 2014, p. 369468. doi: 10.1155/2014/369468.

Riley, H. J. and Bradshaw, A. D. (2019) 'The Influence of the Extracellular Matrix in Inflammation: Findings from the SPARC-Null Mouse.', *Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007)*, (September 2018), p. ar.24133. doi: 10.1002/ar.24133.

- Rivera, A. *et al.* (2005) 'Hypothetical LOC387715 is a second major susceptibility gene for age-related macular degeneration, contributing independently of complement factor H to disease risk', *Human Molecular Genetics*, 14(21), pp. 3227–3236. doi: 10.1093/hmg/ddi353.
- Rodnina, M. V. (2016) 'The ribosome in action: Tuning of translational efficiency and protein folding.', *Protein science : a publication of the Protein Society*, 25(8), pp. 1390–406. doi: 10.1002/pro.2950.
- Rodriguez, A. and Flemington, E. K. (1999) 'Transfection-mediated cell-cycle signaling: considerations for transient transfection-based cell-cycle studies.', *Analytical biochemistry*, 272(2), pp. 171–81. doi: 10.1006/abio.1999.4156.
- Roque, R. S. *et al.* (1999) 'Retina-derived microglial cells induce photoreceptor cell death in vitro.', *Brain research*, 836(1–2), pp. 110–9. doi: 10.1016/s0006-8993(99)01625-x.
- Rosenblad, C. *et al.* (1999) 'Protection and regeneration of nigral dopaminergic neurons by neurturin or GDNF in a partial lesion model of Parkinson's disease after administration into the striatum or the lateral ventricle.', *The European journal of neuroscience*, 11(5), pp. 1554–66. doi: 10.1046/j.1460-9568.1999.00566.x.
- Rovner, B. W. (2002) 'Effect of Depression on Vision Function in Age-Related Macular Degeneration', *Archives of Ophthalmology*, 120(8), p. 1041. doi: 10.1001/archophth.120.8.1041.
- Roybal, C. N. *et al.* (2005) 'Aberrant accumulation of fibulin-3 in the endoplasmic reticulum leads to activation of the unfolded protein response and VEGF expression', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 46(11), pp. 3973–3979. doi: 10.1167/iovs.05-0070.
- Rudat, S. *et al.* (2018) 'RET-mediated autophagy suppression as targetable co-dependence in acute myeloid leukemia.', *Leukemia*. Springer US, 32(10), pp. 2189–2202. doi: 10.1038/s41375-018-0102-4.
- Rudnicka, A. R. *et al.* (2012) 'Age and Gender Variations in Age-related Macular Degeneration Prevalence in Populations of European Ancestry: A Meta-analysis', *Ophthalmology*, 119(3), pp. 571–580. doi: 10.1016/j.ophtha.2011.09.027.
- Rudnicka, A. R. *et al.* (2015) 'Incidence of Late-Stage Age-Related Macular

Degeneration in American Whites: Systematic Review and Meta-analysis', *American Journal of Ophthalmology*. The Authors, 160(1), p. 85–93.e3. doi: 10.1016/j.ajo.2015.04.003.

Runeberg-Roos, P. *et al.* (2016) 'Developing therapeutically more efficient Neurturin variants for treatment of Parkinson's disease.', *Neurobiology of disease*. Elsevier Inc., 96, pp. 335–345. doi: 10.1016/j.nbd.2016.07.008.

Russell, S. (2004) 'CD46: A complement regulator and pathogen receptor that mediates links between innate and acquired immune function', *Tissue Antigens*, 64(2), pp. 111–118. doi: 10.1111/j.1399-0039.2004.00277.x.

Saarma, M. (2000) 'GDNF - a stranger in the TGF-beta superfamily?', *European journal of biochemistry*, 267(24), pp. 6968–71. doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01826.x.

Saarma, M. and Sariola, H. (1999) 'Other neurotrophic factors: glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF).', *Microscopy research and technique*, 45(4–5), pp. 292–302. doi: 10.1002/(SICI)1097-0029(19990515/01)45:4/5<292::AID-JEMT13>3.0.CO;2-8.

Sainath, R. and Gallo, G. (2015) 'Cytoskeletal and signaling mechanisms of neurite formation.', *Cell and tissue research*, 359(1), pp. 267–78. doi: 10.1007/s00441-014-1955-0.

