

Aus dem Lehrstuhl für Humangenetik  
Prof. Dr. rer. nat. Bernhard Weber  
der Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

**„Funktionelle Untersuchungen  
zur Rolle der genetischen Varianten rs704 des Vitronectin-Gens  
in der Netzhaut und dem retinalen Pigmentepithel“**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Niklas Negele

2023



Aus dem Lehrstuhl für Humangenetik  
Prof. Dr. rer. nat. Bernhard Weber  
der Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

**„Funktionelle Untersuchungen  
zur Rolle der genetischen Varianten rs704 des Vitronectin-Gens  
in der Netzhaut und dem retinalen Pigmentepithel“**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Niklas Negele

2023

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

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

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Caroline Brandl

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Januar 2024

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Altersbedingte Makuladegeneration .....	1
1.1.1	Epidemiologie .....	1
1.1.2	Risikofaktoren .....	2
1.1.3	Krankheitsbild und molekulare Pathogenese .....	5
1.1.4	Aktuelle Therapie der AMD .....	10
1.2	Möglicher Einfluss des Vitronectins auf die AMD-Pathogenese .....	11
1.2.1	Aufbau des Vitronectins .....	12
1.2.2	Funktionen des Vitronectins.....	14
1.2.3	Zusammenhang von Vitronectin mit der AMD-Pathogenese .....	15
1.3	Ziel der Arbeit .....	16
<b>2</b>	<b>Material .....</b>	<b>17</b>
2.1	Zellen und Organismen .....	17
2.1.1	<i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> ).....	17
2.1.2	Eukaryotische Zelllinien .....	17
2.1.3	Gewebe .....	18
2.2	Oligonukleotide.....	18
2.3	Plasmide und Expressionskonstrukte.....	19
2.4	Primäre Antikörper.....	19
2.5	Sekundäre Antikörper.....	22
2.6	Enzyme und weitere Proteine.....	23
2.7	Molekularmassenstandards.....	23
2.8	Kit-Systeme .....	24
2.9	Chemikalien und Reagenzien.....	24
2.10	Puffer und Lösungen .....	28

## Inhaltsverzeichnis

2.11	Zellkulturmedien und Zusätze .....	32
2.12	Verbrauchsmaterial .....	33
2.13	Laborgeräte .....	37
2.14	Software .....	40
<b>3</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>41</b>
3.1	Kultivierung verwendeter eukaryotischer Zelllinien.....	41
3.1.1	HEK-293-EBNA-Zellen .....	41
3.1.2	Weri-Rb1-Zellen.....	41
3.1.3	Aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte RPE-Zellen (hiPSC-RPE).....	42
3.1.4	Auftauen von Zellen .....	43
3.2	Konzentrationsbestimmung von Weri-Rb1-Zellen für funktionelle Versuche	44
3.3	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE) .....	44
3.4	Western-Blot – Semi Dry Verfahren .....	45
3.5	Vitronectin-Aufreinigung .....	45
3.5.1	Plasmidpräparation aus Bakterienkulturen („Midi“) .....	45
3.5.2	Calciumphosphat Transfektion von HEK-293-EBNA mit pEXPR- Plasmiden zur heterologen Proteinexpression.....	46
3.5.3	Ernte von Zellen und Überstand nach Calciumphosphat Transfektion .	47
3.5.4	Aufreinigung der Vitronectin-Proteinvarianten mittels Strep-Tactin®- Trennsäulen.....	47
3.5.5	Western-Blot Analysen der Eluate .....	48
3.5.6	Reinheitsbestimmung der Eluate mittels Coomassie-Blue-Färbung .....	49
3.5.7	Konzentrationsbestimmung der Vitronectin-Varianten über Western-Blot Analysen und Bradford-Assay.....	50
3.6	Charakterisierung von hiPSC-RPE-Zellen.....	50
3.6.1	Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER) .....	50

## Inhaltsverzeichnis

3.6.2	Untersuchung des Expressionsprofils mittels reverse Transkriptase-PCR	51
3.6.3	Immuncytochemie an hiPSC-RPE-Zellen .....	54
3.7	Funktionelle Versuche zum Einfluss der Vitronectin-Varianten auf das Bindungsverhalten von Photorezeptoren .....	55
3.7.1	In vitro-Assay zum Einfluss von Vitronectin auf das Bindungsverhalten von Weri-Rb1-Zellen .....	55
3.7.2	Ex vivo-Assay zum Einfluss von Vitronectin auf das Bindungsverhalten von Photorezeptoren aus porcinen Netzhäuten .....	56
3.8	Funktionelle Versuche zum Einfluss der Vitronectin-Varianten auf die Zellhomöostase von Photorezeptoren unter oxidativem Stress .....	57
3.8.1	MTT-Assay.....	57
3.8.2	Untersuchung der Apoptose-Induktion an Weri-Rb1 mittels Tunel-Assay	58
3.8.3	Autophagie-Assay an Weri-Rb1-Zellen.....	59
3.8.4	Signalwegsinduktion an Weri-Rb1-Zellen .....	60
3.9	Funktionelle Versuche zum Einfluss der Vitronectin-Varianten auf die Phagocytose durch hiPSC-RPE-Zellen .....	60
3.9.1	Isolation von Außensegmenten porciner Photorezeptoren .....	60
3.9.2	Erfolgskontrolle und Konzentrationsbestimmung der Photorezeptor-Außensegmente für funktionelle Versuche .....	63
3.9.3	Phagocytose-Assay an hiPSC-RPE-Zellen.....	64
3.9.4	Western-Blot Analyse der Photorezeptor-Außensegment-Aufnahme und der Aktivierung intrazellulärer Signalwege .....	66
3.10	Statistik.....	66
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>67</b>
4.1	Effekt von Vitronectin auf die Adhäsion neuronaler retinaler Zellen .....	67
4.1.1	Adhäsion von Weri-Rb1-Zellen .....	67
4.1.2	Assoziation von dissoziierten Zellen porciner neuraler Netzhäute .....	68

## Inhaltsverzeichnis

4.2	Effekt von Vitronectin auf die Zellhomöostase von Photorezeptoren unter oxidativem Stress.....	70
4.2.1	Zellviabilität von Weri-Rb1-Zellen .....	70
4.2.2	Apoptose-Induktion in Weri-Rb1-Zellen .....	72
4.2.3	Autophagie-Induktion in Weri-Rb1-Zellen .....	74
4.2.4	Intrazelluläre Signalwegsinduktion in Weri-Rb1 .....	75
4.3	Effekt von Vitronectin und seiner Varianten auf das Phagocytoseverhalten von hiPSC-RPE-Zellen.....	79
4.3.1	Charakterisierung der hiPSC-RPE-Zellen.....	79
4.3.2	Phagocytose von Photorezeptor-Außensegmenten.....	82
4.3.3	Effekt auf die intrazellulären Signalwege der hiPSC-RPE während der Phagocytose .....	85
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>89</b>
5.1	Adhäsion neuronaler Zellen unter Vitronectin-Einfluss.....	90
5.2	Zellhomöostase unter Einfluss von oxidativem Stress und Vitronectin.....	92
5.2.1	Apoptose-Induktion .....	93
5.2.2	Autophagie-Induktion .....	95
5.2.3	Intrazelluläres Signaling.....	96
5.2.4	Mögliche Bedeutung der Befunde für die AMD-Pathogenese.....	98
5.3	Prozesse in hiPSC-RPE-Zellen unter Vitronectin-Einfluss .....	100
5.3.1	Phagocytose .....	100
5.3.2	Intrazelluläre Signalwegsaktivierung.....	101
5.4	Ausblick.....	103
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>104</b>
<b>7</b>	<b>Abstract .....</b>	<b>106</b>
<b>8</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>108</b>
<b>9</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>112</b>
<b>10</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>114</b>

## Inhaltsverzeichnis

<b>11 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>116</b>
<b>12 Selbstständigkeitserklärung .....</b>	<b>137</b>
<b>13 Danksagung.....</b>	
<b>14 Lebenslauf.....</b>	

### 1 Einleitung

#### 1.1 Altersbedingte Makuladegeneration

Die altersbedingte Makuladegeneration (AMD) ist eine chronisch progrediente Erkrankung der Netzhaut und des darunterliegenden retinalen Pigmentepithels (RPE). Namensgebend ist das häufig isoliert betroffene zentrale Areal der humanen Netzhaut, die Makula (lat. macula lutea), der Bereich des schärfsten Sehens des menschlichen Auges (Mitchell *et al.*, 2018). Trotz des hohen Leidensdrucks und der Einschränkungen der Betroffenen und des immensen sowohl materiellen als auch immateriellen Aufwands für die Gesundheitssysteme gibt es bis heute nur begrenzte Möglichkeiten zur therapeutischen Behandlung der AMD (Al-Zamil und Yassin, 2017; Hernández-Zimbrón *et al.*, 2018; Rastoin, Pagès und Dufies, 2020).

##### 1.1.1 Epidemiologie

Weltweit sind etwa 8,7 % aller Menschen im Alter von 45-85 Jahren an der AMD erkrankt, aufgrund des globalen Bevölkerungszuwachses und der steigenden Lebenserwartung wird mit einer Zunahme von 196 Millionen Erkrankten im Jahre 2020 auf 288 Millionen in 2040 gerechnet (Wong *et al.*, 2014). In Industrienationen ist die AMD die häufigste Erblindungsursache bei über 65-Jährigen (Grehn, 2019: 335). Am häufigsten von der Erkrankung betroffen sind Menschen europäischer Herkunft bei einer Prävalenz für alle Formen der AMD von etwa 12,3 %, während sie mit 7,5 % in der afrikanisch-stämmigen Bevölkerung, sowie mit 7,4 % bei Menschen asiatischen Ursprungs deutlich niedriger liegt (Wong *et al.*, 2014). Es lässt sich jedoch tendenziell beobachten, dass Regionen mit älterer Bevölkerung auch stärker von der AMD betroffen sind (Kawasaki *et al.*, 2010; Jonas *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2020). So lassen sich beispielsweise in verschiedenen Studien zum Auftreten der frühen AMD in Europa Prävalenzen von bis zu 24 % bei über 65-Jährigen ermitteln (Brandl *et al.*, 2016). Diese demografischen Betrachtungen sind jedoch durch aktuelle Veränderungen in der Bevölkerungsstruktur, wie beispielsweise durch Migration in verschiedenen Teilen der Welt nur von eingeschränkter Aussagekraft (Jonas *et al.*, 2014; Jonas, Cheung und Panda-Jonas, 2017).

Unterschiede in der Erkrankungswahrscheinlichkeit hinsichtlich des biologischen Geschlechts bzw. der Prävalenz männlicher und weiblicher Erkrankter werden von

## Einleitung

einigen Autoren negiert (Colijn *et al.*, 2017; Popp *et al.*, 2017), während in anderen Studien Frauen bei gleichem Risikoprofil häufiger an der Frühform der AMD erkranken als Männer (Sasaki *et al.*, 2018). Insgesamt lässt sich beobachten, dass Frauen häufiger als Männer betroffen sind, was an ihrer tendenziell höheren Lebenserwartung und damit auch höherer Wahrscheinlichkeit, eine altersbedingte Erkrankung zu entwickeln, liegen könnte (Thomas, Mirza und Gill, 2021; Zou *et al.*, 2021). Andererseits werden aber auch pathomechanische Unterschiede zwischen den Geschlechtern diskutiert (Pennington und DeAngelis, 2016).

Zusammenfassend konnte in Untersuchungen zur altersstandardisierten Prävalenz der Erblindung durch eine AMD-Erkrankung zwischen 1990 und 2020 ein Rückgang um 30 % festgestellt werden, welcher vor allem auf die medikamentöse Therapie mit Inhibitoren vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktoren (vascular endothelial growth factor, VEGF) zurückgeführt wird (Bourne *et al.*, 2021, siehe auch Punkt 1.1.4).

### 1.1.2 Risikofaktoren

#### 1.1.2.1 Physiologischer Alterungsprozess

Als einer der Hauptrisikofaktoren für die AMD gilt das Alter (Chakravarthy *et al.*, 2010). Durch den physiologischen Alterungsprozess kommt es im menschlichen Körper zu Veränderungen hinsichtlich der zellulären Funktionen und deren Zusammenspiel im Organismus (Hou *et al.*, 2019). Einige dieser Veränderungen werden als Risikofaktoren zur Entstehung einer AMD gezählt, wie beispielsweise Ablagerungen hyalinen Materials (sog. Drusen) und Lipofusins, die Anreicherungen von Lipiden und Funktionseinschränkung an der Bruch'schen Membran, die erhöhte Exposition gegenüber oxidativem Stress, sowie mitochondriale Schädigung und die Degeneration retinaler Strukturen mit dem Untergang von Zellen (Chakravarthy *et al.*, 2010; Ardeljan und Chan, 2013; Sobrin und Seddon, 2014).

#### 1.1.2.2 Genetik

Der Einfluss genetischer Faktoren auf die Entstehung der AMD wird auf 46 - 71 % geschätzt (Seddon *et al.*, 2005), wobei jedoch deren Einfluss auf chronisch, progrediente Erkrankungen, wie der AMD, mit zunehmendem Alter der Patienten sinken (Farkas und DeAngelis, 2021). Zur Untersuchung des Einflusses genetischer

## Einleitung

Faktoren auf eine Erkrankung können genomweite Assoziationsstudien (GWAS) durchgeführt werden, bei denen i.d.R. die häufigen Genotypen von Erkrankten und Gesunden hinsichtlich ihrer DNA-Varianten auf statistisch signifikante Unterschiede vergleichend untersucht werden (Pearson und Manolio, 2008). Die aktuellste und umfangreichste GWAS zur AMD stammt von Fritsche und Kollegen aus dem Jahr 2016 und konnte bei einer Gesamtzahl von mehr als 43.000 Probanden für 52 unabhängige Varianten auf 34 Genloci eine statistisch hochsignifikante Assoziation mit der AMD belegen (Fritsche *et al.*, 2016). Besonders starke Effekte wiesen dabei Sequenzvarianten im *ARMS2/HTRA1*- (age-related maculopathy susceptibility 2/high temperature requirement A serine peptidase 1) Genlocus, sowie im Genlocus für den Komplementfaktor H (complement factor H, CFH) auf, welche bereits zuvor als starke genetische Risikofaktoren für die AMD beschrieben wurden (Jakobsdottir *et al.*, 2005; Rivera *et al.*, 2005; Xing *et al.*, 2008; Fritsche *et al.*, 2016). Zu insgesamt 18 Varianten, deren Zusammenhang mit der AMD bereits vorher diskutiert wurde, beispielsweise im *CFI*-Gen, welches für den Komplementfaktor I (complement factor I, CFI) kodiert (Fagerness *et al.*, 2009; Van De Ven *et al.*, 2013) oder im *VEGFA*-Gen (Lin *et al.*, 2008; Janik-Papis *et al.*, 2009), kamen noch einmal 16 vorher unbekannte Varianten hinzu, beispielsweise in den *ABCA1* (ATP-binding cassette subfamily A member 1)- oder *MMP9* (Matrixmetalloproteinase 9)-Genen (Fritsche *et al.*, 2016). Die reine Assoziation dieser Sequenzvarianten sagt jedoch nichts über Einfluss und Tragweite der jeweiligen Varianten bei der Entstehung oder der Progression der AMD aus.

In vergleichenden Experimenten mit von AMD betroffenen Zwillingen konnten außerdem Unterschiede in der Methylierung entsprechender Risikogene gezeigt werden, die sich auf den Phänotyp und die Schwere der Erkrankung auswirkten (Hutchinson *et al.*, 2014). So konnten neben den bereits durch GWAS mit der AMD assoziierten Genvarianten auch neue Loci entdeckt werden, deren epigenetische Modifikation mit der AMD in Zusammenhang stehen könnten (Porter *et al.*, 2019). In Zukunft könnten diese Erkenntnisse nicht nur zu therapeutischen Weiterentwicklungen führen, sondern auch die Diagnostik der AMD unter Verwendung der DNA-Methylierung als Biomarker erweitern (Gemenetzi und Lotery, 2020; Farkas und DeAngelis, 2021)

### **1.1.2.3 Ethnizität**

Ein weiterer Risikofaktor der AMD ist die Ethnizität. Frühzeichen der AMD, wie die Bildung von Drusen, sind in Bevölkerungsgruppen kaukasischer Ethnie genauso häufig zu finden, wie in der nicht-kaukasischen Bevölkerung (Chakravarthy *et al.*, 2010; Salimiaghdam *et al.*, 2019). Jedoch ist das Risiko zur Entwicklung fortgeschrittener AMD-Formen für die hellhäutigere Bevölkerung höher, was an einem geringeren Melaningehalt der RPE-Zellen liegen könnte, welches sich protektiv gegen freie Radikale auswirken kann (Lambert *et al.*, 2016; Salimiaghdam *et al.*, 2019). Auch die Pigmentierung der Iris und damit die Augenfarbe könnte einen Einfluss auf die Entstehung der AMD haben (so verdoppelt sich das Risiko bei hellerer Färbung der Iris), wobei ebenfalls die Schutzwirkung des Melanins vor Radikalen und UV-Licht als Ursache diskutiert wird (Chakravarthy *et al.*, 2010; Lambert *et al.*, 2016).

### **1.1.2.4 Umweltfaktoren**

Vor allem das Rauchen und die dadurch entstehende Exposition vulnerabler Gewebe gegenüber Schadstoffen tragen als exogene Faktoren wesentlich zu einem erhöhten Risiko für die AMD-Entstehung bei (Hernández-Zimbrón *et al.*, 2018; Heesterbeek *et al.*, 2020). Gleichzeitig verdoppelt sich bei Rauchern auch das Risiko der Progression der Erkrankung von frühen Formen zur Spätform (AREDS Research Group, 2000; Swaroop *et al.*, 2009; Chakravarthy *et al.*, 2010; Velilla *et al.*, 2013). Dabei könnte sowohl der degenerative Einfluss der freigesetzten Substanzen auf die choroidale Blutversorgung und damit hypoxische, ischämische und infarzierende Prozesse eine Rolle spielen, als auch die Schädigung der Gewebe durch vermehrten oxidativen Stress und die Reduktion antioxidativ wirkender Schutzsubstanzen (Ding, Patel und Chan, 2009; Velilla *et al.*, 2013; Hernández-Zimbrón *et al.*, 2018). Auch epigenetische Veränderungen werden als Ursache für die negativen Auswirkungen des Rauchens auf die AMD-Entstehung diskutiert (Farkas und DeAngelis, 2021).

Ein weiterer exogener Risikofaktor ist verstärkte UV- und Sonnenlichtexposition der Augen, welche zu direkter Schädigung über phototoxische Effekte und Bildung von Radikalen führt (Delcourt *et al.*, 2014; Hernández-Zimbrón *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2018). So könnten beispielsweise auch Katarakt-Operationen, bei denen die physiologisch gealterte, hyperrefraktäre Linse durch ein Kunststoffimplantat ersetzt

## Einleitung

wird, einen Risikofaktor für die Entstehung der AMD darstellen, da durch die Entfernung der natürlichen Linse und ihrer Filterfunktion eine wichtige UV-Barriere verschwindet (Hernández-Zimbrón *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2018; Gan *et al.*, 2020). Es wird diskutiert, ob dieser Effekt durch Implantation einer Intraocularlinse mit Blau-Licht-Filter begrenzt werden könnte (Downie, Busija und Keller, 2018; Hammond, Sreenivasan und Suryakumar, 2019).

Weiter werden auch ein erhöhter Body-Mass-Index (BMI) und erhöhtes Körpergewicht zu den Risikofaktoren gezählt (Chakravarthy *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2016; Salimiaghdam *et al.*, 2019). Durch vermehrte oxidative Schädigung, Förderung inflammatorischer Prozesse und die Veränderung der Zusammensetzung von Lipiden und Lipoproteinen im Blut kommt es zu Gewebsveränderungen, die schließlich das Risiko für die Entstehung einer AMD erhöhen (Jarrett und Boulton, 2012; Zhang *et al.*, 2016). Auch ein Zusammenhang zwischen der AMD und anderen Erkrankungen wird diskutiert, beispielweise kardiovaskulären Erkrankungen, Hypercholesterinämie und Hypertonie (Lim *et al.*, 2012; Pennington and DeAngelis, 2016; Salimiaghdam *et al.*, 2019).

### **1.1.3 Krankheitsbild und molekulare Pathogenese**

#### **1.1.3.1 Symptombild und Krankheitsverlauf**

Patienten, welche eine AMD entwickeln, haben zu Beginn der Erkrankung oft wenige oder keine Symptome, der Beginn ist schleichend, jedoch progredient (Ambati und Fowler, 2012; Van Lookeren Campagne *et al.*, 2014; Michalska-Matecka *et al.*, 2015). Erste Einschränkungen bei der Frühform der AMD zeigen sich häufig beim Lesen durch eine verminderte Sehschärfe (Visus) und Kontrastwahrnehmung, besonders unter schlechten Lichtverhältnissen (Chung, 2020; Thomas, Mirza und Gill, 2021). Manche Patienten bemerken diese Verschlechterung des Sehens zunächst nicht, besonders Patienten in schlechtem Allgemeinzustand klagen aber beispielsweise über vermehrtes Stolpern, Stürze und Verletzungen (Wood *et al.*, 2011; Van Landingham *et al.*, 2014).

Morphologisches Korrelat dieser frühen Stadien ist das Auftreten spezifischer harter oder weicher Drusen in der Untersuchung des Augenhintergrundes (Funduskopie) (Ardeljan und Chan, 2013; García-Layana *et al.*, 2017). Unter klassischen Drusen

## Einleitung

versteht man Ablagerungen hyalinen Materials zwischen der Basallamina des RPE und der inneren Kollagenschicht der Bruch'schen Membran, also der Grenz-Basallamina zwischen RPE-Zellen und Aderhaut (Hageman und Mullins, 1999). Jedoch können drusenoid Ablagerungen auch im subretinalen Raum gefunden werden (Rudolf *et al.*, 2008; Spaide, Ooto und Curcio, 2018). Bestandteile von Drusen können unter anderem Komponenten des Komplementsystems, inflammatorische Proteine, sowie oxidativ modifizierte Lipide und Lipoproteine sein (Crabb *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2010; Boon *et al.*, 2013). Harte Drusen entsprechen dabei kleinen, begrenzten und einzeln lokalisierten gelblichen Ablagerungen mit einem Durchmesser  $<63 \mu\text{m}$ , welche mit einem höheren AMD-Risiko assoziiert sind (Ding, Patel und Chan, 2009; Michalska-Matecka *et al.*, 2015). Weiche Drusen dagegen gelten als Risikofaktor für die Entwicklung der AMD-Spätformen, sie sind heller, größer, unscharf begrenzt und häufig konfluent (Ding, Patel und Chan, 2009; Michalska-Matecka *et al.*, 2015; Somasundaran *et al.*, 2020). Schreitet die Erkrankung fort, können Skotome im zentralen Gesichtsfeld auftreten, zusätzlich zu räumlichen Verzerrungen (sog. Metamorphopsien) (Keane *et al.*, 2015; Al-Zamil und Yassin, 2017; Stahl, 2020). Beim Übergang zu den Spätformen der AMD zeigen sich im Augenfundus zusätzlich Veränderungen der Pigmentierung (hypo- oder hyperpigmentiertes RPE, **Abbildung 1**) und Verdickungen der Bruch'schen Membran (Ding, Patel und Chan, 2009; Lim *et al.*, 2012; García-Layana *et al.*, 2017).

Zu den Spätformen der AMD zählen die „trockene“ geografische Atrophie (GA) und als Unterformen der „feuchten“ AMD die choroidale Neovaskularisation (CNV) und die retinale Neovaskularisation (retinal angiomatous proliferation, RAP) (Lim *et al.*, 2012; Michalska-Matecka *et al.*, 2015; Tsai *et al.*, 2017).



**Abbildung 1: Funduskopie-Aufnahmen unterschiedlicher AMD-Formen.**

Gezeigt sind funduskopische Aufnahmen des Augenhintergrundes: (A) einer gesunden Person mit physiologischer Makula im zentralen Bereich und retinalen Gefäßen; (B) einer an AMD-erkrankten Person mit GA. Es sind große, hypopigmentierte Areale und eine fast depigmentierte Makula zentral zu erkennen; und (C) einer AMD-erkrankten Person mit CNV. Zu erkennen sind pathologische Gefäßneubildungen und Einblutungen als dunkle, rote Flecken (nach Ambati und Fowler, 2012).

Bei der häufigeren GA kommt es zu einer fortschreitenden, flächigen Atrophie des zentralen RPE und zum Absterben von Photorezeptoren (Ding, Patel und Chan, 2009; Van Lookeren Campagne *et al.*, 2014; García-Layana *et al.*, 2017). Durch den Verlust der Sehschärfe verschlechtert sich das Sehvermögen über viele Jahre hinweg kontinuierlich (Lim *et al.*, 2012; Michalska-Malecka *et al.*, 2015).

Bei der neovaskulären Form der AMD kommt es zum Wachstum unreifer, pathologischer Blutgefäße aus retinalen oder choroidalen Gefäßen des Auges (Van Lookeren Campagne *et al.*, 2014; Campochiaro, 2015; Michalska-Malecka *et al.*, 2015). Dabei kann es besonders bei der RAP zum Austritt freier Flüssigkeit oder zu Blutungen kommen (Tsai *et al.*, 2017). Im Falle der CNV kann dies zu einer Anhebung des RPE und darüberliegender Anteile der Netzhaut führen (Ding, Patel und Chan, 2009; Lim *et al.*, 2012; Van Lookeren Campagne *et al.*, 2014). Die Verschlechterung des Visus tritt hierbei meist sehr plötzlich ein und die Progression hin zum vollständigen Verlust verläuft schneller als bei der GA (Ambati und Fowler, 2012; Van Lookeren Campagne *et al.*, 2014).

Der Leidensdruck der Patienten ist hoch, denn die Erkrankung und ihre Symptomatik bergen große Einschränkungen in Aktivitäten des täglichen Lebens (Gopinath *et al.*, 2014; Taylor *et al.*, 2016), begleitende Erkrankungen wie Depressionen können sich entwickeln (Casten und Rovner, 2013; Dawson *et al.*, 2014). Unbehandelt führen beide

## Einleitung

Spätformen zu einem großflächigen Verlust des Sehvermögens (Lim *et al.*, 2012; Jonas *et al.*, 2014; Bourne *et al.*, 2021).

### 1.1.3.2 Molekulare Pathogenese

Während man lange von einer vorwiegend sub-RPE gelegenen Genese der AMD ausging, wurden speziell in den letzten Jahren auch pathologische Veränderungen im subretinalen Bereich mit der AMD-Pathogenese in Verbindung gebracht.

Eine wichtige Rolle bei der AMD-Entstehung spielen reaktive Sauerstoffderivate (reactive oxygen species, ROS), welche durch die Reduktion molekularen Sauerstoffs in der mitochondrialen Atmungskette, bei enzymatischen Reaktionen und durch die Wirkung von UV-Licht und ionisierender Strahlung entstehen (Kauppinen *et al.*, 2016; Nita und Grzybowski, 2016; Domènech und Marfany, 2020). Intrazellulär führt oxidativer Stress zu DNA-Schäden in Zellkern und Mitochondrien, zur Expression pro-inflammatorischer Cytokine, zu einer Abnahme Autophagie-assoziiierter Mechanismen und der Induktion apoptotischer Signalwege an der subretinalen Schnittstelle zwischen Photorezeptoren und RPE-Zellen, was zu chronischer Entzündung und erhöhter Expression von Wachstumsfaktoren wie VEGF führen kann (Datta *et al.*, 2017; Hernández-Zimbrón *et al.*, 2018). Proteine und Lipide werden durch ROS in ihrer chemischen Struktur modifiziert und deren Abbau über Proteasomen und Lysosomen behindert, wodurch es zur Bildung hyaliner Ablagerungen kommen kann (Höhn, König und Grune, 2013). Ablagerungen, die sich unter dem RPE ansammeln, werden als Drusen bezeichnet und finden sich klassischerweise in den Augen AMD-Erkrankter, können aber auch eine unspezifische Veränderung des Alterns darstellen (Kinnunen *et al.*, 2012; Michalska-Malecka *et al.*, 2015). Subretinal gelegene Ablagerungen werden - in Abgrenzung zu klassischen Drusen - als Pseudodrusen oder drusenoide Ablagerungen bezeichnet, sie zeigen eine ähnliche Protein-, jedoch eine andere Lipidzusammensetzung und sind mit einem höheren individuellen Risiko für eine AMD-Entwicklung assoziiert (Spaide, Ooto und Curcio, 2018; Wightman und Guymer, 2019).

Ein weiteres wichtiges Merkmal der AMD-Pathogenese ist die eingeschränkte Funktion von RPE-Zellen und Photorezeptoren (Somasundaran *et al.*, 2020; Thomas, Mirza und Gill, 2021; Shughoury, Sevgi und Ciulla, 2022). Eine der wesentlichen Aufgaben der RPE-Zelle ist die Phagozytose abgestoßener Photorezeptor-

## Einleitung

Außensegmente aus dem subretinalen Raum (Kwon und Freeman, 2020; Lakkaraju *et al.*, 2020). Das RPE und die Photorezeptoren stehen durch ihre vergleichsweise hohe Stoffwechsellistung, eine hohe Versorgungsdichte mit Sauerstoff und erhöhter Exposition gegenüber UV-Licht besonders unter dem Einfluss von oxidativem Stress (Yu-Wai-Man, Griffiths und Chinnery, 2011; Farrar *et al.*, 2013; Lambert *et al.*, 2016; Kaarniranta *et al.*, 2019). Durch Störung der Phagozytose-Prozesse kann es bei der Oxidation und anschließender Aufnahme von Photorezeptor-Außensegmenten durch RPE-Zellen zur Akkumulation kataboler Stoffwechselprodukte kommen, welche sich sowohl extra- als auch intrazellulär ablagern und AMD-typische Entzündungsreaktionen induzieren (Curcio *et al.*, 2011; Ferrington, Sinha und Kaarniranta, 2016; Kauppinen *et al.*, 2016). Mit steigendem Alter nehmen Zahl und Größe der Ablagerungen zu, die Schädigung intensiviert sich und durch den schnellen Anstieg der oxidativen Last wird die antioxidative Kapazität der Netzhaut ab einem bestimmten Zeitpunkt überschritten (Hernández-Zimbrón *et al.*, 2018). Dem Verlust der RPE-Zellen und Photorezeptoren folgt im weiteren Verlauf der Verlust weiterer neuronaler Bestandteile der Netzhaut (Barresi *et al.*, 2023)

Auch die Fehlregulation von Signalwegen, beispielweise der Mitogen-aktivierte-Proteinkinase (mitogen activated protein kinase, MAPK)-Signalweg, trägt zur AMD-Pathogenese bei (Kyosseva, 2016; Zhang *et al.*, 2020). Mitglieder der MAP-Kinasen sind an der Regulation entzündlicher Prozesse (Guo *et al.*, 2014; Tao *et al.*, 2016), als auch an der Angiogenese über VEGF beteiligt, welche als zentraler Mechanismus in der Entwicklung der CNV gilt (Liu *et al.*, 2010; Stefánsson, Geirsdóttir und Sigurdsson, 2011; Xie *et al.*, 2011). Besonders die Aktivität von VEGF-A über den VEGF-R2-Rezeptor spielt in der Entstehung der neovaskulären AMD eine entscheidende Rolle (Hernández-Zimbrón *et al.*, 2018; Finger *et al.*, 2020). MAP-Kinasen sind auch in Mechanismen der Zellhomöostase beteiligt, wie der Apoptose und der Autophagie (Zhou *et al.*, 2015; Yue und López, 2020). Fehlerhaft gesteuerte Autophagie- oder Apoptosemechanismen der RPE-Zellen und Photorezeptoren können zum Zelltod, zur Zellablösung und Atrophie der Netzhaut in der AMD führen (Cagnol und Chambard, 2010; Ryter, Cloonan und Choi, 2013; Z.-Y. Zhang *et al.*, 2020).

Weiter konnten verschiedene Komplementfaktoren unter anderem als Bestandteil AMD-spezifischer Drusen ausgemacht werden (Crabb *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2010; Frederick und Kleinman, 2014) und die durch GWAS detektierten AMD-assoziierten

## Einleitung

Polymorphismen befinden sich ebenfalls häufig in Genen für Faktoren des Komplementsystems (Fritsche *et al.*, 2016; Geerlings, de Jong und den Hollander, 2017). Durch die Aktivierung von Inflammasom-Komplexen am Ende der Komplementkaskade werden Cytokine gebildet, welche zusammen mit einer genetischen Prädisposition zur Dysregulation des Komplementsystems (beispielsweise durch Modifikationen in den Genen von Komplementfaktoren) verstärkende Effekte auf die Krankheitsentwicklung haben könnten (Ding, Patel und Chan, 2009; Ambati, Atkinson und Gelfand, 2013; Shughoury, Sevgi und Ciulla, 2022).

Letztlich wird auch die Struktur der extrazellulären Matrix (EZM) mit der AMD-Pathogenese in Verbindung gebracht. Verschiedene Mutationen in EZM-Bestandteilen können zu Erkrankungen speziell der Makula und zur Aktivierung des Komplementsystems, sowie zur Steigerung der VEGF-Sekretion führen (Johnson und Anderson, 2004; Nilsson und Nilsson Ekdahl, 2012; Fernandez-Godino, Bujakowska und Pierce, 2018). Beispielsweise kann die Degradation der EZM durch die Matrixmetalloproteinasen (MMP) MMP2 und MMP9 über Induktion der Angiogenese durch ein Ungleichgewicht anti- und proangiogener Faktoren an der Pathogenese der CNV beteiligt sein (Hernández-Zimbrón *et al.*, 2018).

### 1.1.4 Aktuelle Therapie der AMD

Die Basis zur Behandlung und Vorbeugung der AMD bildet der Verzicht auf bekannte und vermeidbare Risikofaktoren, wie das Rauchen und die Exposition gegenüber UV-Licht (Al-Zamil und Yassin, 2017; Stahl, 2020). Weiter wird auch die Einnahme bestimmter Nahrungsergänzungsmittel, wie beispielsweise Omega-3-Fettsäuren, Carotinoide und Vitamine, sowie Antioxidantien diskutiert (Moschos *et al.*, 2018). Eine spezielle Mischung aus den Vitaminen C und E, Zink,  $\beta$ -Carotin, Lutein und Zeaxanthin wurde von der AREDS-Forschungsgruppe als Mittel zur Verzögerung des Fortschreitens der frühen AMD zu späteren Formen empfohlen (AREDS Research Group, 2000; Kassoff *et al.*, 2001), welche später durch weitere Vitamine und Minerale ergänzt wurde (Evans und Lawrenson, 2017).

Während für die Behandlung der GA derzeit keine weitere standardisierte Methode existiert, sind für die Behandlung der Neovaskularisationen verschiedene zugelassene medikamentöse Optionen in Verwendung. Ranibizumab ist ein humanisiertes,

## Einleitung

monoklonales Immunglobulin G 1 (IgG 1) kappa-Isotyp Antigen-bindendes Fragment ( $F_{ab}$ ), das VEGF-A mit hoher Affinität bindet (Hernández-Zimbrón *et al.*, 2018) und in 95 % der behandelten Patienten mit neovaskulärer AMD zu einer Stabilisierung und Verbesserung der Sehschärfe führt (Velez-Montoya *et al.*, 2013). Bei Aflibercept handelt es sich um ein Fusionsprotein, das zwei Bindungsdomänen der humanen VEGF-Rezeptoren R1 und R2 mit einem  $F_c$ -Fragment von humanem IgG 1 verbindet (Sarwar *et al.*, 2016). Das Protein zeigt eine höhere Bindungsaffinität zu VEGF-A als der natürliche Rezeptor, bindet jedoch gleichzeitig auch an VEGF-B und plazentaren Wachstumsfaktor 1 (placental growth factor 1, PGF1) und blockiert damit die Wirkung dieser angiogenen Wachstumsfaktoren (Velez-Montoya *et al.*, 2013; Ashraf und Souka, 2017). Bevacizumab ist ein kompletter humaner Antikörper, der alle VEGF-Isoformen binden und ihre Wirkung damit blockieren kann (Sarwar *et al.*, 2016). Die Vorteile dieses okulär als „off-label“ genutzten Chemotherapeutikums liegen dabei vor allem in geringeren Nebenwirkungen als sein für die Behandlung der AMD zugelassenes Pendant Ranibizumab und geringeren Kosten bei gleichem Erfolg (Sarwar *et al.*, 2016; Hernández-Zimbrón *et al.*, 2018; Bro *et al.*, 2020). Zuletzt wurde Brolucizumab für die klinische Anwendung an Patienten mit neovaskulärer AMD zugelassen (Bulirsch *et al.*, 2022). Brolucizumab ist ein humanisiertes einzelkettiges Antikörperfragment (scFv), welches alle VEGF-A-Isoformen bindet und mit dem bisher deutlich länger anhaltende Effekte erzielt werden konnten als mit vergleichbaren intravitreal applizierten anti-VEGF-Medikamenten (Tadayoni *et al.*, 2021).

Die anti-angiogene Therapie behandelt so die Konsequenzen langanhaltender zellulärer Schädigung, wirkt jedoch weder präventiv noch prophylaktisch der Entwicklung der AMD entgegen, sodass sich Entwicklung und Lauf der Erkrankung zwar nicht aufhalten lassen, aber die zeitlichen Auswirkungen begrenzt und die Progression verzögert werden kann (Hernández-Zimbrón *et al.*, 2018). Verschiedenste weitere Therapieformen befinden sich in Entwicklung (Richer *et al.*, 2014; Jaffe *et al.*, 2021; Deng *et al.*, 2022; Lin *et al.*, 2022).

### **1.2 Möglicher Einfluss des Vitronectins auf die AMD-Pathogenese**

Um die genetisch beeinflussten Pathomechanismen aufzudecken und diese Erkenntnisse zur Entwicklung neuartiger Therapieformen nutzen zu können, wurden

## Einleitung

am Institut für Humangenetik funktionelle Analysen an AMD-assoziierten Genen durchgeführt. Aus dem Datensatz von Fritsche und Kollegen zu AMD-assoziierten Polymorphismen (Fritsche *et al.*, 2016) wurden hierfür Gene ausgewählt, welche direkt mit der AMD, AMD-assoziierten Prozessen oder der retinalen Entwicklung in Zusammenhang stehen. Die zu untersuchenden Gene und ihre Genprodukte sollten zudem an der zellulären Regulation durch MAP-Kinasen beteiligt sein und die entsprechenden Polymorphismen in exonischen Regionen der Gene liegen, was einen potenziell größeren Einfluss auf die Funktionen des Gens oder Proteins vermuten ließe.

Eines dieser ausgewählten Gene ist das Vitronectin (*VTN*)-Gen auf Chromosom 17. Es erstreckt sich genomisch auf eine Region von etwa 5 kb, welche acht Exons und sieben Introns beinhaltet (Preissner *et al.*, 1997; Schwartz, Seger und Shaltiel, 1999). In Exon 7 befindet sich der Einzelnukleotidpolymorphismus (single-nucleotide-polymorphism, SNP) rs704. Dieser steht in hohem Kopplungsungleichgewicht (linkage disequilibrium, LD) mit dem führenden SNP (lead-variant) rs11080055 ( $D' = 0,97$ ;  $r^2 = 0,784$ ; berechnet nach Machiela und Chanock, 2015), welcher im Intron 1 des *TMEM97*-Gens lokalisiert ist (Fritsche *et al.*, 2016). Zusammen mit 22 anderen SNPs in hohem LD können so 95 % der AMD-Assoziation des *TMEM97/VTN*-Genlocus erklärt werden. Zudem konnte in neueren Untersuchungen gezeigt werden, dass die Assoziation des SNP rs704 zu den neovaskulären Spätformen der AMD besteht, nicht jedoch zu Frühstadien oder GA- bzw. GA-CNV-Mischformen (Biasella *et al.*, 2022).

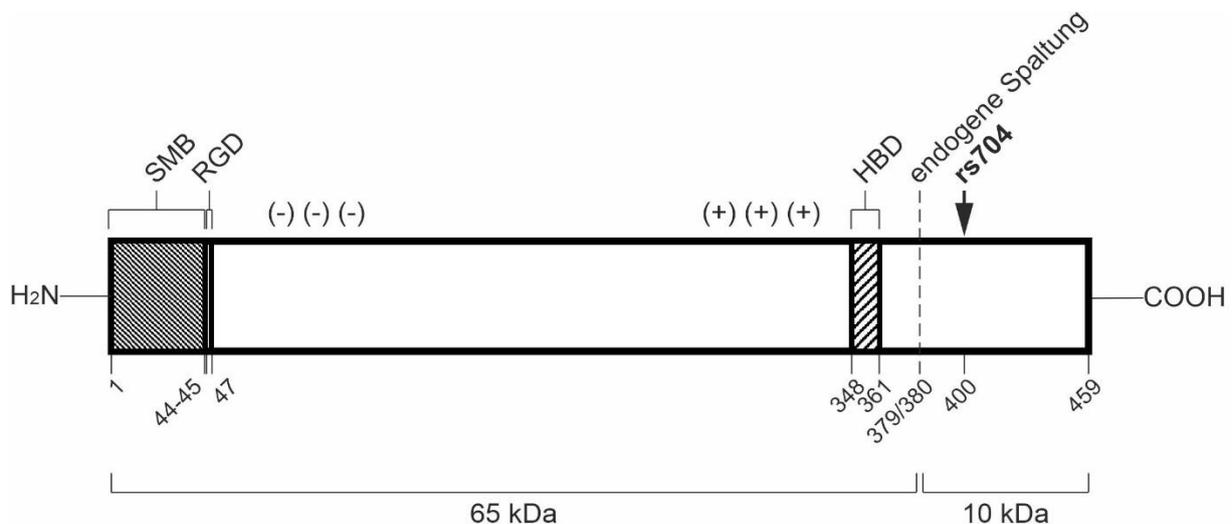
Der SNP rs704 ist dabei die einzige exonische Variante, die durch einen Basenaustausch von Cytosin (C) zu Thymin (T) an Position 1199 innerhalb dieses Locus zu einer Missense-Mutation führt. Dadurch kommt es in der Aminosäuresequenz des Proteins an Position 400 zu einem Austausch von Threonin zu Methionin.