Sandilands, E. *et al.* (2012) 'Src-dependent autophagic degradation of Ret in FAK-signalling-defective cancer cells.', *EMBO reports*. Nature Publishing Group, 13(8), pp. 733–40. doi: 10.1038/embor.2012.92.

Sandmark, J. *et al.* (2018) 'Structure and biophysical characterization of the human full-length neurturin-GFRa2 complex: A role for heparan sulfate in signaling', *Journal of Biological Chemistry*, 293(15), pp. 5492–5508. doi: 10.1074/jbc.RA117.000820.

SanGiovanni, J. P. and Lee, P. H. (2013) 'AMD-Associated Genes Encoding Stress-Activated MAPK Pathway Constituents Are Identified by Interval-Based Enrichment Analysis', *PLoS ONE*, 8(8), pp. 1–8. doi: 10.1371/journal.pone.0071239.

Sarkar, T. R. *et al.* (2012) 'Identification of a Src tyrosine kinase/SIAH2 E3 ubiquitin ligase pathway that regulates C/EBPδ expression and contributes to transformation of breast tumor cells.', *Molecular and cellular biology*, 32(2), pp. 320–32. doi:

10.1128/MCB.05790-11.

Sarks, S. H. *et al.* (1999) 'Early drusen formation in the normal and aging eye and their relation to age related maculopathy: a clinicopathological study', *British Journal of Ophthalmology*, 83(3), pp. 358–368. doi: 10.1136/bjo.83.3.358.

Sawe, N., Steinberg, G. and Zhao, H. (2008) 'Dual roles of the MAPK/ERK1/2 cell signaling pathway after stroke.', *Journal of neuroscience research*, 86(8), pp. 1659–69. doi: 10.1002/jnr.21604.

Saxena, N. *et al.* (2016) 'Burden of Wet Age-Related Macular Degeneration and Its Economic Implications in Singapore in the Year 2030.', *Ophthalmic epidemiology*, 23(4), pp. 232–7. doi: 10.1080/09286586.2016.1193617.

Schieber, M. and Chandel, N. S. (2014) 'ROS function in redox signaling and oxidative stress.', *Current biology : CB*, 24(10), pp. R453-62. doi: 10.1016/j.cub.2014.03.034.

Schuller, A. P. and Green, R. (2018) 'Roadblocks and resolutions in eukaryotic translation.', *Nature reviews. Molecular cell biology*, 19(8), pp. 526–541. doi: 10.1038/s41580-018-0011-4.

Seddon, J. M. *et al.* (1994) 'Dietary carotenoids, vitamins A, C, and E, and advanced age-related macular degeneration. Eye Disease Case-Control Study Group.', *JAMA*, 272(18), pp. 1413–20.

Seddon, J. M. *et al.* (2005) 'The US twin study of age-related macular degeneration: relative roles of genetic and environmental influences.', *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, 123(3), pp. 321–7. doi: 10.1001/archopht.123.3.321.

Segouffin-Cariou, C. and Billaud, M. (2000) 'Transforming ability of MEN2A-RET requires activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathway.', *The Journal of biological chemistry*, 275(5), pp. 3568–76. doi: 10.1074/jbc.275.5.3568.

Segrest, J. P. *et al.* (1971) 'Human erythrocyte membrane glycoprotein: a re-evaluation of the molecular weight as determined by SDS polyacrylamide gel electrophoresis.', *Biochemical and biophysical research communications*, 44(2), pp. 390–5. doi: 10.1016/0006-291x(71)90612-7.

Shabalina, S. A., Ogurtsov, A. Y. and Spiridonov, N. A. (2006) 'A periodic pattern of mRNA secondary structure created by the genetic code.', *Nucleic acids research*,

34(8), pp. 2428–37. doi: 10.1093/nar/gkl287.

Shen, Y. *et al.* (2016) 'Effect of cytokeratin 17 on retinal pigment epithelium degeneration and choroidal neovascularization.', *International journal of ophthalmology*, 9(3), pp. 363–8. doi: 10.18240/ijo.2016.03.06.

Shortle, D. (1996) 'The denatured state (the other half of the folding equation) and its role in protein stability.', *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 10(1), pp. 27–34. doi: 10.1096/fasebj.10.1.8566543.

Smith, W. *et al.* (2001) 'Risk factors for age-related macular degeneration: Pooled findings from three continents.', *Ophthalmology*, 108(4), pp. 697–704.

Sorokin, L. (2010) 'The impact of the extracellular matrix on inflammation.', *Nature reviews. Immunology*. Nature Publishing Group, 10(10), pp. 712–23. doi: 10.1038/nri2852.