### 1.2.1 Aufbau des Vitronectins

Das Vitronectin wurde erstmals 1967 beschrieben und nach seiner Fähigkeit benannt, an gläsernen Oberflächen zelluläre Haftung zu vermitteln (Holmes, 1967). Die *VTN*-mRNA kann in den meisten Geweben des menschlichen Körpers detektiert werden, besonders nach Stress oder Traumen (Leavesley *et al.*, 2013). Vitronectin wird in hohen Konzentrationen von 200-400 µg/ml im Blutplasma gefunden (Felding-

## Einleitung

Habermann und Cheresch, 1993; Leavesley *et al.*, 2013). Die Synthese erfolgt vorrangig in der Leber als 75 kDa monomerisches Vorläuferprotein aus 459 Aminosäuren (AS) (siehe **Abbildung 2**), das nach der Synthese sekretiert wird (Preissner und Reuning, 2011; Leavesley *et al.*, 2013). Im hinteren Augenabschnitt kann *VTN*-mRNA vor allem in Geweben der neuralen Netzhaut (in Photorezeptoren und Ganglienzellen) als auch in RPE-Zellen detektiert werden (Anderson *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2014). Im Blutplasma liegt Vitronectin meist in seiner monomerischen, inaktiven Form vor. Der Kontakt mit Liganden, Rezeptoren oder verschiedenen Oberflächen induziert eine Konformationsänderung und es folgt die Polymerisierung zu großen Komplexen. Dadurch nimmt die Aktivität des Proteins stark zu, vermutlich, weil auf diese Weise im Zentrum des Proteins verdeckte Bereiche, wie die stark konservierte RGD-Sequenz (Arg-Gly-Asp) freigelegt werden und beispielsweise als Bindestelle für Integrine und andere Moleküle dienen können (Izumi, Yamada und Hayashi, 1989; Stockmann *et al.*, 1993; Preissner und Reuning, 2011).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Vitronectin-Domänen.**

Eingezeichnet sind wichtige Domänen des Proteins (Somatomedin-B-Domäne (SMB), Integrin-bindende Domäne Arg-Gly-Asp (RGD), Heparin-bindende Domäne (HBD)) samt ihrer AS-Position, anionische (-) und kationische (+) Bereiche, sowie die Stelle der endogenen Spaltung des Proteins und die Position des SNP rs704 (modifiziert nach Schwartz, Seger und Shaltiel, 1999).

Stabilisiert wird das Protein einerseits durch ionische Wechselwirkungen zwischen einer basischen, polykationischen Domäne am C-terminalen Ende und einer sauren, polyanionischen Domäne am N-terminalen Ende, andererseits auch durch multiple

## Einleitung

Disulfidbindungen an der C-terminalen Heparin-bindenden-Domäne (HBD) und der N-terminalen Somatomedin-B (SMB)-Domäne (Schvartz, Seger und Shaltiel, 1999; Leavesley *et al.*, 2013). Die Cystein-reiche SMB-Domäne, welche 44 AS umfasst, findet sich *in vivo* häufig abgespalten, wobei sie ihre biologische Aktivität jedoch beibehält (Schvartz, Seger und Shaltiel, 1999; Leavesley *et al.*, 2013). Das abgespaltene SMB-Stück homodimerisiert und kann dann beispielsweise mit dem Urokinase-Rezeptor (urokinase plasminogen activator surface receptor, uPAR) oder mit Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) binden (Schvartz, Seger und Shaltiel, 1999; Preissner und Reuning, 2011). Der Hauptteil des Vitronectins (AS 132-459) wird aus mehreren Hämopexin-Domänen gebildet, welche eine Disulfidbrücke (Cys<sup>274</sup>-Cys<sup>453</sup>) beinhalten (Schvartz, Seger und Shaltiel, 1999). Durch bisher nicht näher bekannte Proteasen kann das reife 75 kDa Vitronectin an der Position Arg<sup>379</sup>-Ala<sup>380</sup> in Polypeptide von 65 und 10 kDa gespalten werden (siehe **Abbildung 2**), welche über die oben beschriebene Disulfidbrücke (Cys<sup>274</sup>-Cys<sup>453</sup>) verbunden bleiben (Preissner und Reuning, 2011; Leavesley *et al.*, 2013).

### 1.2.2 Funktionen des Vitronectins

In physiologischen Geweben tritt Vitronectin vor allem als Bestandteil der EZM und in der Wand kleiner Blutgefäße auf (Preissner und Reuning, 2011; Leavesley *et al.*, 2013). In der Netzhaut findet sich Vitronectin in der Bruch'schen Membran und in retinalen Blutgefäßen (Anderson *et al.*, 1999; Curcio und Johnson, 2012; Chakravarty *et al.*, 2022). Vitronectin besitzt matrizelluläre Funktionen: es dient als Bindeglied zwischen EZM-Bestandteilen und nicht-EZM-Molekülen, wie Rezeptoren auf Zelloberflächen oder Cytokinen (Leavesley *et al.*, 2013). Über seine Kollagen- oder Heparin-bindenden Domänen ist es in der EZM verankert und kann Funktionen wie Zelladhäsion und -migration über die Interaktion mit Integrinen vermitteln (Schvartz, Seger und Shaltiel, 1999). Vitronectin nimmt außerdem Schlüsselfunktionen in wichtigen zell- und gewebsregulatorischen Mechanismen ein, wie der Gefäßhomöostase, Wundheilung und Gewebsregeneration sowie neuronaler Zelldifferenzierung (Preissner und Reuning, 2011; Leavesley *et al.*, 2013; Ruzha *et al.*, 2022). Wird Gewebe Stress ausgesetzt, so kann eine erhöhte Expression des Vitronectins und erhöhte Ablagerungen immunoreaktiver Proteinkomponenten im interstitiellen Raum beobachtet werden (Seiffert, 1997; Sun *et al.*, 2018; Biasella *et al.*,

## Einleitung

2020). Vitronectin reagiert dabei auf Stress oder Gewebsschädigung durch Interaktion mit Faktoren des Komplementsystems und des Gerinnungssystems und führt so zu Immunreaktionen und Entzündungen, vor allem dann, wenn Vitronectin im Komplex mit PAI-1 vorliegt (Leavesley *et al.*, 2013; Biasella *et al.*, 2023). Bei der Entstehung von Tumoren spielt Vitronectin über die Angiogenese, bei der Tumorinvasivität und in der Metastasenbildung ebenfalls eine wichtige Rolle (Leavesley *et al.*, 2013).

Vitronectin kann über unterschiedliche Integrin-Rezeptoren gebunden werden und die Akkumulation der Integrine in Cluster auf der Zelloberfläche („protein-rafts“) induzieren, welche neben Integrinen auch Bestandteile des Cytoskeletts und Signalmoleküle enthalten (Felding-Habermann und Cheresh, 1993; Leavesley *et al.*, 2013). Diese Proteinaggregationen werden auch als fokale Adhäsionskontakte bezeichnet, welche eine Verbindung zwischen Umgebung und Zellinnerem herstellen und Ausgangspunkte zellulärer Kommunikation und Signalgebung sind (Leavesley *et al.*, 2013). Durch die unmittelbare Nähe der Liganden, Rezeptoren und Signalwegskomponenten wird die Effektivität der Signalübermittlung und die zelluläre Reaktion darauf verstärkt, die Signalweiterleitung erfolgt über intrazelluläre Kinasen (Preissner und Reuning, 2011; Leavesley *et al.*, 2013).

### 1.2.3 Zusammenhang von Vitronectin mit der AMD-Pathogenese

Vitronectin wurde sowohl in AMD-assoziierten Drusen, subretinalen Ablagerungen als auch in laminaren Konkrementen der Bruch'schen Membran nachgewiesen (Hageman *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2010). Erhöhte Mengen von Vitronectin fanden sich auch im Cytoplasma von RPE-Zellen AMD-Erkrankter (Pauleikhoff, 2005; Lommatzsch *et al.*, 2007).

Durch den SNP rs704 kommt es in der Aminosäuresequenz des Vitronectins an Position 400 zu einem Austausch von Threonin zu Methionin. Dies beeinflusst die endogene Spaltung des Proteins und könnte so zu Veränderungen im biologischen Verhalten des Vitronectins führen (Tollefsen, Weigel und Kabeer, 1990). In funktionellen Analysen am Institut für Humangenetik der Universität Regensburg konnte der Effekt von rs704 auf die Spaltung des Vitronectins bestätigt werden. Zusätzlich wurde ein Einfluss von rs704 auf die Expression, Sekretion und Prozessierung, nicht jedoch die Oligomerisierung des Vitronectins festgestellt (Biasella

## Einleitung

*et al.*, 2020). Auch zeigte sich ein Einfluss von Vitronectin auf die endotheliale Adhäsion, die Gefäßformierung und die Bildung der EZM (Biasella *et al.*, 2020, 2022) sowie ein Zusammenhang zu entzündlichen Prozessen in der AMD (Biasella *et al.*, 2023).

### 1.3 Ziel der Arbeit

Durch diese Arbeit sollten Erkenntnisse zu einer möglichen Rolle des Vitronectins in der AMD-Pathogenese gewonnen werden. Im Gegensatz zu den vorher am Institut durchgeführten funktionellen Untersuchungen, welche auf sub-RPE gelegene pathologische Prozesse ausgerichtet waren, liegt der Fokus dieser Arbeit auf der Beeinflussung subretinaler Prozesse. Es wurde dabei auch auf funktionelle Unterschiede zwischen der nicht-AMD-assoziierten Variante VTN\_rs704:C und der AMD-assoziierten Variante VTN\_rs704:T eingegangen. Die humane Retinoblastom-Zelllinie Weri-Rb1 und dissoziierte retinale Zellen aus porcinen Netzhäuten sollten als Modelle genutzt werden, um die Adhäsion retinaler Zellen unter Vitronectin-Einfluss zu untersuchen. Anschließend sollte der Einfluss der Vitronectin-Varianten auf die oxidative Stressreaktion retinaler Zellen, im Speziellen auf Prozesse der Zellhomöostase, wie Zellviabilität, Apoptose und Autophagie, näher untersucht werden. Weiter sollten mithilfe von RPE-Zellen, welche aus humanen pluripotenten Stammzellen (hiPSC) differenziert wurden (sogenannte hiPSC-RPE-Zellen) der Einfluss der Vitronectin-Varianten auf die Phagozytose von porcinen Photorezeptor-Außensegmenten, sowie die Auswirkungen auf Phagozytose-assoziierte intrazelluläre Signalwege analysiert werden. Die aus dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse sollen einen Beitrag zum genaueren Verständnis der Pathomechanismen der AMD und dadurch auch zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze leisten.

## 2 Material

### 2.1 Zellen und Organismen

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

Tabelle 1: Auflistung des in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Stamms und seiner Herkunft.

Stamm	Herkunft
<i>E. coli</i> strain DH5 $\alpha$	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

#### 2.1.2 Eukaryotische Zelllinien

Tabelle 2: Auflistung aller in der Arbeit verwendeter eukaryotischer Zelllinien, ihrer Ursprungsorganismen, ihrer Ursprungszelltypen und ihrer Herkunft.

Zelllinie	Ursprungsorganismus	Ursprungszelltyp	Herkunft
Human embryonic kidney (HEK)-293-EBNA	<i>Homo sapiens</i>	embryonale Nierenzellen	ATCC; LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland
Human induced pluripotent stem-cell derived retinal pigment epithelium (hiPSC-RPE)*	<i>Homo sapiens</i>	humane, aus pluripotenten Stammzellen induzierte RPE-Zellen	Institut für Humangenetik, Universität Regensburg, Deutschland
Weri-Rb1	<i>Homo sapiens</i>	Retinoblastomzellen	ATCC; LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland

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

### 2.1.3 Gewebe

**Tabelle 3: Auflistung der in dieser Arbeit benutzten Gewebe, ihrer Ursprungsorganismen und ihrer Herkunft.**

Gewebe	Ursprungsorganismus	Herkunft
Porcine Netzhaut	<i>Sus scrofa domesticus</i>	Fleischzerlegebetrieb & Metzgerei Arnold Kurth e.K., Regensburg, Deutschland

### 2.2 Oligonukleotide

**Tabelle 4: Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Primer zur Charakterisierung der hiPSC-RPE-Zellen mittels Reverse Transkriptase (RT)-PCR.**

Primername	5'-3'-Sequenzen
hBEST1-RT-F	CCTGCTGAACGAGATGAACA
hBEST1-RT-R	GGACACCTGCAAATTCCTGT
hITGB8-RT-F	ATCCTGTGCCAGGTGCCTT
hITGB8-RT-R	TGGACGCAGCTGGATAGACAC
hOct4_RT_Z_F	CGAGCAATTTGCCAAGCTCCTGAA
hOct4_RT_Z_R	TCGGGCACTGCAGGAACAAATTC
hRLBP1-RT-F	ACAAGTATGGCCGAGTGGTC
hRLBP1-RT-R	CCACATTGTAGGTCGTGGTG
hTYR-RT-F	CCATGGATAAAGCTGCCAAT
hTYR-RT-R	GCCCAGATCTTTGGATGAAA
huRPE65-RT-F	CAATGGGTTTCTGATTGTGGA
Rpe65-R	GGGTGAGAAACAAGATGGG
RT_hSOX2-F	ACACCAATCCCATCCCACT
RT_hSOX2-r	GCAAACCTTCCTGCAAAGCTC
GusB-Ex11-12_F	GGTTGGAGAGCTCATTGGA
GusB-Ex11-12_R	CACGCAGGTGGTATCAGTCTT

### 2.3 Plasmide und Expressionskonstrukte

**Tabelle 5: Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Plasmide/Expressionskonstrukte, ihres Verwendungszwecks und ihrer Herkunft.**

Vektor	Verwendungszweck	Herkunft
pEXPR-IBA103	Expressionskontrolle	IBA life sciences, Göttingen, Deutschland
pEXPR-IBA103- VTN_rs704:C	Expression von Streptavidin (Strep-) getagtem VTN_rs704:C	Institut für Humangenetik, Universität Regensburg, Deutschland
pEXPR-IBA103- VTN_rs704:T	Expression von Strep- getagtem VTN_rs704:T	Institut für Humangenetik, Universität Regensburg, Deutschland

### 2.4 Primäre Antikörper

**Tabelle 6: Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten primären Antikörper, ihres Typs, der Spezies des Expressionssystems, ihrer Verdünnung in der jeweiligen Anwendung, ihres Verwendungszwecks und ihrer Herkunft.**

Antikörper gegen	Typ	Spezies des Expressions- systems	Verdünnung	Verwen- dungs- zweck	Herkunft
AKT (C67E7)	mAK	Kaninchen	1:1.000 in Antikörper- lösung 2	WB	Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA
ATP1A1 (55187-1- AP)	pAK	Kaninchen	1:2.000 in Antikörper- lösung 1	WB	Proteintech Group, Rosemont, IL, USA
ATP1A1 (55187-1- AP)	pAK	Kaninchen	1:100 in Antikörper- lösung 3	ICC	Proteintech Group, Rosemont, IL, USA

## Material

ATP1B1 (15192-1-AP)	pAK	Kaninchen	1:500 in Antikörper- lösung 3	ICC	Proteintech Group, Rosemont, IL, USA
BEST1 (ab2182)	mAK	Maus	1:500 in Antikörper- lösung 3	ICC	Abcam, Cambridge, UK
beta-Aktin (A5441)	mAK	Maus	1:10.000 in Antikörper- lösung 1	WB	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
FAK (#3285)	pAK	Kaninchen	1:3.000 in Antikörper- lösung 1	WB	Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA
ITGB5 (Integrin B5) (PA5-17260)	pAK	Kaninchen	1:250 in Antikörper- lösung 2	WB	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
LC3B (#4108)	pAK	Kaninchen	1:1.000 in Antikörper- lösung 2	WB	Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA
p44/42 MAPK (ERK1/2) (137F5)	mAK	Kaninchen	1:2.000 in Antikörper- lösung 2	WB	Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA
p-62 (SQSTM1)	mAK	Kaninchen	1:1.000 in Antikörper- lösung 2	WB	Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA
Phospho- AKT (S5473)	mAK	Kaninchen	1:1.000 in Antikörper- lösung 2	WB	Cell Signaling Technologies,

## Material

					Danvers, MA, USA
Phospho- FAK (#3281P)	pAK	Kaninchen	1:3.000 in Antikörper- lösung 1	WB	Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA
Phospho- p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/ Tyr204), (D.13.14.4E ) XP®	mAK	Kaninchen	1:2.000 in Antikörper- lösung 1	WB	Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA
Phospho- SRC (#6943P)	mAK	Kaninchen	1:1.000 in Antikörper- lösung 1	WB	Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA
Rhodopsin 1D4	mAK	Maus	1:10.000 in Antikörper- lösung 1	WB	Prof. Dr. Robert S. Molday, Department of Ophthalmology and Visual Sciences, University of British Columbia, Kanada
SRC (#2123S)	mAK	Kaninchen	1:1.000 in Antikörper- lösung 1	WB	Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA

## Material

Tubulin-alpha (T9026)	mAK	Maus	1:500 in Antikörper- lösung 1	WB	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
VTN (MAB2349)	mAK	Maus	1:5.000 in Antikörper- lösung 1	WB	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
ZO1 (61-7300)	pAK	Kaninchen	1:100 in Antikörper- lösung 3	ICC	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen), Waltham, MA, USA

mAK: monoklonaler Antikörper, pAK: polyklonaler Antikörper, ICC: Immunocytochemie, WB: Western-Blot, (): Herstelleridentifikationsnummer angegeben, wenn vorhanden.

## 2.5 Sekundäre Antikörper

**Tabelle 7: Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten sekundären Antikörper, der Verdünnung in der jeweiligen Anwendung, ihrer Verwendung und ihrer Herkunft.**

Antikörper	Verdünnung	Verwendung	Herkunft
Alexa Flour® anti-goat: green ( $\lambda=488$ nm)	1:800 in Antikörperlösung 4	ICC	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen), Waltham, MA, USA
Alexa Flour® anti-mouse: red ( $\lambda=594$ nm)	1:800 in Antikörperlösung 4	ICC	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen), Waltham, MA, USA
Alexa Flour® anti-rabbit: green ( $\lambda=488$ nm)	1:800 in Antikörperlösung 4	ICC	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen), Waltham, MA, USA
Ziege Anti-Kaninchen IgG, Peroxidase-Konjugat	1:10.000 in Antikörperlösung 1	WB	(Calbiochem) Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Ziege Anti-Maus IgG, Peroxidase-Konjugat	1:10.000 in Antikörperlösung 1	WB	(Calbiochem) Merck Chemicals GmbH,

## Material

			Schwalbach, Deutschland
Ziege Anti-Ziege IgG, Peroxidase- Konjugat	1:10.000 in Antikörperlösung 1	WB	(Calbiochem) Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland

ICC: Immuncytochemie, WB: Western-Blot.

## 2.6 Enzyme und weitere Proteine

**Tabelle 8: Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Enzyme bzw. kommerziell erhältlicher, rekombinanter Proteine und ihrer Herkunft.**

<b>Enzym</b>	<b>Herkunft</b>
DNase I	Quiagen, Hilden, Deutschland
GoTaq® DNA Polymerase	Promega Corporation, Madison, WI, USA
rekombinantes Vitronectin (10424-H08H)	Sino Biological Inc., Beijing, China
RevertAid Reverse Transcriptase (EP0441)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

(): Herstelleridentifikationsnummer angegeben, wenn vorhanden.

## 2.7 Molekularmassenstandards

**Tabelle 9: Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Molekularmassenstandards, ihres Verwendungszwecks und ihrer Herkunft.**

<b>Molekularmassenstandard</b>	<b>Verwendungszweck</b>	<b>Herkunft</b>
GeneRuler™ DNA Ladder Mix	Molekularmassenstandard für die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Molekularmassenstandard für die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

## Material

### 2.8 Kit-Systeme

**Tabelle 10: Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Kit-Systeme und ihrer Herkunft.**

<b>Kit-System</b>	<b>Herkunft</b>
Bio-Rad DC protein assay Kit	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
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
GoTaq® PCR Buffer	Promega Corporation, Madison, WI, USA
In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
NucleoBond® Xtra Midi	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
PureLink™ RNA Mini Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
RevertAid RT Reverse Transcription Kit inclusive Random Hexamer Primer (100 µM)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
RNase-Free DNase Set (50)	Quiagen, Hilden, Deutschland

### 2.9 Chemikalien und Reagenzien

**Tabelle 11: Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien, sowie ihrer Herkunft.**

<b>Chemikalie/Reagenz</b>	<b>Herkunft</b>
1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazan (MTT), C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> N <sub>5</sub> S	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

## Material

10x Puffer E Strep-Tactin® Elution Buffer mit Desthiobiotin	IBA GmbH, Göttingen, Deutschland
10x Puffer R Strep-Tactin® Regeneration Buffer mit HABA	IBA GmbH, Göttingen, Deutschland
10x Puffer W Strep-Tactin®/Strep- Tactin®XT Wash Buffer	IBA GmbH, Göttingen, Deutschland
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)- Stain-Lösung, C <sub>16</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub>	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Agarose (Biozym LE)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Ammoniak-Lösung (25%), NH <sub>3</sub>	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumperoxidisulfat (APS), (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ampicillin Natriumsalz, C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> N <sub>3</sub> NaO <sub>4</sub> S	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Bisbenzimid (H 33342, Hoechst), C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> Cl <sub>3</sub> N <sub>6</sub> O	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Borsäure, H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Chemikalienlager der Universität Regensburg
Bovines Serumalbumin (BSA)	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Calciumchlorid, CaCl <sub>2</sub>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Chloroquin, C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> ClN <sub>3</sub>	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail Tablets provided in EASYpack	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Coomassie Brilliant Blue R-250, (Natriumsalz), C <sub>45</sub> H <sub>44</sub> N <sub>3</sub> NaO <sub>7</sub> S <sub>2</sub>	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland
Corning® Matrigel® Growth Factor Reduced (GFR) Basement Membrane Matrix, LDEV-frei	Corning Inc., Corning, NY, USA

## Material

Dako Eindeckmedium	Agilent, Santa Clara, CA, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO), C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Dithiothreitol (DTT), C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	Genaxxon Bioscience, Ulm, Deutschland
Essigsäure (96 %), CH <sub>3</sub> COOH	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethanol (≥99,8 % p.a.), C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid-Lösung (0,07 %), C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> BrN <sub>3</sub>	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat Dinatrium Dihydrat Salz (EDTA), C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>8</sub> •2H <sub>2</sub> O	(Titriplex) Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Glycerin (87 %), C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Glycerin (99,5 %), C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	Chemikalienlager der Universität Regensburg
Glycin, C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Hefeextrakt	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
HEPES, C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	VWR Life Sciences AMRESCO®, Radnor, PA, USA
Isopropanol, C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Kaliumchlorid, KCl	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Magnesiumchlorid, MgCl <sub>2</sub>	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland

## Material

Methanol, CH <sub>3</sub> OH	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumacetat Trihydrat, CH <sub>3</sub> COONa•3H <sub>2</sub> O	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Natriumcarbonat, Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Natriumchlorid, NaCl	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (Sodium dodecyl sulfate – SDS) (≥99%), C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> NaO <sub>4</sub> S	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat, NaHCO <sub>3</sub>	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Natriumthiosulfat Pentahydrat, Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> •5H <sub>2</sub> O	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Paraformaldehyde (PFA), (CH <sub>2</sub> O) <sub>n</sub>	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Pepton	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany
Roti®-Quant 5x Konzentrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese Gel (40 %) Acrylamid/ Bisacrylamid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Saccharose (Sucrose), C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	Chemikalienlager der Universität Regensburg
Salzsäure (1 M), HCl	(Titripur) Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Salzsäure rauchend (37 %), HCl	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland

## Material

Taurin (2-Aminoethansulfonsäure, NH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> H)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tetramethylethylendiamin (TEMED), (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromid (98%), C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> BrN <sub>5</sub> S	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tri-Natrium Citrat Dihydrat, C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> •2H <sub>2</sub> O	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), NH <sub>2</sub> C(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub>	Affymetrix, Santa Clara, USA
Tris-HCl, pH 6,8	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland
Tris-HCl, pH 7,5	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland
Tris-HCl, pH 8,0	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland
Tris-HCl, pH 8,6	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland
Triton® X-100 (Octoxinol 9); C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O(C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O) <sub>n</sub> mit n = 9-10	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Tween® 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Wasserstoffperoxid (34%), H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ziegenserum	Abcam, Cambridge, UK
β-Mercaptoethanol, HSCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

## 2.10 Puffer und Lösungen

**Tabelle 12: Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen, ihrer Zusammensetzung und Menge der Bestandteile.**

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	Menge
10x Towbin, pH 8,7	Glycin	190 mM
	Tris-HCl, pH 7,5	0,25 mM
	Methanol	20 % v/v
	H <sub>2</sub> O dest.	

## Material

10x Tris-buffered-Saline (TBS), pH 7,5	Tris-HCl, pH 7,5 NaCl H <sub>2</sub> O dest.	25 mM 150 mM
20 % Sucrose-Lösung	Sucrose Taurinpuffer	20% w/v
25x cOmplete™-Puffer	1 Tablette cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail 1x PBS	2 ml
2x HEPES buffered Saline (HBS)	NaCl KCl Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> HEPES H <sub>2</sub> O dest.	280 mM 10 mM 1,5 mM 50 mM
5x Lämmli-Puffer	Bromphenolblau Tris-HCl, pH 6,8 β-Mercaptoethanol SDS Glycerin H <sub>2</sub> O dest.	0,01 % v/v 60 mM 5 % w/v 2 % w/v 10 % v/v
5x Tris-Borat-EDTA (TBE), pH 8,0	Tris-HCl, pH 8,0 Borsäure EDTA H <sub>2</sub> O dest.	0,5 M 0,5 M 10 mM
60 % Sucrose-Lösung	Sucrose Taurinpuffer	60 % w/v
Ammoniumhydroxid-Lösung (NH <sub>4</sub> OH)	NH <sub>3</sub> 1x PBS	2 % v/v
Antikörperlösung 1 (für WB)	Milchpulver 1x TBS-T	5 % w/v
Antikörperlösung 2 (für WB)	BSA 1x TBS-T	5 % w/v
Antikörperlösung 3 (für Primär-Antikörper-ICC)	Triton® X-100 Ziegenserum	20 % v/v 2 % v/v

## Material

	NaN <sub>3</sub> 1x PBS	10 % v/v
Antikörperlösung 4 (für Sekundär-Antikörper- ICC)	Triton® X-100 Ziegenserum 1x PBS	20 % v/v 2 % v/v
Blocklösung für ICC	Ziegenserum (10 %) Triton® X-100 (20 %) 1x PBS	10 % v/v 0,3 % v/v
Blocklösung für WB	Milchpulver 1x TBS-T	5 % w/v
Bromphenolblau DNA- Ladepuffer	Bromphenolblau Glycerin (87 %) H <sub>2</sub> O dest.	0,01 % w/v 40 % v/v
CaCl <sub>2</sub> -Lösung	CaCl <sub>2</sub> 1x PBS	0,1 M
Chloroquin-Phosphat-Lösung	Chloroquin-Phosphat H <sub>2</sub> O dest.	0,025 M
Coomassie-Färbelösung	Methanol Essigsäure Coomassie brilliant Blue H <sub>2</sub> O dest.	30 % v/v 10 % v/v 0,10 % w/v
Dezellularisationspuffer	Triton®X-100 NH <sub>4</sub> OH 1x PBS	0,5 % v/v 20 mM
HCl-Isopropanol-Lösung (0,1 M)	HCl (1 M) Isopropanol	10 % v/v
House Taq DNA Polymerase 10x Puffer	KCl Tris-HCl, pH 9,0 MgCl <sub>2</sub> Triton® X-100 H <sub>2</sub> O dest.	500 mM 100 mM 15 mM 1 % v/v
LB-Medium	Pepton Hefeextrakt	1 % w/v 0,5 % w/v

## Material

	NaCl H <sub>2</sub> O dest.	1 % w/v
MTT-Lösung	MTT 1x PBS	0,05 % w/v
PB, pH 7,2	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O dest.	78 mM 26 mM
PBS, pH 7,4	NaCl KCl Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O dest.	137 mM 0,27 mM 10 mM 1,8 mM
PFA-Lösung	PFA 1x PBS	4 % w/v
Poly-L-Lysin-Lösung	Poly-L-Lysin (10 mg/ml) Penicillin/Streptomycin 1x PBS	1 % v/v 1 % v/v
SDS-Laufpuffer, pH 8,6	Tris-HCl, pH 8,6 Glycin SDS H <sub>2</sub> O dest.	25 mM 3 M 10 % w/v
Taurin-Puffer	Taurin Tris-HCl, pH 7,5 MgCl <sub>2</sub> NaCl H <sub>2</sub> O dest.	100 mM 1 M 1 M 5 M
Towbin-Puffer	Methanol 1x Towbin	20 % v/v
Tris-buffered-Saline mit Tween20 (TBS-T)	Tween® 20 1x TBS	0,1 % v/v
Triton® X-100-Lösung	Triton® X-100 H <sub>2</sub> O dest.	1,5 % v/v
Trypsin-Lösung	Trypsin	10x

## Material

	1x PBS	
--	--------	--

WB: Western-Blot, ICC: Immunocytochemie.

### 2.11 Zellkulturmedien und Zusätze

**Tabelle 13: Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Zellkulturmedien und deren Zusätze, weitere in der Zellkultur verwendete Lösungen und Puffer, sowie deren Herkunft.**

Medium/Zusatz	Herkunft
$\beta$ -Mercaptoethanol, HSCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) F12	(Gibco) Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Dulbecco's PBS	(Gibco) Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat Dinatrium Dihydrat Salz (EDTA), C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>8</sub> •2H <sub>2</sub> O	(Titriplex) Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Fetal Bovine Serum Gold (FBS)	(Gibco) Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Geneticin (G418) -Sulfat-Lösung, C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> N <sub>4</sub> O <sub>10</sub> •2H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	(Gibco) Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Gentamicin (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
Nikotinamid (10 mM), C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O,	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
OptiMEM™ Medium	(Gibco) Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland

## Material

Penicillin (10.000 Units)/Streptomycin (10mg/ml)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Plasmocin™ treatment	InvivoGen, San Diego, CA, 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 (0,5 %) - EDTA (0,2 %), 10x in PBS	GE Healthcare, Galfont St. Giles, UK

## 2.12 Verbrauchsmaterial

**Tabelle 14: Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien und deren Herkunft.**

<b>Material</b>	<b>Herkunft</b>
6-Well Zellkulturplatten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
12-Well Zellkulturplatten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
24-Well Zellkulturplatten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
48-Well Zellkulturplatten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
96-Well Zellkulturplatten (transparenter Rahmen)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
96-Well Zellkulturplatten (schwarzer Rahmen)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Adhäsionsobjektträger Superfrost® Plus	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland
CombiTips-Eppendorf (5 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
CombiTips-Eppendorf (10 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
CryoPure Gefäß violett (1,6 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

## Material

Deckgläschen (7 mm)	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland
Deckgläschen (10 mm)	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland
Einmalkanülen 0,90 x 70 mm, 20 G	Medizinlager des Universitätsklinikums Regensburg
Einwegpasteurpipetten (3 ml)	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland
Falcontube (15 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Falcontube (50 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Färbekammer, ABS Deckel	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland
Filterspitzen (10 µl)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Filterspitzen (100 µl)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Filterspitzen (1.000 µl)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Glasflaschen	DWK Life Sciences GmbH, Wertheim, Deutschland
Glaspipetten	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Gravity flow Strep-Tactin® Sepharose® column (1 ml)	IBA GmbH, Göttingen, Deutschland
Hamilton Spritze, Serie 700 Microliter™	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland
Handschuhe Nitril blau	Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
Handschuhe Nitril grün	Kimberly-Clark Professional, Roswell, GA, USA

## Material

Küvetten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
MicroAmp™ Optical 8-Tube Strip with Attached Optical Caps (0,2 ml)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Mullbinde (Verbandpäckchen)	Büromittellager der Universität Regensburg
Objektträgermappe mit Deckel, stark	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Open-Top Thinwall Ultra-Clear Tube, 25 x 89 mm – 50 Pk (38,5 ml)	Beckman Coulter Lifesciences, Brea, CA, USA
Parafilm® M	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
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 (1.000 µl)	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland
pluriStrainer® 5 µm, cell-strainer	Hiss Diagnostics GmbH, Freiburg, Deutschland
PVDF-Membran	(Millipore) Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Reagenz-Reservoir (25 ml)	(Moonlab®) neoLab Migge GmbH, Heidelberg, 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
Rührfisch	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

## Material

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. 11	FEATHER® Safety Razor Co., Osaka, Japan
Skalpell No. 22	FEATHER® Safety Razor Co., Osaka, Japan
Spritze (5 ml)	Medizinlager des Universitätsklinikums Regensburg
Spritze (10 ml)	Medizinlager des Universitätsklinikums Regensburg
Subkutannadeln, 20 G, 120 mm	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
ThinCerts™ - TC Einsätze, transparent (Porengröße: 4 µm)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
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

## 2.13 Laborgeräte

**Tabelle 15: Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Laborgeräte und deren Zubehör, sowie ihrer Herkunft.**

<b>Laborgeräte</b>	<b>Herkunft</b>
Abzug	Wesemann GmbH – Zentrale, Syke, Deutschland
APT.line® CB CO <sub>2</sub> incubators	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Autoklav V-150	Systemec GmbH, Wettengel, Deutschland
CASY Model TT – Cell Counter and Analyzer	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
Duomax 1030 Rocking Platform Shaker	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, Deutschland
Eismaschine AF 100	Scotsman Industries Inc., Vernon Hills, IL, USA
Feinwaage Explorer	Ohaus Europe GmbH, Nänikon, Schweiz
Fluoreszenzmikroskop Axioskop 2 mot plus	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Gelelektrophoreseapparatur Mini PROTEAN 3	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Gelkammer Blue Marine™200	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Inkubator für Bakterien 37°C	Memmert GmbH, Schwabach, Deutschland
Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (FV3000 Fluoview)	Olympus Life Sciences, Hamburg, Germany
Leica DM IL 090135.001 Kontrastmikroskop	Leica GmbH, Wetzlar, Deutschland
Leica TCS SP5 konfokales Fluoreszenzmikroskop	Leica GmbH, Wetzlar, Deutschland
Mikrowelle KOR-6D07	Daewoo, Seoul, Südkorea

## Material

Milli-Q-Synthesis Reinstwasseranlage	(Millipore) Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, 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
Optima™ L-90K Ultrazentrifuge	Beckman Coulter Lifesciences, Brea, CA, USA
pH Meter Lab 850	SI Analytics GmbH, Mainz, Deutschland
Photometer Ultrospec 2100 pro	GE Healthcare (früher Amersham Biosciences), Chicago, Illinois, USA
Pipettierhilfe accu-jet	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
RM5 Rollschüttler (Assistent®)	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim/Rhön, Deutschland
Rotator RS-24	Biosan, Riga, Lettland
RS-TR5 Rollenmischer (für Falcontubes)	Phoenix Instrument GmbH, Garbsen, Deutschland
Schüttelinkubationshaube TH15	Edmund Bühler GmbH, Bodelshausen, Deutschland
Schüttelinkubator Certomat R	B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Deutschland
SDS-PAGE Platten 1,5 mm	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
SDS-PAGE Platten Mini Protean System Short Plates	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Spannungsmessgerät EVOMX	World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA

## Material

Sterilbank	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
SW40 Swing-out Rotor	Beckman Coulter Lifesciences, Brea, CA, USA
Tecan SPARK® Mikroplaterreader	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz
Thermocycler peqSTAR	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland
Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Titramax 101 Shaker	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, Deutschland
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	BioRAD Laboratories GmbH, München, Deutschland
Transferpipette® (10 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Transferpipette® (100 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Transferpipette® (1.000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Transilluminator UST-30_M-8R	BioView Ltd., Billerica, MA, USA
Ultraschallbad Sonorex™ Super 10P	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Ultraschallgerät Vibra Cell VCX400	Sonics Materials, Newtown, CT, USA
Vakuumpumpe Vacusafe	INTEGRA Biosciences AG, Zizers, Schweiz
Vortex Genie2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Waage	Scaltec Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
Wasserbad W12	Labortechnik Medingen, Arnsdorf, Deutschland
Wasserdestilliergerät	GFL GmbH, Burgwedel, Deutschland
Werkbank Heraguard	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Biofuge fresco (Tischzentrifuge)	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Biofuge pico (Tischzentrifuge)	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland

## Material

Zentrifuge Megafuge 1.0R (Kühlzentrifuge Falcontube)	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Sigma 2-5	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode, Deutschland

## 2.14 Software

**Tabelle 16: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Software und ihrer Herkunft.**

<b>Software</b>	<b>Herkunft</b>
AxioVision LE 4.8	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Corel PHOTO-PAINT	Corel Corporation, Ottawa, Ontario, Kanada
CorelDRAW Graphicsuite 2019	Corel Corporation, Ottawa, Ontario, Kanada
Image Studio	LI-COR Biosciences GmbH, Lincoln, NE, USA
ImageJ	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA
Microsoft Office	Microsoft Cooperation, Redmond, WA, USA
SigmaPlot Version12.5	Systat Software, San Jose, CA, USA
Tecan SPARKCONTROL	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz
XLSTAT	Addinsoft, Paris, Frankreich

### 3 Methoden

#### 3.1 Kultivierung verwendeter eukaryotischer Zelllinien

Für die Kultivierung eukaryotischer Zelllinien wurde bei allen Arbeitsschritten eine biologisch sichere Arbeitsumgebung genutzt. Alle verwendeten Zellmedien, Puffer und Lösungen wurden steril gehalten und bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Direkt vor Gebrauch wurden sie in einem 37 °C warmen Wasserbad für 5 bis 10 min aufgewärmt. Wachstum und Zustand der Zellen wurden regelmäßig unter einem Mikroskop kontrolliert (Leica DM IL 090-135.001). Alle eukaryotischen Zelllinien wurden in einem Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

##### 3.1.1 HEK-293-EBNA-Zellen

Adhärente HEK-293-EBNA-Zellen wurden in 10 cm Zellkulturschalen in DMEM Medium kultiviert. Dem Medium wurden 4,5 g/l D-Glucose und L-Glutamin, außerdem 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin, 10 % (v/v) FBS und 1 % (v/v) G418-Sulfat hinzugefügt.

Die Zellen wurden bei 90 % Konfluenz zweimal pro Woche unter sterilen Bedingungen gesplittet. Für das Passagieren wurde das verbrauchte Zellmedium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 10 ml frischem Zellmedium durch Auf- und Abpipettieren von den Platten gelöst. Schlussendlich wurde die Zelllösung in neue 10 cm Zellkulturschalen überführt und dabei in einem Verhältnis von 1:10 ausgesät. Jede Zellkulturschale wurde mit frischem Medium wieder auf ein Gesamtvolumen von 10 ml aufgefüllt. Es folgte erneut die Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>.

##### 3.1.2 Weri-Rb1-Zellen

Die Kultivierung der Weri-Rb1 Zelllinie in Suspension erfolgte in RPMI 1640 Medium, welches mit 10 % (v/v) FCS und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin versetzt wurde.

Das Passagieren erfolgte je nach Wachstumsgeschwindigkeit ein bis zweimal wöchentlich im Verhältnis 1:3. Nach Kontrolle unter dem Mikroskop wurde eine gut bewachsene T25 Zellkulturflasche durch Auf- und Abpipettieren durchmischt, und neue Zellkulturflaschen mit je 7 ml frischem RPMI-Medium + 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin + 10 % (v/v) FCS befüllt. 3 ml der alten Zellsuspension wurden

## Methoden

dann in je eine neue Zellkulturflasche überführt, sodass pro Flasche wieder 10 ml Gesamtvolumen vorhanden waren. Die Inkubation und Lagerung der Zelllinien erfolgte bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Aufgrund des natürlichen Alterungsprozesses der Zellen wurde die Kultivierung bis zur Passage 14 fortgeführt, danach wurden die Zellen verworfen und neue Zellen aufgetaut. Eine mikroskopische Kontrolle des Zustands und Zellwachstums erfolgte alle zwei Tage und vor jeder Verwendung der Zellen für Versuche.

### **3.1.3 Aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte RPE-Zellen (hiPSC-RPE)**

HiPSC-RPE wurden am Institut für Humangenetik aus Fibroblasten der Hautstanzen freiwilliger Spender aus der Abteilung für Augenheilkunde des Universitätsklinikums Regensburg durch Rückprogrammierung zu Stammzellen gewonnen (Ethikvotum der Universität Regensburg Referenz-Nr. 12-101-0241 und Amendment zu 12-101-0241). Diese Vorarbeiten wurden am Institut freundlicherweise von Nico Hertel nach dem Protokoll von Brandl und Kollegen (Brandl *et al.*, 2014) durchgeführt. Anschließend wurden diese Stammzellen über einen Zeitraum von zwei Wochen zu retinalen Pigmentepithel-Zellen (RPE) ausdifferenziert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte dabei auf GFR-Matrigel-beschichteten Transwellfiltern in 12-Well-Platten. Als Wachstums- und Nährmedium wurde KnockOut™ DMEM Medium + 2 mM L-Glutamin + 5 % (v/v) KnockOut™ Serum Replacement + 0,1 mM Gibco™ MEM Non-Essential Amino Acids Solution + 0,1 mM β-Mercaptoethanol + 5 µg/ml Gentamicin + 10 mM Nicotinamid verwendet. Zusätzlich wurde während der Phase der Ausdifferenzierung zu RPE-Zellen 1 % (v/v) Plasmocin zugegeben. Der Erfolg der Ausdifferenzierung wurde mikroskopisch durch die Ausbildung einer „Honigwabenstruktur“ kontrolliert. War diese honigwabenartige Struktur des hiPSC-RPE-Zellverbands erkennbar, wurden die Zellen passagiert, wenn nicht, wurden die Zellen unter oben genannten Bedingungen noch weitere Tage bis zum Erfolg der Ausdifferenzierung kultiviert.

Zur Vorbereitung des Passagierens wurden neue Transwellfilter (für den Einsatz in 12-Well-Platten) mit 0,5 ml GFR-Matrigel für eine Stunde bei 37 °C beschichtet, worauf überschüssiges Matrigel abgenommen wurde. Im Anschluss wurden die Wells einer 12-Well-Zellkulturplatte mit 1 ml Medium befüllt und die Transwellfilter eingesetzt. Von

## Methoden

den zu passagierenden Zellen wurde das alte Nährmedium abgesaugt, die Zellen mit 500 µl PBS gewaschen und dann für 20 min mit 2 ml TrypLE™ je Filter bei 37 °C inkubiert. Die Enzymlösung wurde danach vollständig abgenommen. Die enzymatisch von den Filtern abgelösten Zellen wurden mit 2 ml PBS resuspendiert und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 1.200 x g für 5 min (Zentrifuge Biofuge pico). Das Zellpellet wurde danach in 6 ml PBS resuspendiert und im Verhältnis 1:12 auf die neuen Filter ausgesät, das heißt je 500 µl dieser Zelllösung wurden auf die vorbereiteten GFR-Matrigel-beschichteten Transwellfilter pipettiert. Die ausgesäten Zellen wurden wieder für 2 Wochen unter oben geschilderten Bedingungen, jedoch ohne Plasmocinzusatz kultiviert, bis wieder eine Honigwabenstruktur der Zellen erkennbar war, sodass danach ein zweites Passagieren im Verhältnis 1:12 (siehe oben) erfolgen konnte. Anschließend wurden die hiPSC-RPE-Zellen auf ihren Filtern für mindestens sechs Wochen gealtert, bis erste Experimente mit ihnen durchgeführt werden konnten.