Sparrow, J. R. *et al.* (2003) 'A2E, a byproduct of the visual cycle.', *Vision research*, 43(28), pp. 2983–90. doi: 10.1016/s0042-6989(03)00475-9.

Stefánsson, E., Geirsdóttir, Á. and Sigurdsson, H. (2011) 'Metabolic physiology in age related macular degeneration', *Progress in Retinal and Eye Research*. Elsevier Ltd, 30(1), pp. 72–80. doi: 10.1016/j.preteyeres.2010.09.003.

Stein, G. H. *et al.* (1999) 'Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts.', *Molecular and cellular biology*, 19(3), pp. 2109–17. doi: 10.1128/mcb.19.3.2109.

Stepanenko, A. A. and Heng, H. H. (2017) 'Transient and stable vector transfection: Pitfalls, off-target effects, artifacts.', *Mutation research*, 773, pp. 91–103. doi: 10.1016/j.mrrev.2017.05.002.

Stone, E. M. *et al.* (1999) 'A single EFEMP1 mutation associated with both Malattia Leventinese and Drayton honeycomb retinal dystrophy', *Nature Genetics*, 22(2), pp. 199–202. doi: 10.1038/9722.

Su, R. *et al.* (2017) 'Particulate matter exposure induces the autophagy of macrophages via oxidative stress-mediated PI3K/AKT/mTOR pathway.', *Chemosphere*, 167, pp. 444–453. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.10.024.

- Summers, D. K. (1991) 'The kinetics of plasmid loss.', *Trends in biotechnology*, 9(8), pp. 273–8. doi: 10.1016/0167-7799(91)90089-Z.
- Szatmári-Tóth, M. *et al.* (2016) 'Clearance of autophagy-associated dying retinal pigment epithelial cells - a possible source for inflammation in age-related macular degeneration.', *Cell death & disease*, 7(9), p. e2367. doi: 10.1038/cddis.2016.133.
- Tang, B. *et al.* (2014) 'Proteasome Inhibitors Activate Autophagy Involving Inhibition of PI3K-Akt-mTOR Pathway as an Anti-Oxidation Defense in Human RPE Cells', *PLoS ONE*. Edited by D. C. Rubinsztein, 9(7), p. e103364. doi: 10.1371/journal.pone.0103364.
- Tanida, I., Ueno, T. and Kominami, E. (2008) 'LC3 and Autophagy', in *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, pp. 77–88. doi: 10.1007/978-1-59745-157-4_4.
- Tanida, I. and Waguri, S. (2010) 'Measurement of autophagy in cells and tissues.', *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 648, pp. 193–214. doi: 10.1007/978-1-60761-756-3_13.
- Tansey, M. G. *et al.* (2000) 'GFRalpha-mediated localization of RET to lipid rafts is required for effective downstream signaling, differentiation, and neuronal survival.', *Neuron*, 25(3), pp. 611–23. doi: 10.1016/S0896-6273(00)81064-8.
- Tao, L. *et al.* (2016) 'Angiotensin-converting enzyme 2 activator diminazene aceturate prevents lipopolysaccharide-induced inflammation by inhibiting MAPK and NF-κB pathways in human retinal pigment epithelium.', *Journal of neuroinflammation*, 13, p. 35. doi: 10.1186/s12974-016-0489-7.
- Taylor, H. R. (2016) 'The Global Issue of Vision Loss and What We Can Do About It', *Asia-Pacific Journal of Ophthalmology*, 5(2), pp. 95–96. doi: 10.1097/APO.0000000000000188.
- Teti, A. (1992) 'Regulation of cellular functions by extracellular matrix.', *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 2(10 Suppl), pp. S83-7.
- The Lancet (2018) 'Age-related macular degeneration: treatment at what cost?', *The Lancet*. Elsevier Ltd, 392(10153), p. 1090. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32291-8.
- Thurman, J. M. *et al.* (2009) 'Oxidative stress renders retinal pigment epithelial cells susceptible to complement-mediated injury.', *The Journal of biological chemistry*,

284(25), pp. 16939–47. doi: 10.1074/jbc.M808166200.

Trupp, M. *et al.* (1996) 'Functional receptor for GDNF encoded by the c-ret proto-oncogene.', *Nature*, 381(6585), pp. 785–9. doi: 10.1038/381785a0.

Uzdensky, A. *et al.* (2013) 'Protection effect of GDNF and neurturin on photosensitized crayfish neurons and glial cells.', *Journal of molecular neuroscience : MN*, 49(3), pp. 480–90. doi: 10.1007/s12031-012-9858-6.

Vajzovic, L. *et al.* (2012) 'Maturation of the human fovea: correlation of spectral-domain optical coherence tomography findings with histology.', *American journal of ophthalmology*, 154(5), p. 779–789.e2. doi: 10.1016/j.ajo.2012.05.004.

van de Ven, J. P. H. *et al.* (2013) 'A functional variant in the CFI gene confers a high risk of age-related macular degeneration.', *Nature genetics*. Nature Publishing Group, 45(7), pp. 813–7. doi: 10.1038/ng.2640.

Vieira, P., Thomas-Crusells, J. and Vieira, A. (2003) 'Internalization of glial cell-derived neurotrophic factor receptor GFR alpha 1 in the absence of the ret tyrosine kinase coreceptor.', *Cellular and molecular neurobiology*, 23(1), pp. 43–55.

Vierkotten, S., Muether, P. S. and Fauser, S. (2011) 'Overexpression of HTRA1 leads to ultrastructural changes in the elastic layer of Bruch's membrane via cleavage of extracellular matrix components.', *PloS one*. Edited by A. Lewin, 6(8), p. e22959. doi: 10.1371/journal.pone.0022959.

Vinding, T. *et al.* (1992) 'Risk factor analysis for atrophic and exudative age-related macular degeneration. An epidemiological study of 1000 aged individuals.', *Acta ophthalmologica*, 70(1), pp. 66–72.

Vogel, C. *et al.* (2010) 'Sequence signatures and mRNA concentration can explain two-thirds of protein abundance variation in a human cell line.', *Molecular systems biology*. Nature Publishing Group, 6(1), p. 400. doi: 10.1038/msb.2010.59.

Vogt, S. D. *et al.* (2011) 'Retinal pigment epithelial expression of complement regulator CD46 is altered early in the course of geographic atrophy.', *Experimental eye research*, 93(4), pp. 413–23. doi: 10.1016/j.exer.2011.06.002.

Wang, A. L. *et al.* (2009) 'Autophagy and exosomes in the aged retinal pigment epithelium: Possible relevance to drusen formation and age-related macular

degeneration', *PLoS ONE*, 4(1). doi: 10.1371/journal.pone.0004160.

Wang, G. *et al.* (2017) 'Enhancing Accuracy in Molecular Weight Determination of Highly Heterogeneously Glycosylated Proteins by Native Tandem Mass Spectrometry.', *Analytical chemistry*, 89(9), pp. 4793–4797. doi: 10.1021/acs.analchem.6b05129.

Wang, Y.-C., Peterson, S. E. and Loring, J. F. (2014) 'Protein post-translational modifications and regulation of pluripotency in human stem cells.', *Cell research*. Nature Publishing Group, 24(2), pp. 143–60. doi: 10.1038/cr.2013.151.

Wen, J., Arakawa, T. and Philo, J. S. (1996) 'Size-Exclusion Chromatography with On-Line Light-Scattering, Absorbance, and Refractive Index Detectors for Studying Proteins and Their Interactions', *Analytical Biochemistry*, 240(2), pp. 155–166. doi: 10.1006/abio.1996.0345.

Whitmarsh, A. J. (2007) 'Regulation of gene transcription by mitogen-activated protein kinase signaling pathways.', *Biochimica et biophysica acta*, 1773(8), pp. 1285–98. doi: 10.1016/j.bbamcr.2006.11.011.

Whitmore, S. S. *et al.* (2015) 'Complement activation and choriocapillaris loss in early AMD: implications for pathophysiology and therapy.', *Progress in retinal and eye research*, 45(1), pp. 1–29. doi: 10.1016/j.preteyeres.2014.11.005.

Widenfalk, J. *et al.* (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', *The Journal of Neuroscience*, 17(21), pp. 8506–8519. doi: 10.1523/JNEUROSCI.17-21-08506.1997.

Winkler, B. S. *et al.* (1999) 'Oxidative damage and age-related macular degeneration.', *Molecular vision*. Edited by H. Bönig, 5(5), p. 32.

Wolf, C., Rothermel, A. and Robitzki, A. 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.', *Journal of neurochemistry*, 107(1), pp. 96–104. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05594.x.