Eine mikroskopische Kontrolle des Wachstums und Zustands der hiPSC-RPE-Zellen auf den Filtern fand regelmäßig im Abstand von zwei Tagen statt. Im Anschluss an die Kontrollen wurde das alte Medium auf und unter den Filtern abgenommen und auf den Filtern durch 0,5 ml, unter den Filtern durch 1 ml frisches Medium ersetzt. Die weitere Kultivierung erfolgte bei konstant 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Inkubator.

### **3.1.4 Auftauen von Zellen**

Nach Überführung der Zellen aus den Glycerinstocks in ein 15 ml Falcontube mit 9 ml Medium, wurden die Lösungen bei 1.000 x g für 5 min bei RT zentrifugiert (Zentrifuge Sigma 2-5). Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet danach in 1 ml Wachstumsmedium resuspendiert. Die fertige Zellsuspension wurde dann in 10 cm Zellkulturschalen oder T25 Zellkulturflaschen pipettiert und 9 ml Medium zugegeben. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium gewechselt und die Zellen bis zum Erreichen 90 %-iger Konfluenz bei 37 °C kultiviert. Das Passagieren der Zellen erfolgte wie oben beschrieben.

### 3.2 Konzentrationsbestimmung von Weri-Rb1-Zellen für funktionelle Versuche

Weri-Rb1 Zellsuspensionen aus vier gut bewachsenen T25 Zellkulturflaschen wurden durch Schwenken gut durchmischt und in einem 50 ml Falcontube vereinigt. Es folgte eine Zentrifugation bei 1.200 x g für 5 min (Zentrifuge Sigma 2-5). Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 2 ml PBS resuspendiert, danach wurde erneut zentrifugiert (siehe oben). Das Zellpellet wurde dann in 25 ml RPMI 1640 Medium, welches mit 10 % (v/v) FCS und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin versetzt wurde, aufgenommen. 70 µl dieser Zelllösung wurden in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und die Zellen mittels CASY Model TT – Cell Counter and Analyzer nach Herstelleranweisung gezählt.

### 3.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)

Für die elektrophoretische Trennung von Proteinen durch SDS-PAGE, wurden Gele von 1,5 mm Dicke verwendet. Diese Gele bestanden aus einem 12,5 % Trenngel und einem 3 % Sammelgel, deren Komponenten in **Tabelle 17** zusammengefasst sind.

**Tabelle 17: Darstellung der Zusammensetzung des in dieser Arbeit verwendeten SDS-PAGE-Trenngels (12,5 %) und des SDS-PAGE-Sammelgels (3 %).**

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

Die verwendeten Proben für die SDS-PAGE wurden mit 5x Lämmli-Puffer versetzt und für 5 min bei 93 °C aufgekocht. 2 µl des PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10-180 kDa, Thermo Fisher Scientific) wurden als Molekularmassenstandard für Proteine aufgetragen. Die Gelelektrophoresekammer wurde mit SDS-Laufpuffer gefüllt, wobei darauf geachtet wurde, dass die Gele vollständig von Puffer bedeckt waren. Für die Elektrophorese wurde eine Spannung von 50 V verwendet, bis die Proben das

## Methoden

Sammelgel vollständig durchlaufen hatten, danach wurde die Spannung auf 150 V erhöht.

### 3.4 Western-Blot – Semi Dry Verfahren

Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine auf eine 0,45 µm PVDF-Membran überführt. Die Membran wurde vorher für 3 min in Methanol aktiviert und danach zusammen mit dem SDS-PAGE-Gel und einem Whatman-Paper (3 mm Dicke) mit Towbin-Puffer durchtränkt. Für den Proteintransfer wurde das Trans-Blot®-Turbo™ Transfer System (BioRAD) verwendet. Der Transfer wurde bei einer Spannung von 24 V für 40 min vollzogen. Anschließend wurden die Membranen auf einem Shaker (Heidolph Duomax1030) für 1 h bei RT in Antikörperlösung 1 geblockt. Danach wurden die Membranen mit einem Primärantikörper in entsprechender Verdünnung (siehe **Tabelle 6**) über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Membranen je dreimal für 5 min mit TBS-T auf einem Shaker gewaschen und anschließend mit dem entsprechenden Sekundärantikörper für 1 h bei RT unter Schütteln inkubiert. Danach folgte erneut ein dreimaliges Waschen für je 5 min mit TBS-T. Zur Analyse wurden die Membranen mit Clarity™ Western Blotting Substrate oder bei schwächeren Signalen mit dem Clarity Max™ Western Blotting Substrate behandelt und das entstandene Chemilumineszenzsignal mit dem Odyssey Fc Imager (LI-COR) aufgezeichnet. Die densitometrische Analyse der Blots erfolgte mit der ImageStudio-Software.

### 3.5 Vitronectin-Aufreinigung

#### 3.5.1 Plasmidpräparation aus Bakterienkulturen („Midi“)

Für die Plasmidamplifikation wurde der Bakterienstamm *E. coli* DH5α verwendet, welcher bereits zuvor mit der entsprechenden Plasmid-DNA (pEXPR-IBA103-VTN\_rs704:C, pEXPR-IBA103-VTN\_rs704:T, pEXPR-IBA103) transformiert worden war.

Es wurde eine Pipettenspitze des auf -80 °C gekühlten *E. coli*-Glycerolstocks entnommen und in 100 ml LB-Medium + 1 % (v/v) Ampicillin gegeben. Es folgte eine Inkubation auf einem Schüttelinkubator (Certomat R) bei 37 °C und 150 x g über Nacht.

## Methoden

Für die Präparation der Plasmid-DNA am darauffolgenden Tag wurde das NucleoBond® XtraMidi Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG) verwendet. Die Arbeitsschritte erfolgten, wie in den Herstelleranweisungen angegeben. Schlussendlich wurde die Plasmid-DNA mit 100 µl H<sub>2</sub>O dest. eluiert. Die Konzentration der erhaltenen DNA wurde mithilfe des NanoDrop® ND1000 Spektrophotometers bestimmt, worauf die Plasmide mit H<sub>2</sub>O dest. auf 1.000 ng/µl verdünnt wurden.

### **3.5.2 Calciumphosphat Transfektion von HEK-293-EBNA mit pEXPR-Plasmiden zur heterologen Proteinexpression**

Zur Vorbereitung der Calciumphosphat Transfektion wurde am Vortag eine 10 cm Zellkulturschale mit 5 ml Poly-L-Lysin beschichtet und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das überschüssige Poly-L-Lysin wieder entfernt und die Zellkulturschale mit PBS gewaschen. Das alte Wachstumsmedium der HEK-293-EBNA-Zellen wurde abgesaugt, die Zellen mit 10 ml frischem Medium (DMEM Zellkulturmedium + 1 % Penicillin/Streptomycin + 1 % G418 + 10 % FCS) durch Auf- und Abpipettieren vom Boden der Zellkulturschale gelöst und je 5 ml dieser Lösung auf den Poly-L-Lysin beschichteten Platten verteilt. Jede Zellkulturschale wurde dann mit zusätzlichen 5 ml frischem Medium auf 10 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Nach erneuter Inkubation über Nacht bei 37 °C wurde am nächsten Tag das alte Nährmedium abgesaugt und 10 ml frisches DMEM + 1 % Penicillin/Streptomycin + 10 % FCS dazugegeben. Die Platten wurden dann unter Schwenken mit 10 µl Chloroquin für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Danach folgte ein Mediumwechsel zu frischem DMEM + 1 % Penicillin/Streptomycin + 1 % G418 + 10 % FCS. In der Zwischenzeit wurde der Transfektionsansatz wie in **Tabelle 18** vorbereitet. Plasmid-DNA, H<sub>2</sub>O und CaCl<sub>2</sub> wurden zuerst in einem 2 ml Reaktionsgefäß gemischt, danach folgte das 2x HBS, das durch zehnmaliges Unterblubbern dem übrigen Reaktionsgemisch beigefügt wurde. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei RT wurde der Transfektionsansatz tröpfchenweise zu den Zellen in den Zellkulturschalen gegeben und unter Schwenken der Platte durchmischt. Die Zellen wurden darauf für 7 h bei 37 °C inkubiert. Es folgte ein erneuter Mediumwechsel zu DMEM + 1 % Penicillin/Streptomycin + 1 % G418. Nach 72 h Inkubation bei 37 °C wurden der Überstand und die Zellen geerntet.

**Tabelle 18: Auflistung der Bestandteile des in dieser Arbeit verwendeten Calciumphosphat Transfektionsansatzes.**

<b>Bestandteil</b>	<b>Volumen für 10 cm Zellkulturschale</b>
Plasmid-DNA	20 µg
H <sub>2</sub> O	418 µl
CaCl <sub>2</sub>	62 µl
2x HBS	500 µl

### **3.5.3 Ernte von Zellen und Überstand nach Calciumphosphat Transfektion**

Während der Ernte von Überstand und Zellen wurden die Zellkulturplatten auf Eis gelagert.

Der Überstand wurde durch Abkippen in 50 ml Falcontubes überführt und sofort wieder auf Eis gestellt. Um alle zellulären Bestandteile zu entfernen, folgte ein Zentrifugationsschritt bei 500 x g und 4 °C für 5 min (Zentrifuge Megafuge 1.0R). Der Überstand wurde in 50 ml Falcontubes überführt und bei -20 °C gelagert. Für Western-Blot Analysen wurden 100 µl des Überstandes mit 25 µl 5x Lämmli-Puffer in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gemischt und bei 93 °C für 5 min aufgeköcht.

Zur Zellernte wurden die Zellkulturschalen (von denen bereits der Mediumüberstand entfernt wurde) mit 10 ml PBS befüllt und die adhärennten Zellen mithilfe eines Zellspatels mechanisch vom Boden gelöst. Die Lösung wurde in 15 ml Falcontubes überführt und für 3 min bei 1.000 x g und 4 °C abzentrifugiert (Zentrifuge Sigma 2-5). Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet erneut mit 500 µl PBS in Lösung gebracht und nochmals für 3 min bei 1.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde ein zweites Mal verworfen, das Zellpellet in 800 µl PBS resuspendiert und die Zellen für 30 s bei 38 % Amplitude sonifiziert (Ultraschallgerät Vibra Cell VCX400). Das so gewonnene Zelllysate wurde mit 200 µl 5x Lämmli-Puffer versetzt und für 5 min bei 93 °C aufgeköcht. Alle Western-Blot-Proben wurden bei -20 °C gelagert.

### **3.5.4 Aufreinigung der Vitronectin-Proteinvarianten mittels Strep-Tactin®-Trennsäulen**

Aus den Überständen von HEK-293-EBNA-Zellen, die heterolog Strep-getagtes Vitronectin exprimierten (nach Transfektion mit pEXPR-VTN\_rs704:C oder

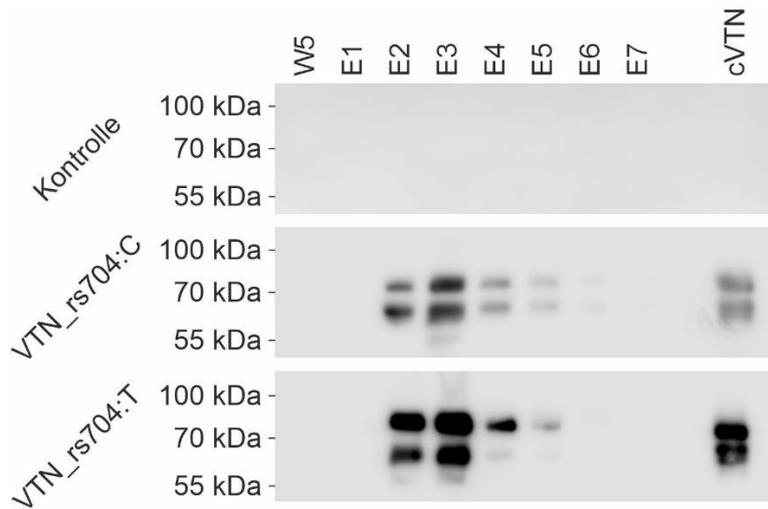
## Methoden

pEXPR\_rs704:T), wurden mit Hilfe der Sepharosegel-Trennsäulen von IBA life sciences die Vitronectin-Varianten aufgereinigt. Dazu wurde für jede Variante eine separate Trennsäule benutzt, sowie eine Trennsäule für eine Kontrollaufreinigung aus Überständen von HEK-293-EBNA-Zellen, die mit dem leeren pEXPR-IBA103 transfiziert worden waren. Die Aufreinigung erfolgte aus 10 ml Überstand nach Herstellerangaben (Strep-Tactin® Purification Kit). Die Überstände wurden Stück für Stück in die Trennsäulen gefüllt und in regelmäßigen Abständen wurde das Sepharosegel durch Rühren mit einer Pipettenspitze aufgelockert, um den Durchfluss zu verbessern. Die gesamte Aufreinigung fand in einem auf 4 °C gekühlten Raum statt. Von den fünf Waschschritten wurde der Durchfluss des letzten Waschschriffs behalten und zur Kontrolle ebenfalls per Western-Blot analysiert. Die Eluate aus den einzelnen Trennsäulen wurden getrennt nach Eluatfraktion 1 bis 7 in 2 ml Reaktionsgefäßen aufgefangen und für spätere Analysen bei -20 °C gelagert.

### 3.5.5 Western-Blot Analysen der Eluate

Um für die späteren Versuche Vitronectin-Eluate mit möglichst hoher Konzentration zu erhalten, wurden die Vitronectin-Konzentrationen in den Eluaten 1 bis 7 per Western-Blot verglichen. Hierzu wurden 10 µl jeder Eluatfraktion über SDS-PAGE aufgetrennt und einer anschließenden Western-Blot Analyse mit Antikörpern gegen Vitronectin unterzogen (siehe 3.3 und 3.4). Die Ergebnisse dieser Western-Blot-Analysen sind in **Abbildung 3** dargestellt. Die drei Eluatfraktionen, welche die höchste Konzentration an Protein aufwiesen (E2, E3 und E4 in **Abbildung 3**), wurden für die weiteren Versuche vereinigt und bei -20 °C gelagert.

## Methoden

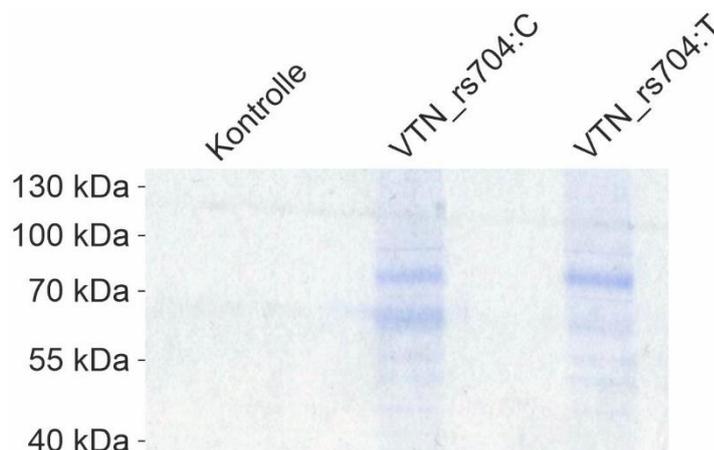


**Abbildung 3: Western-Blot Analyse zur Ermittlung des Vitronectingehalts der einzelnen Eluatfraktionen.**

Nach Proteinaufreinigung der Vitronectin-Varianten (VTN\_rs704:T bzw. VTN\_rs704:C) bzw. der Kontrollaufreinigung wurden die letzte der fünf Waschfraktionen (W5), sowie die sieben Eluatfraktionen (E1-E7) Western-Blot Analysen mit Antikörpern gegen Vitronectin unterzogen. Zur Kontrolle wurde kommerzielles Vitronectin (cVTN) mit aufgetragen.

### 3.5.6 Reinheitsbestimmung der Eluate mittels Coomassie-Blue-Färbung

Zur Untersuchung der Reinheit der Eluate wurde eine Färbung des Gesamtproteins mittels Coomassie-Blue durchgeführt. In einem ersten Schritt wurden 10 µl der Eluate auf ein 12,5 %-iges Polyacrylamidgel geladen und wie unter Punkt 3.3 aufgetrennt. Darauf wurde das Polyacrylamidgel in Coomassie-Färbelösung eingelegt und bei RT über Nacht auf einem Schwenker (Duomax 1030) inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Gel aus der Färbelösung entnommen und anschließend für 1 h unter Schwenken bei RT mit einer Coomassie-Entfärbelösung behandelt. Dieser Schritt wurde wiederholt, bis sich die blau gefärbten Protein-Banden deutlich vom entfärbten Hintergrund abzeichneten (siehe **Abbildung 4**). In der Kontrollaufreinigung waren keine Proteinbanden angefärbt, in den beiden Vitronectin-Aufreinigungen wurden die Vitronectin-Varianten mit einer Größe von 75 kDa (obere Bande) bzw. 65 kDa (untere Bande, nur bei VTN\_rs704:C) detektiert.



**Abbildung 4: Coomassie-Färbung eines PA-Gels nach SDS-PAGE.**

Nach Proteinaufreinigung der Vitronectin-Varianten (VTN\_rs704:T bzw. VTN\_rs704:C) bzw. der Kontrollaufreinigung wurden die vereinigten Eluatfraktionen (E2, E3 und E4) einer Coomassie-Blue-Färbung unterzogen.

### **3.5.7 Konzentrationsbestimmung der Vitronectin-Varianten über Western-Blot Analysen und Bradford-Assay**

Zur Konzentrationsbestimmung wurden je 20 µl der vereinigten Eluatfraktionen nach Vitronectinaufreinigung (E2, E3 und E4) sowie 5 µl des kommerziell erworbenen Vitronectins (siehe **Tabelle 8**, auf 25 µg/ml eingestellt) auf einem SDS-Gel aufgetrennt (siehe Punkt 3.3) und einer Western-Blot Analyse mit Antikörpern gegen Vitronectin unterzogen (siehe Punkt 3.4). Die Banden der Eluatfraktionen und des kommerziellen Vitronectins wurden densitometrisch ausgewertet. Über den Vergleich der Eluatfraktionen mit dem kommerziellen Vitronectin, konnte die Konzentration in den Eluatfraktionen errechnet werden.

Ein weiterer Ansatz zur Konzentrationsbestimmung des aufgereinigten Vitronectins war die Proteinbestimmung nach Bradford („Bradford-Assay“, nach Bradford, 1976). Dabei wurde zunächst eine Reihe von BSA-Lösungen in H<sub>2</sub>O dest. erstellt, sodass Proteinmengen von 0 µg, 0,2 µg, 0,5 µg, 1 µg, 2 µg, 3 µg, 5 µg und 10 µg vorlagen. Je 20 µl jedes Vitronectin-Eluats, sowie 5 µl des kommerziellen Vitronectins mit einer Konzentration von 25 µg/ml (als Kontrolle), wurden in den Test eingesetzt. Zu jeder BSA- bzw. Vitronectin-Fraktion wurde 1 ml des 1:5 verdünnten Bradford-Reagenz (Carl Roth GmbH + Co. KG) gegeben. Nach 20 min Inkubationszeit in Dunkelheit bei RT wurde der Inhalt jedes Cups in Messküvetten umgefüllt und die Absorbanz der einzelnen Proben mit dem Photometer (Ultrospec 2100 pro) bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Aus der errechneten Kurvengleichung für die BSA-Proben wurde die Konzentration der Vitronectin-Fraktionen ermittelt.

Nach den Konzentrationsbestimmungen wurden die Vitronectin-Eluate auf die gewünschte Konzentration eingestellt, indem sie mit dem Elutionspuffer (Puffer E „elution buffer“, siehe **Tabelle 11**) verdünnt wurden. Zur Langzeitaufbewahrung wurden die Vitronectin-Eluate in 100 µl Aliquots aufgeteilt und bei -20 °C gelagert. Vor jeder Benutzung wurden die Proben vorsichtig auf Eis aufgetaut.

## **3.6 Charakterisierung von hiPSC-RPE-Zellen**

### **3.6.1 Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER)**

Für die Messungen des transepithelialen Widerstandes der hiPSC-RPE-Zellen wurde am Vortag der Messung auf -80 °C gefrorenes GFR-Matrigel aufgetaut und mit 15 ml

## Methoden

hiPSC-RPE Kultivierungsmedium (siehe Punkt 3.1.3) versetzt. Das Matrigel wurde durch Auf- und Abpipettieren gelöst und je 0,5 ml auf drei neue Transwellfilter einer 12-Well-Zellkulturplatte gegeben, welche danach für eine Stunde bei 37 °C inkubiert wurde. Anschließend wurde das überschüssige Matrigel wieder abgenommen und die Filter mit je 1,5 ml Medium unten und 1 ml Medium oben befüllt. Die drei zu messenden hiPSC-RPE Filter wurden ebenfalls auf die neue Platte überführt, das Medium abgezogen, die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen und mit der gleichen Menge Medium befüllt, wie die nur mit Matrigel beschichteten Filter. Es folgte eine weitere Kultivierung für 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Inkubator.

Am darauffolgenden Tag wurde zunächst das Spannungsmessgerät (EVOMX) unter sterilen Bedingungen gereinigt und kalibriert. Dazu wurde die Elektrode zuerst für 15 min in 70 % Ethanol gereinigt und dann für weitere 15 min in 150 mM NaCl-Lösung auf einen Nullwert gesetzt. Die Messungen erfolgten ohne Kontakt zur Wellwand und in dreimaliger Wiederholung. Anschließend wurden die Mittelwerte bestimmt und die Widerstände auf die Fläche der Filtermembranen umgerechnet.

### **3.6.2 Untersuchung des Expressionsprofils mittels Reverse Transkriptase-PCR**

#### **3.6.2.1 RNA-Isolierung**

Für die Isolation der hiPSC-RPE RNA wurde das PureLink™ RNA Mini Kit von Thermo Fisher Scientific nach Herstellerangaben verwendet, mit den im Folgenden angegebenen Modifikationen. Die Zellen wurden mithilfe eines Zellspatels mechanisch von der Filteroberfläche gelöst und mit 1 ml Lysepuffer und 10 µl β-Mercaptoethanol versetzt. Die Lösung wurde in Schredder-Säulen (Qiagen) überführt und für 2 min bei 12.000 x g zentrifugiert (Zentrifuge Biofuge pico), um verbleibende Zellbestandteile zu zerkleinern. Darauf wurde die Zelllösung durch Auf- und Abpipettieren durchmischt und 1 ml 70 % Ethanol zugegeben. 10 µl DNase I und 70 µl RDD-Puffer (RNase free DNase Set, Qiagen) wurden mit 350 µl Waschpuffer 1 („WB I“) vermischt und auf das Zellpellet gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei RT wurden weitere 350 µl des Waschpuffers 1 zupipettiert, bevor bei 12.000 x g für 15 s bei RT zentrifugiert wurde. Die Elution der RNA erfolgte in 35 µl RNase freiem H<sub>2</sub>O. Die RNA-Konzentration wurde mit Hilfe des Spektrophotometers NanoDrop® ND1000

## Methoden

gemessen, wobei als Kontrolle RNase freies H<sub>2</sub>O verwendet wurde. Abschließend wurde die RNA bei -80 °C gelagert.

### 3.6.2.2 cDNA-Synthese

Um aus der gewonnenen RNA cDNA herzustellen, wurde das RevertAid RT Reverse Transcription Kit von Thermo Fisher Scientific verwendet, wobei nach Herstellerangaben vorgegangen wurde, mit den im Folgenden genannten Modifikationen. Es wurden 1.000 ng RNA eingesetzt, auf 11,5 µl mit RNase freiem H<sub>2</sub>O aufgefüllt und 1 µl Random Hexamer Primer (100 µM) hinzugefügt. Die Lösung wurde anschließend gemischt, gevortext und auf Eis gelagert. Für die cDNA-Synthesereaktion wurde ein Mastermix vorbereitet (siehe **Tabelle 19**) und ebenfalls auf Eis gelagert.

**Tabelle 19: Zusammensetzung des Mastermixes für die Synthese der cDNA.**

Komponente	Volumen
5x Reaktionspuffer	4 µl
RNase freies H <sub>2</sub> O	0,5 µl
dNTPs (1,25 mM)	2 µl
Reverse Transkriptase	1 µl

Zum Annealing wurde die RNA-Primer-Lösung in den Thermocycler (peqSTAR) eingesetzt und für 5 min bei 65 °C inkubiert (siehe **Tabelle 20**). Nach dem Annealing wurde der Thermocycler gestoppt und 7,5 µl des Mastermixes (siehe **Tabelle 19**) dazugegeben. Zur cDNA-Synthese wurde darauf das Thermocycler-Programm (siehe **Tabelle 20**) fortgesetzt. Die Lagerung der synthetisierten cDNA erfolgte bei -20 °C.

**Tabelle 20: Darstellung des Ablaufs, der Temperatur und der Dauer der einzelnen Schritte des für die cDNA-Synthese im Thermocycler verwendeten Programms.**

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer
Annealing	65 °C	5 min
cDNA-Synthese	25 °C	10 min
	42 °C	60 min
Hitzeinaktivierung	70 °C	10 min

### 3.6.2.3 cDNA-Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation der cDNA-Fragmente, die für die hiPSC-RPE Charakterisierung interessant waren, wurden 100 ng cDNA aus hiPSC-RPE-Zellen sowie aus hiPSC-Zellen (als Stammzellkontrolle) eingesetzt. Proben mit H<sub>2</sub>O dest. statt cDNA dienten als Negativkontrolle. Die Komponenten des PCR-Ansatzes sind in **Tabelle 21** angegeben.

**Tabelle 21: Auflistung der Komponenten und Volumina eines Ansatzes für die cDNA-PCR.**

Komponente	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
cDNA (50 ng/µl)	2 µl
GoTaq® Polymerase	0,25 µl
H <sub>2</sub> O dest.	14,75 µl

Die vorbereiteten Tube-Strips wurden durch Vortexen gemischt und kurz abzentrifugiert (Zentrifuge Biofuge pico), bevor sie in den Thermocycler (peqSTAR) eingesetzt wurden. Die PCR erfolgte dort unter dem in **Tabelle 22** angegebenen Programm.

**Tabelle 22: Ablauf der PCR zur cDNA-Amplifikation.**

PCR-Schritt	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Vorheizen	95 °C	-	
Initiale Denaturierung	95 °C	3 min	
Denaturierung	94 °C	30 s	31 Zyklen*
Annealing	60 °C*	30 s	
Elongation	72 °C	20 s	
Finale Elongation	72 °C	4 min	
Pause	10 °C	-	

\*Modifikationen bei bestimmten Primer-Kombinationen: für SOX2: Annealing 62 °C, 25 Zyklen; für OCT4: Annealing 62 °C, 21 Zyklen; für ITGB8 und BEST1: 25 Zyklen; für RPE65, RLBP1, TYR, GUSB: wie oben dargestellt.

### 3.6.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der cDNA erfolgte mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese auf 1,5 %-igen Agarosegelen (Zusammensetzung siehe **Tabelle 23**). Je 14 µl der zu untersuchenden Proben wurden in die Geltaschen geladen. Die Auftrennung der Nukleinsäuren erfolgte bei einer konstanten Spannung von 200 V für 30 min. Die entstandenen Banden wurden später mit dem Transilluminator UST-30\_M-8R unter UV-Licht sichtbar gemacht.

**Tabelle 23: Zusammensetzung eines 1,5 %-igen Agarosegels.**

Komponente	Volumen
1x TBE	150 ml
Agarose	2,25 g
Ethidiumbromid-Lösung (0,07 %)	100 µl

### 3.6.3 Immuncytochemie an hiPSC-RPE-Zellen

Die Transwell-Filter mit den zu färbenden hiPSC-RPE-Zellen wurden am ersten Tag mithilfe eines Skalpell aus ihrer Umfassung herausgetrennt und halbiert, die Filterhälften dann mit der Zelleite nach oben in einer 24-Well-Zellkulturplatte positioniert. Es folgten zwei Waschschrte mit je 300 µl PBS und zwei Minuten Inkubationszeit pro Schritt. Die Filter wurden darauf zur Fixierung vollständig mit 2 %-iger PFA-Lösung bedeckt und für 10 min bei RT inkubiert. Danach folgten wiederum drei Waschschrte mit PBS für jeweils 5 min. Anschließend wurden die Filter mit je 300 µl ICC-Blocklösung (siehe **Tabelle 12**) inkubiert, welche für 30 min bei RT auf den Filtern verblieb. Nachdem die Blocklösung wieder abgenommen wurde, folgte schlussendlich die Färbung mit den Primärantikörpern gegen ATP1A1, ATP1B1, BEST1 und ZO-1 (siehe **Tabelle 6**, Verdünnungen und entsprechende Antikörperlösung siehe **Tabelle 12**) in einem abgeschlossenen Kühlraum bei 4 °C über Nacht. Am nächsten Tag wurden zunächst die Primärantikörperlösungen durch dreimaliges Waschen mit PBS zu je 5 min Einwirkzeit wieder abgespült und anschließend bei reduzierter Beleuchtung 300 µl der Sekundärantikörperlösung (siehe **Tabelle 7** und **Tabelle 12**) aufgebracht. Zeitgleich wurden auch die Zellkerne der Proben mit DAPI in einer Verdünnung von 1:1.000 in Antikörperlösung 4 (siehe **Tabelle 11** und **Tabelle 12**) angefärbt. Die Inkubationszeit für diesen Schritt betrug 30 min, wobei die Proben dabei im Dunkeln gelagert wurden. Es folgten wieder 3 Waschschrte mit je 300 µl

## Methoden

PBS für je 2 min. Im letzten Schritt wurden Objektträger mit einem luftblasenfreien Tropfen Dako Eindeckmedium benetzt und die eingefärbten Filterhälften umgekehrt mit der Zellseite nach unten auf den Tropfen gesetzt. Die abstehenden Ränder der Filter wurden mit einem Skalpell entfernt und die Proben mit einem Deckglas vorsichtig gesichert. Die Lagerung der Proben erfolgte bei 4 °C in Dunkelheit bis zum Aushärten des Eindeckmediums (drei bis vier Tage). Die mikroskopische Analyse der eingefärbten Zellproben wurde mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (FV3000 Fluoview, Olympus) bei 40-facher Vergrößerung im Z-stack-mode durchgeführt.

### **3.7 Funktionelle Versuche zum Einfluss der Vitronectin-Varianten auf das Bindungsverhalten von Photorezeptoren**

#### **3.7.1 *In vitro*-Assay zum Einfluss von Vitronectin auf das Bindungsverhalten von Weri-Rb1-Zellen**

Die Kultivierung der Weri-Rb1-Zellen erfolgte, wie unter Punkt 3.1.2 beschrieben. Zwei gut bewachsene T25 Flaschen der Weri-Rb1-Zellen wurden unter Schwenken durchmischt und in einen 50 ml Falcontube überführt. Die Zellen wurden bei 1.200 x g für 5 min (Zentrifuge Sigma 2-5) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 2 ml PBS resuspendiert, danach wurde erneut zentrifugiert (siehe oben). Das Zellpellet wurde dann in 25 ml RPMI 1640 Medium + 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin aufgenommen. 100 µl der Zellsuspension wurden dann in je ein Well einer 96-Well-Zellkulturplatte gegeben und mit den Vitronectin-Eluaten versetzt, sodass in jedem Well eine Vitronectin-Konzentration von 1,5 µg/ml vorlag, bzw. mit der gleichen Menge an Kontrolleluat (siehe 3.5.4). Der Versuch wurde in Duplikaten für jede Behandlung durchgeführt. Die Zellen wurden für vier Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert

Direkt nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte eine Kontrolle der Zellen unter dem Mikroskop (Leica DM IL 090-135.001). Die überschüssige Zelllösung mit nicht adhären Zellen wurde abgenommen und die verbleibenden Zellen mit 50 µl Hoechst-Färbelösung in einer Verdünnung von 1:1.000 in PBS gefärbt. Dazu wurden die Zellen für 10 min in Dunkelheit inkubiert. Anschließend folgten drei Waschschrte mit je 100 µl PBS, um weiteres nicht adhären Zellmaterial und Farbstoffreste zu

## Methoden

entfernen. Zur Analyse des Assays wurden zuerst unter dem Nikon Eclipse TE2000-S (inverses Epifluoreszenzmikroskop) Aufnahmen in 4-facher und 10-facher Vergrößerung und unter Weißlicht und UV-Licht durchgeführt. Abschließend wurde zur Quantifizierung der Adhäsion die Gesamtfluoreszenz eines Wells mit dem Tecan SPARK® Mikroplaterreader und der Tecan SPARKCONTROL-Software analysiert (Anregung: 360 nm, Emission: 490 nm).

### **3.7.2 Ex vivo-Assay zum Einfluss von Vitronectin auf das Bindungsverhalten von Photorezeptoren aus porcinen Netzhäuten**

#### **3.7.2.1 Präparation neuronaler Zellen aus porciner Netzhaut**

Frische Schweineaugen wurden am Präparationstag bei einem lokalen Schlachthaus beschafft und die Präparation unter sterilen und biologisch sicheren Bedingungen unter einem Abzug durchgeführt. Jedes einzelne Auge wurde in einem ersten Schritt von überschüssigem Bindegewebe, Fettgewebe und Muskulatur befreit und dann für 60 s in 70 %-igem Ethanol sterilisiert. Danach wurde mit einem Skalpell (Feather Skalpell No. 11) eine Stichinzision 3-4 mm hinter dem Limbus des Auges durchgeführt und der Bulbus oculi mit einer Schere eröffnet. Der Glaskörper wurde entnommen und dann mit einer dünnen Pinzette die Netzhaut vorsichtig und ohne die darunterliegende RPE-Zellschicht zu beschädigen vollständig aus dem hinteren Augenbecher herausgetrennt. Die gesammelten Netzhäute wurden einzeln in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und direkt auf Eis gestellt. Zu den Geweben wurden je 1 ml RPMI-Medium + 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin + 0,4 % (v/v) Gentamicin gegeben, die Netzhäute anschließend durch kräftiges Auf- und Abpipettieren zerkleinert und die Zellen so mechanisch voneinander dissoziiert (nach Ivanova *et al.*, 2013). Es folgte eine Inkubationszeit von einer Stunde bei 37 °C unter leichtem Schütteln auf einem Heizblock (Thermomixer compact).

#### **3.7.2.2 Adhäsions-Assay mit neuronalen Zellen aus porciner Netzhaut**

Zur Aussaat der Zellen für den Adhäsions-Assay wurden die Zellsuspensionen noch einmal gut durchmischt und dann mit RPMI-Medium (siehe oben) im Verhältnis 1:20 verdünnt. 100 µl dieser Lösungen wurden in je ein Well einer 96-Well-Zellkulturplatte pipettiert und mit Vitronectin-Eluaten versetzt, sodass eine Vitronectin-Konzentration

## Methoden

von 6 µg/ml erreicht wurde, bzw. mit der gleichen Menge an Kontrolleluat (siehe 3.5.4). Der Assay wurde in Duplikaten je Behandlung durchgeführt. Die Zellen wurden schließlich für 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen unter den exakt gleichen Bedingungen wie in Punkt 3.7.1 beschrieben weiterbehandelt und analysiert. Zur statistischen Analyse wurden vier zusätzliche unabhängige Replikate von Frau Fabiola Biasella, naturwissenschaftlicher Doktorandin am Institut für Humangenetik der Universität Regensburg, miteinbezogen.

### **3.8 Funktionelle Versuche zum Einfluss der Vitronectin-Varianten auf die Zellhomöostase von Photorezeptoren unter oxidativem Stress**

#### **3.8.1 MTT-Assay**

##### **3.8.1.1 Etablierung der Versuchsbedingungen für den MTT-Assay**

Für den MTT-Assay (nach Mosmann, 1983) zur Analyse der Zellviabilität der Weri-Rb1-Zellen wurden diese, wie in 3.1.2 und 3.2 beschrieben, kultiviert und ausgezählt. Für den Versuch wurden 1 Mio. Zellen pro Well auf eine vorher für eine Stunde mit Poly-L-Lysin beschichtete 24-Well-Zellkulturplatte ausgesät. Nach einer 24-stündigen Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde das alte Medium abgenommen, die Zellen mit 200 µl PBS gewaschen und mit 250 µl frischem RPMI 1640 Medium + 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin versetzt. Zwischenzeitlich wurden Verdünnungsreihen von 34 %-igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 M) in FCS-freiem Zellmedium hergestellt, sodass Lösungen zu je 15 mM, 30 mM, 60 mM, 90 mM, 150 mM, 200 mM, 300 mM und 500 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entstanden. Von diesen wurden dann je 2,5 µl auf die Zellen gegeben, wodurch sich eine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration von 0,15 mM, 0,3 mM, 0,6 mM, 0,9 mM, 1,5 mM, 2 mM, 3 mM und 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in den Wells ergaben. Die 24-Well-Platte wurde für 2 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Inkubator platziert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde erneut ein Mediumwechsel vollzogen (siehe oben) und die Zellen für 18 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Am nächsten Tag wurde das MTT-Reagenz hergestellt (siehe **Tabelle 12**) und 5 ml dieser Lösung in 45 ml RPMI 1640 Medium + 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin verdünnt. Von den behandelten Zellen wurde das alte Medium abgenommen und mit 1 ml PBS gewaschen. Danach wurde den Zellen 1 ml der verdünnten MTT-Lösung

## Methoden

zugegeben und für mindestens 30 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Zellen wurden danach unter dem Mikroskop (Leica DM IL 090135.001) auf ihre blau-violette Anfärbung kontrolliert. Bei ausreichend starker Färbung wurden die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend mit 200 µl 0,1 M HCl-Isopropanol-Lösung versetzt. Nach einer Inkubation für 10 min bei RT unter leichtem Schütteln auf dem Heidolph Titramax 101 Shaker wurden 100 µl jeder Probe entnommen und in eine 96-Well-Zellkulturplatte mit schwarzem Rahmen überführt. Zusätzlich wurden 100 µl HCl-Isopropanol-Lösung als Negativkontrolle in Mess-Wellen pipettiert. Die Messung der Absorption bei 540 nm erfolgte in Duplikaten mit dem Tecan SPARK® Mikroplaterereader und wurde mit der Tecan SPARKCONTROL-Software analysiert. Nach Auswertung der Ergebnisse wurde eine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration von 0,15 mM als geeignete Konzentration für die folgenden Versuche mit rekombinantem Vitronectin bestimmt.

### **3.8.1.2 Durchführung des MTT-Assays mit rekombinantem Vitronectin bei oxidativem Stress mit 0,15 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Die Weri-Rb1-Zellen wurden, wie unter Punkt 3.8.1.1 beschrieben, ausgesät. Nach der 24-stündigen Inkubation und den Waschschritten mit Mediumwechsel wurden den Zellen die Vitronectin-Eluate zugefügt, sodass in den Wells eine Vitronectin-Konzentration von 1,5 µg/ml erreicht wurde. Schließlich wurden zusätzlich 2,5 µl des 15 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hinzugefügt, sodass im Well eine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration von 0,15 mM erreicht wurde. Nach Zufuhr des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fanden alle weiteren Schritte und die Analysen nach dem in Punkt 3.8.1.1 beschriebenen Procedere statt.

### **3.8.2 Untersuchung der Apoptose-Induktion an Weri-Rb1 mittels Tunel-Assay**

Für den Tunel-Assay zur Untersuchung der Apoptose-Induktion an Weri-Rb1-Zellen wurde zunächst eine 24-Well-Zellkulturplatte mit Deckgläschen-Inserts eines Durchmessers von 7 mm ausgestattet und für 1 h mit Poly-L-Lysin beschichtet. Wie unter Punkt 3.8.1.1 beschrieben, wurden nun 2 Mio. Weri-Rb1-Zellen pro Well ausgesät. Die weitere Behandlung, Vitronectin-Zugabe und Durchführung des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stresses mit 0,15 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> erfolgte, wie unter Punkt 3.8.1.2 beschrieben.

Zur Ermittlung der Apoptoseinduktion wurde der Tunel-Assay mit dem In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein (Roche) nach Herstellerangaben durchgeführt. Nach

## Methoden

Abzug des Mediums und drei Waschrissen mit je 400 µl PBS wurden die Zellen mit 200 µl der Fixierungslösung (4 % PFA) bei RT für eine Stunde inkubiert. Es folgte ein Waschschriff mit 400 µl PBS. Danach wurden 20 µl der Permeabilitätslösung auf die Zellen pipettiert und für 2 min auf Eis inkubiert. Die Reaktionslösung wurde aus 180 µl *label solution* und 20 µl *enzyme solution* gemischt. Die Arbeiten wurden in einem abgedunkelten Raum durchgeführt. Die Inkubation erfolgte in einem Inkubator für Bakterien bei 37 °C (Mettler GmbH). Für die Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI wurden nach dreimaligem Waschen der Zellen 400 µl 1x PBS und 200 µl der DAPI-Lösung (siehe **Tabelle 11**) in einer Verdünnung von 1:1.000 in Antikörperlösung 4 (siehe **Tabelle 12**) auf die Zellen gegeben und für 20 min bei RT unter langsamem Schwenken (Heidolph Duomax 1030) inkubiert. Anschließend wurden die Proben dreimal mit 400 µl PBS gewaschen. Die Deckgläschen wurden darauf vorsichtig mithilfe einer Pinzette aus den Wells gehoben, um sie dann, mit der zellbewachsenen Oberfläche nach unten, auf einen luftblasenfreien Tropfen Dako Eindeckmedium auf einem Objektträger zu setzen. Die Lagerung der Proben erfolgte bei 4 °C in Dunkelheit bis zum Aushärten des Eindeckmediums (drei bis vier Tage). Die mikroskopische Analyse der eingefärbten Zellproben wurde mit dem Zeiss Fluoreszenzmikroskop Axioskop 2 mot plus in 20-facher Vergrößerung durchgeführt. Die Auswertung erfolgte automatisiert mit der ImageJ-Software. Dabei wurden die Flächen der Tunel-positiven Zellkerne mit der Gesamtfläche aller DAPI-positiven Zellkerne auf den einzelnen Mikroskopbildern verglichen. In der ImageJ-Software wurden für die Flächenberechnung Signalgrenzwerte von 50-255 festgelegt, und nur Signale in diesem Bereich ausgewertet.

### 3.8.3 Autophagie-Assay an Weri-Rb1-Zellen

Zur Untersuchung der Zellautophagie in Weri-Rb1-Zellen wurden die Zellen, wie unter den Punkten 3.1.2 und 3.2 beschrieben, kultiviert und gezählt und dann 2 Mio. Zellen pro Well auf Poly-L-Lysin beschichteten 24-Well-Zellkulturplatten ausgesät. Nach einer Inkubation über Nacht (siehe 3.8.1.1) wurde den Zellen Vitronectin und 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugefügt (nach Szatmári-Tóth *et al.*, 2016). Nach 2 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde die Autophagie-Induktion untersucht. Hierfür wurde der Überstand abgenommen und die Wells mit 500 µl PBS aufgefüllt. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis. Die Zellen wurden mit einem Zellspatel mechanisch von der Well-Oberfläche

## Methoden

gelöst und durch Auf- und Abpipettieren suspendiert. Die Zellsuspension wurde dann in 2 ml Reaktionsgefäße überführt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 5 min bei 4.000 x g und 4 °C (Zentrifuge Biofuge fresco). Anschließend wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet in 120 µl PBS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann mit dem Vibra Cell VCX400 bei 38 % Amplitude für 15 s sonifiziert. Die Proben wurden danach mit 30 µl 5x Lämmli-Puffer bei 93 °C für 5 min aufgekocht. Die Analyse des Versuchs erfolgte über Western-Blot mit Antikörpern gegen die Autophagiemarker p62 und LC3 (I) und (II), sowie gegen ACTB als Housekeeper (Antikörperlösungen und -Verdünnungen siehe **Tabelle 6** und **Tabelle 12**).

### 3.8.4 Signalwegsinduktion an Weri-Rb1-Zellen

Um die Signalwegsinduktion in Weri-Rb1 nach oxidativem Stress zu untersuchen wurden die Zellpellets aus dem Autophagieversuch in Punkt 3.8.3 verwendet. Die Analyse der Signalwegsinduktion erfolgte über Western-Blots mit Antikörpern gegen ERK1/2 und phosphoryliertes ERK1/2, AKT und phosphoryliertes AKT, sowie gegen FAK und phosphoryliertes FAK (Antikörperlösungen und -Verdünnungen siehe **Tabelle 6** und **Tabelle 12**).

## 3.9 Funktionelle Versuche zum Einfluss der Vitronectin-Varianten auf die Phagocytose durch hiPSC-RPE-Zellen

### 3.9.1 Isolation von Außensegmenten porciner Photorezeptoren

Zur Vorbereitung der Isolation von Photorezeptor-Außensegmenten (nach Brandl *et al.*, 2014) wurden am Vortag 100 mM Taurinpuffer hergestellt. Außerdem wurde eine 60 %-ige Sucrose-Lösung vorbereitet (beides siehe **Tabelle 12**). Am Isolationstag selbst wurden zunächst in 50 ml Falcontubes je 24 ml Sucrose-Gradientenlösungen (20 bis 60 %) aus Taurin-Puffer und der 60 %-igen Sucrose-Lösung hergestellt (**siehe Tabelle 24**).

## Methoden

**Tabelle 24: Auflistung der Komponenten für die Gradientenlösungen entsprechender Konzentration und die dafür benötigten Mengen.**

<b>Konzentration (in %)</b>	<b>Taurin-Puffer (100 mM)</b>	<b>Sucrose-Lösung (60 %)</b>
20	16 ml	8 ml
27	13,2 ml	10,8 ml
33	10,8 ml	13,2 ml
41	7,6 ml	16,4 ml
50	4 ml	20 ml
60	-	24 ml

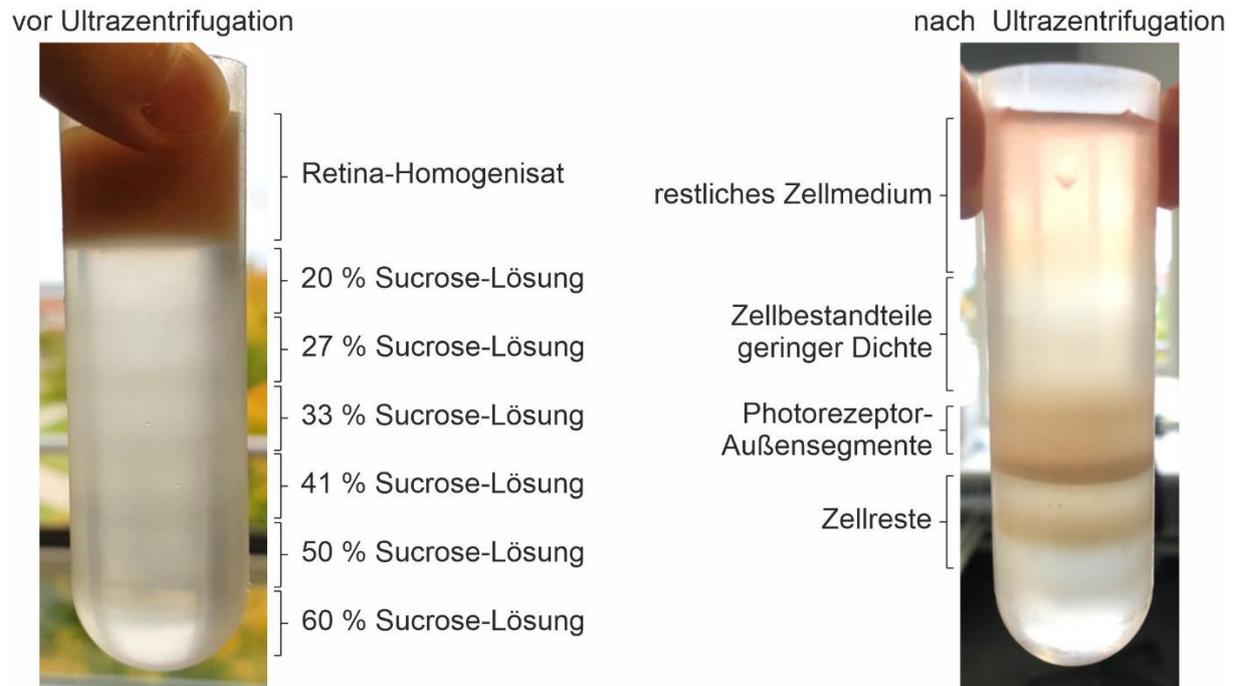
Zusätzlich wurde eine 20 %-ige Sucrose-Inhibitor-Lösung hergestellt, indem in einem 50 ml Falcontube eine 20 %-ige Sucrose-Lösung mit 2,5 µl eines Protease-Inhibitors (1x cOmplete™-Puffer) versetzt wurde.

Frische Schweineaugen wurden aus einem lokalen Schlachthaus bezogen und aus diesen 25 Netzhäute wie unter 3.7.2.1 beschrieben präpariert, welche dann für das weitere Vorgehen kontinuierlich auf Eis gehalten wurden. Die Sammelgefäße für die Netzhäute wurden mit 20 %-iger Sucrose-Inhibitor-Lösung ausgespült und die Netzhäute samt 20 %-iger Sucrose-Inhibitor-Lösung in ein 50 ml Falcontube überführt. Sie wurden mit 20 %-iger Sucrose-Inhibitor-Lösung auf ein Gesamtvolumen von 40 ml aufgefüllt und gut durchmischt. Je 10 ml wurden auf kleinere 15 ml Falcontubes verteilt, um eine bessere mechanische Zerkleinerung der Gewebestücke durch Auf- und Abpipettieren zu ermöglichen. War aus den Gewebestücken in Sucrose-Inhibitor-Lösung eine homogene Suspension entstanden, wurde diese wieder in einem großen Falcontube vereinigt, anschließend durch die Gewebeporen einer gedoppelten Mullbinde filtriert und auf Eis gelagert.

In der Zwischenzeit wurden 5 ml der Gradientenlösungen mit einer 5 ml Spritze und langer Kanüle (Subkutannadel, 20 G, 120 mm) aufgezogen und in die Zentrifugenröhrchen (Open-Top Thinwall Ultra-Clear Tube, 38,5 ml) gegeben. Es wurde mit der 20 %-igen Gradientenlösung begonnen. Die nächsthöher konzentrierte Lösung (27 %) wurde dann aufgezogen und durch einen geraden Stich bis zum Röhrchenboden unter die 20 %-ige Lösung gespritzt. Mit der 33 %-igen Lösung und Weiteren wurde genauso verfahren, sodass letztendlich ein Gradient aus 20 %-iger Lösung (ganz oben) bis zu 60 %-iger Lösung (ganz unten) entstand. 10 ml des Retina-Homogenisats wurden

## Methoden

dann vorsichtig auf die Gradientenlösung aufpipettiert (siehe **Abbildung 5**, links). Im Anschluss wurde bei 23.000 x g für 2 h zentrifugiert (Optima™ L-90K Ultrazentrifuge, SW40 Swing-out Rotor). Die Photorezeptoren-Außensegmente sind als dunkelbraune Bande bei ca. 40 % Sucrose zu erkennen (**Abbildung 5**, rechts).



**Abbildung 5: Fotografien der Ultrazentrifugationsröhrchen während der Aufreinigung von Photorezeptor-Außensegmenten, vor (links) und nach (rechts) dem Zentrifugationsschritt.**

Die linke Bildhälfte zeigt das Beladungsschema der Röhrchen, die höchst-konzentrierte Sucrose-Lösung befindet sich ganz unten, die mit der niedrigsten Konzentration ganz oben. Die Schichtung ist durch die unterschiedliche Lichtbrechung der Lösungen zu erkennen. Die rechte Bildhälfte zeigt die Auftrennung verschiedener Netzhautfraktionen entsprechend ihrer Dichte im Sucrose-Gradienten.

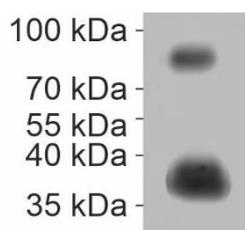
Nach der Zentrifugation wurden die isolierten Photorezeptor-Außensegmente mit einer 10 ml Spritze und Einmalkanülen (20 G) aus der Gradientenlösung abgesaugt und in 2 ml Reaktionsgefäße überführt. Es folgte eine Zentrifugation bei 13.000 x g für 5 min bei 4 °C (Zentrifuge Biofuge fresco). Der Überstand wurde abgenommen und noch einmal unter gleichen Einstellungen zentrifugiert, um zunächst nicht abzentrifugierte Photorezeptor-Außensegmentreste aus den Überständen einzusammeln. Die Pellets aus der zweiten Zentrifugation werden in insgesamt 1 ml OptiMEM™ Medium mit dem Pellet der ersten Zentrifugation resuspendiert, vereinigt und auf Eis gestellt.

## Methoden

Nun wurde das gesamte Volumen (1 ml) eines Reaktionsgefäßes gut auf- und abpipettiert und zum Pellet eines anderen Reaktionsgefäßes hinzugegeben und gut resuspendiert. Die Suspension wurde dann zu einem dritten Pellet hinzugegeben. Das erste geleerte Reaktionsgefäß wurde mit 1 ml OptiMEM™ befüllt und ausgespült, die Spüllösung in das zweite geleerte Reaktionsgefäß übertragen, erneut ausgespült und dann in das dritte Reaktionsgefäß zur Suspension auf ein Gesamtvolumen von 2 ml gegeben. Die Gesamtzahl der Reaktionsgefäße reduziert sich dabei auf ein Drittel der anfänglichen Menge. Die Reaktionsgefäße wurden erneut bei 13.000 x g für 5 min und bei 4 °C (Zentrifuge Biofuge fresco) zentrifugiert, der Überstand abgenommen und 1 ml OptiMEM™ in ein Reaktionsgefäß gegeben, sodass ein zweiter Waschgang analog dem ersten folgen konnte. Nach einem zweiten Zentrifugationsschritt schloss sich ein dritter Waschschritt an. Die Lagerung der fertig aufgereinigten Photorezeptor-Außensegmente erfolgte bei -81 °C.

### 3.9.2 Erfolgskontrolle und Konzentrationsbestimmung der Photorezeptor-Außensegmente für funktionelle Versuche

Um die Aufreinigung der Photorezeptor-Außensegmente zu überprüfen, wurde eine SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot unter Verwendung des Rho1D4 Primärantikörpers mit 20 µl Photorezeptor-Außensegmenten in 12,5 %-igen SDS-PAGE-Gelen durchgeführt. Bei erfolgreicher Aufreinigung wurden zwei Banden beobachtet: Die obere reflektiert die 74 kDa schweren Dimere der Rhodopsin-Moleküle, die untere Bande entspricht den 37 kDa Monomeren (siehe **Abbildung 6**). Um die Protein-Konzentration der isolierten Photorezeptor-Außensegmente zu bestimmen, wurde ein Protein-Assay nach Bradford (Bradford, 1976), wie in 3.5.7 beschrieben, durchgeführt. Es wurden 18 µl der Photorezeptor-Außensegmente-Probe eingesetzt. Die Ergebnisse dreier unabhängiger Messungen wurden gemittelt.



**Abbildung 6: Western-Blot Analyse zur Qualitätskontrolle der Aufreinigung der Photorezeptor-Außensegmente.**

Nach Aufreinigung der Photorezeptor-Außensegmente wurde die Fraktion einer Western-Blot Analyse mit Antikörpern gegen Rhodopsin (Rho1D4) durchgeführt.

### 3.9.3 Phagocytose-Assay an hiPSC-RPE-Zellen

Um den Einfluss von Vitronectin auf die Phagocytose durch hiPSC-RPE-Zellen testen zu können, wurde das bestehende Protokoll zu hiPSC-RPE Phagocytose-Assays (Brandl *et al.*, 2014) mit Modifikationen übernommen.

Zur Vorbereitung der Versuchsdurchführung wurde die Probe der Photorezeptor-Außensegmente auf Eis aufgetaut und die benötigte Menge (siehe unten) in einem 2 ml Reaktionsgefäß mit Zellmedium auf 1 ml aufgefüllt. Wie bei Westenskow und Kollegen (Westenskow *et al.*, 2012) beschrieben, wurden 4 µg Photorezeptor-Außensegmente pro Quadratcentimeter hiPSC-RPE verfüttert, was bei einer Größe, der von uns benutzten Transwellfilter von 1,113 cm<sup>2</sup> und einer Photorezeptor-Außensegment-Konzentration von 103,03 µg/ml bei 43 µl Einsatzvolumen pro Well etwa 20 Photorezeptor-Außensegmenten pro Zelle entspricht. Dieser Wert wird in der bekannten Literatur als physiologischer Photorezeptor-Außensegment-Uptake pro Tag gewertet (Singh, Phillips, *et al.*, 2013; Singh, Shen, *et al.*, 2013; Dalvi *et al.*, 2019). Die Photorezeptor-Außensegment-Lösung wurde dann für 5 min bei 10 %-iger Amplitude und RT in ein Ultraschallbad (Sonorex™ Super 10P) gegeben. Danach wurde die Photorezeptor-Außensegment-Lösung durch einen 5 µm cell-Strainer filtriert. Der cell-Strainer wurde mit Medium nachgespült und die filtrierten Photorezeptor-Außensegmente auf 4,5 ml Gesamtvolumen aufgefüllt.

Bei dem verwendeten Zellkulturmedium handelte es sich um KnockOut™ DMEM Zellkulturmedium mit KnockOut™ DMEM Medium + 2 mM L-Glutamin + 5 % (v/v) KnockOut™ Serum Replacement + 0,1 mM Gibco™ MEM Non-Essential Amino Acids Solution + 0,1 mM β-Mercaptoethanol + 5 µg/ml Gentamicin + 10 mM Nicotinamid. Im Gegensatz zum Originalprotokoll wurde dabei auf KnockOut™ Serum Replacement verzichtet, um den Effekt von im Serum enthaltenen Vitronectin oder ähnlichen wirkenden Serumproteinen auf die hiPSC-RPE-Zellen auszuschließen.

Wie im Originalprotokoll wurden für die Versuche mindestens sechs Wochen alte hiPSC-RPE-Zellen benutzt. Vor Versuchsbeginn wurden die Zellen mikroskopisch (Leica DM IL 090135.001) überprüft. Den hiPSC-RPE-Zellen, die wie unter Punkt 3.1.3 beschrieben kultiviert wurden, wurde das alte Medium abgenommen. Die Zellen wurden mit 250 µl PBS auf bzw. mit 1 ml PBS unter dem Filter gewaschen. Jedes Well wurde dann mit 1 ml frischem Zellkulturmedium befüllt, der Filter blieb zunächst leer.

## Methoden

Für jeden Ansatz wurde nun eine Suspension aus 500 µl der Photorezeptor-Außensegment-Lösung und Vitronectin- bzw. Kontroll-Eluaten (Vitronectin-konzentration in Photorezeptor-Außensegment-Lösung: 1,5 µg/ml) vorbereitet. Hierfür wurden 30 µl abgenommen und als Input-Proben analysiert. Die Input-Proben wurden auf Eis gelagert und später mit 6 µl 5x Lämmli-Puffer vermischt. Nach kurzem Aufkochen für 5 min bei 93 °C, wurden die Proben bei -20 °C gelagert. Die restliche Mischung (470 µl) wurde auf je einen Transwell-Filter mit hiPSC-RPE gegeben.

Im Anschluss fand eine Inkubation der Zellen mit den Photorezeptor-Außensegmenten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> statt. Die Analyse der Photorezeptor-Außensegment-Aufnahme durch die hiPSC-RPE-Zellen erfolgte 2 h nach Zufuhr der Photorezeptor-Außensegmente (Zeitpunkt 0 h), 4 h nach Zufuhr der Photorezeptor-Außensegmente (Zeitpunkt 2 h) und 6 h nach Zufuhr der Photorezeptor-Außensegmente (Zeitpunkt 4 h).

Nach Ablauf von 2 h wurde das Medium auf den Zellfiltern abgenommen und jeder Filter dreimal mit 1 ml 1x PBS gewaschen, um überschüssige Photorezeptor-Außensegmente zu entfernen. Die ersten Proben wurden dann geerntet (Zeitpunkt 0 h), die restlichen Filter wurden wieder mit 500 µl Medium und Vitronectin-Eluaten auf eine Konzentration von 1,5 µg/ml befüllt und unter den gleichen Bedingungen wie vorher inkubiert, bevor nach weiteren 2 h (Zeitpunkt 2 h) oder 4 h (Zeitpunkt 4 h) auch die restlichen Zellen geerntet wurden.

Für die Zellernte wurden den Filtern 200 µl cOmplete™-Puffer zugegeben, die Zellen dann mechanisch mit einer Pipettenspitze von den Filtern gelöst, und durch Auf- und Abpipettieren suspendiert. Anschließend wurden die Proben in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und für 5 min bei 4.600 x g und 4 °C zentrifugiert (Zentrifuge Biofuge fresco). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Zellpellet mit 150 µl 1x cOmplete™-Puffer resuspendiert. Danach folgte bei 38 %-iger Amplitude eine Sonifizierung der Zellen für 10 s (Vibra Cell VCX400). Die Proben wurden mit 30 µl 5x Lämmli-Puffer versetzt und bei 93 °C für 5 min aufgekocht. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

### **3.9.4 Western-Blot Analyse der Photorezeptor-Außensegment-Aufnahme und der Aktivierung intrazellulärer Signalwege**

Die Photorezeptor-Außensegment-Aufnahme und die Aktivierung intrazellulärer Signalwege wurden mittels Western-Blot überprüft. Je 10 µl der Input-Proben und 20 µl der Zellproben wurden dafür auf ein 12,5 %-iges SDS-PAGE-Gel gegeben. SDS-PAGE und Western-Blot wurden wie unter den Punkten 3.3 und 3.4 beschrieben durchgeführt. Die Färbung der Blots erfolgte mit Antikörpern gegen Rhodopsin und beta-Aktin zur Beurteilung der Phagozytosevorgänge. Zur Untersuchung der intrazellulären Signalwege wurde mit Antikörpern gegen ERK1/2 und phosphoryliertes ERK1/2, AKT und phosphoryliertes AKT, sowie gegen FAK und phosphoryliertes FAK gefärbt. Die Proben wurden gegen ATP1A1 normalisiert. Eine Vitronectinfärbung wurde durchgeführt, um die Bindung rekombinanten Vitronectins zu untersuchen. Die Auswertung erfolgte, wie unter Punkt 3.4 beschrieben (Antikörperlösungen und -Verdünnungen siehe **Tabelle 6** und **Tabelle 12**).

### **3.10 Statistik**

Die statistischen Berechnungen wurden mit der Excel Statistik-Software XLSTAT ausgewertet. Im ersten Schritt wurde mittels Shapiro-Wilks-Test die Normalverteilung der Ergebnisse überprüft. Normalverteilte Ergebnisse wurden weiter mit dem t-Test untersucht, wenn nicht mehr als zwei zu untersuchende Gruppen vorlagen. Wenn mehr als zwei Gruppen vorhanden waren, wurde der ANOVA-Test mit Tukey's multiple comparison correction verwendet. Ergebnisse ohne Normalverteilung wurden bei zwei zu untersuchenden Gruppen mittels des Wilcoxon-Mann-Whitney Tests untersucht, bei mehr als zwei Gruppen wurde der Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Modifikation und Bonferroni-Korrektur verwendet.

### 4 Ergebnisse

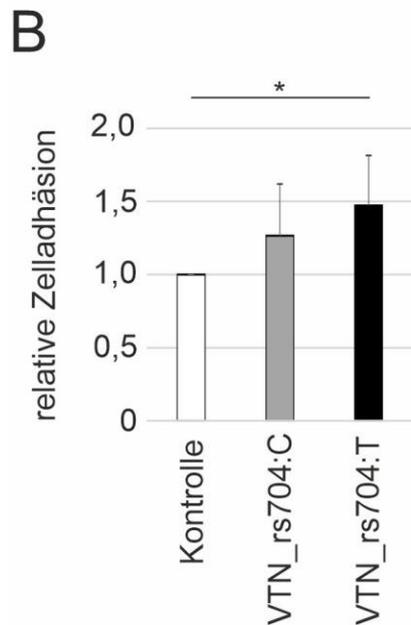
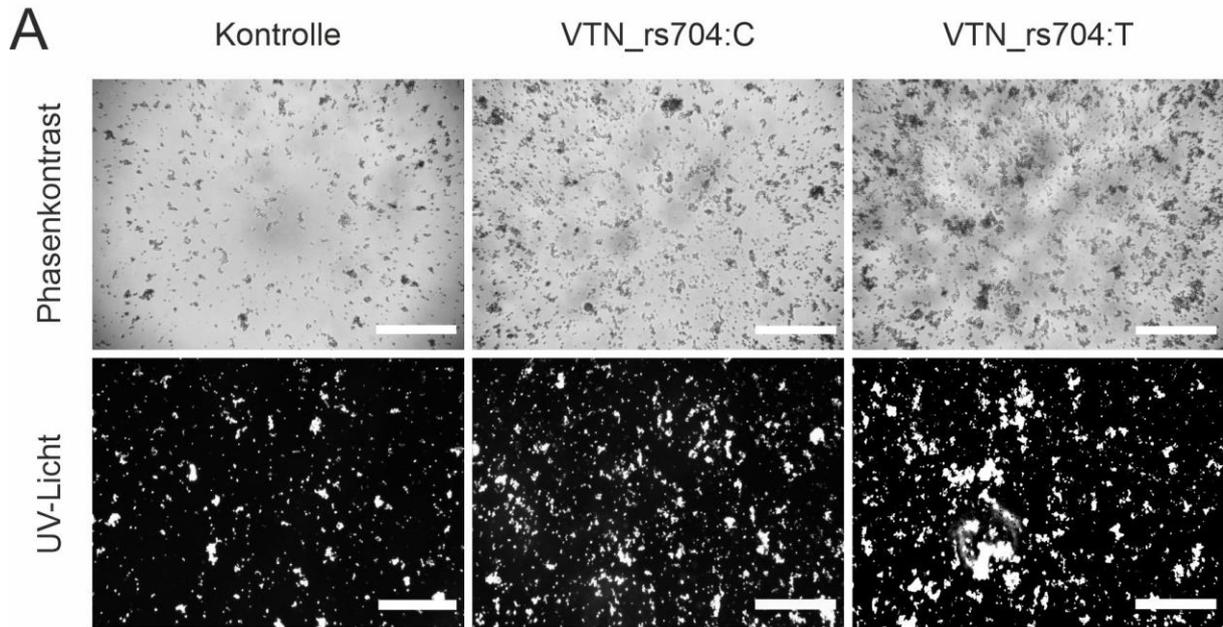
#### 4.1 Effekt von Vitronectin auf die Adhäsion neuronaler retinaler Zellen

Als Teil der Pathogenese der AMD wird die fokale Ablösung der Netzhaut von darunter liegenden Schichten beschrieben (Ardeljan und Chan, 2013; Van Lookeren Campagne *et al.*, 2014). Im Rahmen dieser Arbeit sollte deswegen der Einfluss von Vitronectin auf die Adhäsion retinaler Zellen untersucht werden. Als Modellsystem wurden Weri-Rb1-Zellen gewählt, welche aus humanem Retinoblastom isoliert wurden und ein Photorezeptor-ähnliches Expressionsprofil aufweisen (Di Polo und Farber, 1995; Gustmann, 2009; Xu *et al.*, 2014), sowie dissoziierte Zellen porciner neuronaler Netzhaut, welche in anatomischer und physiologischer Hinsicht große Ähnlichkeit zu menschlichen Netzhäuten besitzt und zu >80 % aus Photorezeptoren besteht (Beauchemin, 1974; Curcio *et al.*, 1990; Chandler *et al.*, 1999; Yan *et al.*, 2020).

##### 4.1.1 Adhäsion von Weri-Rb1-Zellen

Um einen Effekt der Vitronectin-Varianten VTN\_rs704:C (nicht-Risiko-assoziiert) und VTN\_rs704:T (Risiko-assoziiert) auf die Adhäsion von Weri-Rb1-Zellen zu überprüfen, wurden dissoziierte Weri-Rb1 für 4 h mit den aufgereinigten Vitronectin-Varianten (1,5 µg/ml) bzw. dem selben Volumen an Kontroll-Eluat in 96-Well-Platten inkubiert. Nach mehreren Waschschritten wurden adhärenente Zellen mittels Hoechst-Lösung angefärbt. Nach der Anfertigung von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (**Abbildung 7A**) erfolgte eine Messung der Fluoreszenzintensität (**Abbildung 7B**) als Maß für die Zelladhäsion mittels eines Mikroplateraders.

Bei Weri-Rb1-Zellen, die mit Vitronectin behandelt worden waren, zeigte sich gegenüber unbehandelten Zellen ein Anstieg der zellulären Adhäsion. Dies ist sowohl in den mikroskopischen Aufnahmen (**Abbildung 7A**), also auch in der photometrischen Messung (**Abbildung 7B**) zu erkennen. Für die mit VTN\_rs704:C behandelten Proben konnte ein Anstieg von über 25 % im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden. Bei den mit VTN\_rs704:T behandelten Zellen zeigte sich eine noch deutlichere Steigerung um etwa 50 % verglichen mit den Kontrollproben (**Abbildung 7B**), statistisch signifikanter Unterschied zwischen VTN\_rs704:T und Kontrolle:  $p < 0,05$ ). Zwischen den beiden Vitronectin-Varianten konnte kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden.



**Abbildung 7: Einfluss von Vitronectin-Varianten auf die zelluläre Adhäsion von Weri-Rb1-Zellen.**

Dissoziierte Weri-Rb1-Zellen wurden in 96-Well-Zellkulturplatten für 4 h in Gegenwart von aufgereinigtem VTN\_rs704:C und VTN\_rs704:T (je 1,5 µg/ml) bzw. demselben Volumen des Kontrolleluats inkubiert. Nach mehreren Waschschritten folgte eine quantitative Auswertung adhärenter Zellen. Hierfür wurden die Zellen mit Hoechst-Lösung angefärbt. Im Anschluss erfolgten **A)** Phasenkontrast- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen in 4-facher Vergrößerung, Skalierung 500 µm, sowie **B)** photometrische Messungen zur Ermittlung der Gesamtfluoreszenz adhärenter Zellen im Mikroplaterereader. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus acht unabhängigen Replikaten, kalibriert auf die Kontrolle. Eine statistische Evaluierung erfolgte mittels Kruskal-Wallis Test, gefolgt von Dunn's-Post Modifikation mit Bonferroni-Korrektur. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch Sternchen gekennzeichnet ( $p < 0,05$ ).

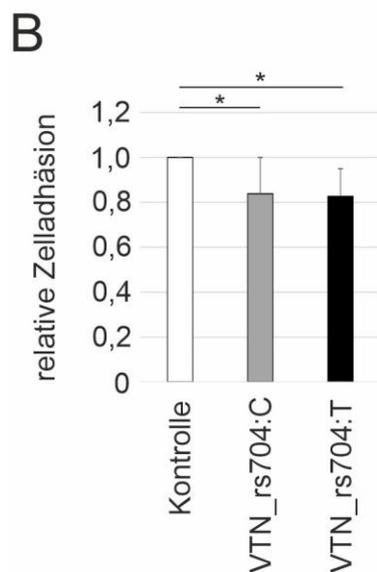
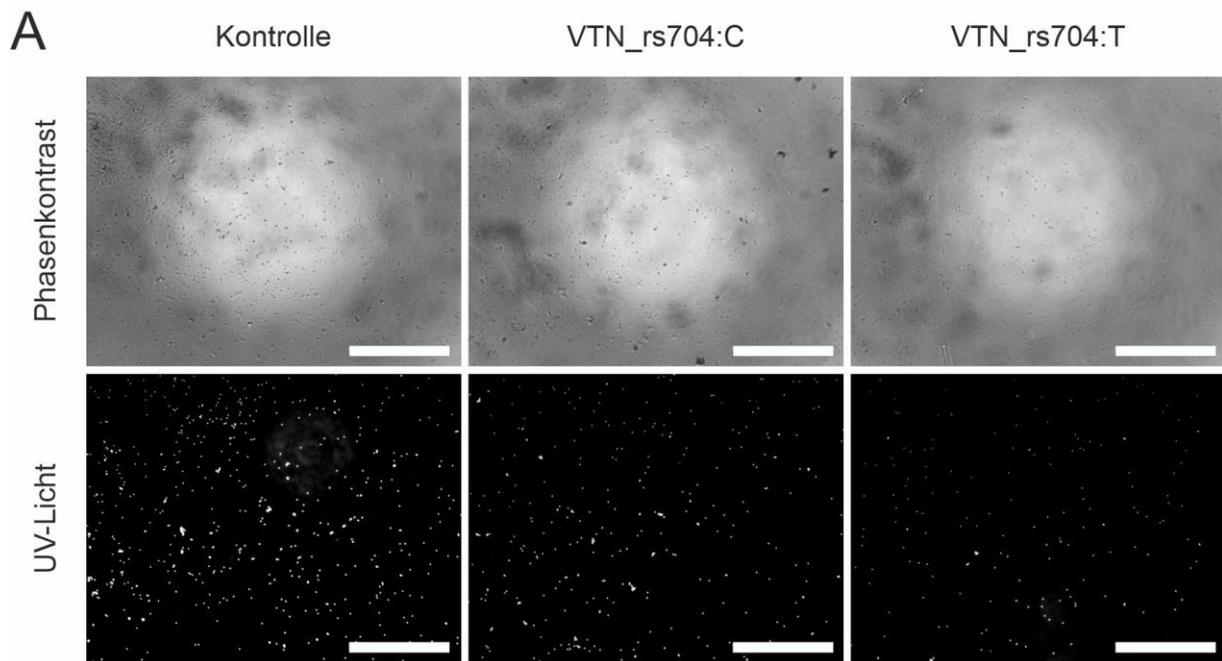
#### 4.1.2 Assoziation von dissoziierten Zellen neuraler Schweine-Netzhäute

Dissoziierte Zellen porciner Netzhäute wurden in 96-Well-Zellkulturplatten für 24 h mit 6 µg/ml VTN\_rs704:C, VTN\_rs704:T bzw. mit dem selben Volumen an Kontrolleluat inkubiert. Nach mehreren Waschschritten wurden adhärenere Zellen mittels Hoechst-Lösung angefärbt und einer quantitativen Analyse über Fluoreszenzmikroskopie (**Abbildung 8A**) bzw. photometrische Messung der Fluoreszenz (**Abbildung 8B**) unterzogen.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen, die für Weri-Rb1-Zellen erhalten wurden, zeigte sich bei porcinen retinalen Zellen, die mit Vitronectin behandelt worden waren,

## Ergebnisse

gegenüber Zellen, die mit Vitronectin-freiem Kontrolleluat behandelt wurden, ein Abfall der zellulären Adhäsion. Für die mit VTN\_rs704:C behandelten Proben konnte eine Verringerung der Adhäsion um 17 % im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Bei den mit VTN\_rs704:T behandelten Zellen zeigte sich eine vergleichbare Abnahme um 18 % verglichen mit den Kontrollproben. Beide Unterschiede erwiesen sich als statistisch signifikant ( $p < 0,05$  zwischen VTN\_rs704:C bzw. VTN\_rs704:T und Kontrolle), zwischen den beiden Vitronectin-Varianten zeigte sich hier jedoch kein Unterschied (**Abbildung 8B**).



**Abbildung 8: Einfluss von Vitronectin-Varianten auf die zelluläre Adhäsion von dissoziierten Zellen neuronaler porciner Netzhaut.**

Dissoziierte Zellen neuronaler porciner Netzhaut wurden in 96-Well-Zellkulturplatten für 24 h in Gegenwart von aufgereinigtem VTN\_rs704:C und VTN\_rs704:T (je 6  $\mu\text{g/ml}$ ) bzw. demselben Volumen an Kontrolleluat inkubiert. Nach mehreren Waschschritten folgte eine quantitative Auswertung adhärenter Zellen. Hierfür wurden die Zellen mit Hoechst-Lösung angefärbt. Im Anschluss erfolgten **A**) Phasenkontrast- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen in 4-facher Vergrößerung, Skalierung 500  $\mu\text{m}$ , sowie **B**) photometrische Messungen zur Ermittlung der Gesamtfluoreszenz adhärenter Zellen im Mikroplaterereader. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus 10 unabhängigen Replikaten, kalibriert auf die Kontrolle. Eine statistische Evaluierung erfolgte mittels Kruskal-Wallis Test, gefolgt von Dunn's-Post Modifikation mit Bonferroni-Korrektur. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch Sternchen gekennzeichnet ( $p < 0,05$ ).

### **4.2 Effekt von Vitronectin auf die Zellhomöostase von Photorezeptoren unter oxidativem Stress**

Die Ursache für den Verlust von Photorezeptoren in der Pathogenese der AMD kann vielfältig sein. Kumulativer oxidativer Stress scheint dabei eine bedeutende Rolle zu spielen (Winkler *et al.*, 1999; Hollyfield, 2010). Deshalb sollte in den folgenden funktionellen Versuchen ein möglicher Effekt von Vitronectin auf AMD-assoziierte Veränderungen der Zellhomöostase unter oxidativem Stress untersucht werden. Dazu gehören Veränderungen der Zellviabilität (Adler *et al.*, 1999), Veränderungen der Apoptose (Cook *et al.*, 1995; Kyosseva, 2016), der Autophagie (Lohr *et al.*, 2006; Kunchithapautham und Rohrer, 2007) und der Aktivierung intrazellulärer Signalwege (Domènech und Marfany, 2020) – alles Prozesse, die auch durch Vitronectin beeinflusst werden (Schvartz, Seger und Shaltiel, 1999; Zhao *et al.*, 2011; Chan *et al.*, 2015; Kyosseva, 2016; Katoh, 2020). Als zelluläres Modellsystem dienten hier erneut Weri-Rb1-Zellen.

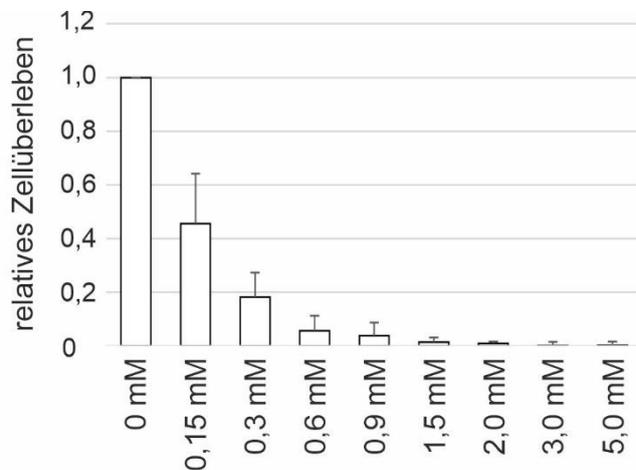
#### **4.2.1 Zellviabilität von Weri-Rb1-Zellen**

Um den Effekt der Vitronectin-Varianten VTN\_rs704:C und VTN\_rs704:T auf das Überleben von Weri-Rb1-Zellen unter oxidativem Stress zu untersuchen, wurde in Vorversuchen in FCS-freiem Medium zunächst die optimale Konzentration von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zur Stressinduktion an Weri-Rb1-Zellen ermittelt. Die Konzentration sollte in einem Bereich liegen, in dem die Zellviabilität so stark betroffen war, dass sowohl bei einem möglicherweise negativen als auch bei einem möglicherweise positiven Effekt von Vitronectin Abweichungen der Zellviabilität nach unten bzw. nach oben zu detektieren wären. Die Zellen sollten nach dem oxidativen Stress also reduzierte, aber nicht vollständig fehlende Zellviabilität aufweisen.

Die Zellen wurden hierfür mit 0,15 mM, 0,3 mM, 0,6 mM, 0,9 mM, 1,5 mM, 2 mM, 3 mM und 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 2 h inkubiert. Im Anschluss wurde ein Mediumwechsel vollzogen und die Zellen konnten für 18 h regenerieren. Zur Ermittlung der Zellviabilität wurde ein MTT-Assay durchgeführt – ein Standardverfahren zur Bestimmung metabolischer Aktivität und damit Viabilität der Zellen, bei dem NAD(P)H-abhängig MTT durch die zelluläre Oxidoreduktase zu seiner unlöslichen, blauen und damit im

## Ergebnisse

Photometer quantifizierbaren Formazan-Form reduziert wird (Riss *et al.*, 2004). Die Ergebnisse sind in **Abbildung 9** dargestellt.



**Abbildung 9: Einfluss von oxidativem Stress auf die Zellviabilität von Weri-Rb1-Zellen.**

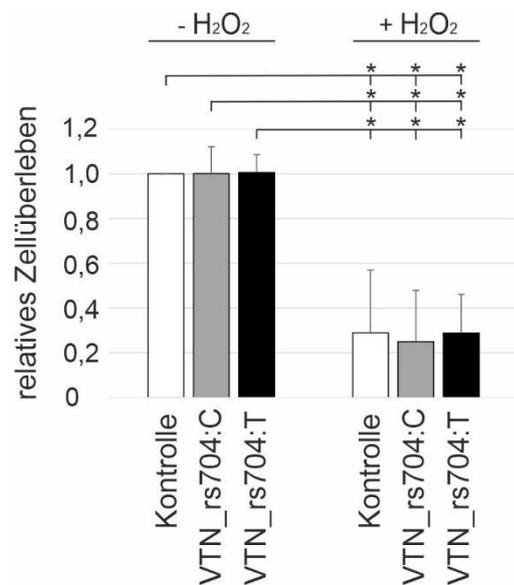
Weri-Rb1-Zellen wurden für 2 h mit 0 mM, 0,15 mM, 0,3 mM, 0,6 mM, 0,9 mM, 1,5 mM, 2,0 mM, 3,0 mM und 5,0 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert und anschließend einer 18-stündigen Regenerationsphase unterzogen. Im Anschluss erfolgte ein MTT-Assay zur Ermittlung der Zellviabilität. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Replikaten, kalibriert auf die Kontrolle. 0,15 mM wurden als ideale H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration für nachfolgende MTT-Assays ermittelt.

Bereits bei einer Konzentration von 0,15 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurde eine Reduktion der relativen zellulären Viabilität der Weri-Rb1-Zellen auf 46 % der Zellen im Vergleich zur unbehandelten Gruppe erzielt. Für weitere Versuche zum Einfluss von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf Zellviabilität und Apoptoserate wurde deswegen eine Konzentration von 0,15 mM genutzt, um oxidativen Stress zu induzieren. Dabei wurde den Weri-Rb1-Zellen zusätzlich 1,5 µg/ml VTN\_rs704:C bzw. VTN\_rs704:T oder dasselbe Volumen an Kontrolleluat zugegeben. Die Induktion von oxidativem Stress und Regeneration erfolgten wie zuvor beschrieben.

Nach Regeneration wiesen die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-behandelten Weri-Rb1-Zellen ein deutlich reduziertes Zellüberleben (ca. 30 %) im Vergleich zur nicht gestressten Kontrollgruppe auf (siehe **Abbildung 10**). Dabei wurden statistisch signifikante Unterschiede zwischen allen nicht-behandelten und allen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-behandelten Zellen ermittelt ( $p < 0,05$ ).

Weder VTN\_rs704:C noch VTN\_rs704:T hatten einen statistisch signifikanten Einfluss auf die Zellviabilität von nicht-behandelten und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle ( $p > 0,05$ ). Darüber hinaus wurde auch kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen VTN\_rs704:C und VTN\_rs704:T in behandelten Proben beobachtet.

## Ergebnisse



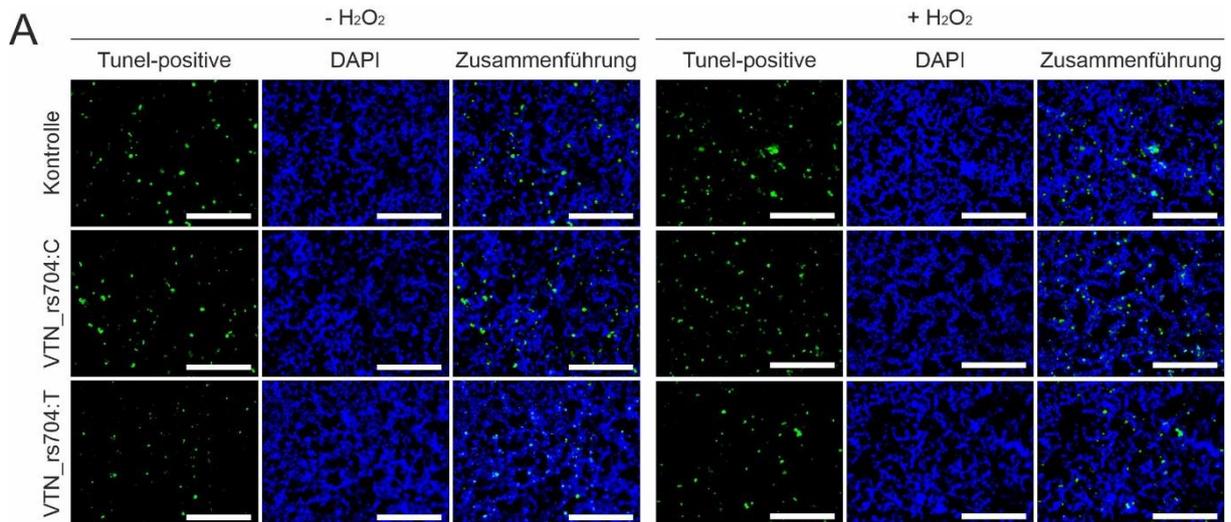
**Abbildung 10: Einfluss von Vitronectin-Varianten auf die Zellviabilität von Weri-Rb1-Zellen nach oxidativem Stress.**

Weri-Rb1-Zellen wurden in Gegenwart von aufgereinigtem VTN\_rs704:C und VTN\_rs704:T (je 1,5 µg/ml) bzw. demselben Volumen an Kontrolleluat für 2 h in Gegenwart von 0 (-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) bzw. 0,15 mM (+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert und anschließend einer 18-stündigen Regenerationsphase unterzogen. Im Anschluss erfolgte ein MTT-Assay zur Ermittlung der Zellviabilität. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus neun unabhängigen Replikaten, kalibriert auf die Kontrolle. Eine statistische Evaluierung erfolgte mittels Kruskal-Wallis Test, gefolgt von Dunn's-Post Modifikation mit Bonferroni-Korrektur. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch Sternchen gekennzeichnet (p < 0,05).