Wong, T. *et al.* (2008) 'The Natural History and Prognosis of Neovascular Age-Related

- Macular Degeneration. A Systematic Review of the Literature and Meta-analysis', *Ophthalmology*, 115(1), pp. 116–127. doi: 10.1016/j.ophtha.2007.03.008.
- Wong, W. L. *et al.* (2014) 'Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: A systematic review and meta-analysis', *The Lancet Global Health*. Wong *et al.* Open Access article distributed under the terms of CC BY-NC-ND, 2(2), pp. e106–e116. doi: 10.1016/S2214-109X(13)70145-1.
- Xian, C. J., Huang, B.-R. and Zhou, X.-F. (1999) 'Distribution of neurturin mRNA and immunoreactivity in the peripheral tissues of adult rats', *Brain Research*, 835(2), pp. 247–258. doi: 10.1016/S0006-8993(99)01590-5.
- Xu, Q. *et al.* (2018) 'Understanding AMD by analogy: systematic review of lipid-related common pathogenic mechanisms in AMD, AD, AS and GN.', *Lipids in health and disease*. *Lipids in Health and Disease*, 17(1), p. 3. doi: 10.1186/s12944-017-0647-7.
- Yabuta, Y. *et al.* (2001) 'Folding Pathway Mediated by an Intramolecular Chaperone', *Journal of Biological Chemistry*, 276(48), pp. 44427–44434. doi: 10.1074/jbc.M107573200.
- Yang, Z. *et al.* (2006) 'A variant of the HTRA1 gene increases susceptibility to age-related macular degeneration.', *Science (New York, N.Y.)*, 314(5801), pp. 992–3. doi: 10.1126/science.1133811.
- Yu-Wai-Man, P., Griffiths, P. G. and Chinnery, P. F. (2011) 'Mitochondrial optic neuropathies - Disease mechanisms and therapeutic strategies', *Progress in Retinal and Eye Research*, 30(2), pp. 81–114. doi: 10.1016/j.preteyeres.2010.11.002.
- Yu, A. L. *et al.* (2009) 'Subtoxic oxidative stress induces senescence in retinal pigment epithelial cells via TGF-beta release.', *Investigative ophthalmology & visual science*, 50(2), pp. 926–35. doi: 10.1167/iovs.07-1003.
- Yue, B. (2014) 'Biology of the Extracellular Matrix', *Journal of Glaucoma*, 23(8 Suppl 1), pp. S20–S23. doi: 10.1097/IJG.000000000000108.
- Zarbin, M. A. (2004) 'Current Concepts in the Pathogenesis of Age-Related Macular Degeneration', *Archives of Ophthalmology*, 122(4), p. 598. doi: 10.1001/archopht.122.4.598.
- Zhang, J. *et al.* (2016) 'ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling.', *Oxidative*

medicine and cellular longevity, 2016(Figure 1), p. 4350965. doi: 10.1155/2016/4350965.

Zhou, N. E., Kay, C. M. and Hodges, R. S. (1994) 'The role of interhelical ionic interactions in controlling protein folding and stability. De novo designed synthetic two-stranded alpha-helical coiled-coils.', *Journal of molecular biology*, 237(4), pp. 500–12. doi: 10.1006/jmbi.1994.1250.

Zielasek, J. and Hartung, H. P. (1996) 'Molecular mechanisms of microglial activation.', *Advances in neuroimmunology*, 6(2), pp. 191–22. doi: 10.1016/0960-5428(96)00017-4.

12 Danksagung

Meinen Dank möchte ich an das gesamte Institut für Humangenetik der Universität Regensburg richten, die mich jederzeit unterstützt haben. Besonders möchte ich alle Mitglieder der AG Friedrich erwähnen, ohne diese die Erstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Vielen Dank auch an Herrn Weber, für immer sehr schnellen, hilfreichen Input und Unterstützung zu jeder Zeit.

13 Lebenslauf

Zur Person:

Name, Vorname: Zankel, Martin

Geburtsdatum/-ort: 08.07.1996 in Garmisch-Partenkirchen

Universitäre Ausbildung:

2015-2022 Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg

Berufliche Erfahrungen:

2014-2015 Ableistung eines Bundesfreiwilligendienstes (BFD) im Krankenhaus Weilheim i. OB

Schulische Ausbildung:

2006-2014 Besuch des Staffelsee-Gymnasiums Murnau mit Erreichen der allgemeinen Hochschulreife (Abitur) 2014