### 4.2.2 Apoptose-Induktion in Weri-Rb1-Zellen

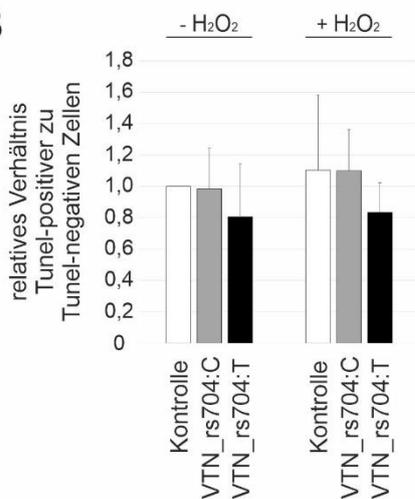
Um einen möglichen Effekt der Vitronectin-Varianten VTN\_rs704:C und VTN\_rs704:T auf die Apoptose-Induktion nach oxidativem Stress zu untersuchen, wurden Weri-Rb1-Zellen wie zuvor für den MTT-Assay mit 0,15 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 1,5 µg/ml VTN\_rs704:C oder VTN\_rs704:T bzw. demselben Volumen an Kontrolleluat inkubiert und anschließend einer 18-stündigen Regenerationsphase, ebenfalls in Gegenwart von Vitronectin bzw. Kontrolleluat unterzogen. Im Anschluss wurde zur Detektion von DNA-Strangbrüchen, die bei der Apoptose entstehen, ein Tunel-Assay durchgeführt. Hierbei werden die Strangbrüche an den Enden der Nukleinsäuremoleküle (terminale „nick-ends“) in einer enzymatischen Reaktion mit Hilfe der terminalen Deoxynukleotidyl-Transferase (TDT) mit fluoreszierenden Nukleotiden (dUTPs) markiert (TDT dUTP nick end labeling = Tunel) (nach Gavrieli, Sherman und Ben-Sasson, 1992). Diese Tunel-positiven Zellen wurden nach fluoreszenzmikroskopischer Aufnahme mit Hilfe der ImageJ-Software quantifiziert (siehe **Abbildung 11**).

## Ergebnisse



**B**

**Abbildung 11: Einfluss von Vitronectin-Varianten auf die Apoptose-Induktion in Weri-Rb1-Zellen nach oxidativem Stress.**



Weri-Rb1-Zellen wurden in Gegenwart von aufgereinigtem VTN\_rs704:C und VTN\_rs704:T (je 1,5 µg/ml) bzw. demselben Volumen an Kontrolleluat für 2 h in Gegenwart von 0 (-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) bzw. 0,15 mM (+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert und anschließend einer 18-stündigen Regenerationsphase unterzogen. Im Anschluss erfolgte ein Tunel-Assay zur Visualisierung apoptotischer Zellkerne, sowie DAPI-Färbung zur Visualisierung aller Zellkerne. **A)** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme bei 20-facher Vergrößerung, Skalierung: 200 µm. **B)** Die Fläche Tunel-gefärbter Zellkerne, sowie die aller DAPI-gefärbter Zellkerne wurde mittels ImageJ bestimmt. Im Anschluss wurde der Anteil der Tunel-gefärbten Zellkerne an den gesamten Zellkernen errechnet. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Replikaten, kalibriert auf die Kontrolle ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung. Eine statistische Evaluierung erfolgte mittels Kruskal-Wallis Test, gefolgt von Dunn's-Post Modifikation mit Bonferroni-Korrektur.

Bei den mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelten Weri-Rb1-Zellen zeigte sich im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ein leichter Anstieg der Tunel-positiven Zellen um ca. 10 %, welcher jedoch nicht statistisch signifikant war. Die mit VTN\_rs704:C behandelten Zellen verhielten sich dabei gleich zu den Kontroll-Zellen. Die Weri-Rb1-Zellen, die mit VTN\_rs704:T behandelt worden waren, zeigten jedoch sowohl in den unter oxidativem Stress stehenden Proben, als auch in der nicht mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelten Gruppe eine um ca. 20 % niedrigere Apoptoserate (p >0,05).

### 4.2.3 Autophagie-Induktion in Weri-Rb1-Zellen

Um einen weiteren Aspekt des oxidativen Stresses in der Pathogenese der AMD zu untersuchen, wurde der Einfluss der Vitronectin-Varianten auf durch oxidativen Stress induzierte Autophagie-Prozesse untersucht.

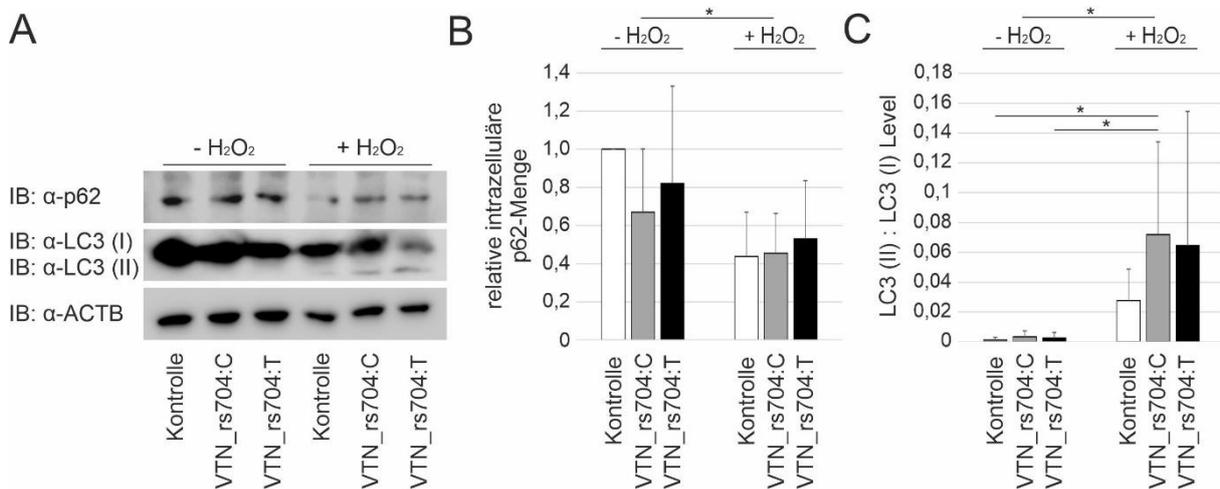
Hierfür wurden Weri-Rb1-Zellen für 2 h mit 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> unter oxidativen Stress gesetzt (nach Szatmári-Tóth *et al.*, 2016) und anschließend mit Hilfe von Western-Blots die Autophagie-Induktion anhand der Autophagiemarker LC3 und p62 untersucht. Der Autophagiemarker LC3 (Leichtkette, „light chain“) liegt auf zellulärer Ebene in zwei Formen vor: LC3 (I) als cytosolische Form und LC3 (II) als membranständige Form von Autophagosomen (Tanida und Waguri, 2010). Wird in einer Zelle Autophagie induziert, so wird das LC3 (I) mit cytosolischem Phosphatidylethanolamin konjugiert und dabei zur LC3 (II)-Form (Mizushima und Yoshimori, 2007). Diese beiden Formen des LC3 sind im Western-Blot als separate Banden zu erkennen, da das LC3 (II) aufgrund seiner höheren Hydrophobizität in der SDS-PAGE schneller wandert (Mizushima und Yoshimori, 2007; Murakami *et al.*, 2013). Ein steigendes Verhältnis von LC3 (II) zu LC3 (I) deutet also auf Autophagie-Induktion hin (Mizushima und Yoshimori, 2007). Der Autophagiemarker p62 wird durch Autophagie-Induktion verstärkt abgebaut (Liu *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2023).

Die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-behandelten Proben zeigten im Vergleich zu unbehandelten Proben eine deutliche Verringerung der p62-Expression, was auf eine erfolgreiche Autophagie-Induktion schließen lässt (siehe **Abbildung 12A** und **B**, statistisch signifikant zwischen allen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-behandelten Proben im Vergleich zu allen nicht-oxidativ gestressten Proben,  $p < 0,05$ ). Dabei schien Vitronectin bei nicht-oxidativ gestressten Proben auch einen leichten Rückgang der p62-Proteinwerte zu bewirken (**Abbildung 12B**), der jedoch statistisch nicht signifikant war.

Ebenso konnte für die Gesamtheit aller mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-behandelten Proben eine statistisch signifikante Steigerung der LC3 (II)-Menge im Verhältnis zur LC3 (I)-Menge beobachtet werden (siehe **Abbildung 12C**,  $p < 0,05$  zwischen allen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-behandelten Proben im Vergleich zu allen nicht-oxidativ gestressten Proben). Dabei zeigte sich eine Steigerung im Verhältnis von LC3 (II) zu LC3 (I) von ca. 0,002 bei den nicht-oxidativ gestressten Zellen auf bis zu 0,07 bei den H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-behandelten Proben. Vitronectin schien hier bei den H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-behandelten Proben einen Autophagie-verstärkenden

## Ergebnisse

Einfluss zu haben, da im Vergleich zu Kontrolleluat-behandelten Zellen das Verhältnis von LC3 (II) zu LC3 (I) in Gegenwart von Vitronectin etwa doppelt so hoch war (**Abbildung 12A und C**).



**Abbildung 12: Einfluss von Vitronectin-Varianten auf die Autophagie-Induktion in Weri-Rb1-Zellen nach oxidativem Stress.**

Weri-Rb1-Zellen wurden in Gegenwart von aufgereinigtem VTN\_rs704:C und VTN\_rs704:T (je 1,5 µg/ml) bzw. demselben Volumen an Kontrolleluat für 2 h in Gegenwart von 0 (-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) bzw. 1 mM (+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Western-Blot Analyse mit Antikörpern gegen p62, LC3 und ACTB als Ladekontrolle (**A**). Die Signale wurden über die LICOR Image Studio-Software quantifiziert. **B**) Für p62 erfolgte eine Normalisierung auf ACTB, **C**) für LC3 wurde das Verhältnis aus LC3 (II) zu LC3 (I) errechnet. Gezeigt werden Mittelwerte und Standardabweichungen aus sechs unabhängigen Replikaten, kalibriert gegen die nicht-oxidativ gestresste (- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) Kontrolle. Die Auswertung erfolgte für alle Proben mit Hilfe des Kruskal-Wallis Tests und anschließender Dunn's-Post Modifikation mit Bonferroni-Korrektur, bzw. für den Vergleich der Gesamtheit aller gestressten gegen die ungestressten Zellen mit Wilcoxon-Mann-Whitney Test. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch Sternchen gekennzeichnet (p < 0,05).

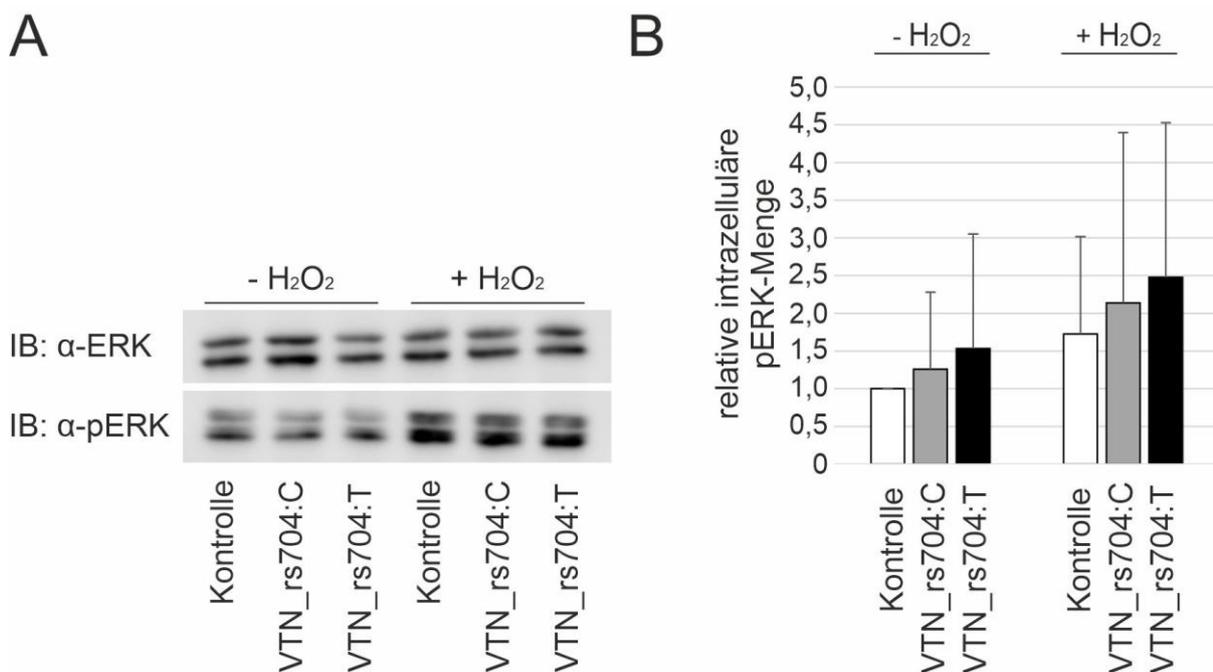
### 4.2.4 Intrazelluläre Signalwegsinduktion in Weri-Rb1

Vitronectin aktiviert nach Bindung an seine Rezeptoren verschiedene Signalwege, wie den ERK (extracellular signal regulated kinases) -Signalweg (Schvartz, Seger und Shaltiel, 1999), den FAK (focal adhesion kinase) -Signalweg (Keasey *et al.*, 2018) oder den AKT-Signalweg (Zheng *et al.*, 2000). Um einen Effekt von Vitronectin auf das intrazelluläre Signaling vor und nach Applikation von oxidativem Stress in Weri-Rb1-Zellen untersuchen zu können, wurden Western-Blot Analysen mit Antikörpern gegen phosphorylierte und damit aktivierte Markerproteine der jeweiligen Signalwege durchgeführt.

## Ergebnisse

Als Marker für den ERK-Signalweg wurde die Phosphorylierung von ERK1/2 (Guo *et al.*, 2020) verfolgt, als Marker für den FAK-Signalweg die Phosphorylierung von FAK (Zhao und Guan, 2011) und als Marker für den AKT-Signalweg die Phosphorylierung von AKT (Madhunapantula, Mosca und Robertson, 2011).

In der Analyse der ERK-Signalwegsaktivierung zeigt sich für die mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelten Proben eine tendenzielle Steigerung der ERK1/2-Phosphorylierung im Vergleich zu den nicht gestressten Proben (siehe **Abbildung 13**,  $p > 0,05$ ). In den mit VTN\_rs704:T inkubierten Proben wurden höhere Werte an phosphoryliertem ERK1/2 im Vergleich zu Proben erhalten, die mit Kontrolleluat oder VTN\_rs704:C inkubiert worden waren, sowohl mit als auch ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stress. Die beobachteten Unterschiede waren dabei statistisch nicht signifikant.

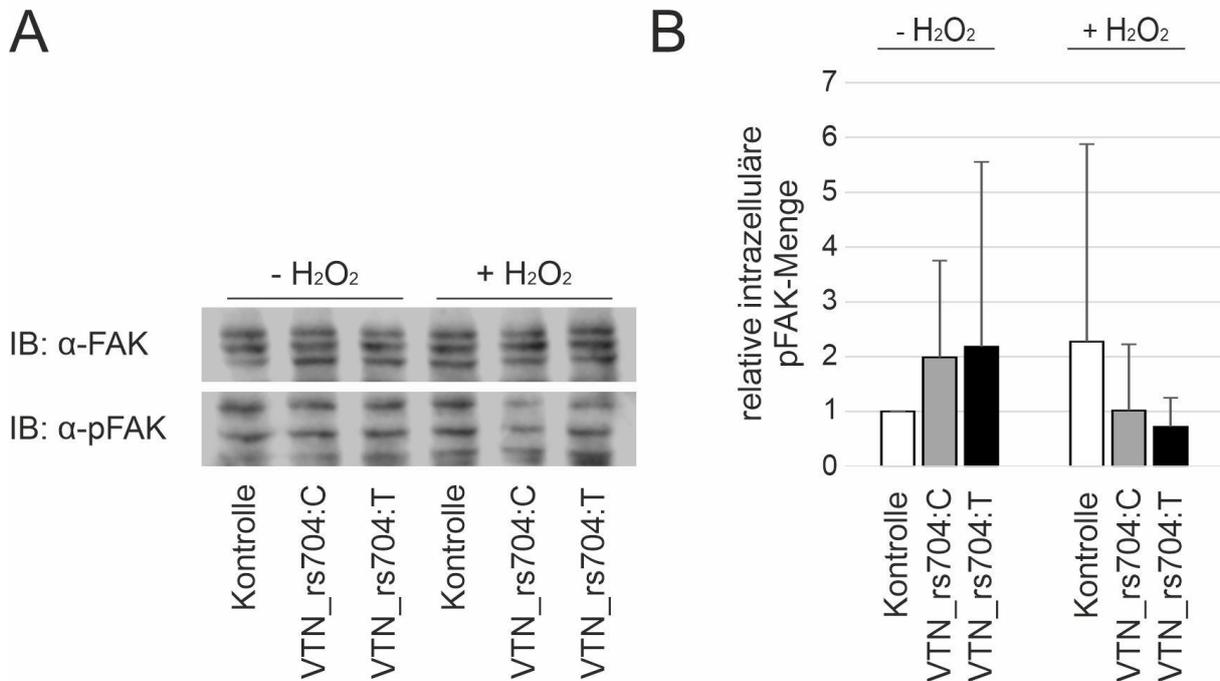


**Abbildung 13: Einfluss von Vitronectin-Varianten auf die ERK-Signalwegs-Induktion in Weri-Rb1-Zellen nach oxidativem Stress.**

Weri-Rb1-Zellen wurden in Gegenwart von aufgereinigtem VTN\_rs704:C und VTN\_rs704:T (je 1,5 µg/ml) bzw. demselben Volumen an Kontrolleluat für 2 h in Gegenwart von 0 (-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) bzw. 1 mM (+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert. **A**) Im Anschluss erfolgte eine Western-Blot Analyse mit Antikörpern gegen phosphoryliertes ERK1/2 (pERK1/2) und gesamtes ERK1/2. **B**) Die Signale wurden über die LICOR Image Studio-Software quantifiziert. Signale von pERK1/2 wurden auf die Signale von ERK1/2 normalisiert und gegen die nicht-oxidativ gestresste (- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) Kontrolle kalibriert. Gezeigt werden Mittelwerte und Standardabweichungen aus sechs unabhängigen Replikaten. Die Auswertung erfolgte für alle Proben mit Hilfe des Kruskal-Wallis Tests und anschließender Dunn's-Post Modifikation mit Bonferroni-Korrektur, bzw. für den Vergleich der Gesamtheit aller gestressten gegen die ungestressten Zellen mit Wilcoxon-Mann-Whitney Test. Es wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede detektiert.

## Ergebnisse

Als nächstes wurde der FAK-Signalweg untersucht (**Abbildung 14**). Dabei zeigten sich sowohl im Vergleich von Kontrollproben mit den mit Vitronectin-Varianten behandelten Proben als auch im Vergleich von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-gestressten mit den nicht-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-gestressten Proben keine Unterschiede (siehe **Abbildung 14B**).



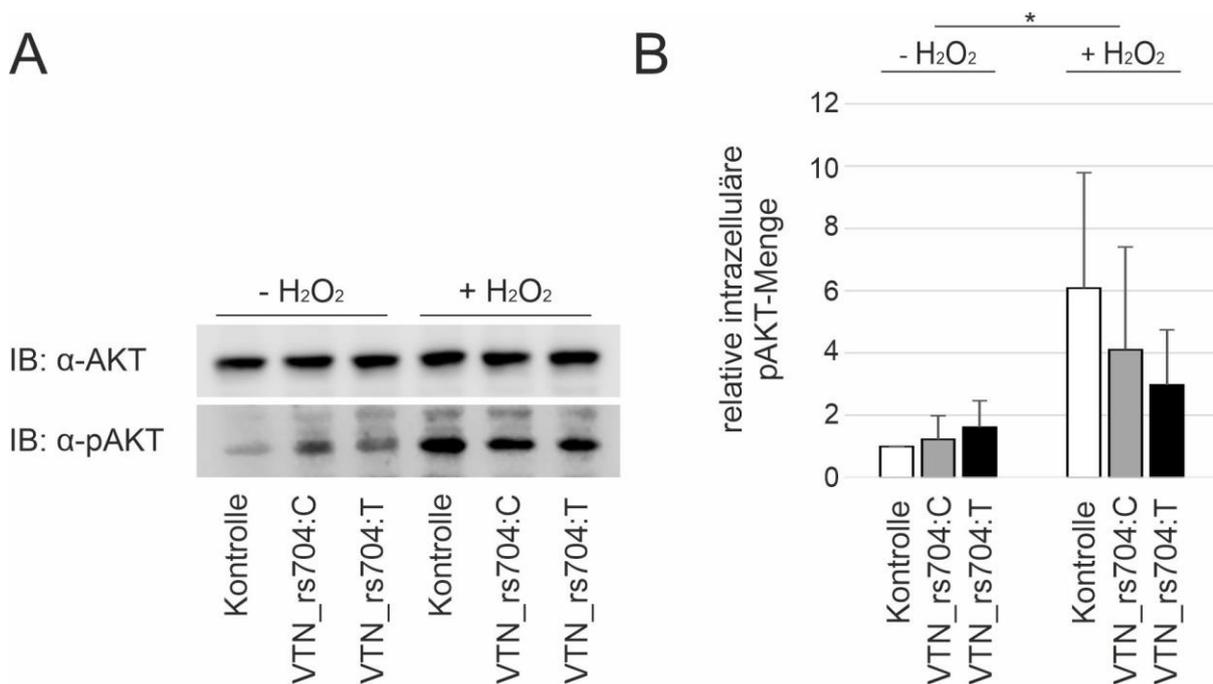
**Abbildung 14: Einfluss von Vitronectin-Varianten auf die FAK-Signalwegs-Induktion in Weri-Rb1-Zellen nach oxidativem Stress.**

Weri-Rb1-Zellen wurden in Gegenwart von aufgereinigtem VTN\_rs704:C und VTN\_rs704:T (je 1,5 µg/ml) bzw. demselben Volumen an Kontrolleluat für 2 h in Gegenwart von 0 (-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) bzw. 1 mM (+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert. **A**) Im Anschluss erfolgte eine Western-Blot Analyse mit Antikörpern gegen phosphoryliertes FAK (pFAK) und gesamtes FAK. **B**) Die Signale wurden über die LICOR Image Studio-Software quantifiziert. Signale von pFAK wurden auf die Signale von FAK normalisiert und gegen die nicht-oxidativ gestresste (-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) Kontrolle kalibriert. Gezeigt werden Mittelwerte und Standardabweichungen aus sechs unabhängigen Replikaten. Die Auswertung erfolgte für alle Proben mit Hilfe des Kruskal-Wallis Tests und anschließender Dunn's-Post Modifikation mit Bonferroni-Korrektur, bzw. für den Vergleich der Gesamtheit aller gestressten gegen die ungestressten Zellen mit Wilcoxon-Mann-Whitney Test. Es wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede detektiert.

In der Analyse der AKT-Signalwege konnte zwischen der Gesamtheit aller nicht-oxidativ gestresster Proben und den mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelten Proben eine statistisch signifikante Steigerung der relativen phosphorylierten AKT-Menge im Vergleich zum AKT festgestellt werden ( $p < 0,05$ , **Abbildung 15**). Diese Steigerung war zwischen den einzelnen Vitronectin-Varianten unterschiedlich stark ausgeprägt. So stiegen die relativen intrazellulären phosphorylierten AKT-Mengen in den gestressten, mit

## Ergebnisse

VTN\_rs704:C behandelten Proben im Vergleich zu den ungestressten, mit VTN\_rs704:C behandelten Proben um mehr als das Dreifache. Bei den mit VTN\_rs704:T behandelten Proben fiel dieser Anstieg geringer aus (Anstieg um das 1,8-fache). Den größten Anstieg des phosphorylierten AKT bei gestressten Proben, konnte mit einem Anstieg um etwa das Sechsfache der unbehandelten Proben, in der Vitronectin-freien Kontrollgruppe beobachtet werden (siehe **Abbildung 15**).



**Abbildung 15: Einfluss von Vitronectin-Varianten auf die AKT-Signalwegs-Induktion in Weri-Rb1-Zellen nach oxidativem Stress.**

Weri-Rb1-Zellen wurden in Gegenwart von aufgereinigtem VTN\_rs704:C und VTN\_rs704:T (je 1,5 µg/ml) bzw. demselben Volumen an Kontrolleuat für 2 h in Gegenwart von 0 (-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) bzw. 1 mM (+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Western-Blot Analyse mit Antikörpern gegen phosphoryliertes AKT (pAKT) und gesamtes AKT, sowie gegen ACTB als Ladekontrolle (**A**). **B** Die Signale wurden über die LICOR Image Studio-Software quantifiziert. Signale von pAKT wurden auf die Signale von AKT normalisiert und gegen die nicht-oxidativ gestresste (-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) Kontrolle kalibriert. Gezeigt werden Mittelwerte und Standardabweichungen aus fünf unabhängigen Replikaten. Die Auswertung erfolgte für alle Proben mit Hilfe des Kruskal-Wallis Tests und anschließender Dunn's-Post Modifikation mit Bonferroni-Korrektur, bzw. für den Vergleich der Gesamtheit aller gestressten gegen die ungestressten Zellen mit Wilcoxon-Mann-Whitney Test. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch Sternchen gekennzeichnet (p < 0,05).

### **4.3 Effekt von Vitronectin und seiner Varianten auf das Phagocytoseverhalten von hiPSC-RPE-Zellen**

Ein wichtiger Aspekt der Pathogenese der AMD ist die eingeschränkte Funktion der RPE-Zellen zur Phagocytose der abgestoßenen äußeren Segmente der Photorezeptoren (Ding, Patel und Chan, 2009; Van Lookeren Campagne *et al.*, 2014; Michalska-Małecka *et al.*, 2015). Dabei ist auch der RPE-ständige Vitronectin (Integrin)-Rezeptor an der Regulation der Phagocytose beteiligt (Nandrot, Chang und Finnemann, 2008). Im Folgenden sollte deswegen ein möglicher Einfluss von Vitronectin auf die Phagocytosekapazität von RPE-Zellen untersucht werden.

Wie alle zellulären Prozesse, so ist auch die Phagocytose ein durch intrazelluläre Signalwege gesteuerter Prozess (Kevany und Palczewski, 2010; Chiang *et al.*, 2017). Dazu gehört zum Beispiel der ERK-Signalweg, der FAK-Signalweg und die Phosphorylierung des initialen Signaltransmitters SRC (Finnemann, 2003; Plows *et al.*, 2004; Law *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2019). Da all diese Signalwege auch durch Vitronectin nach dessen Bindung an den Vitronectin (Integrin)-Rezeptor reguliert werden (Felsenfeld *et al.*, 1999; Schwartz, Seger und Shaltiel, 1999; Keasey *et al.*, 2018), sollte im Rahmen der Phagocytose-Assays auch die intrazelluläre Signalwegsinduktion verfolgt werden.

#### **4.3.1 Charakterisierung der hiPSC-RPE-Zellen**

Als Modell für die RPE-Zellschicht der menschlichen Netzhaut wurden hiPSC-RPE-Zellen verwendet. Um die korrekte Ausdifferenzierung der hiPSCs zu hiPSC-RPE-Zellen zu überprüfen, wurden Untersuchungen zur Bildung einer Epithelbarriere, zur Expression RPE-typischer Zellmarker, und zur korrekten Lokalisation charakteristischer Proteine durchgeführt (nach Biasella *et al.*, 2020).

Um die epitheliale Integrität zu überprüfen, wurde der transepitheliale elektrische Widerstand (transepithelial electrical resistance, TEER) der hiPSC-RPE-Zellen gemessen. Die dabei erhaltenen Werte lagen für sechs Wochen alte hiPSC-RPE-Zellen bei  $120,2 \pm 6,2 \Omega \cdot \text{cm}^2$ , wobei in der dazu bekannten Literatur Werte zwischen  $50$  und  $200 \Omega \cdot \text{cm}^2$  bei intakter Barrierefunktion humaner RPE-Monolayer angegeben werden (Maminishkis *et al.*, 2006; Ablonczy und Crosson, 2007).

## Ergebnisse

Zur Untersuchung des RPE-typischen Expressionsmusters wurden Reverse Transkriptase-PCR Analysen an sechs Wochen alten hiPSC-RPE-Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 16A** dargestellt. Es zeigte sich, dass die RPE-Markergene *RPE65*, *BEST1*, *RLBP1* und *ITGB8* in hiPSC-RPE-Zellen exprimiert werden, wohingegen keine Expression in hiPSC-Zellen detektiert wurde. Auch die Expression des Melanogenesemarkers *TYR* konnte in hiPSC-RPE-Zellen nachgewiesen werden, nicht jedoch in hiPSC-Zellen. Im Gegenzug wurden die Stammzellmarker *SOX2* und *OCT4* nur in hiPSC- und nicht in hiPSC-RPE-Zellen nachgewiesen.

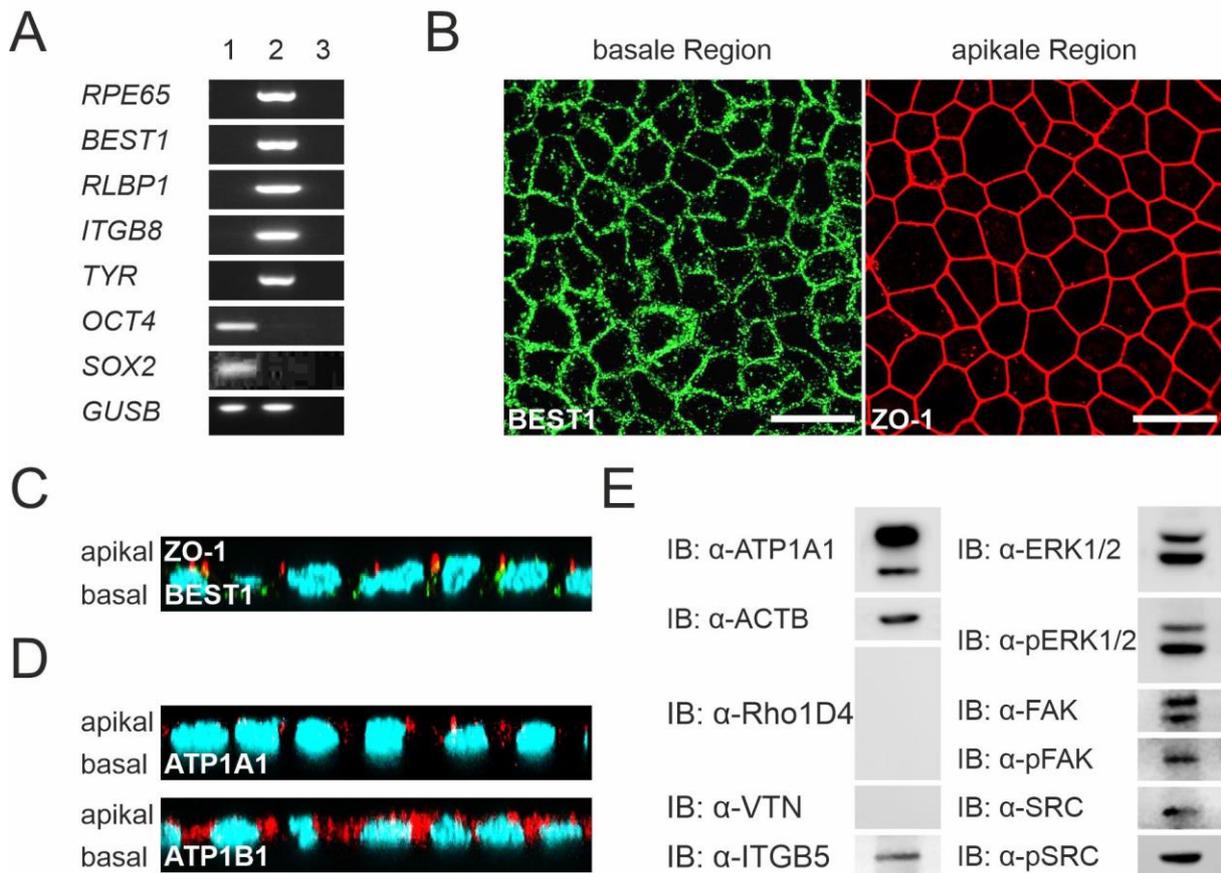
Des Weiteren wurde auch die physiologische Architektur des hiPSC-RPE genauer untersucht. Dazu wurden sechs Wochen alte hiPSC-RPE-Zellen einer immunocytochemischen Färbung unterzogen und Expression und Lokalisation der charakteristischen Membranproteine Bestrophin 1 (*BEST1*), Zonula-occludens (*ZO-1*, „tight junction protein 1“) und Natrium-/Kalium-ATPase alpha1 (*ATP1A1*) und beta1 (*ATP1B1*) dargestellt (siehe **Abbildung 16B-D**). Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen zeigen eine korrekte laterale Lokalisation der Marker *BEST1* und *ZO-1*, entsprechend ihrer physiologischen Lokalisation im RPE (Williams und Rizzolo, 1997; Marmorstein *et al.*, 2000). Dabei ließ sich *BEST1* eher im basolateralen Bereich darstellen, wohingegen *ZO-1* im apikal-lateralen Bereich zu detektieren war. Die Natrium-/Kalium-ATPase-Untereinheiten *ATP1A1* und *ATP1B1* wurden, entsprechend ihrer physiologischen Lokalisation im RPE (Hu *et al.*, 1994), an der apikalen Seite detektiert.

Vor der Durchführung späterer Phagozytose- und Signaling-Versuche wurde außerdem die endogene Proteinexpression folgender Proteine überprüft: Vitronectin, Rhodopsin als Marker für Photorezeptor-Außensegmente (Concepcion, Mendez und Chen, 2002), Integrin  $\alpha_v\beta_5$  als wahrscheinlichster Rezeptor für die Phagozytosevorgänge am RPE (Finnemann und Nandrot, 2006),  $\beta$ -Aktin, Tubulin und *ATP1A1* als mögliche Housekeeper (Kobayashi und Kawakami, 1997; Mazzoni, Mao und Finnemann, 2019), ERK1/2 und phosphoryliertes ERK1/2 als Marker für das MAP-Kinasen-Signaling (Kyosseva, 2016), FAK und phosphoryliertes FAK als Marker für den FAK-Signalweg (Schaller, 2010), sowie SRC und phosphoryliertes SRC als Marker für die Aktivierung von SRC, einem initialen Signaltransmitter, der an verschiedenen Signalwegen beteiligt ist (Felsenfeld *et al.*, 1999). Die Ergebnisse

## Ergebnisse

dieser Analysen sind in **Abbildung 16E** dargestellt. Es wurde keine Vitronectin-Expression ausgehend von den hiPSC-RPE-Zellen detektiert, sodass potenzielle Effekte des extern zugeführten, rekombinanten Vitronectins allein auf dieses zurückzuführen wären. Ebenso konnte auch kein Rhodopsin-Signal in den hiPSC-RPE-Zellen detektiert werden, sodass phagozytierte Photorezeptor-Außensegmente im späteren Versuch über Rhodopsin gemessen werden können. Da der gängige Housekeeper Aktin (ACTB) selbst an den zellulären Phagozytoseprozessen teilnimmt und eine Veränderung der intrazellulären Proteinmenge möglich ist, wurde als weiterer Housekeeper ATP1A1 miteinbezogen (May und Machesky, 2001; Mazzoni, Mao und Finnemann, 2019). Auch der Vitronectin (Integrin)-Rezeptor  $\alpha_v\beta_5$  (ITGB5) war auf den hiPSC-RPE-Zellen zu detektieren. Für alle Signaling-Marker konnten ebenfalls deutliche Banden erhalten werden.

## Ergebnisse



**Abbildung 16: Charakterisierung der hiPSC-RPE-Zellen.**

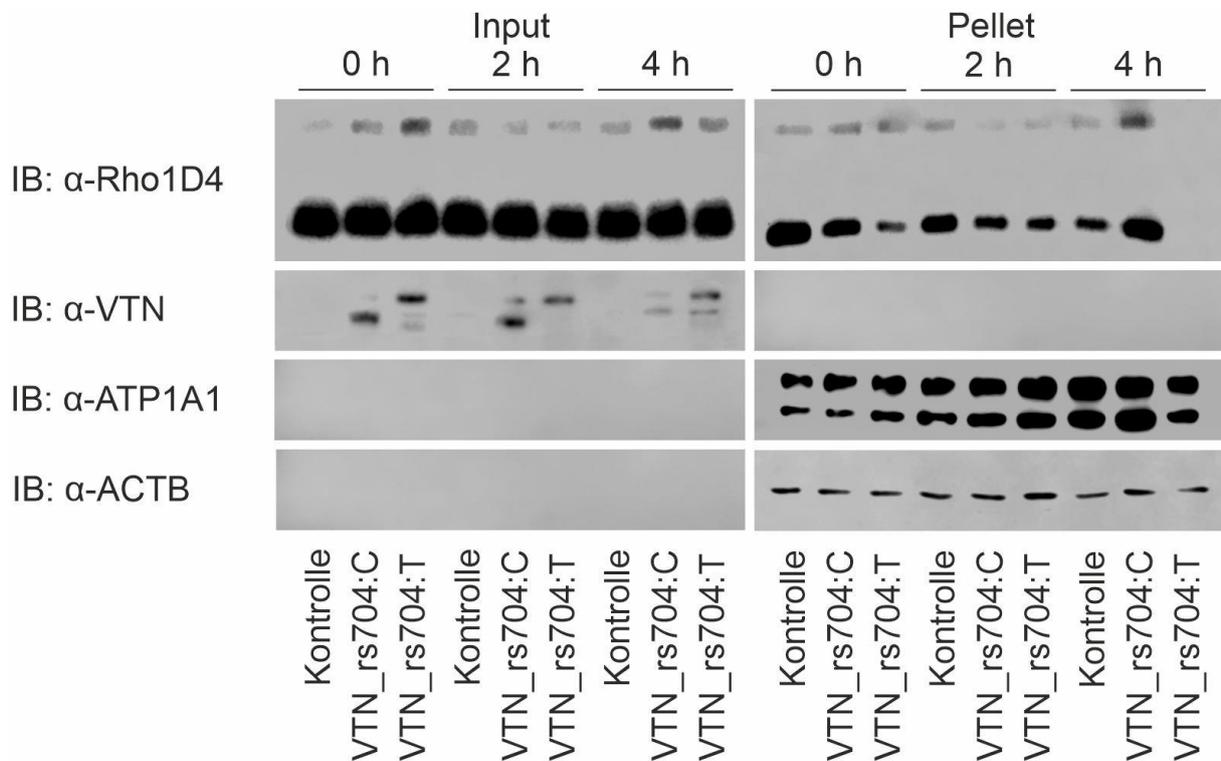
Nach Abschluss der hiPSC-RPE-Ausdifferenzierung (siehe auch Biasella *et al.*, 2020) wurden die Zellen auf Expression und Lokalisation spezifischer RPE-Marker untersucht. **A)** RT-PCR zur Analyse der mRNA-Expression von RPE-Markergenen *RPE65*, *BEST1*, *RLBP1* und *ITGB8*, des Melanogenesemarkers *TYR* und der Stammzellmarker *OCT4* und *SOX2* mit cDNA aus hiPSCs (Spur 1) und hiPSC-RPE (Spur 2). Die PCR mit Primern gegen den Housekeeper *GUSB* diente als Kontrolle. Als Negativkontrolle wurde H<sub>2</sub>O dest. statt cDNA zugegeben (Spur 3). **B)** Immunocytochemische Färbung der hiPSC-RPE-Zellen mit Antikörpern gegen BEST1 (grün), ZO-1 (rot). Konfokalmikroskopische Aufnahme in 40-facher Vergrößerung, Skalierung 20 µm. **C)** Vertikale Z-Projektion nach immunocytochemischer Färbung gegen BEST1 (grün) und ZO-1 (rot), Zellkerne sind mit DAPI (blau) angefärbt. Konfokalmikroskopische Aufnahme in 40-facher Vergrößerung. **D)** Vertikale Z-Projektion nach immunocytochemischer Färbung gegen ATP1A1 (rot) und ATP1B1 (rot), Zellkerne sind mit DAPI angefärbt (blau). Konfokalmikroskopische Aufnahme in 40-facher Vergrößerung. **E)** Western-Blot Analysen von hiPSC-RPE Zelllysaten mit Antikörpern gegen ATP1A1, ACTB, Rhodopsin (Rho1D4), Vitronectin, Integrin  $\alpha\beta_5$  (ITGB5), ERK1/2 bzw. phosphoryliertes (p)ERK1/2, FAK bzw. phosphoryliertes (p)FAK und SRC bzw. phosphoryliertes (p)SRC.

### 4.3.2 Phagozytose von Photorezeptor-Außensegmenten

Zur Untersuchung eines Effekts der Vitronectin-Varianten auf das Phagozytoseverhalten von RPE-Zellen wurden hiPSC-RPE-Zellen mit Photorezeptor-Außensegmenten aus porcinen Netzhäuten unter Zugabe des rekombinanten Vitronectins (1,5 µg/ml) für 2 h inkubiert. Im Anschluss wurden die hiPSC-RPE-Zellen gewaschen, um nicht gebundene Photorezeptor-Außensegmente zu entfernen und die

## Ergebnisse

ersten Zellproben (Zeitpunkt 0 h) geerntet. Nach weiteren zwei Stunden Inkubation mit Vitronectin wurde ein weiteres Zellpellet geerntet (Zeitpunkt 2 h) und nach weiteren zwei Stunden ebenso mit den letzten Proben (Zeitpunkt 4 h) verfahren. Anschließend wurden die Zellpellets einer Western-Blot Analyse unterzogen, um die Phagozytose der Photorezeptor-Außensegmente zu untersuchen. Vom Input wurden vor der Applikation auf die Zellen Aliquots abgenommen und ebenfalls der Western-Blot Analyse unterzogen (siehe **Abbildung 17**). Western-Blots aus fünf unabhängigen Replikaten wurden einer quantitativen Analyse zur Bestimmung aufgenommener Photorezeptor-Außensegmente unterzogen (**Abbildung 17**).



**Abbildung 17: Western-Blot Analyse zum Einfluss von Vitronectin auf die Phagozytose-Kapazität von hiPSC-RPE-Zellen.**

HiPSC-RPE-Zellen wurden für 2 h mit isolierten Photorezeptor-Außensegmenten unter Zugabe von je 1,5 µg/ml VTN\_rs704:C und VTN\_rs704:T bzw. demselben Volumen aus Kontrolleluat inkubiert. Von dem jeweiligen Input der verschiedenen Ansätze wurden Proben entnommen. Nach mehreren Waschschritten wurden die ersten so behandelten Zellen geerntet (Zeitpunkt 0 h). Weitere Ansätze wurden für weitere 2 h bzw. 4 h inkubiert (Zeitpunkte 2 h und 4 h). Im Anschluss erfolgte eine Western-Blot Analyse mit Antikörpern gegen Rhodopsin (Rho1D4), Vitronectin (VTN) sowie ACTB und ATP1A1 als Housekeeper.

## Ergebnisse

Wie in den Input-Proben zu sehen, waren in allen Ansätzen in etwa gleiche Mengen an Photorezeptor-Außensegmenten und Vitronectin (VTN\_rs704:C, VTN\_rs704:T, außer in Kontrollproben) vorhanden. Es wurden keine Signale für ACTB oder ATP1A1 erhalten.

Vitronectin wurde nicht in den Zellpellets detektiert, obwohl die Expression des Vitronectin-Rezeptors in Vorversuchen bei hiPSC-RPE-Zellen nachgewiesen wurde (**Abbildung 16E**). Ob zu geringe Mengen an Vitronectin gebunden hatten, welche unter der Detektionsgrenze der Western-Blot Analyse lagen, Vitronectin in den Waschschritten wieder abgewaschen wurde oder kaum/kein Vitronectin an die Proben gebunden hatte, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

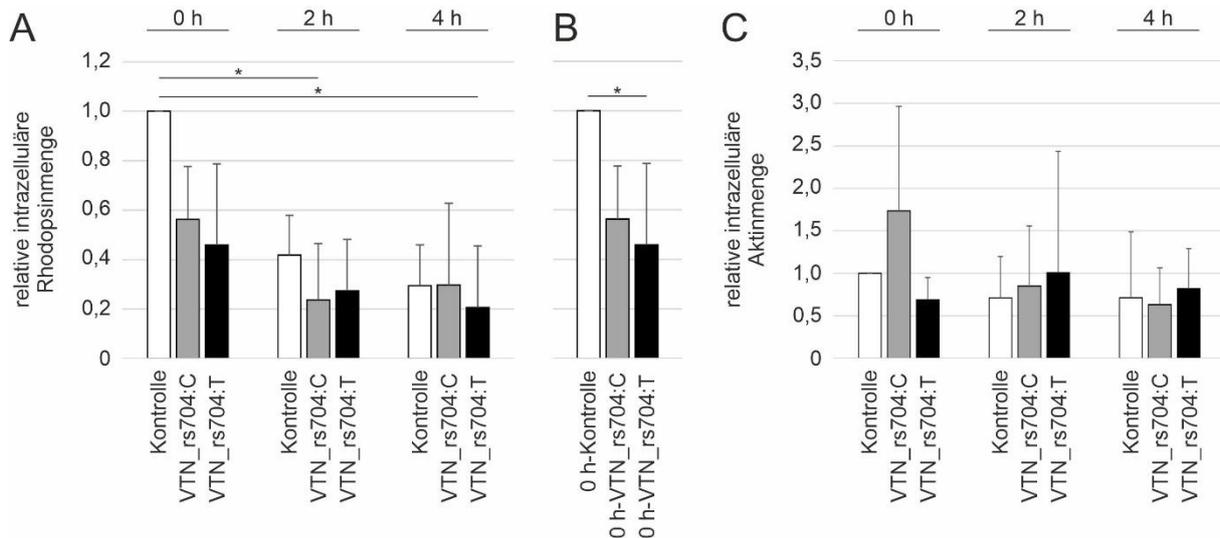
Hingegen wurden in den Zellpellets starke Signale mit dem Rhodopsin-Antikörper erhalten (**Abbildung 17**), was die Bindung bzw. Phagozytose von Photorezeptor-Außensegmenten durch die hiPSC-RPE-Zellen belegt. Dabei konnte ein generelles Absinken der intrazellulären Rhodopsin-Menge mit fortschreitender Zeit beobachtet werden (von 0 h bis zu 4 h um ca. 30-50 %, siehe **Abbildung 18A**). Im Gesamtvergleich aller Proben wurden dabei statistisch signifikante Unterschiede zwischen der unbehandelten Kontrolle und dem 2 h-Pellet, das mit VTN\_rs704:C behandelt worden war, sowie zwischen der unbehandelten Kontrolle und dem mit VTN\_rs704:T behandelten 4 h-Pellet detektiert ( $p < 0,05$ ).

Insgesamt zeigte sich in den Kontroll-Proben nach der initialen Inkubation mit Photorezeptor-Außensegmenten (Zeitpunkt 0 h) eine höhere Rhodopsinmenge, als in den mit Vitronectin-Varianten behandelten Proben. Bei Einzelbetrachtung dieses Zeitpunkts war der Unterschied zwischen Kontrollproben und mit VTN\_rs704:T behandelten Proben statistisch signifikant ( $p < 0,05$ , **Abbildung 18B**).

2 h später (Zeitpunkt 2 h) waren die Rhodopsin-Mengen in den Zellen jeweils um ca. 50 % abgesunken (**Abbildung 18A**). Noch einmal zwei Stunden später (Zeitpunkt 4 h) waren primär die Rhodopsin-Mengen der Kontrollzellen nochmals um ca. 30 % reduziert (**Abbildung 18A**).

Für die Menge von ACTB konnten keine Unterschiede im Laufe des Versuchs oder für unterschiedliche Vitronectin-Varianten ermittelt werden (**Abbildung 18C**), was hier gegen eine Beeinflussung der ACTB-Mengen durch die Phagozytose-Induktion spricht.

## Ergebnisse



**Abbildung 18: Einfluss von Vitronectin auf die Phagozytose-Kapazität von hiPSC-RPE-Zellen – quantitative Auswertung.**

Die Western-Blot Analysen aus fünf unabhängigen Replikaten des Phagozytose-Versuchs (beispielhaft gezeigt in **Abbildung 17**) wurden quantitativ über die LICOR Image Studio-Software ausgewertet. Die Signale von Rhodopsin und Aktin wurden dabei auf die Signale von ATP1A1 normalisiert. Die Rhodopsin-Auswertung erfolgte für alle Proben (**A**) bzw. nur für die 0 h-Proben (**B**) mit Hilfe des Kruskal-Wallis Tests und anschließender Dunn's-Post Modifikation mit Bonferroni-Korrektur. Für die Aktin-Auswertung (**C**) wurden wieder alle Proben miteinbezogen. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit Sternchen gekennzeichnet ( $p < 0,05$ ).

### 4.3.3 Effekt auf die intrazellulären Signalwege der hiPSC-RPE-Zellen während der Phagozytose

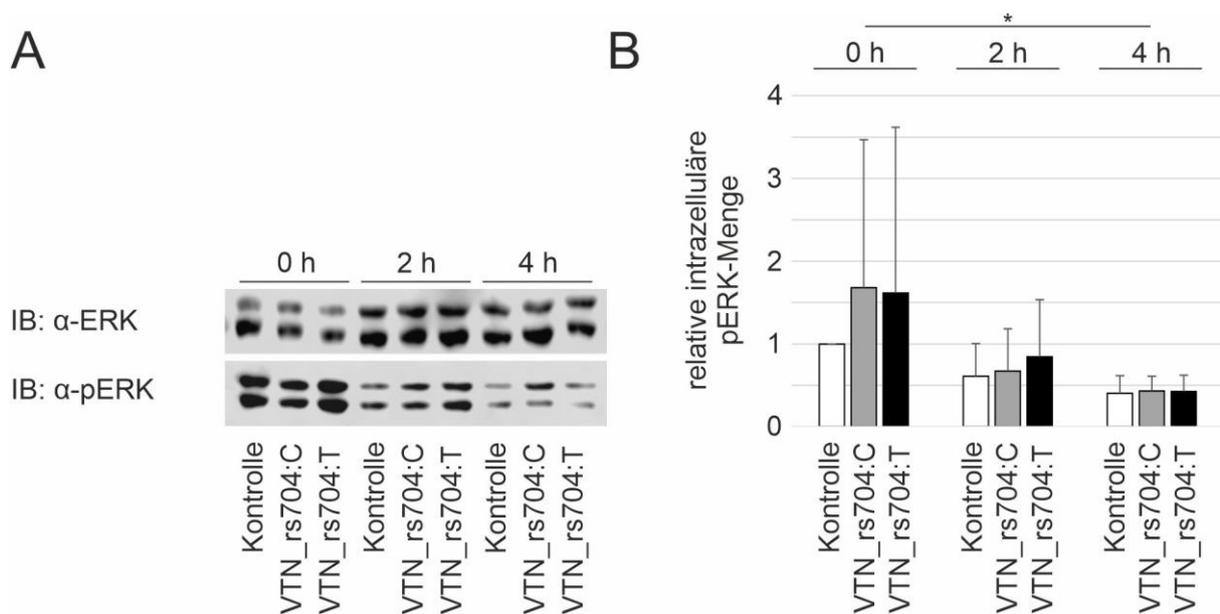
Im Folgenden wurden die Effekte der Vitronectin-Varianten auf die mit der Phagozytose assoziierten intrazellulären Signalwege (ERK1/2, FAK und SRC-Aktivierung; Finnemann, 2003; Law *et al.*, 2009; Chiang *et al.*, 2017) an den behandelten hiPSC-RPE-Zellen untersucht. Dazu wurden die Zell-Pellets aus den in 4.3.2 beschriebenen Phagozytose-Assays Western-Blot Analysen mit Antikörpern gegen ERK1/2, FAK, SRC und deren phosphorylierte Formen als Marker für die jeweiligen Signalwege unterzogen (siehe auch 4.2.4 und 4.3.1; Felsenfeld *et al.*, 1999; Schaller, 2010; Kyosseva, 2016).

Dabei konnte festgestellt werden, dass die relative intrazelluläre Menge des phosphorylierten und damit aktivierten ERK1/2 einen zeitabhängigen Rückgang aufweist (**Abbildung 19**): Vergleicht man die 0 h- und die 2 h-Proben miteinander, so halbierten sich die Mengen des phosphorylierten ERK1/2 in etwa. Nach weiteren 2 h fand eine weitere Reduktion der Mengen an phosphoryliertem ERK1/2 statt. Im

## Ergebnisse

Vergleich der gesamten Proben, welche zu einem der definierten Zeitpunkte genommen wurden, war dieser Rückgang für alle 4 h-Proben im Vergleich zu allen 0 h-Proben statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ).

Die mit unterschiedlichen Vitronectin-Varianten behandelten Proben unterschieden sich dabei im Wesentlichen nicht voneinander. In der 0 h-Probe könnte man tendenziell etwas größere Mengen an phosphoryliertem ERK1/2 in den mit Vitronectin behandelten Zellen vermuten als in der Kontrolle. Aufgrund der hohen Standardabweichungen bei den mit Vitronectin behandelten Proben ist hier jedoch keine gesicherte Aussage möglich.

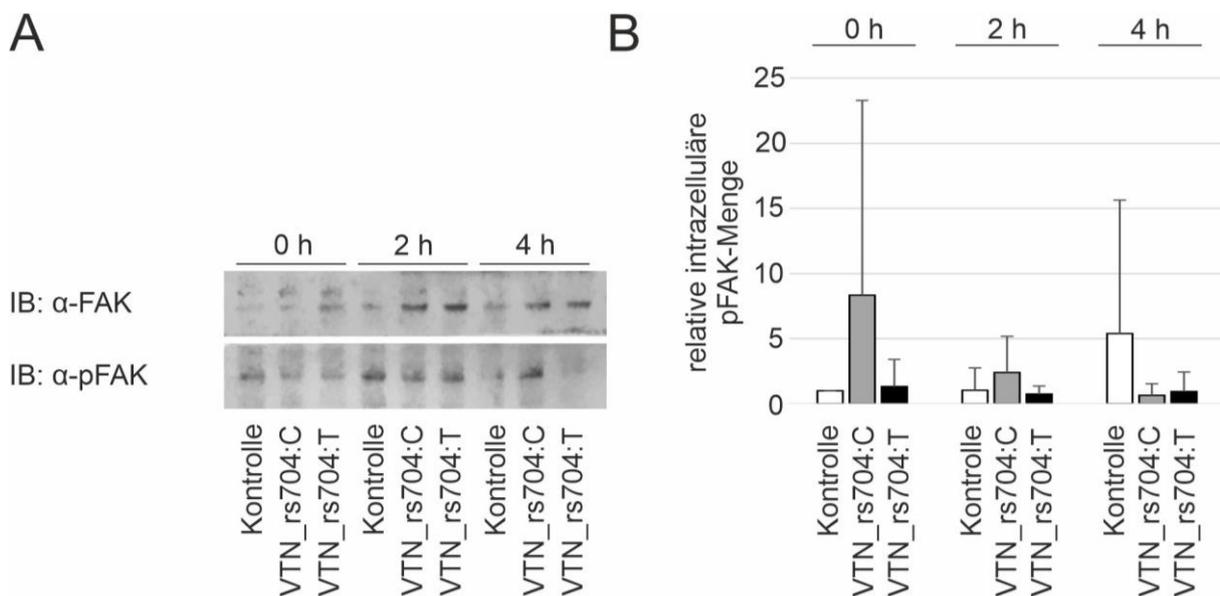


**Abbildung 19: Western-Blot Analyse zum Einfluss von Vitronectin auf das intrazelluläre ERK1/2-Signaling nach Phagocytose-Induktion in hiPSC-RPE-Zellen.**

HiPSC-RPE-Zellen wurden für zwei Stunden mit isolierten Photorezeptor-Außensegmenten unter Zugabe von je 1,5  $\mu\text{g/ml}$  VTN\_rs704:C und VTN\_rs704:T bzw. demselben Volumen aus Kontrolleluat inkubiert. Nach mehreren Waschschriffen wurden die ersten so behandelten Zellen geerntet (Zeitpunkt 0 h). Weitere Ansätze wurden für weitere 2 h bzw. 4 h inkubiert (Zeitpunkte 2 h und 4 h). **A**) Im Anschluss erfolgte eine Western-Blot Analyse mit Antikörpern gegen gesamtes ERK1/2, sowie gegen phosphoryliertes ERK1/2 (pERK1/2). **B**) Die Western-Blot Analysen aus fünf unabhängigen Replikaten wurden quantitativ über die LICOR Image Studio-Software ausgewertet. Die Signale von pERK wurden dabei auf die Signale von ERK normalisiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Kruskal-Wallis Tests und anschließender Dunn's-Post Modifikation mit Bonferroni-Korrektur. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit Sternchen gekennzeichnet ( $p < 0,05$ ).

## Ergebnisse

Für die Immunoblots der phosphorylierten FAK-Proteine konnten statistisch keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Zeitpunkten oder für Vergleich von Vitronectin-Varianten mit Kontrollen ermittelt werden (siehe **Abbildung 20**). Die Auswertung gestaltete sich jedoch aufgrund der schlechten Detektierbarkeit der FAK-Proteine in den Zellpellets und daraus resultierenden großen Standardabweichungen schwierig.



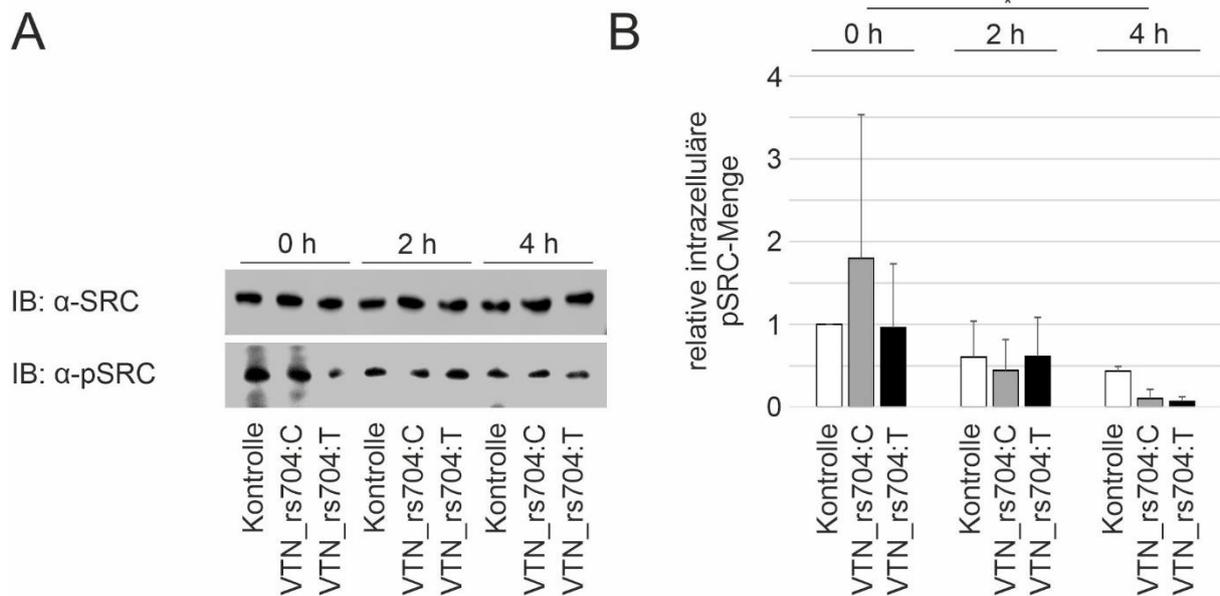
**Abbildung 20: Western-Blot Analyse zum Einfluss von Vitronectin auf das intrazelluläre FAK-Signaling nach Phagozytose-Induktion in hiPSC-RPE-Zellen.**

HiPSC-RPE-Zellen wurden für zwei Stunden mit isolierten Photorezeptor-Außensegmenten unter Zugabe von je 1,5 µg/ml VTN\_rs704:C und VTN\_rs704:T bzw. demselben Volumen an Kontrolleuat inkubiert. Nach mehreren Waschschritten wurden die ersten so behandelten Zellen geerntet (Zeitpunkt 0 h). Weitere Ansätze wurden für weitere 2 h bzw. 4 h inkubiert (Zeitpunkte 2 h und 4 h). **A**) Im Anschluss erfolgte eine Western-Blot Analyse mit Antikörpern gegen gesamtes FAK, sowie gegen phosphoryliertes FAK (pFAK). **B**) Die Western-Blot Analysen aus vier unabhängigen Replikaten wurden quantitativ über die LICOR Image Studio-Software ausgewertet. Die Signale von pFAK wurden dabei auf die Signale von FAK normalisiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Kruskal-Wallis Tests und anschließender Dunn's-Post Modifikation mit Bonferroni-Korrektur. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede detektiert werden.

In den Analysen der SRC-Aktivierung konnte eine deutliche signifikante Reduktion der Mengen an phosphoryliertem und damit aktiviertem SRC im Laufe der Inkubationszeit gemessen werden (siehe **Abbildung 21**). Nach zweistündiger Inkubation (Zeitpunkt 2 h) sank die relative Menge des intrazellulären phosphorylierten SRC in allen Proben auf etwa die Hälfte im Vergleich zum Zeitpunkt 0 h ab. Nach weiteren zwei Stunden Inkubation (Zeitpunkt 4 h) konnte eine weitere Reduktion des Signals gezeigt werden.

## Ergebnisse

Diese Abnahme war in der Gesamtheit der 4 h-Proben im Vergleich mit der Gesamtheit der 0 h-Proben statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ). Nach 4 h wurde zusätzlich in den mit Vitronectin behandelten Proben eine tendenziell niedrigere intrazelluläre Menge an phosphoryliertem SRC detektiert, als in der Kontrollprobe (ca. 80 % weniger im Vergleich zur 4 h-Kontrolle).



**Abbildung 21: Western-Blot Analyse zum Einfluss von Vitronectin auf das intrazelluläre SRC-Signaling nach Phagozytose-Induktion in hiPSC-RPE-Zellen.**

HiPSC-RPE-Zellen wurden für zwei Stunden mit isolierten Photorezeptor-Außensegmenten unter Zugabe von je 1,5  $\mu\text{g/ml}$  VTN\_rs704:C und VTN\_rs704:T bzw. demselben Volumen aus Kontrolleluat inkubiert. Nach mehreren Waschschriffen wurden die ersten so behandelten Zellen geerntet (Zeitpunkt 0 h). Weitere Ansätze wurden für weitere 2 h bzw. 4 h inkubiert (Zeitpunkte 2 h und 4 h). **A**) Im Anschluss erfolgte eine Western-Blot Analyse mit Antikörpern gegen gesamtes SRC sowie gegen phosphoryliertes SRC (pSRC). **B**) Die Western-Blot Analysen aus drei unabhängigen Replikaten wurden quantitativ über die LICOR Image Studio-Software ausgewertet. Die Signale von pSRC wurden dabei auf die Signale von SRC normalisiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Kruskal-Wallis Tests und anschließender Dunn's-Post Modifikation mit Bonferroni-Korrektur. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit Sternchen gekennzeichnet ( $p < 0,05$ ).

## 5 Diskussion

Der Einzelnukleotidpolymorphismus rs704 im *VTN*-Gen ist hoch signifikant mit der AMD assoziiert. Um eine mögliche Rolle des Vitronectins auf subretinale Prozesse in der AMD-Pathogenese zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit funktionelle Versuche zum Einfluss der Isoformen *VTN\_rs704:T*, welche mit der AMD assoziiert ist und *VTN\_rs704:C*, dem nicht-Risiko-Allel, durchgeführt.

In Versuchen zum Einfluss des Vitronectins auf die zelluläre Adhäsion von Retinoblastom (Weri-Rb1)- und dissoziierten porcinen Netzhaut-Zellen, konnte unter Vitronectin-Behandlung eine gesteigerte Adhäsion der Weri-Rb1-Zellen festgestellt werden, jedoch eine verminderte Adhäsion der dissoziierten porcinen Netzhaut-Zellen. In beiden Fällen wurde kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen *VTN\_rs704:C* oder *VTN\_rs704:T* beobachtet. Nach oxidativem Stress (durch  $H_2O_2$ -Behandlung) zeigten die Weri-Rb1-Zellen ein deutlich reduziertes Zellüberleben, Vitronectin beeinflusste diesen Prozess nicht. Bei Messung apoptotischer Weri-Rb1-Zellen nach  $H_2O_2$ -Stress wurde keine Veränderung der Anzahl apoptotischer Zellen durch *VTN\_rs704:C* erzielt. Zellen, welche mit *VTN\_rs704:T* behandelt worden waren, zeigten eine leichte, statistisch jedoch nicht signifikant verminderte Apoptose sowohl in der  $H_2O_2$ -behandelten, als auch in der unbehandelten Gruppe. Bei Messung der Autophagie nach  $H_2O_2$ -Stress in Weri-Rb1-Zellen schien Vitronectin – sowohl bei oxidativ gestressten als auch bei nicht-gestressten Zellen – eine leichte Autophagie-induzierende Wirkung zu besitzen. Auf den ERK1/2- und den AKT Signalweg in diesen Zellen hatte der oxidative Stress einen stimulierenden Einfluss. Zusätzlich wurde das ERK-Signaling durch Vitronectin leicht stimuliert, wobei *VTN\_rs704:T* tendenziell eine etwas stärkere Stimulierung zeigte als *VTN\_rs704:C*. Die  $H_2O_2$ -induzierte Steigerung des AKT-Signalings fiel in den mit Vitronectin behandelten Zellen etwas geringer aus als in den Kontrollzellen. Der FAK-Signalweg wurde weder durch die Behandlung mit  $H_2O_2$  noch durch Vitronectin beeinflusst. In Versuchen zum Einfluss des Vitronectins und seiner Varianten auf die Phagozytose von Photorezeptor-Außensegmenten durch hiPSC-RPE-Zellen konnte eine verminderte Phagozytose-Aktivität in Vitronectin behandelten Zellen beobachtet werden. Auf das ERK- oder FAK-Signaling hatte Vitronectin in diesen Zellen keinen Einfluss. Jedoch wurde eine Reduktion des SRC-Signalings durch beide Vitronectin-Varianten beobachtet.

### 5.1 Adhäsion neuronaler Zellen unter Vitronectin-Einfluss

Als Teil der Pathogenese der AMD wird die fokale Ablösung der Netzhaut von darunter liegenden Schichten beschrieben (Ardeljan und Chan, 2013; Van Lookeren Campagne *et al.*, 2014). Die Integrität des Zellverbandes der einzelnen Netzhautschichten wird dabei vor allem von der Interaktion zwischen Photorezeptoren und dem RPE bestimmt (Anderson *et al.*, 1983; Steinberg, 1985). Sind diese Interaktionen gestört, kann es zur Ablösung der Netzhaut kommen. Als Ursache dafür werden verschiedene Mechanismen diskutiert, wobei Veränderungen in der Biologie der extrazellulären Matrix, also des Materials zwischen RPE und Photorezeptoren, eine Schlüsselrolle einnehmen, denn sie tragen entscheidend zu retinaler Ablösung und damit zur Degeneration der Netzhaut bei (Cook *et al.*, 1995; Nandrot *et al.*, 2006). Da Vitronectin als wichtiges Glied in der Organisation der extrazellulären Matrix gesehen werden kann (Hayman *et al.*, 1985), wurde im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss von Vitronectin auf die zelluläre Adhäsion von Photorezeptor-Modellzellen untersucht. In humanen Retinoblastomzellen (Weri-Rb1) zeigte sich in Gegenwart von Vitronectin im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Steigerung der zellulären Adhäsion, wobei VTN\_rs704:T einen stärkeren Effekt zeigte als VTN\_rs704:C. Bei dissoziierten Zellen porciner Netzhäute zeigte sich im Gegenzug eine Verminderung der zellulären Adhäsion unter Vitronectin-Einfluss, ohne deutlichen Unterschied zwischen den beiden Vitronectin-Varianten.

Allgemein ist bekannt, dass Vitronectin adhäsive Eigenschaften besitzt (Felding-Habermann und Cheresch, 1993), welche über verschiedene Rezeptoren, aber auch Rezeptor-unabhängig vermittelt werden können (Preissner und Reuning, 2011). Die Rezeptor-unabhängige Bindungskapazität von Vitronectin wurde schon früh entdeckt, so ist Vitronectin nach seiner Eigenschaft benannt, auf Glasoberflächen zu adsorbieren und dadurch Adhäsion zu vermitteln (Steele *et al.*, 1991). Aber auch über seine matrizellulären Eigenschaften (darunter wird die Interaktion mit Komponenten der extrazellulären Matrix einerseits, sowie seine Bindung an membranständige Rezeptoren andererseits verstanden) kann Adhäsion vermittelt werden (Stockmann *et al.*, 1993).

Betrachtet man die Rezeptor-vermittelte Adhäsion über Vitronectin genauer, so spielen dabei die membranständigen Integrin-Rezeptoren eine wichtige Rolle. So kann Vitronectin an unterschiedliche Rezeptoren dieser Gruppe binden, wie zum Beispiel

## Diskussion

$\alpha_v\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$ ,  $\alpha_v\beta_6$ ,  $\alpha_v\beta_8$  und  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (Felding-Habermann und Cheresh, 1993; Schnapp *et al.*, 1995; Leavesley *et al.*, 2013). Im subretinalen Raum stellen  $\alpha_v\beta_5$ -Integrine die einzig bekannten Integrin-Rezeptoren dar, welche sowohl auf Photorezeptor-Zellen als auch auf RPE-Zellen lokalisiert sind (Anderson, Johnson und Hageman, 1995; Finnemann *et al.*, 1997). In Untersuchungen mit  $\beta_5$ -Knockout-Mäusen konnte ein stärkeres zentrales Detachment im Vergleich zu peripheren Bereichen der Netzhaut und außerdem auch eine altersabhängige Verminderung der retinalen Adhäsion beobachtet werden (Nandrot *et al.*, 2006). Vitronectin könnte folglich über seine Bindung an diese Rezeptorklasse ebenfalls zu einer Veränderung der retinalen Adhäsion beitragen. Weitere membranständige Rezeptoren, die durch ihre Bindung an Vitronectin Zelladhäsion vermitteln können, sind die Urokinase-Rezeptoren (uPAR) (Schvartz, Seger und Shaltiel, 1999).

Weri-Rb1-Zellen exprimieren Integrine (Reinhard *et al.*, 2020), über die Proteinexpression von uPAR in Weri-Rb1-Zellen ist bislang nichts publiziert. Eine mögliche Erklärung für die erhöhte Adhäsivität von Weri-Rb1-Zellen unter Vitronectin-Einfluss könnte somit über die Bindung des Vitronectins an zelluläre Integrine (oder uPAR) gefunden werden. Auch porcine retinale Zellen verfügen, wie alle tierischen Zellen (mit Ausnahme der Erythrozyten), über Integrin-Rezeptoren, wohingegen die uPAR-Expression in der neuronalen Netzhaut unter gesunden Bedingungen als eher gering beschrieben wird (Danen, 2006; Cammalleri *et al.*, 2019). Auch hier könnte also über eine Bindung von Vitronectin an Integrine (oder uPAR) zelluläre Adhäsion vermittelt werden. Unsere Daten zeigten bei diesen Zellen jedoch eine verringerte Adhäsion in Gegenwart von Vitronectin, abweichend zu den Ergebnissen für Weri-Rb1-Zellen. Eine Erklärung hierfür könnte die hohe Expression des Plasminogen Aktivator Inhibitors 1 (PAI-1) oder von Kininogenen sein, welche in porcinen Netzhaut-Präparaten nachgewiesen wurde (Meyer *et al.*, 2002; Liu und Feener, 2013). PAI-1 und Kininogene vermitteln über ihre Bindung an Vitronectin anti-adhäsive Effekte, durch ihre inhibitorische Wirkung auf die Integrin- oder uPAR-vermittelte Adhäsion (Kjøller *et al.*, 1997; Schvartz, Seger und Shaltiel, 1999; Preissner und Reuning, 2011).

Weiter wurden mit den Weri-Rb1 Zellen von niedrigem Differenzierungsgrad genutzt. Weri-Rb1-Zellen zeigen sowohl typische Marker für Photorezeptor-Zapfen (Xu *et al.*, 2014) als auch für Stäbchen (Di Polo und Farber, 1995; Gustmann, 2009). Gleichzeitig können aber auch Merkmale retinaler Progenitor-Zellen gefunden werden (Y. Liu *et*

*al.*, 2017), sodass von einer geringen Maturation bei Weri-Rb1-Zellen ausgegangen werden muss. Die Photorezeptoren, welche den Großteil der dissoziierten Zellen in der Netzhaut von Schweinen einnehmen, sind im Gegenzug ausdifferenziert. Das Expressionsprofil von Weri-Rb1 und dissoziierten neuronalen Zellen ist also stark unterschiedlich, was die unterschiedliche Reaktion auf Vitronectin erklären könnte.

Schließlich stellen die dissoziierten porcinen Netzhäute ein Gemisch aus allen Zellen der porcinen Netzhaut dar. Es könnte also sein, dass der Hauptanteil der adhärenen Zellen nicht durch Photorezeptoren gebildet wird (auch wenn diese einen Großteil der Zellen in der Netzhaut ausmachen), sondern vorwiegend ein anderer Zelltyp adhäriert. In unserer Auswertung kann nicht differenziert werden, welche Art von Zellen am Boden der Zellkulturplatten anhaftet. Handelt es sich tatsächlich nicht um Photorezeptoren, so könnte dieser andere Zelltyp gegenüber Vitronectin eine gänzlich andere Reaktivität aufweisen.

Unterschiede im adhäsiven Effekt des Vitronectins bei verschiedenen Zelltypen wurden auch schon zuvor beobachtet. So konnte in Adhäsionsversuchen mit HUVECs unter Vitronectineinfluss gezeigt werden, dass deren zelluläre Adhäsion ebenfalls verringert ausfiel, während Vitronectin bei hiPSC-RPE-Zellen und porcinen RPE-Zellen eine gesteigerte Adhäsion bewirkte (Biasella *et al.*, 2020). Interessanterweise führten im Rahmen dieser Studien Adhäsionsversuche auf Vitronectin-haltiger EZM bei allen Zellen, auch HUVECs, zu gesteigerter Adhäsion im Vergleich zu Versuchen auf Vitronectin-freier EZM. So ist es denkbar, dass die zelluläre Adhäsion von Photorezeptoren im subretinalen EZM-haltigen Raum, ebenfalls durch Vitronectin gesteigert wird. Dabei könnte Vitronectin zu einer Veränderung der EZM-Zusammensetzung führen, wie bereits ebenfalls in der Studie von Biasella und Kollegen in *in vitro* Versuchen gezeigt werden konnte (Biasella *et al.*, 2020).

### **5.2 Zellhomöostase unter Einfluss von oxidativem Stress und Vitronectin**

Das Absterben von Photorezeptoren in der Pathogenese der AMD kann unterschiedliche Ursachen haben. Kumulativer oxidativer Stress auf die Zellen der Netzhaut scheint einen besonders großen Einfluss zu haben (Winkler *et al.*, 1999; Hollyfield, 2010). Deshalb sollten mögliche Effekte von Vitronectin auf AMD-assoziierte Veränderungen der Zellhomöostase unter oxidativem Stress untersucht werden. Als

Modell für Photorezeptoren wurden dabei wieder Weri-Rb1-Zellen genutzt. Nach Vorversuchen zur Etablierung einer geeigneten Konzentration von  $H_2O_2$  zur Induktion von oxidativem Stress, konnte zwischen Vitronectin-behandelten und unbehandelten Zellen kein Unterschied in der Reduktion des zellulären Überlebens festgestellt werden. Da für die reduzierte Aktivität mitochondrialer und cytoplasmatischer Enzyme in gestressten Zellen unterschiedliche Mechanismen in Frage kommen und auch diese auf einen möglichen Einfluss von Vitronectin untersucht werden sollten, wurden anschließend Versuche zur Induktion von Apoptose, Autophagie und zur intrazellulären Signalwegsaktivierung von Weri-Rb1-Zellen unter oxidativem Stress durchgeführt.

### 5.2.1 Apoptose-Induktion

Ein möglicher Mechanismus, der immer wieder im Zusammenhang mit einem Absterben von Photorezeptoren diskutiert wird, ist die Apoptose (Cook et al., 1995; Remé et al., 1998; Murakami et al., 2013). In postmortalen humanen Netzhautpräparaten von AMD-Patienten konnten Hinweise auf apoptotische Zelluntergangsvorgänge in Photorezeptoren gefunden werden (Dunaief et al., 2002). In Mausmodellen mit Retinitis pigmentosa konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Photorezeptoren durch Apoptose zugrunde gehen (Portera-Cailliau et al., 1994; Corrochano et al., 2008). Für den Einfluss von Vitronectin gibt es in der Literatur dabei sowohl Hinweise auf eine pro-apoptotische Wirkung (Felding-Habermann und Cheresch, 1993; Malagolini et al., 2013), als auch Hinweise auf eine anti-apoptotische Wirkung (Bae et al., 2012; Goyal und Ta, 2020).

In dieser Arbeit sollte die Apoptose in Weri-Rb1-Zellen durch Behandlung mit  $H_2O_2$  induziert und anschließend durch Tunel-Färbung sichtbar gemacht werden. Dabei zeigte sich für die oxidativ gestressten Zellen eine geringfügig höhere Rate an apoptotischen Zellen im Vergleich mit den nicht-gestressten Zellen. Die geringe Steigerung der Apoptoserate von Weri-Rb1-Zellen könnte zunächst als Zeichen für eine für den Versuch zu geringe  $H_2O_2$ -Konzentration interpretiert werden. Jedoch wurde bei gleicher  $H_2O_2$ -Konzentration im MTT-Assay eine deutliche Reduktion des Zellüberlebens festgestellt. Diese könnte somit auch durch andere Mechanismen des Zellunterganges verursacht worden sein. Beispielsweise ist von Nekrose oder

## Diskussion

Nekroptose beim Untergang von Zellen unter oxidativem Stress in der AMD berichtet worden (Kinnunen *et al.*, 2012; Hanus, Anderson und Wang, 2015). Neuere Erkenntnisse lassen außerdem darauf schließen, dass der Zelltod von Photorezeptoren durch oxidativen Stress in degenerativen Netzhauterkrankungen eher durch Caspase-unabhängige (also nicht-apoptotische) Signalwege initiiert wird (Newton und Megaw, 2020). So könnte die verminderte Beseitigung von All-trans-Retinsäure in der trockenen AMD zur Ferroptose der Photorezeptoren führen, einem Apoptose-unabhängigen Weg des Zelltodes (Chen *et al.*, 2021). Vitronectin könnte dabei auch diese alternativen Wege des Zelltodes beeinflussen (Stepanek *et al.*, 2011).

Weiter wäre es auch möglich, dass die Weri-Rb1-Zellen durch die Versuchsdurchführung selbst stark geschädigt worden waren und Apoptose auch in der nicht-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-gestressten Gruppe induziert wurde. Der zusätzliche oxidative Stress durch eine Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> würde dann nur noch zu einer geringen zusätzlichen Steigerung der Apoptoseaktivität in der behandelten Zellgruppe führen. Mögliche Ursache für diese „unbeabsichtigte“ Apoptose-Induktion, wäre beispielweise der Nährstoffentzug, durch das für den Versuch verwendete Serum-freie Zellmedium. Für viele Zellarten ist belegt, dass das Fehlen bestimmter Nährstoffe Apoptose in den betroffenen Zellen induzieren kann (Mercille und Massie, 1994; Caro-Maldonado und Muoz-Pinedo, 2011). Auch neuronale Zellen können betroffen sein (J. Liu *et al.*, 2017). Zudem könnten auch Scherkräfte, welche durch das mehrmalige Waschen auf die Zellen einwirken, in neuronalen Zellen zur Apoptose führen (Song *et al.*, 2020).

Die mit der AMD-assoziierten Vitronectin-Variante VTN\_rs704:T behandelten Zellen wiesen sowohl in den H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-gestressten als auch in den ungestressten Weri-Rb1-Zellen eine geringfügig niedrigere Apoptoserate auf, als die der Kontrolleluat- und VTN\_rs704:C-behandelten Zellen. Dies könnte durch eine anti-apoptotische Aktivität von VTN\_rs704:T erklärt werden. So beschrieben Bae und Kollegen, dass in entzündeten Geweben Vitronectin die Apoptose von Neutrophilen verhindern konnte (Bae *et al.*, 2012). Da bereits bekannt ist, dass die genetische Variante rs704 im VTN-Gen die Spaltung des Vitronectins ändern und damit auch potentielle Veränderungen in der dreidimensionalen Konfiguration einhergehen können (Tollefsen, Weigel und Kaber, 1990), könnte dies eine Erklärung für veränderte Eigenschaften von VTN\_rs704:T liefern. Anzumerken ist jedoch, dass dieser Versuch lediglich in drei

## Diskussion

Replikaten durchgeführt wurde und die beobachteten Unterschiede statistisch nicht signifikant waren. Weitere Repetitionen des Experiments könnten dies klären. Ebenso stellt sich die Frage, ob die in dem artifiziellen Versuchsaufbau beobachtete, leicht anti-apoptotische Aktivität des Vitronectins auch *in vivo* eine Rolle in der AMD-Entstehung spielt.

### 5.2.2 Autophagie-Induktion

Veränderte Autophagie-Mechanismen in Zellen der Netzhaut gelten bereits seit langem als AMD-assoziierte Prozesse (Kaarniranta *et al.*, 2023). Neben pathologischen Veränderungen in der Autophagie von RPE-Zellen sind dabei auch Veränderungen in Photorezeptoren von Bedeutung (Bo *et al.*, 2015). So wurde beispielsweise von Autophagie-Mechanismen in absterbenden Photorezeptoren nach retinaler Ablösung berichtet (Besirli *et al.*, 2011). In lichtgeschädigten Mäusenetzhäuten und Photorezeptoren, die mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt worden waren, konnten ebenfalls Hinweise auf Induktion von Autophagie gefunden werden (Kunchithapautham und Rohrer, 2007). Außerdem konnten in Drusen AMD-erkrankter Augen erhöhte Mengen Autophagie-spezifischer Marker detektiert werden (Wang *et al.*, 2010). Gleichzeitig konnten in Drusen auch hohe Mengen an Vitronectin gefunden werden (Hageman und Mullins, 1999). Vitronectin kann wiederum über Integrin-Rezeptoren den MAPK-Signalweg und darüber Autophagieprozesse beeinflussen (Schvartz, Seger und Shaltiel, 1999).

In dieser Arbeit konnte in den H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-behandelten Weri-Rb1-Zellen eine Reduktion an intrazellulärem p62 und eine relativ erhöhte Expression von LC3 (II) im Vergleich zur LC3 (I)-Menge gezeigt werden. Diese charakteristischen Veränderungen bekannter Autophagiemarker (Mizushima und Yoshimori, 2007; Liu *et al.*, 2016), lassen auf eine Autophagie-Induktion in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-behandelten Weri-Rb1-Zellen schließen. Sie stehen im Einklang mit Ergebnissen von Kunchithapautham und Rohrer, die eine Autophagie-fördernde Wirkung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf Photorezeptor-Zellen zeigen konnten (Kunchithapautham und Rohrer, 2007). Die im MTT-Assay beobachtete Abnahme der Weri-Rb1 Zellviabilität nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stress könnte folglich durch eine gesteigerte Autophagie-Aktivität erklärt werden.

Mit Vitronectin-Behandlung wurden sowohl bei ungestressten als auch bei H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-gestressten Zellen (hier sogar mit stärkerem Effekt) höhere Mengen an LC3 (II) beobachtet als in der Kontrolle. Auch fiel in den Vitronectin-behandelten Zellen die p62-Expression geringer aus als in der Kontrolle. Dies könnte für einen Autophagie-induzierenden Effekt von Vitronectin sprechen. Vitronectin ist über die Bindung an Integrin-Rezeptoren an der Regulation von MAPK-Signalwegen beteiligt (Schvartz, Seger und Shaltiel, 1999). Diese wiederum sind in der Lage durch ihre Aktivierung Autophagie zu vermitteln (Cagnol und Chambard, 2010; Kyosseva, 2016). Eine Feinregulation dieser Prozesse durch Vitronectin könnte entscheidend zur Regulation der retinalen Integrität beitragen.

### 5.2.3 Intrazelluläres Signaling

Es ist bekannt, dass sowohl in der Entstehung retinaler Degeneration in der AMD (Makarev *et al.*, 2014) als auch bei der zellulären Reaktion auf oxidativen Stress (Poli *et al.*, 2012) die Aktivierung verschiedener Signalwege eine wichtige Rolle spielt. Vitronectin kann nach Bindung an seine Integrin-Rezeptoren verschiedene Signalwege aktivieren, wie beispielweise den ERK-Signalweg (Schvartz, Seger und Shaltiel, 1999), den FAK-Signalweg (Keasey *et al.*, 2018) oder den AKT-Signalweg (Zheng *et al.*, 2000).

In der Analyse der ERK-Signalwegsaktivierung zeigt sich für die mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelten Proben eine tendenzielle Steigerung der ERK1/2-Phosphorylierung im Vergleich zu den nicht gestressten Proben. Dies steht im Einklang mit vorherigen Studien, bei denen der ERK1/2-Signalweg ebenfalls durch oxidativen Stress aktiviert werden konnte (Cargnello und Roux, 2011).

Durch Vitronectin konnte eine Steigerung des ERK1/2-Signalings erzielt werden, wobei die AMD-Risiko-assoziierte Variante VTN\_rs704:T einen stärkeren Effekt aufwies, als die nicht-Risiko-assoziierte Variante VTN\_rs704:C. Unterschiede im Effekt der Vitronectin-Varianten könnten durch die zuvor diskutierten strukturellen Unterschiede der Proteinisoformen (Tollefsen, Weigel und Kabeer, 1990; Biasella *et al.*, 2020) erklärt werden, welche unterschiedliche Kapazitäten bei der Bindung an die Rezeptoren oder der Regulation der Rezeptor-Aktivität aufweisen könnten. Da das ERK1/2-Signaling auch entscheidend die Autophagie und Apoptose reguliert (Plowey

## Diskussion

*et al.*, 2008; Cagnol und Chambard, 2010; Sridharan, Jain und Basu, 2011; Yue und López, 2020), könnte dies auch den zuvor beschriebenen Einfluss der Vitronectin-Varianten auf diese Prozesse erklären.

Für die Auswertung der FAK-Signalwegsaktivierung zeigten sich sowohl im Vergleich von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-gestressten mit den nicht-gestressten Zellproben als auch im Vergleich von Kontrollen mit Vitronectin-behandelten Proben keine Unterschiede. Hier müssen jedoch auch die hohen Standardabweichungen in den Versuchsergebnissen erwähnt werden, welche vermutlich den schwachen und damit schlecht quantifizierbaren Fluoreszenzsignalen geschuldet sind. Der Grund hierfür könnte in einer generell sehr geringen Aktivierung der FAK-Signalwege in Weri-Rb1-Zellen liegen. Weri-Rb1-Zellen wachsen gewöhnlich suspendiert in ihrem Zellmedium (McFall, Sery und Makadon, 1977). In Untersuchungen zum Vergleich adhärenter und nicht-adhärenter Zellen konnte eine unterschiedliche Expression von Gen-Sets beobachtet werden, die mit Zell-Zell-Bindung und Cytoskelettorganisation in Verbindung stehen. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von Proteinen, die in Zelladhäsionsprozesse involviert sind, in Suspensionszellen stark reduziert war (Malm *et al.*, 2020; Ye *et al.*, 2021). So könnte die nicht-adhärente Lebensweise der Weri-Rb1-Zellen dazu beitragen, dass Signalwege wie der FAK-Signalweg, die ihren Ursprung an fokalen adhäsiven Kontakten haben, nicht oder nur sehr schwach induziert werden können.

In der Analyse der AKT-Signalwege konnte bei den mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelten Proben eine Steigerung der phosphorylierten AKT-Menge gegenüber den nicht oxidativ gestressten Proben festgestellt werden. Dies steht im Einklang mit mehreren Publikationen, die zeigen, dass eine Aktivierung des AKT-Signalwegs als zelluläre Reaktion auf oxidativen Stress nachgewiesen werden kann (Song *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2011; Koundouros und Poulgiannis, 2018). Durch die Aktivierung des AKT-Signalwegs über externe Stimuli wie oxidativen Stress, werden zelluläre Prozesse aktiviert, die zum Überleben der Zelle beitragen sollen (Song, Ouyang und Bao, 2005). Zu diesen protektiven Reaktionen gehören beispielsweise Apoptose oder Autophagie (Hemmings und Restuccia, 2012; Katoh, 2020).

In den hier durchgeführten Versuchen fiel nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung die Aktivierung des AKT-Signalwegs in den mit Kontrolleluat behandelten Proben stärker aus, als in den mit Vitronectin behandelten Proben, wobei mit VTN\_rs704:T ein etwas stärker

## Diskussion

hemmender Effekt als mit VTN\_rs704:C beobachtet werden konnte. Im Gegensatz dazu konnte in bisherigen Studien eine Aktivierung des AKT-Signalwegs durch Vitronectin gezeigt werden (Zheng *et al.*, 2000). Diese Beobachtung könnte durch den zeitlichen Ablauf der Signalwegsaktivierung erklärt werden: Auf Bindung des externen Stimulus folgt die Aktivierung von Signalwegen, welche jedoch später durch verschiedene zelluläre Prozesse einer gegenläufigen Regulation unterliegen (Bjorge, Jakymiw und Fujita, 2000; Guarino, 2010). Es wäre denkbar, dass durch eine zu lange Inkubationszeit in diesem Experiment die direkten Auswirkungen des Vitronectins auf den AKT-Signalweg durch gegenläufige Prozesse überlagert wurden.

Generell ist die Signalwegsaktivierung in Zellen ein zeitlich und räumlich koordinierter Prozess (Bjorge, Jakymiw und Fujita, 2000; Kim und Choi, 2010; Lavoie, Gagnon und Therrien, 2020), der durch Messung zu einem bestimmten Inkubationszeitpunkt, wie sie im Rahmen dieser Studie durchgeführt wurde, nicht umfassend aufgeschlüsselt werden kann. Die Versuche dieser Arbeit geben einen ersten Hinweis auf mögliche Effekte des Vitronectins, wie die Aktivierung des ERK1/2-Signalwegs. Um den Effekt des Vitronectins auf die intrazelluläre Signalwegsaktivierung im subretinalen Raum und im Speziellen auf Photorezeptoren zu klären, sind weitere Versuche erforderlich mit kürzeren Inkubationszeiten und auch anderen Modellsystemen, wie zum Beispiel retinalen Explantaten oder *in vivo* Versuchen an murinen Netzhäuten.

### **5.2.4 Mögliche Bedeutung der Befunde für die AMD-Pathogenese**

In der Literatur finden sich Hinweise, dass Apoptose und Autophagie sowohl an cytoprotektiven Mechanismen beteiligt sein können als auch direkt am Untergang von Photorezeptoren (Mizushima und Levine, 2010; Hseu *et al.*, 2019; Janus *et al.*, 2020). Diese Prozesse unterliegen dabei einer strikten Regulation durch intrazelluläre Signalwege (Cook *et al.*, 1995; Degterev *et al.*, 2005; Buytaert *et al.*, 2006; Hemmings und Restuccia, 2012; Katoh, 2020).

In Mausmodellen mit Retinitis pigmentosa konnte sich die Apoptose von Photorezeptorzellen protektiv auf das Überleben von Netzhautzellen und den Erhalt der visuellen Funktion auswirken (Halaby, 2012). Durch die Überexpression von anti-apoptotischem Bcl-2 konnte nur eine partielle Erhaltung licht-geschädigter Photorezeptoren gezeigt werden (Chen *et al.*, 1996; Joseph und Li, 1996; Tsang *et al.*,

## Diskussion

1997), während bei physiologischer Expression von Bcl-2 und damit normaler Funktionsweise der Apoptose eine größere Zahl überlebender Photorezeptoren beobachtet werden konnte (Lem *et al.*, 1992; Bennett *et al.*, 1996).

Autophagie kann sich ebenfalls protektiv auf das zelluläre Überleben auswirken. In Photorezeptoren von *Drosophila* führt eine Suppression der Autophagie zu alters- und lichtabhängiger Degeneration der Zellen (Wang, Lao und Edgar, 2009). Ein Knockdown von den an der Autophagie beteiligten Genen *Atg7* oder *Atg8* zeigt ähnliche Effekte, zusammen mit einer Akkumulation von Rhodopsin (Midorikawa *et al.*, 2010). In Mäusen konnte beobachtet werden, dass das Fehlen der Autophagie-Marker Beclin1 oder *Atg7* vermehrt zu Licht-induzierter retinaler Degeneration führt (Chen *et al.*, 2013). Das Fehlen von Beclin1 kann dabei auch zu verstärkten Ablagerungen von  $\beta$ -Amyloiden mit einhergehenden neurodegenerativen Veränderungen führen (Pickford *et al.*, 2008). Auch in der AMD wurden solche  $\beta$ -Amyloid-Ablagerungen beschrieben (Johnson *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2005).

Autophagie- und apoptotische Prozesse führen jedoch auch zum Absterben retinaler Zellen. So vermittelt exzessive Lichteinwirkung auf Photorezeptoren deren Zelltod durch Apoptose (Remé *et al.*, 1998). Nach degenerativer Netzhautablösung konnten bei absterbenden Photorezeptoren typische Merkmale apoptotischer Mechanismen gefunden werden (Murakami *et al.*, 2013). Die Inhibition apoptotischer Signalwege bei Netzhautablösung kann wiederum das zelluläre Überleben von Photorezeptoren steigern (Zacks *et al.*, 2007). In postmortalen humanen Netzhautpräparaten von AMD-Patienten wurden ebenfalls Hinweise auf apoptotische Zelluntergangsvorgänge gefunden (Dunaief *et al.*, 2002) und auch in Mausmodellen mit Retinitis Pigmentosa konnte gezeigt werden, dass Photorezeptoren durch Apoptose zugrunde gehen (Portera-Cailliau *et al.*, 1994; Corrochano *et al.*, 2008).

Auch die Autophagie kann entscheidend zur Regulation degenerativer Prozesse in der Netzhaut beitragen. So konnte gezeigt werden, dass bei lichtgeschädigten Zellen der Zelltod über Autophagie induziert wird, wenn die Zellen apoptotisch nicht zugrunde gehen konnten (Buytaert *et al.*, 2006). Dieser Mechanismus käme einer exzessiven Selbst-Degradation gleich (Yu *et al.*, 2004). Auch gibt es Hinweise auf Verbindungen zwischen der Autophagie und der Nekrose als Ursache für den Zelltod (Degterev *et al.*, 2005).

## Diskussion

Interessanterweise finden sich in der Literatur auch Hinweise, dass es unter Inhibition von Autophagie-Mechanismen in Photorezeptoren unter Stresskonditionen zu vermehrter Akkumulation von Phototransduktionsproteinen kommt und die Zellen über Apoptose zugrunde gehen (Z. Zhou *et al.*, 2015; Xiao *et al.*, 2021). Durch den induzierten Stress könnte zunächst cytoprotektive Autophagie ausgelöst werden, um die Photorezeptoren vor cytotoxischen Stoffwechselprodukten zu schützen (Yao *et al.*, 2016). Hingegen könnte ein durch Autophagie nicht kontrollierbares Ausmaß an stressbedingter Zellschädigung der Photorezeptoren zu apoptotischem Zelluntergang führen. Dies könnte auch eine mögliche Erklärung für die in unseren Versuchen erhaltenen Ergebnisse liefern, in denen unter oxidativem Stress eine erhöhte Autophagie-Aktivität der Zellen nachgewiesen, jedoch nur geringe Apoptose-Aktivität detektiert werden konnte. Für RPE-Zellen ist bereits seit längerem bekannt, dass oxidativer Stress zu eingeschränkter Autophagie führt und in Folge essenzielle RPE-Funktionen, wie die Phagozytose von Photorezeptor-Außensegmenten und deren Abbau gestört wird, RPE-Zellen in Folge zugrunde gehen und letztlich Photorezeptoren absterben können (Z.-Y. Zhang *et al.*, 2020). Ein ähnlicher Prozess könnte auch in Photorezeptoren ablaufen und zu deren Zelltod führen.

In der Netzhaut scheint also eine fein-balancierte Regulation von intrazellulären Signalwegen, Apoptose und Autophagie für die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase von essenzieller Bedeutung zu sein. Vitronectin könnte über seinen Einfluss auf diese Prozesse entscheidend in die Steuerung der retinalen Integrität eingreifen und somit zur AMD-Pathogenese beitragen, bei der ein Verlust dieser ausbalancierten Regulation auftritt (Ding, Patel und Chan, 2009).

## **5.3 Prozesse in hiPSC-RPE-Zellen unter Vitronectin-Einfluss**

### **5.3.1 Phagozytose**

Veränderungen der Phagozytosevorgänge von RPE-Zellen der Netzhaut wurden vielfach als typische Zeichen der AMD-Pathogenese beschrieben (Kinnunen *et al.*, 2012; Lim *et al.*, 2012; Inana *et al.*, 2018). Der Vitronectin-bindende Integrin-Rezeptor  $\alpha_v\beta_5$  spielt bei der Regulation der Phagozytose eine entscheidende Rolle (Felding-Habermann und Cheresch, 1993; Horton, 1997; Leavesley *et al.*, 2013; Kwon und Freeman, 2020).

## Diskussion

In den hier durchgeführten Phagozytose-Assays war zum ersten Messzeitpunkt (2 h nach Zugabe der Photorezeptor-Außensegmente zu den hiPSC-RPE-Zellen) eine größere Rhodopsin-Aufnahme in die Zellen zu detektieren, die mit Kontrolleluat behandelt worden waren, verglichen mit den Vitronectin-behandelten Zellen. Zu späteren Messzeitpunkten nahm die Rhodopsinmenge in allen Zellen ab, wobei auch die Unterschiede zwischen Vitronectin- und kontrollbehandelten Zellen kleiner wurden.

Die in unseren Versuchen gefundene inhibitorische Wirkung von Vitronectin auf die Phagozytose steht in Einklang mit Beobachtungen aus anderen Studien (Bae *et al.*, 2013). Dieser Effekt könnte aus der Konkurrenz des Vitronectins mit anderen Integrin-Rezeptorliganden resultieren. Während der Phagozytose vermittelt beispielsweise auch Milchfettglobulin EGF-Faktor 8 (MFG-E8) die Bindung der Photorezeptor-Außensegmente an  $\alpha_v\beta_5$ -Integrin-Rezeptoren (Kwon und Freeman, 2020). Vitronectin könnte durch die Bindung an Integrin  $\alpha_v\beta_5$  zu einer kompetitiven Hemmung der Bindung von MFG-E8 führen und damit im Vergleich zur Kontrolle niedrigere Phagozytoseraten verursachen.

Die sinkenden Rhodopsinsignale im weiteren zeitlichen Verlauf des Versuchs könnten durch die Degradation des Sehfärbstoffes in den hiPSC-RPE-Zellen verursacht werden, wie sie für RPE-Zellen bereits vielfach beschrieben wurde (Bok, 1993; Kevany und Palczewski, 2010; Kwon und Freeman, 2020). Die anfänglichen Unterschiede in den Rhodopsin-Mengen zwischen Vitronectin- und Kontroll-behandelten Proben bleiben dabei nicht erhalten, es ist jedoch unklar, ob dies auf eine beschleunigte Degradation des Rhodopsins in Kontroll-Proben oder auf die niedrigen und damit schwer zu quantifizierenden Rhodopsin-Mengen zurückzuführen ist. Inwiefern Vitronectin also auf den Rhodopsin-Degradations-Prozess Einfluss nimmt, konnte im Rahmen dieser Studie nicht geklärt werden.

### 5.3.2 Intrazelluläre Signalwegsaktivierung

Wie alle zellulären Prozesse, ist auch die Phagozytose ein durch intrazelluläre Signalwege gesteuerter Prozess (Wu *et al.*, 2005; Kevany und Palczewski, 2010; Chiang *et al.*, 2017). Zu den regulatorischen Signalwegen gehören auch hier der ERK1/2-Signalweg (Plows *et al.*, 2004; Chiang *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2019), der FAK-Signalweg (Finnemann, 2003) und außerdem der SRC-Signalweg (Shelby *et al.*,

## Diskussion

2015), welche auch durch Vitronectin beeinflusst werden können (Felding-Habermann und Cheresch, 1993; Schwartz, Seger und Shaltiel, 1999; Salazar und Rozengurt, 2001; Leavesley *et al.*, 2013).

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen der Signalwegsaktivierung in hiPSC-RPE-Zellen nach Phagozytose von Photorezeptor-Außensegmenten konnten zum ersten Messzeitpunkt nach Beginn der Phagozytose die größten Mengen an phosphoryliertem und damit aktiviertem ERK1/2 und SRC nachgewiesen werden. Die Aktivierung dieser Proteine sank darauf mit zunehmender Inkubationszeit ab. Dies steht im Einklang mit Ergebnissen vorheriger Studien zur Signalwegsaktivierung in Phagozytose-Assays. So wurde beispielsweise gezeigt, dass das Maximum der ERK1/2-Phosphorylierung 15 min nach der Phagozytose von Photorezeptor-Außensegmenten durch ARPE-19-Zellen zu beobachten ist und im Anschluss graduell abnimmt (Chiang *et al.*, 2017).

Trotz hoher Standardabweichungen lassen unsere Daten auf eine leicht erhöhte ERK1/2-Aktivierung zum ersten Messzeitpunkt in den Vitronectin-behandelten Proben gegenüber den Kontrolleluat-behandelten Proben schließen, was jedoch in zusätzlichen Replikaten bestätigt und statistisch abgesichert werden muss. Mit fortschreitender Zeit und damit absinkenden Mengen an aktiviertem ERK1/2, waren keine Unterschiede mehr zwischen Vitronectin-behandelten und unbehandelten Zellen zu erkennen. Die erhöhte Aktivierung des ERK1/2-Signalwegs, in den mit Vitronectin behandelten Zellen zum ersten Messzeitpunkt könnte durch die Bindung des Vitronectins an den  $\alpha\beta_5$ -Integrin-Rezeptor erklärt werden, welche eine Aktivierung des ERK1/2-Signalwegs induzieren kann (Yee, Weaver und Hammer, 2008). Dies stünde auch im Einklang mit der zuvor beschriebenen geringeren Phagozytoseaktivität in den Vitronectin-behandelten Proben (siehe Punkt 5.3.1).

Zum letzten Messzeitpunkt wurden dagegen verringerte Mengen an phosphoryliertem SRC in den Vitronectin-behandelten Proben im Vergleich zu den Kontrolleluat-behandelten Proben detektiert. Da dieser Effekt zu den vorherigen Zeitpunkten nicht zu beobachten war, stellt sich die Frage, ob die längere Vitronectin-Inkubation die SRC-Aktivierung inhibieren könnte. Wie schon zuvor erwähnt, könnte Vitronectin über die Integrin-Rezeptoren den SRC-Signalweg aktivieren (Playford und Schaller, 2004). Eine Erklärung für den inhibitorischen Effekt von Vitronectin könnte auch hier, wie

## Diskussion

zuvor diskutiert (siehe Punkt 5.3.1), im zeitlichen Ablauf der Signalwegsinduktion und darauffolgender gegenläufiger zellulärer Prozesse liegen (Bjorge, Jakymiw und Fujita, 2000; Guarino, 2010).

In den Analysen zur Aktivierung des FAK-Signalwegs konnte kein zeitlicher Effekt oder ein Einfluss von Vitronectin beobachtet werden. Hier war jedoch, wie zuvor für Weri-Rb1-Zellen (siehe Punkt 5.2.3) eine hohe Standardabweichung in den Proben zu beobachten, die vermutlich ebenfalls aufgrund schwacher und damit schlecht quantifizierbarer Signale zu Stande kam.

### 5.4 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen darauf schließen, dass Vitronectin einen Beitrag zu subretinalen Prozessen der AMD-Pathologie leistet, wie der Photorezeptor-Adhäsion, der Signalwegsaktivierung in verschiedenen Zelltypen und der RPE-Phagozytose. Damit liefert diese Arbeit einen Beitrag, die AMD-Pathogenese und die Auswirkungen auf Prozesse in und um Photorezeptoren der Netzhaut besser zu verstehen. Jedoch werden auch zukünftig weitere Untersuchungen vieler Aspekte der Funktion von Vitronectin im subretinalen Raum nötig sein, um den Einfluss von Vitronectin auf pathologische Prozesse der AMD ganz aufzuschlüsseln und letztendlich effektive Therapieoptionen für Patienten entwickeln zu können. Gerade die Untersuchungen zur Aktivierung einzelner Signalwegskaskaden und ihrer genauen Wirkungsweise in pathologischen Prozessen der AMD, wie beispielsweise der Autophagie, könnten hier ein Schlüssel zur zukünftigen medikamentösen Behandlung sein. So gab es bereits erste Ideen, wie Sirolimus zur Behandlung der AMD eingesetzt werden könnte, ein Medikament, das durch die Induktion der Autophagie zur Erhaltung von Netzhautgeweben und zur Beseitigung schädlicher Veränderungen der Netzhaut beitragen soll (Murakami *et al.*, 2013). Die klinische Wirksamkeit dieses Medikaments stellte sich jedoch bisher als nicht zufriedenstellend heraus (Wong *et al.*, 2013; Minturn *et al.*, 2021), sodass es nach wie vor hohen Bedarf an therapeutischen Optionen für eine effektive AMD-Behandlung gibt.

### 6 Zusammenfassung

Die altersbedingte Makuladegeneration (AMD) ist eine komplexe genetische Erkrankung, die in vielen Ländern der westlichen Welt die häufigste Ursache für Erblinden in höherem Alter darstellt (Salimiaghdam *et al.*, 2019). Die Risikofaktoren der AMD sind vielfältig und interindividuell unterschiedlich stark ausgeprägt (Chakravarthy *et al.*, 2010). Ablösung und Absterben der Photorezeptoren, Veränderungen der Homöostase, sowie starke Einschränkungen subretinaler Phagozytose-Mechanismen führen zu progredientem Verlust des Sehvermögens der Betroffenen (Van Lookeren Campagne *et al.*, 2014). Alle diese Faktoren können durch die Genetik beeinflusst werden (DeAngelis *et al.*, 2017).

Der Polymorphismus rs704 im *VTN*-Gen auf Chromosom 17 konnte in aktuellen GWAS als eine AMD-assoziierte genetische Variante detektiert werden (Fritsche *et al.*, 2016). Durch rs704 kommt es an Position 400 des Vitronectin-Proteins zu einem Aminosäureaustausch von Threonin zu Methionin. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Auswirkungen der unterschiedlichen Vitronectin-Varianten auf subretinale AMD-assoziierte Prozesse untersucht.

Hierfür wurden die nicht-AMD-assoziierte Variante *VTN*\_rs704:C sowie die AMD-assoziierte Variante *VTN*\_rs704:T heterolog in HEK-293-EBNA-Zellen exprimiert, aufgereinigt und in funktionellen Analysen eingesetzt.

In Versuchen zur zellulären Adhäsion retinaler Zellen (Weri-Rb1-Zellen und dissoziierte Zellen porciner Netzhaut) konnten unterschiedliche Effekte von Vitronectin auf die Adhäsion der beiden Zelltypen gezeigt werden: Ein verstärkender Einfluss auf die Adhäsion von Weri-Rb1-Zellen und ein inhibitorischer Einfluss auf die Adhäsion der porcinen Netzhautzellen. Dabei wurde kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Vitronectin-Varianten gefunden.

Weiter wurden nach Induktion von oxidativem Stress auf Retinoblastom-Zellen Effekte der Vitronectin-Varianten auf Apoptose- und Autophagie-Induktion untersucht und die intrazelluläre Signalwegs-Aktivierung analysiert. Für oxidativ gestresste Zellen zeigte sich hierbei eine geringfügig erhöhte Rate an Apoptose bzw. Autophagie, wobei die AMD-assoziierte Variante *VTN*\_rs704:T einen leichten Apoptose-inhibierenden Effekt ausübte. Beide Vitronectin-Varianten wiesen tendenziell einen (statistisch nicht signifikanten) stimulierenden Effekt auf die Autophagie auf. In der Analyse der ERK1/2-

## Zusammenfassung

bzw. AKT-Signalwegsaktivierung zeigt sich für alle oxidativ gestressten Proben eine tendenzielle Steigerung der ERK1/2- und AKT-Phosphorylierung (und somit Aktivierung) im Vergleich zu allen nicht gestressten Proben. Unter Vitronectin-Behandlung konnte dabei eine etwas stärkere ERK1/2-Phosphorylierung beobachtet werden, am stärksten fiel dieser Effekt mit der AMD-assoziierten Vitronectin-Variante VTN\_rs704:T aus. Die AKT-Phosphorylierung fiel in den Vitronectin-behandelten Proben geringer aus, die AMD-assoziierte Variante zeigte dabei den geringsten Effekt auf die AKT-Phosphorylierung.

Im dritten Teilprojekt wurde der Einfluss der Vitronectin-Varianten auf die Phagozytose und damit verbundene intrazelluläre Signalwegsaktivierung in hiPSC-RPE-Zellen untersucht. Beide Vitronectin-Varianten schienen die Aufnahme von Photorezeptor-Außensegmenten (isoliert aus porciner Netzhaut) zu inhibieren, ein statistisch signifikanter Unterschied wurde zwischen den Zellen nachgewiesen, die mit Kontrolleluat behandelt wurden und den Zellen, die mit der AMD-assoziierten Variante inkubiert wurden. In der Untersuchung der intrazellulären Signalwegsaktivierung konnte ein zeitabhängiger Rückgang des phosphorylierten ERK1/2 ohne wesentliche Unterschiede zwischen den Vitronectin-Varianten beobachtet werden. In den Analysen der SRC-Phosphorylierung konnte ebenfalls eine signifikante zeitabhängige Reduktion der Mengen an phosphoryliertem SRC beobachtet werden, wobei beide Vitronectin-Varianten zu fortgeschrittener Zeit einen leichten inhibitorischen Effekt auf die Phosphorylierung zeigten.

Zusammengefasst zeigen die Versuche einen Einfluss des Vitronectins auf subretinale, AMD-assoziierte Prozesse. Inwiefern diese jedoch *in vivo* zur AMD-Pathogenese beitragen, bedarf weiterer Forschung.

## 7 Abstract

Age-related macular degeneration (AMD) is a complex genetic disease and the major cause of legal-blindness in elderly people in many western countries (Salimiaghdam *et al.*, 2019). Risk factors of AMD are widespread and vary strongly between individuals (Chakravarthy *et al.*, 2010). Changes in photoreceptor homeostasis, detachment and cell death together with dysregulation of subretinal RPE-phagocytosis of photoreceptor-outer-segments, lead to progredient vision loss finally (Van Lookeren Campagne *et al.*, 2014). All these factors can be influenced by genetics (DeAngelis *et al.*, 2017).

The polymorphism rs704 in *VTN*-gene on chromosome 17 was detected in latest GWAS by Fritsche and colleagues to be a genetic variant associated with AMD (Fritsche *et al.*, 2016). It causes a change from threonine to methionine at amino acid position 400. Within this thesis, the effect of vitronectin isoforms on subretinal AMD-associated processes was investigated.

For functional analyses, both protein-isoforms were heterologously expressed in HEK-293-EBNA cells, subsequently purified, and used in several experimental approaches.

First experiments on cellular adhesion of retinal cells (Weri-Rb1 cells and dissociated cells of porcine retina) revealed divergent effects of vitronectin on the adhesion of these two cell types: a promoting influence of vitronectin on Weri-Rb1 adhesion and an inhibitory influence on the adhesion of porcine retinal cells. No statistically significant differences were detected between the vitronectin isoforms.

In a second project following the consequences of oxidative stress in retinoblastoma cells, the effect of the vitronectin isoforms on apoptosis and autophagy induction, as well as on intracellular signaling was investigated. Oxidatively stressed cells showed slightly increased rate of apoptosis and autophagy, with a slight apoptosis-inhibiting effect of the AMD-associated isoform *VTN*\_rs704:T. Both vitronectin isoforms seemed to have a stimulatory (but statistically not significant) effect on autophagy. Analyzing ERK1/2- and AKT-signaling, all H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated samples showed a tendentially increased ERK1/2 and AKT-phosphorylation (and thus activation) in comparison to non-stressed samples. Under vitronectin treatment, a stronger ERK1/2-phosphorylation was detectable, being strongest with the AMD-associated vitronectin isoform *VTN*\_rs704:T.

## Abstract

AKT-phosphorylation was decreased in vitronectin treated samples, with the weakest effect shown for AMD-associated isoform.

Thirdly, influence of the two vitronectin isoforms on phagocytosis and associated intracellular signaling by hiPSC-RPE cells has been analyzed. Both vitronectin isoforms seemed to inhibit uptake of photoreceptors-outer-segments (isolated from porcine retina), a statistically significant difference was observed between cells treated with control eluate and cells treated with the AMD-associated vitronectin isoform. Analyzing intracellular signaling during phagocytosis, a gradual decrease of phosphorylated ERK1/2 was observed, without any differences between vitronectin and control treated cells. Analyzing SRC phosphorylation, a significant time-dependent reduction of phosphorylated SRC was detected, with both vitronectin isoforms showing a slightly inhibitory effect on SRC phosphorylation with increasing incubation time.

Taken together these experiments show an influence of vitronectin on subretinal AMD-associated processes. Whether this also affects AMD-pathogenesis *in vivo*, remains to be clarified.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
°C	Grad Celsius
μ	mikro
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
μm	Mikrometer
ABCA1	ATP binding cassette subfamily A member 1
AK	Antikörper
AKT	Proteinkinase B
AMD	altersbedingte Makuladegeneration
ANOVA	analysis of variance
APS	Ammoniumpersulfat
AREDS	Age-Related Eye Disease Study
ARMS/HTRA1	age-related maculopathy susceptibility 2/High-temperature requirement A serine peptidase 1
AS	Aminosäure
BMI	body mass index
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
cDNA	komplementäre DNA
CFH	Komplementfaktor H
CFI	Komplementfaktor I
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
CNV	choroidale Neovaskularisation
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CTRB2-CTRB1	Chymotrypsinogen B2-Chymotrypsinogen B1
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco´s modified eagle medium

## Abkürzungsverzeichnis

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleinacid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat Dinatrium Dihydrat Salz
EGF	epidermal growth factor (epidermaler Wachstumsfaktor)
ERK	extracellular signal-regulated kinase (extrazelluläre Signal-regulierte Kinase)
et al.	et aliter
EZM	extrazelluläre Matrix
F <sub>ab</sub>	Antigen-bindendes Fragment
FAK	focal adhesion kinase (fokale Adhäsionskinase)
FBS/FCS	fetal bovine serum/fetal calve serum (fetales Rinderserum/ fetales Kälberserum)
F <sub>c</sub>	fragment crystallizable (kristallisierendes Fragment)
g	Gramm
G418	Geneticin
GA	geografische Atrophie
GWAS	Genom-weite Assoziationsstudie
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HBD	Heparin-bindende Domäne
HBS	2x HEPES buffered saline
hiPSC	human-induced pluripotent stemcell (humane induzierte pluripotente Stammzelle)
IB	Immunoblot
ICC	Immunocytochemie
IgG	Immunglobulin G
kDa	kilodalton
l	Liter

## Abkürzungsverzeichnis

LB-Medium	Lysogeny broth-Medium
m	milli
M	Molar
mAK	monoklonaler Antikörper
MAPK	mitogen-activated protein kinase (Mitogen-aktivierte Proteinkinase)
MFG-E8	Milchfettglobulin EGF-Faktor 8
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	messenger-ribonucleic acid (messenger-Ribonukleinsäure)
MTT	1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazan
n	nano
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pAK	polyklonaler Antikörper
PB	phosphate-buffer (Phosphatpuffer)
PBS	phosphate-buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	polymerase-chain-reaction (Polymerasekettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
PGF	placental growth factor (plazentarer Wachstumsfaktor)
PVDF	Polyvinyliden-Fluorid
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RPE	retinales Pigmentepithel
rpm	rounds per minute

## Abkürzungsverzeichnis

RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse transcriptase polymerase-chain-reaction (Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion)
s	Sekunde
scFv	single-chain fragment variable (einzelkettiges variables Antikörperfragment)
SDS	sodiumdodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
SMB	Somatomedin B
SNP	single nucleotide polymorphism (Einzelnukleotidpolymorphismus)
SRC	Proto-Onkogen Tyrosin-Proteinkinase Sarkom
Strep	Streptavidin
SYN3-TIMP3	Synapsin 3-TIMP Metalloproteinase Inhibitor 3
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-buffered saline (Tris-gepufferte Salzlösung)
TBS-T	Tris-buffered saline with Tween® 20 (Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween® 20)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinases
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WB	Western-Blot
Ω	Ohm

## 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung des in dieser Arbeit verwendeten <i>E. coli</i> -Stamms und seiner Herkunft.....	17
Tabelle 2: Auflistung aller in der Arbeit verwendeter eukaryotischer Zelllinien, ihrer Ursprungsorganismen, ihrer Ursprungszelltypen und ihrer Herkunft. ....	17
Tabelle 3: Auflistung der in dieser Arbeit benutzten Gewebe, ihrer Ursprungsorganismen und ihrer Herkunft.....	18
Tabelle 4: Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Primer zur Charakterisierung der hiPSC-RPE-Zellen mittels Reverse Transkriptase (RT)-PCR.....	18
Tabelle 5: Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Plasmide/Expressionskonstrukte, ihres Verwendungszwecks und ihrer Herkunft. ...	19
Tabelle 6: Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten primären Antikörper, ihres Typs, der Spezies des Expressionssystems, ihrer Verdünnung in der jeweiligen Anwendung, ihres Verwendungszwecks und ihrer Herkunft.....	19
Tabelle 7: Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten sekundären Antikörper, der Verdünnung in der jeweiligen Anwendung, ihrer Verwendung und ihrer Herkunft. ...	22
Tabelle 8: Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Enzyme bzw. kommerziell erhältlicher, rekombinanter Proteine und ihrer Herkunft. ....	23
Tabelle 9: Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Molekularmassenstandards, ihres Verwendungszwecks und ihrer Herkunft.....	23
Tabelle 10: Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Kit-Systeme und ihrer Herkunft.....	24
Tabelle 11: Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien, sowie ihrer Herkunft.....	24
Tabelle 12: Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen, ihrer Zusammensetzung und Menge der Bestandteile. ....	28
Tabelle 13: Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Zellkulturmedien und deren Zusätze, weitere in der Zellkultur verwendete Lösungen und Puffer, sowie deren Herkunft.....	32
Tabelle 14: Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien und deren Herkunft.....	33
Tabelle 15: Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Laborgeräte und deren Zubehör, sowie ihrer Herkunft. ....	37

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 16: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Software und ihrer Herkunft. .....	40
Tabelle 17: Darstellung der Zusammensetzung des in dieser Arbeit verwendeten SDS-PAGE-Trenngels (12,5 %) und des SDS-PAGE-Sammelgels (3 %). ....	44
Tabelle 18: Auflistung der Bestandteile des in dieser Arbeit verwendeten Calciumphosphat-Transfektionsansatzes. ....	47
Tabelle 19: Zusammensetzung des Mastermixes für die Synthese der cDNA. ....	52
Tabelle 20: Darstellung des Ablaufs, der Temperatur und der Dauer der einzelnen Schritte des für die cDNA-Synthese im Thermocycler verwendeten Programms. ....	52
Tabelle 21: Auflistung der Komponenten und Volumina eines Ansatzes für die cDNA- PCR. ....	53
Tabelle 22: Ablauf der PCR zur cDNA-Amplifikation. ....	53
Tabelle 23: Zusammensetzung eines 1,5 %-igen Agarosegels. ....	54
Tabelle 24: Auflistung der Komponenten für die Gradientenlösungen entsprechender Konzentration und die dafür benötigten Mengen. ....	61

## 10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Funduskopie-Aufnahmen unterschiedlicher AMD-Formen. ....	7
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Vitronectin-Domänen. ....	13
Abbildung 3: Western-Blot Analyse zur Ermittlung des Vitronectingehalts der einzelnen Eluatfraktionen. ....	49
Abbildung 4: Coomassie-Färbung eines PA-Gels nach SDS-PAGE. ....	49
Abbildung 5: Fotografien der Ultrazentrifugationsröhrchen während der Aufreinigung von Photorezeptor-Außensegmenten, vor (links) und nach (rechts) dem Zentrifugationsschritt. ....	62
Abbildung 6: Western-Blot Analyse zur Qualitätskontrolle der Aufreinigung der Photorezeptor-Außensegmente.....	63
Abbildung 7: Einfluss von Vitronectin-Varianten auf die zelluläre Adhäsion von Weri- Rb1-Zellen.....	68
Abbildung 8: Einfluss von Vitronectin-Varianten auf die zelluläre Adhäsion von dissoziierten Zellen neuronaler porciner Netzhaut.....	69
Abbildung 9: Einfluss von oxidativem Stress auf die Zellviabilität von Weri-Rb1- Zellen.....	71
Abbildung 10: Einfluss von Vitronectin-Varianten auf die Zellviabilität von Weri-Rb1- Zellen nach oxidativem Stress.....	72
Abbildung 11: Einfluss von Vitronectin-Varianten auf die Apoptose-Induktion in Weri- Rb1-Zellen nach oxidativem Stress.....	73
Abbildung 12: Einfluss von Vitronectin-Varianten auf die Autophagie-Induktion in Weri-Rb1-Zellen nach oxidativem Stress.....	75
Abbildung 13: Einfluss von Vitronectin-Varianten auf die ERK-Signalwegs-Induktion in Weri-Rb1-Zellen nach oxidativem Stress.....	76
Abbildung 14: Einfluss von Vitronectin-Varianten auf die FAK-Signalwegs-Induktion in Weri-Rb1-Zellen nach oxidativem Stress.....	77
Abbildung 15: Einfluss von Vitronectin-Varianten auf die AKT-Signalwegs-Induktion in Weri-Rb1-Zellen nach oxidativem Stress.....	78
Abbildung 16: Charakterisierung der hiPSC-RPE-Zellen.....	82
Abbildung 17: Western-Blot Analyse zum Einfluss von Vitronectin auf die Phagocytose-Kapazität von hiPSC-RPE-Zellen. ....	83

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 18: Einfluss von Vitronectin auf die Phagocytose-Kapazität von hiPSC-RPE-Zellen – quantitative Auswertung. ....	85
Abbildung 19: Western-Blot Analyse zum Einfluss von Vitronectin auf das intrazelluläre ERK1/2-Signaling nach Phagocytose-Induktion in hiPSC-RPE-Zellen.	86
Abbildung 20: Western-Blot Analyse zum Einfluss von Vitronectin auf das intrazelluläre FAK-Signaling nach Phagocytose-Induktion in hiPSC-RPE-Zellen. ....	87
Abbildung 21: Western-Blot Analyse zum Einfluss von Vitronectin auf das intrazelluläre SRC-Signaling nach Phagocytose-Induktion in hiPSC-RPE-Zellen. ...	88

## 11 Literaturverzeichnis

- Ablonczy, Z. and Crosson, C. E. (2007) 'VEGF modulation of retinal pigment epithelium resistance', *Experimental Eye Research*, 85(6), pp. 762–771. doi: 10.1016/j.exer.2007.08.010.
- Adler, R. *et al.* (1999) 'Cell death in age-related macular degeneration.', *Molecular vision*, 5(May), p. 31. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10562655>.
- Al-Zamil, W. M. and Yassin, S. A. (2017) 'Recent developments in age-related macular degeneration: a review.', *Clinical interventions in aging*, 12, pp. 1313–1330. doi: 10.2147/CIA.S143508.
- Ambati, J., Atkinson, J. P. and Gelfand, B. D. (2013) 'Immunology of age-related macular degeneration', *Nature Reviews Immunology*. NIH Public Access, pp. 438–451. doi: 10.1038/nri3459.
- Ambati, J. and Fowler, B. J. (2012) 'Mechanisms of Age-Related Macular Degeneration', *Neuron*, 75(1), pp. 26–39. doi: 10.1016/j.neuron.2012.06.018.
- Anderson, D. H. *et al.* (1983) 'Retinal detachment in the cat: the pigment epithelial-photoreceptor interface.', *Investigative ophthalmology & visual science*, 24(7), pp. 906–926. Available at: <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2159669> (Accessed: 15 March 2021).
- Anderson, D. H. *et al.* (1999) 'Vitronectin gene expression in the adult human retina.', *Investigative ophthalmology & visual science*, 40(13), pp. 3305–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10586957>.
- Anderson, D. H., Johnson, L. V. and Hageman, G. S. (1995) 'Vitronectin receptor expression and distribution at the photoreceptor-retinal pigment epithelial interface.', *The Journal of comparative neurology*, 360(1), pp. 1–16. doi: 10.1002/cne.903600102.
- Ardeljan, D. and Chan, C.-C. (2013) 'Aging is not a disease: Distinguishing age-related macular degeneration from aging', *Progress in Retinal and Eye Research*, 37, pp. 68–89. doi: 10.1016/j.preteyeres.2013.07.003.
- AREDS Research Group (2000) 'AREDS Report No. 2: A Clinical Trial of Zinc and Antioxidants', *J Nutr*, 130(5S), pp. 1516S–19S.
- Ashraf, M. and Souka, A. A. R. (2017) 'Aflibercept in age-related macular degeneration: Evaluating its role as a primary therapeutic option', *Eye (Basingstoke)*, 31(11), pp. 1523–1536. doi: 10.1038/eye.2017.81.
- Bae, H.-B. *et al.* (2012) 'Vitronectin Inhibits Neutrophil Apoptosis through Activation of Integrin-Associated Signaling Pathways', *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 46(6), pp. 790–796. doi: 10.1165/rcmb.2011-0187OC.
- Bae, H.-B. *et al.* (2013) 'Vitronectin Inhibits Efferocytosis through Interactions with Apoptotic Cells as well as with Macrophages', *The Journal of Immunology*. doi: 10.4049/jimmunol.1200625.
- Barresi, C. *et al.* (2023) 'Retinal neurodegeneration in age-related macular degeneration', *European Journal of Ophthalmology*, pp. 1–7. doi: 10.1177/11206721231186166.

## Literaturverzeichnis

Beauchemin, M. L. (1974) 'The fine structure of the pig's retina', *Albrecht von Graefes Archiv für Klinische und Experimentelle Ophthalmologie*, 190(1), pp. 27–45. doi: 10.1007/BF00414333.

Bennett, J. *et al.* (1996) 'Photoreceptor cell rescue in retinal degeneration (rd) mice by in vivo gene therapy', *Nature Medicine*, 2(6), pp. 649–654. doi: 10.1038/nm0696-649.

Besirli, C. G. *et al.* (2011) 'Autophagy activation in the injured photoreceptor inhibits fas-mediated apoptosis', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 52(7), pp. 4193–4199. doi: 10.1167/iovs.10-7090.

Biasella, F. *et al.* (2020) 'Altered protein function caused by AMD-associated variant rs704 links vitronectin to disease pathology', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 61(14). doi: 10.1167/IOVS.61.14.2.

Biasella, F. *et al.* (2022) 'Vitronectin and Its Interaction with PAI-1 Suggests a Functional Link to Vascular Changes in AMD Pathobiology', *Cells*, 11(11). doi: 10.3390/cells11111766.

Biasella, F. *et al.* (2023) 'The extracellular microenvironment in immune dysregulation and inflammation in retinal disorders', *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media SA. doi: 10.3389/fimmu.2023.1147037.

Bjorge, J. D., Jakymiw, A. and Fujita, D. J. (2000) 'Selected glimpses into the activation and function of Src kinase', *Oncogene*, pp. 5620–5635. doi: 10.1038/sj.onc.1203923.

Bo, Q. *et al.* (2015) 'Role of Autophagy in Photoreceptor Cell Survival and Death', *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 25(1), pp. 23–32. doi: 10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2015012376.

Bok, D. (1993) 'The retinal pigment epithelium: a versatile partner in vision.', *Journal of cell science. Supplement*, 17(Supplement 17), pp. 189–95. doi: 10.1242/jcs.1993.supplement\_17.27.

Boon, C. J. F. *et al.* (2013) 'Cuticular drusen: Stars in the sky', *Progress in Retinal and Eye Research*, pp. 90–113. doi: 10.1016/j.preteyeres.2013.08.003.

Bourne, R. R. A. *et al.* (2021) 'Causes of blindness and vision impairment in 2020 and trends over 30 years, and prevalence of avoidable blindness in relation to VISION 2020: The Right to Sight: An analysis for the Global Burden of Disease Study', *The Lancet Global Health*, 9(2), pp. e144–e160. doi: 10.1016/S2214-109X(20)30489-7.

Bradford, 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. 248–254. doi: 10.1006/abio.1976.9999.

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.

Brandl, C. *et al.* (2016) 'Epidemiology of age-related macular degeneration', *Ophthalmologie*. Springer Verlag, pp. 735–745. doi: 10.1007/s00347-016-0341-6.

- Bro, T. *et al.* (2020) 'Off-label use of bevacizumab for wet age-related macular degeneration in Europe', *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 258(3), pp. 503–511. doi: 10.1007/s00417-019-04569-8.
- Bulirsch, L. M. *et al.* (2022) 'Short-term real-world outcomes following intravitreal brolocizumab for neovascular AMD: SHIFT study', *British Journal of Ophthalmology*, 106(9), pp. 1288–1294. doi: 10.1136/bjophthalmol-2020-318672.
- Buytaert, E. *et al.* (2006) 'Role of endoplasmic reticulum depletion and multidomain proapoptotic BAX and BAK proteins in shaping cell death after hypericin-mediated photodynamic therapy', *The FASEB Journal*, 20(6), pp. 756–758. doi: 10.1096/fj.05-4305fje.
- Cagnol, S. and Chambard, J. C. (2010) 'ERK and cell death: Mechanisms of ERK-induced cell death - Apoptosis, autophagy and senescence', *FEBS Journal*, pp. 2–21. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07366.x.
- Calcagno, A. M. *et al.* (2006) 'Plasma membrane calcium ATPase (PMCA4): A housekeeper for RT-PCR relative quantification of polytopic membrane proteins', *BMC Molecular Biology*, 7(1), p. 29. doi: 10.1186/1471-2199-7-29.
- Cammalleri, M. *et al.* (2019) 'The uPAR System as a Potential Therapeutic Target in the Diseased Eye', *Cells*, 8(8), p. 925. doi: 10.3390/cells8080925.
- Campochiaro, P. A. (2015) 'Molecular pathogenesis of retinal and choroidal vascular diseases', *Progress in Retinal and Eye Research*, pp. 67–81. doi: 10.1016/j.preteyeres.2015.06.002.
- Cargnello, M. and Roux, P. P. (2011) 'Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(1), pp. 50–83. doi: 10.1128/mmbr.00031-10.
- Caro-Maldonado, A. and Muoz-Pinedo, C. (2011) 'Dying for Something to Eat: How Cells Respond to Starvation', *The Open Cell Signaling Journal*, 3, pp. 42–51. doi: 10.2174/1876390101103010042.
- Casten, R. J. and Rovner, B. W. (2013) 'Update on depression and age-related macular degeneration', *Current Opinion in Ophthalmology*. NIH Public Access, pp. 239–243. doi: 10.1097/ICU.0b013e32835f8e55.
- Chakravarthy, U. *et al.* (2010) 'Clinical risk factors for age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis.', *BMC ophthalmology*, 10(1), p. 31. doi: 10.1186/1471-2415-10-31.
- Chakravarty, D. *et al.* (2022) 'Systemic deficiency of vitronectin is associated with aortic inflammation and plaque progression in ApoE-Knockout mice', *FASEB BioAdvances*, 4(2), pp. 121–137. doi: 10.1096/fba.2021-00108.
- Chan, C.-M. *et al.* (2015) 'Protective Effects of Resveratrol against UVA-Induced Damage in ARPE19 Cells', *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), pp. 5789–5802. doi: 10.3390/ijms16035789.
- Chandler, M. J. *et al.* (1999) 'Photoreceptor density of the domestic pig retina', *Veterinary Ophthalmology*, 2(3), pp. 179–184. doi: 10.1046/j.1463-5224.1999.00077.x.

Chen, C. *et al.* (2021) 'Ferroptosis drives photoreceptor degeneration in mice with defects in all-trans-retinal clearance', *Journal of Biological Chemistry*, 296, p. 100187. doi: 10.1074/jbc.RA120.015779.

Chen, J. *et al.* (1996) 'bcl-2 overexpression reduces apoptotic photoreceptor cell death in three different retinal degenerations', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(14), pp. 7042–7047. doi: 10.1073/pnas.93.14.7042.

Chen, M. J. *et al.* (2019) 'Microglial ERK signaling is a critical regulator of pro-inflammatory immune responses in Alzheimer's disease', *bioRxiv*. doi: 10.1101/798215.

Chen, Y. *et al.* (2013) 'Autophagy Protects the Retina from Light-induced Degeneration\*', *Journal of Biological Chemistry*, 288(11), pp. 7506–7518. doi: 10.1074/jbc.M112.439935.

Chiang, C. K. *et al.* (2017) 'Quantitative phosphoproteomics reveals involvement of multiple signaling pathways in early phagocytosis by the retinal pigmented epithelium', *Journal of Biological Chemistry*, 292(48), pp. 19826–19839. doi: 10.1074/jbc.M117.812677.

Chung, S. T. L. (2020) 'Reading in the presence of macular disease: a mini-review', *Ophthalmic and Physiological Optics*. Blackwell Publishing Ltd, pp. 171–186. doi: 10.1111/opo.12664.

Colijn, J. M. *et al.* (2017) 'Prevalence of Age-Related Macular Degeneration in Europe: The Past and the Future', *Ophthalmology*, 124(12), pp. 1753–1763. doi: 10.1016/j.ophtha.2017.05.035.

Concepcion, F., Mendez, A. and Chen, J. (2002) 'The carboxyl-terminal domain is essential for rhodopsin transport in rod photoreceptors', *Vision Research*, 42(4), pp. 417–426. doi: 10.1016/S0042-6989(01)00195-X.

Cook, B. *et al.* (1995) 'Apoptotic photoreceptor degeneration in experimental retinal detachment.', *Investigative ophthalmology & visual science*, 36(6), pp. 990–996. Available at: <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2161637> (Accessed: 10 March 2021).

Corrochano, S. *et al.* (2008) 'Attenuation of vision loss and delay in apoptosis of photoreceptors induced by proinsulin in a mouse model of retinitis pigmentosa', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 49(9), pp. 4188–4194. doi: 10.1167/iovs.08-2182.

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*, 99(23), pp. 14682–14687. doi: 10.1073/pnas.222551899.

Curcio, C. A. *et al.* (1990) 'Human photoreceptor topography', *Journal of Comparative Neurology*, 292(4), pp. 497–523. doi: 10.1002/cne.902920402.

Curcio, C. A. *et al.* (2011) 'The oil spill in ageing Bruch membrane', *British Journal of Ophthalmology*. Br J Ophthalmol, pp. 1638–1645. doi: 10.1136/bjophthalmol-2011-300344.

Curcio, C. A. and Johnson, M. (2012) 'Structure, Function, and Pathology of Bruch's

Membrane', in *Retina Fifth Edition*. Elsevier Inc, pp. 465–481. doi: 10.1016/B978-1-4557-0737-9.00020-5.

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*, 5(1). doi: 10.1038/s41420-019-0171-9.

Danen, E. H. J. (2006) 'Integrins: An Overview of Structural and Functional Aspects', in *Integrins and Development*. CRC Press, pp. 13–27. doi: 10.1201/9781498712989-6.

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*. Elsevier Ltd, pp. 201–218. doi: 10.1016/j.preteyeres.2017.03.002.

Dawson, S. R. *et al.* (2014) 'The prevalence of anxiety and depression in people with age-related macular degeneration: A systematic review of observational study data', *BMC Ophthalmology*, 14(1), pp. 1–7. doi: 10.1186/1471-2415-14-78.

DeAngelis, M. M. *et al.* (2017) 'Genetics of age-related macular degeneration (AMD)', *Human Molecular Genetics*, pp. R45–R50. doi: 10.1093/hmg/ddx228.

Degterev, A. *et al.* (2005) 'Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury', *Nature Chemical Biology*, 1(2), pp. 112–119. doi: 10.1038/nchembio711.

Delcourt, C. *et al.* (2014) 'Lifetime exposure to ambient ultraviolet radiation and the risk for cataract extraction and age-related macular degeneration: The alienor study', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 55(11), pp. 7619–7627. doi: 10.1167/iovs.14-14471.

Deng, Y. *et al.* (2022) 'Age-related macular degeneration: Epidemiology, genetics, pathophysiology, diagnosis, and targeted therapy', *Genes and Diseases*. Chongqing Medical University, pp. 62–79. doi: 10.1016/j.gendis.2021.02.009.

Ding, X., Patel, M. and Chan, C.-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.

Domènech, E. and Marfany, G. (2020) 'The Relevance of Oxidative Stress in the Pathogenesis and Therapy of Retinal Dystrophies', *Antioxidants*, 9(4), p. 347. doi: 10.3390/antiox9040347.

Downie, L. E., Busija, L. and Keller, P. R. (2018) 'Blue-light filtering intraocular lenses (IOLs) for protecting macular health', *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley and Sons Ltd. doi: 10.1002/14651858.CD011977.pub2.

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.

Evans, J. R. and Lawrenson, J. G. (2017) 'Antioxidant vitamin and mineral supplements for slowing the progression of age-related macular degeneration', *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley and Sons Ltd. doi: 10.1002/14651858.CD000254.pub4.

- Fagerness, J. A. *et al.* (2009) 'Variation near complement factor I is associated with risk of advanced AMD', *European Journal of Human Genetics*, 17(1), pp. 100–104. doi: 10.1038/ejhg.2008.140.
- Farkas, M. H. and DeAngelis, M. M. (2021) 'Age-Related Macular Degeneration: From Epigenetics to Therapeutic Implications', in *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer, pp. 221–235. doi: 10.1007/978-3-030-66014-7\_9.
- Farrar, G. J. *et al.* (2013) 'Mitochondrial disorders: Aetiologies, models systems, and candidate therapies', *Trends in Genetics*. Trends Genet, pp. 488–497. doi: 10.1016/j.tig.2013.05.005.
- Felding-Habermann, B. and Cheresh, D. A. (1993) 'Vitronectin and its receptors', *Current Opinion in Cell Biology*, 5(5), pp. 864–868. doi: 10.1016/0955-0674(93)90036-P.
- Felsenfeld, D. P. *et al.* (1999) 'Selective regulation of integrin–cytoskeleton interactions by the tyrosine kinase Src', *Nature Cell Biology*, 1(4), pp. 200–206. doi: 10.1038/12021.
- 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.
- 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*. Elsevier Ltd, pp. 69–89. doi: 10.1016/j.preteyeres.2015.09.002.
- Finger, R. P. *et al.* (2020) 'Anti-vascular endothelial growth factor in neovascular age-related macular degeneration-A systematic review of the impact of anti-VEGF on patient outcomes and healthcare systems', *BMC Ophthalmology*, 20(1), pp. 1–14. doi: 10.1186/s12886-020-01554-2.
- Finnemann, S. C. *et al.* (1997) 'Phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelial cells requires  $\alpha\beta 5$  integrin for binding but not for internalization', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(24), pp. 12932–12937. doi: 10.1073/pnas.94.24.12932.
- Finnemann, S. C. (2003) 'Focal adhesion kinase signaling promotes phagocytosis of integrin-bound photoreceptors', *The EMBO Journal*, 22(16), pp. 4143–4154. doi: 10.1093/emboj/cdg416.
- Finnemann, S. C. and Nandrot, E. F. (2006) *Retinal Degenerative Diseases*, *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Edited by J. G. Hollyfield, R. E. Anderson, and M. M. LaVail. Boston, MA: Springer US (Advances in Experimental Medicine and Biology). doi: 10.1007/0-387-32442-9.
- Frederick, P. A. and Kleinman, M. E. (2014) 'The Immune System and AMD', *Current Ophthalmology Reports*, 2(1), pp. 14–19. doi: 10.1007/s40135-013-0037-x.
- 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. 134–143. doi: 10.1038/ng.3448.

- Gan, A. T. L. *et al.* (2020) 'Cataract surgery and the 6-year incidence of age-related macular degeneration in a multiethnic asian cohort', *Asia-Pacific Journal of Ophthalmology*, 9(2), pp. 130–136. doi: 10.1097/APO.0000000000000275.
- García-Layana, A. *et al.* (2017) 'Early and intermediate age-related macular degeneration: Update and clinical review', *Clinical Interventions in Aging*, 12, pp. 1579–1587. doi: 10.2147/CIA.S142685.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y. and Ben-Sasson, S. A. (1992) 'Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation.', *Journal of Cell Biology*, 119(3), pp. 493–501. doi: 10.1083/jcb.119.3.493.
- 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*, 84, pp. 65–76. doi: 10.1016/j.molimm.2016.11.016.
- Gemenetzi, M. and Lotery, A. J. (2020) 'Epigenetics in age-related macular degeneration: new discoveries and future perspectives', *Cellular and Molecular Life Sciences*. Springer, pp. 807–818. doi: 10.1007/s00018-019-03421-w.
- Gopinath, B. *et al.* (2014) 'Age-related macular degeneration and 5-year incidence of impaired activities of daily living', *Maturitas*, 77(3), pp. 263–266. doi: 10.1016/j.maturitas.2013.12.001.
- Goyal, U. and Ta, M. (2020) 'A novel role of vitronectin in promoting survival of mesenchymal stem cells under serum deprivation stress', *Stem Cell Research & Therapy*, 11(1), p. 181. doi: 10.1186/s13287-020-01682-y.
- Grehn, F. (2019) *Augenheilkunde*. 32nd edn. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-662-59154-3.
- Guarino, M. (2010) 'Src signaling in cancer invasion', *Journal of Cellular Physiology*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 14–26. doi: 10.1002/jcp.22011.
- Guo, Y. *et al.* (2020) 'ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis (Review)', *Experimental and Therapeutic Medicine*, 19(3), pp. 1997–2007. doi: 10.3892/etm.2020.8454.
- Gustmann, S. (2009) *Genetische Mechanismen der Tumorprogression bei Retinoblastom*. Universität Duisburg-Essen. Available at: <https://core.ac.uk/download/pdf/33798963.pdf>.
- 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', *The FASEB Journal*, 13(3), pp. 477–484. doi: 10.1096/fasebj.13.3.477.
- Hageman, G. S. and Mullins, R. F. (1999) 'Molecular composition of drusen as related to substructural phenotype.', *Molecular vision*, 5(May), p. 28.
- Halaby, R. (2012) 'Does apoptosis regulate the function of retinal photoreceptors?', *Medical hypothesis, discovery & innovation ophthalmology journal*, 1(2), pp. 21–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24600615>.
- Hammond, B. R., Sreenivasan, V. and Suryakumar, R. (2019) 'The effects of blue light-filtering intraocular lenses on the protection and function of the visual system',

*Clinical Ophthalmology*. Dove Medical Press Ltd, pp. 2427–2438. doi: 10.2147/OPHTH.S213280.

Hanus, J., Anderson, C. and Wang, S. (2015) 'RPE necroptosis in response to oxidative stress and in AMD', *Ageing Research Reviews*, pp. 286–298. doi: 10.1016/j.arr.2015.09.002.

Hayman, E. G. *et al.* (1985) 'Vitronectin-A major cell attachment-promoting protein in fetal bovine serum', *Experimental Cell Research*, 160(2), pp. 245–258. doi: 10.1016/0014-4827(85)90173-9.

Heesterbeek, T. J. *et al.* (2020) 'Risk factors for progression of age-related macular degeneration', *Ophthalmic and Physiological Optics*. Blackwell Publishing Ltd, pp. 140–170. doi: 10.1111/opo.12675.

Hemmings, B. A. and Restuccia, D. F. (2012) 'PI3K-PKB/Akt Pathway', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(9), p. a011189. doi: 10.1101/cshperspect.a011189.

Hernández-Zimbrón, L. F. *et al.* (2018) 'Age-Related Macular Degeneration: New Paradigms for Treatment and Management of AMD', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, pp. 1–14. doi: 10.1155/2018/8374647.

Höhn, A., König, J. and Grune, T. (2013) 'Protein oxidation in aging and the removal of oxidized proteins', *Journal of Proteomics*. J Proteomics, pp. 132–159. doi: 10.1016/j.jprot.2013.01.004.

Hollyfield, J. G. (2010) 'Age-Related Macular Degeneration: The Molecular Link between Oxidative Damage, Tissue-Specific Inflammation and Outer Retinal Disease', *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51(3), pp. 1276–1281. doi: 10.1167/iovs.09-4478.

Holmes, R. (1967) 'Preparation from human serum of an alpha-one protein which induces the immediate growth of unadapted cells in vitro.', *The Journal of cell biology*, 32(2), pp. 297–308. doi: 10.1083/jcb.32.2.297.

Horton, M. A. (1997) 'The avbeta3 Integrin "Vitronectin Receptor";', *Int. J. Biochem. Cell Bid. Int. J. Biochem. Cell Biol*, 29(29), pp. 721–725. Available at: [http://ac.els-cdn.com/S1357272596001550/1-s2.0-S1357272596001550-main.pdf?\\_tid=0d7b2ca0-6cdc-11e7-89f2-00000aacb35d&acdnat=1500507983\\_6f0d3563ca019d54f2bd0b8618a03524](http://ac.els-cdn.com/S1357272596001550/1-s2.0-S1357272596001550-main.pdf?_tid=0d7b2ca0-6cdc-11e7-89f2-00000aacb35d&acdnat=1500507983_6f0d3563ca019d54f2bd0b8618a03524).

Hou, Y. *et al.* (2019) 'Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease', *Nature Reviews Neurology*. Nature Publishing Group, pp. 565–581. doi: 10.1038/s41582-019-0244-7.

Hseu, Y. C. *et al.* (2019) 'Kalantuboside B induced apoptosis and cytoprotective autophagy in human melanoma A2058 cells: An in vitro and in vivo study', *Free Radical Biology and Medicine*, 143, pp. 397–411. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.08.015.

Hu, J. G. *et al.* (1994) 'Localization of NaK ATPase on cultured human retinal pigment epithelium.', *Investigative ophthalmology & visual science*, 35(10), pp. 3582–3588. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8088949>.

Hutchinson, J. N. *et al.* (2014) '(Epi)genetic analyses of age-related macular degeneration: Case-control and discordant twin studies', *Human Heredity*, 78(2), pp.

59–72. doi: 10.1159/000362814.

Inana, G. *et al.* (2018) 'RPE phagocytic function declines in age-related macular degeneration and is rescued by human umbilical tissue derived cells', *Journal of Translational Medicine*, 16(1), p. 63. doi: 10.1186/s12967-018-1434-6.

Ivanova, E. *et al.* (2013) 'Optimized Protocol for Retinal Wholemount Preparation for Imaging and Immunohistochemistry', *Journal of Visualized Experiments*, (82), p. 51018. doi: 10.3791/51018.

Izumi, M., Yamada, K. M. and Hayashi, M. (1989) 'Vitronectin exists in two structurally and functionally distinct forms in human plasma', *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 990(2), pp. 101–108. doi: 10.1016/S0304-4165(89)80019-4.

Jaffe, G. J. *et al.* (2021) 'C5 Inhibitor Avacincaptad Pegol for Geographic Atrophy Due to Age-Related Macular Degeneration: A Randomized Pivotal Phase 2/3 Trial', in *Ophthalmology*. Elsevier Inc., pp. 576–586. doi: 10.1016/j.ophtha.2020.08.027.

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.

Janik-Papis, K. *et al.* (2009) 'Association between vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and age-related macular degeneration in a Polish population', *Experimental and Molecular Pathology*, 87(3), pp. 234–238. doi: 10.1016/j.yexmp.2009.09.005.

Janus, P. *et al.* (2020) 'Pro-death signaling of cytoprotective heat shock factor 1: upregulation of NOXA leading to apoptosis in heat-sensitive cells', *Cell Death and Differentiation*, 27(7), pp. 2280–2292. doi: 10.1038/s41418-020-0501-8.

Jarrett, S. G. and Boulton, M. E. (2012) 'Consequences of oxidative stress in age-related macular degeneration.', *Molecular aspects of medicine*, 33(4), pp. 399–417. doi: 10.1016/j.mam.2012.03.009.

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.* (2002) 'The Alzheimer's A beta -peptide is deposited at sites of complement activation in pathologic deposits associated with aging and age-related macular degeneration.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(18), pp. 11830–5. doi: 10.1073/pnas.192203399.

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*, 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*. Asia-Pacific Academy of Ophthalmology, pp. 493–497. doi: 10.22608/APO.2017251.

Joseph, R. M. and Li, T. (1996) 'Overexpression of Bcl-2 or Bcl-XL transgenes and photoreceptor degeneration.', *Investigative ophthalmology & visual science*, 37(12),

pp. 2434–46. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8933760>.

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.

Kaarniranta, K. *et al.* (2023) 'Autophagy in age-related macular degeneration', *Autophagy*, pp. 388–400. doi: 10.1080/15548627.2022.2069437.

Kassoff, A. *et al.* (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*, 119(10), pp. 1417–1436. doi: 10.1001/archophth.119.10.1417.

Katoh, K. (2020) 'FAK-Dependent Cell Motility and Cell Elongation', *Cells*, 9(1), p. 192. doi: 10.3390/cells9010192.

Kauppinen, A. *et al.* (2016) 'Inflammation and its role in age-related macular degeneration', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(9), pp. 1765–1786. 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*, 117(5), pp. 921–927. doi: 10.1016/j.ophtha.2009.10.007.

Keane, P. A. *et al.* (2015) 'Strategies for improving early detection and diagnosis of neovascular age-related macular degeneration', *Clinical Ophthalmology*. Dove Medical Press Ltd, pp. 353–366. doi: 10.2147/OPHTH.S59012.

Keasey, M. P. *et al.* (2018) 'Blood vitronectin is a major activator of LIF and IL-6 in the brain through integrin-FAK and uPAR signaling.', *Journal of cell science*, 131(3), p. jcs202580. doi: 10.1242/jcs.202580.

Kevany, B. M. and Palczewski, K. (2010) 'Phagocytosis of retinal rod and cone photoreceptors.', *Physiology (Bethesda, Md.)*, 25(1), pp. 8–15. doi: 10.1152/physiol.00038.2009.

Kim, E. K. and Choi, E. J. (2010) 'Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. Elsevier, pp. 396–405. doi: 10.1016/j.bbadis.2009.12.009.

Kinnunen, K. *et al.* (2012) 'Molecular mechanisms of retinal pigment epithelium damage and development of age-related macular degeneration', *Acta Ophthalmologica*, pp. 299–309. doi: 10.1111/j.1755-3768.2011.02179.x.

Kjøller, L. *et al.* (1997) 'Plasminogen Activator Inhibitor-1 Represses Integrin- and Vitronectin-Mediated Cell Migration Independently of Its Function as an Inhibitor of Plasminogen Activation', *Experimental Cell Research*, 232(2), pp. 420–429. doi: 10.1006/excr.1997.3540.

Kobayashi, M. and Kawakami, K. (1997) 'Synergism of the ATF/CRE site and GC box in the housekeeping Na,K-ATPase  $\alpha$ 1 subunit gene is essential for constitutive expression', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 241(1), pp. 169–174. doi: 10.1006/bbrc.1997.7781.

Koundouros, N. and Pouligiannis, G. (2018) 'Phosphoinositide 3-Kinase/Akt

- signaling and redox metabolism in cancer', *Frontiers in Oncology*, p. 160. doi: 10.3389/fonc.2018.00160.
- Kunchithapautham, K. and Rohrer, B. (2007) 'Apoptosis and Autophagy in Photoreceptors Exposed to Oxidative Stress', *Autophagy*, 3(5), pp. 433–441. doi: 10.4161/auto.4294.
- Kwon, W. and Freeman, S. A. (2020) 'Phagocytosis by the Retinal Pigment Epithelium: Recognition, Resolution, Recycling.', *Frontiers in immunology*, 11, p. 604205. doi: 10.3389/fimmu.2020.604205.
- Kyosseva, S. V. (2016) 'Targeting MAPK Signaling in Age-Related Macular Degeneration', *Ophthalmology and Eye Diseases*, 8, pp. 23–30. doi: 10.4137/OED.S32200.
- Lakkaraju, A. *et al.* (2020) 'The cell biology of the retinal pigment epithelium', *Progress in Retinal and Eye Research*, 78, p. 100846. doi: 10.1016/j.preteyeres.2020.100846.
- Lambert, N. G. *et al.* (2016) 'Risk factors and biomarkers of age-related macular degeneration', *Progress in Retinal and Eye Research*. Elsevier Ltd, pp. 64–102. doi: 10.1016/j.preteyeres.2016.04.003.
- Van Landingham, S. W. *et al.* (2014) 'Fear of falling in age-related macular degeneration', *BMC Ophthalmology*, 14(1), p. 10. doi: 10.1186/1471-2415-14-10.
- Lavoie, H., Gagnon, J. and Therrien, M. (2020) 'ERK signalling: a master regulator of cell behaviour, life and fate', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Research, pp. 607–632. doi: 10.1038/s41580-020-0255-7.
- Law, A.-L. *et al.* (2009) 'Annexin A2 Regulates Phagocytosis of Photoreceptor Outer Segments in the Mouse Retina', *Molecular Biology of the Cell*. Edited by J. E. Gruenberg, 20(17), pp. 3896–3904. doi: 10.1091/mbc.e08-12-1204.
- Leavesley, D. I. *et al.* (2013) 'Vitronectin - Master controller or micromanager?', *IUBMB Life*, 65(10), pp. 807–818. doi: 10.1002/iub.1203.
- Lem, J. *et al.* (1992) 'Retinal degeneration is rescued in transgenic rd mice by expression of the cGMP phosphodiesterase  $\beta$  subunit', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(10), pp. 4422–4426. doi: 10.1073/pnas.89.10.4422.
- Li, J. Q. *et al.* (2020) 'Prevalence and incidence of age-related macular degeneration in Europe: A systematic review and meta-analysis', *British Journal of Ophthalmology*, 104(8), pp. 1077–1084. doi: 10.1136/bjophthalmol-2019-314422.
- Li, M. *et al.* (2014) 'Comprehensive analysis of gene expression in human retina and supporting tissues', *Human Molecular Genetics*, 23(15), pp. 4001–4014. doi: 10.1093/hmg/ddu114.
- Lim, L. S. *et al.* (2012) 'Age-related macular degeneration', *The Lancet*, 379(9827), pp. 1728–1738. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60282-7.
- Lin, J. B. *et al.* (2022) 'Neuroprotection for Age-Related Macular Degeneration', *Ophthalmology Science*. Elsevier, p. 100192. doi: 10.1016/j.xops.2022.100192.
- Lin, J. M. *et al.* (2008) 'Vascular Endothelial Growth Factor Gene Polymorphisms in

Age-related Macular Degeneration', *American Journal of Ophthalmology*, 145(6), pp. 1045-1051.e2. doi: 10.1016/j.ajo.2008.01.027.

Liu, J. *et al.* (2017) 'Nutrient deprivation induces apoptosis of nucleus pulposus cells via activation of the BNIP3/AIF signalling pathway', *Molecular Medicine Reports*, 16(5), pp. 7253–7260. doi: 10.3892/mmr.2017.7550.

Liu, J. and Feener, E. P. (2013) 'Plasma kallikrein-kinin system and diabetic retinopathy', *Biological Chemistry*, pp. 319–328. doi: 10.1515/hsz-2012-0316.

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 - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1801(2), pp. 106–113. doi: 10.1016/j.bbalip.2009.09.022.

Liu, W. J. *et al.* (2016) 'p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin–proteasome system upon ubiquitinated protein degradation', *Cellular & Molecular Biology Letters*, 21(1), p. 29. doi: 10.1186/s11658-016-0031-z.

Liu, Y. *et al.* (2017) 'Regulated differentiation of WERI-Rb-1 cells into retinal neuron-like cells', *International Journal of Molecular Medicine*, 40(4), pp. 1172–1184. doi: 10.3892/ijmm.2017.3102.

Lohr, H. R. *et al.* (2006) 'Multiple, parallel cellular suicide mechanisms participate in photoreceptor cell death', *Experimental Eye Research*, 83(2), pp. 380–389. doi: 10.1016/j.exer.2006.01.014.

Lommatzsch, A. *et al.* (2007) 'Complement factor H variant Y402H and basal laminar deposits in exudative age-related macular degeneration', *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 245(11), pp. 1713–1716. doi: 10.1007/s00417-007-0649-7.

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.

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*, 31(21), pp. 3555–3557. doi: 10.1093/bioinformatics/btv402.

Madhunapantula, S. V., Mosca, P. J. and Robertson, G. P. (2011) 'The Akt signaling pathway', *Cancer Biology & Therapy*, 12(12), pp. 1032–1049. doi: 10.4161/cbt.12.12.18442.

Makarev, E. *et al.* (2014) 'Pathway activation profiling reveals new insights into Age-related Macular Degeneration and provides avenues for therapeutic interventions', *Ageing*, 6(12), pp. 1064–1075. doi: 10.18632/aging.100711.

Malagolini, N. *et al.* (2013) 'Apoptotic cells selectively uptake minor glycoforms of vitronectin from serum', *Apoptosis*, 18(4), pp. 373–384. doi: 10.1007/s10495-013-0812-z.

Malm, M. *et al.* (2020) 'Evolution from adherent to suspension: systems biology of HEK293 cell line development', *Scientific Reports*, 10(1), p. 18996. doi: 10.1038/s41598-020-76137-8.

Maminishkis, A. *et al.* (2006) 'Confluent monolayers of cultured human fetal retinal pigment epithelium exhibit morphology and physiology of native tissue', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 47(8), pp. 3612–3624. doi: 10.1167/iovs.05-1622.

Marmorstein, A. D. *et al.* (2000) 'Bestrophin, the product of the Best vitelliform macular dystrophy gene (VMD2), localizes to the basolateral plasma membrane of the retinal pigment epithelium', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(23), pp. 12758–12763. doi: 10.1073/pnas.220402097.

May, R. C. and Machesky, L. M. (2001) 'Phagocytosis and the actin cytoskeleton', *Journal of Cell Science*, pp. 1061–1077. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11228151>.

Mazzoni, F., Mao, Y. and Finnemann, S. C. (2019) *Retinal Degeneration*. Edited by B. H. F. Weber and T. Langmann. New York, NY: Springer New York (Methods in Molecular Biology). doi: 10.1007/978-1-4939-8669-9.

McFall, R. C., Sery, T. W. and Makadon, M. (1977) 'Characterization of a new continuous cell line derived from a human retinoblastoma.', *Cancer research*, 37(4), pp. 1003–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/844036>.

Mercille, S. and Massie, B. (1994) 'Induction of apoptosis in nutrient-deprived cultures of hybridoma and myeloma cells', *Biotechnology and Bioengineering*, 44(9), pp. 1140–1154. doi: 10.1002/bit.260440916.

Meyer, M. W. *et al.* (2002) 'Plasminogen activator inhibitor-1 mRNA expression in cultured pigmented ciliary epithelial cells of the porcine eye', *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 240(8), pp. 679–686. doi: 10.1007/s00417-002-0510-y.

Michalska-Matecka, K. *et al.* (2015) 'Age related macular degeneration – challenge for future: Pathogenesis and new perspectives for the treatment', *European Geriatric Medicine*, 6(1), pp. 69–75. doi: 10.1016/j.eurger.2014.09.007.

Midorikawa, R. *et al.* (2010) 'Autophagy-dependent rhodopsin degradation prevents retinal degeneration in Drosophila.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(32), pp. 10703–19. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2061-10.2010.

Minturn, R. J. *et al.* (2021) 'Intravitreal sirolimus for persistent, exudative age-related macular degeneration: a Pilot Study', *International Journal of Retina and Vitreous*, 7(1), pp. 1–10. doi: 10.1186/s40942-021-00281-0.

Mitchell, P. *et al.* (2018) 'Age-related macular degeneration', *The Lancet*. Lancet Publishing Group, pp. 1147–1159. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31550-2.

Mizushima, N. and Levine, B. (2010) 'Autophagy in mammalian development and differentiation', *Nature Cell Biology*, 12(9), pp. 823–830. doi: 10.1038/ncb0910-823.

Mizushima, N. and Yoshimori, T. (2007) 'How to interpret LC3 immunoblotting', *Autophagy*, pp. 542–545. doi: 10.4161/auto.4600.

Moschos, M. M. *et al.* (2018) 'Anti-platelet effects of vitamin supplements in age-related macular degeneration: an in vitro study', *Cutaneous and Ocular Toxicology*,

37(3), pp. 207–209. doi: 10.1080/15569527.2017.1409754.

Mosmann, T. (1983) 'Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays', *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), pp. 55–63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.

Murakami, Y. *et al.* (2013) 'Photoreceptor cell death and rescue in retinal detachment and degenerations', *Progress in Retinal and Eye Research*, 37, pp. 114–140. doi: 10.1016/j.preteyeres.2013.08.001.

Nandrot, E. F. *et al.* (2006) 'Novel role for  $\alpha\text{v}\beta\text{5}$ -integrin in retinal adhesion and its diurnal peak', *Am J Physiol Cell Physiol*, 290(4), pp. 1256–1262. doi: 10.1152/ajpcell.00480.2005.

Nandrot, E. F., Chang, Y. and Finnemann, S. C. (2008) 'Alphavbeta5 integrin receptors at the apical surface of the RPE: one receptor, two functions.', *Advances in experimental medicine and biology*, 613, pp. 369–75. doi: 10.1007/978-0-387-74904-4\_43.

Newton, F. and Megaw, R. (2020) 'Mechanisms of Photoreceptor Death in Retinitis Pigmentosa', *Genes*, 11(10), p. 1120. doi: 10.3390/genes11101120.

Nilsson, B. and Nilsson Ekdahl, K. (2012) 'The tick-over theory revisited: Is C3 a contact-activated protein?', *Immunobiology*. Elsevier GmbH, pp. 1106–1110. doi: 10.1016/j.imbio.2012.07.008.

Nita, M. and Grzybowski, A. (2016) 'The Role of the Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in the Pathomechanism of the Age-Related Ocular Diseases and Other Pathologies of the Anterior and Posterior Eye Segments in Adults', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, pp. 1–23. doi: 10.1155/2016/3164734.

Pauleikhoff, D. (2005) 'Neovascular age-related macular degeneration: Natural history and treatment outcomes', *Retina*. Retina, pp. 1065–1084. doi: 10.1097/00006982-200512000-00016.

Pearson, T. A. and Manolio, T. A. (2008) 'How to interpret a genome-wide association study', *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 299(11), pp. 1335–1344. doi: 10.1001/jama.299.11.1335.

Pennington, K. L. and DeAngelis, M. M. (2016) 'Epidemiology of age-related macular degeneration (AMD): associations with cardiovascular disease phenotypes and lipid factors', *Eye and Vision*, 3(1), p. 34. doi: 10.1186/s40662-016-0063-5.

Pickford, F. *et al.* (2008) 'The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid beta accumulation in mice.', *The Journal of clinical investigation*, 118(6), pp. 2190–9. doi: 10.1172/JCI33585.

Playford, M. P. and Schaller, M. D. (2004) 'The interplay between Src and integrins in normal and tumor biology', *Oncogene*. Nature Publishing Group, pp. 7928–7946. doi: 10.1038/sj.onc.1208080.

Plowey, E. D. *et al.* (2008) 'Role of autophagy in G2019S-LRRK2-associated neurite shortening in differentiated SH-SY5Y cells', *Journal of Neurochemistry*, 105(3), pp. 1048–1056. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05217.x.

- Plows, L. D. *et al.* (2004) 'Activation of extracellular-signal regulated kinase is required for phagocytosis by *Lymnaea stagnalis* haemocytes', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1692(1), pp. 25–33. doi: 10.1016/j.bbamcr.2004.03.002.
- Poli, G. *et al.* (2012) 'Oxidative Stress and Cell Signalling', *Current Medicinal Chemistry*, 11(9), pp. 1163–1182. doi: 10.2174/0929867043365323.
- Di Polo, A. and Farber, D. B. (1995) 'Rod photoreceptor-specific gene expression in human retinoblastoma cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(9), pp. 4016–4020. doi: 10.1073/pnas.92.9.4016.
- Popp, N. A. *et al.* (2017) 'No Sex Differences in the Frequencies of Common Single Nucleotide Polymorphisms Associated with Age-Related Macular Degeneration', *Current Eye Research*, 42(3), pp. 470–475. doi: 10.1080/02713683.2016.1196708.
- Porter, L. F. *et al.* (2019) 'Whole-genome methylation profiling of the retinal pigment epithelium of individuals with age-related macular degeneration reveals differential methylation of the SKI, GTF2H4, and TNXB genes', *Clinical Epigenetics*, 11(1), p. 6. doi: 10.1186/s13148-019-0608-2.
- Portera-Cailliau, C. *et al.* (1994) 'Apoptotic photoreceptor cell death in mouse models of retinitis pigmentosa', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(3), pp. 974–978. doi: 10.1073/pnas.91.3.974.
- Preissner, K. T. *et al.* (1997) 'Molecular crosstalk between adhesion receptors and proteolytic cascades in vascular remodelling.', *Thrombosis and haemostasis*, 78(1), pp. 88–95. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9198134>.
- Preissner, K. T. and Reuning, U. (2011) 'Vitronectin in vascular context: Facets of a multitasking matricellular protein', *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. *Semin Thromb Hemost*, pp. 408–424. doi: 10.1055/s-0031-1276590.
- Rastoin, O., Pagès, G. and Dufies, M. (2020) 'Experimental Models in Neovascular Age Related Macular Degeneration', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(13), p. 4627. doi: 10.3390/ijms21134627.
- Reinhard, J. *et al.* (2020) 'Expression Changes and Impact of the Extracellular Matrix on Etoposide Resistant Human Retinoblastoma Cell Lines', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), p. 4322. doi: 10.3390/ijms21124322.
- Remé, C. E. *et al.* (1998) 'Apoptotic cell death in retinal degenerations', *Progress in Retinal and Eye Research*, 17(4), pp. 443–464. doi: 10.1016/S1350-9462(98)00009-3.
- Richer, S. *et al.* (2014) 'Resveratrol based oral nutritional supplement produces long-term beneficial effects on structure and visual function in human patients', *Nutrients*, 6(10), pp. 4404–4420. doi: 10.3390/nu6104404.
- Riss, T. L. *et al.* (2004) *Cell Viability Assays, Assay Guidance Manual*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23805433> (Accessed: 11 March 2021).
- 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.

Rudolf, M. *et al.* (2008) 'Sub-retinal drusenoid deposits in human retina: Organization and composition', *Experimental Eye Research*, 87(5), pp. 402–408. doi: 10.1016/j.exer.2008.07.010.

Ruzha, Y. *et al.* (2022) 'Role of Vitronectin and Its Receptors in Neuronal Function and Neurodegenerative Diseases', *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), p. 23. doi: 10.3390/ijms232012387.

Ryter, S. W., Cloonan, S. M. and Choi, A. M. K. (2013) 'Autophagy: A critical regulator of cellular metabolism and homeostasis', *Molecules and Cells*, pp. 7–16. doi: 10.1007/s10059-013-0140-8.

Salazar, E. P. and Rozengurt, E. (2001) 'Src Family Kinases Are Required for Integrin-mediated but Not for G Protein-coupled Receptor Stimulation of Focal Adhesion Kinase Autophosphorylation at Tyr-397', *Journal of Biological Chemistry*, 276(21), pp. 17788–17795. doi: 10.1074/jbc.M100984200.

Salimiaghdam, N. *et al.* (2019) 'Age-related Macular Degeneration (AMD): A Review on its Epidemiology and Risk Factors', *The Open Ophthalmology Journal*, 13(1), pp. 90–99. doi: 10.2174/1874364101913010090.

Sarwar, S. *et al.* (2016) 'Aflibercept for neovascular age-related macular degeneration', *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley and Sons Ltd. doi: 10.1002/14651858.CD011346.pub2.

Sasaki, M. *et al.* (2018) 'Gender-specific association of early age-related macular degeneration with systemic and genetic factors in a Japanese population', *Scientific Reports*, 8(1). doi: 10.1038/s41598-017-18487-4.

Schaller, M. D. (2010) 'Cellular functions of FAK kinases: Insight into molecular mechanisms and novel functions', *Journal of Cell Science*, pp. 1007–1013. doi: 10.1242/jcs.045112.

Schnapp, L. M. *et al.* (1995) 'The human integrin  $\alpha 8\beta 1$  functions as a receptor for tenascin, fibronectin, and vitronectin', *Journal of Biological Chemistry*, 270(39), pp. 23196–23202. doi: 10.1074/jbc.270.39.23196.

Schwartz, I., Seger, D. and Shaltiel, S. (1999) 'Molecules in focus: Vitronectin', *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 31(1), pp. 539–544.

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*, 123(3), pp. 321–327. doi: 10.1001/archophth.123.3.321.

Seiffert, D. (1997) 'Constitutive and regulated expression of vitronectin.', *Histology and histopathology*, 12(3), pp. 787–97. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9225162>.

Shelby, S. J. *et al.* (2015) 'MERTK signaling in the retinal pigment epithelium regulates the tyrosine phosphorylation of GDP dissociation inhibitor alpha from the GDI/CHM family of RAB GTPase effectors', *Experimental Eye Research*, 140, pp. 28–40. doi: 10.1016/j.exer.2015.08.006.

Shughoury, A., Sevgi, D. D. and Ciulla, T. A. (2022) 'Molecular Genetic Mechanisms in Age-Related Macular Degeneration', *Genes*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). doi: 10.3390/genes13071233.

Singh, R., Phillips, M. J., *et al.* (2013) 'Functional analysis of serially expanded human iPS cell-derived RPE cultures', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 54(10), pp. 6767–6778. doi: 10.1167/iovs.13-11943.

Singh, R., Shen, W., *et al.* (2013) 'iPS cell modeling of Best disease: insights into the pathophysiology of an inherited macular degeneration', *Human Molecular Genetics*, 22(3), pp. 593–607. doi: 10.1093/hmg/ddt469.

Sobrin, L. and Seddon, J. M. (2014) 'Nature and nurture- genes and environment- predict onset and progression of macular degeneration', *Progress in Retinal and Eye Research*, pp. 1–15. doi: 10.1016/j.preteyeres.2013.12.004.

Somasundaran, S. *et al.* (2020) 'Retinal pigment epithelium and age-related macular degeneration: A review of major disease mechanisms', *Clinical and Experimental Ophthalmology*, pp. 1043–1056. doi: 10.1111/ceo.13834.

Song, G., Ouyang, G. and Bao, S. (2005) 'The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival', *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. J Cell Mol Med, pp. 59–71. doi: 10.1111/j.1582-4934.2005.tb00337.x.

Song, W. *et al.* (2020) 'SIRT1 Inhibits High Shear Stress-Induced Apoptosis in Rat Cortical Neurons', *Cellular and Molecular Bioengineering*, 13(6), pp. 621–631. doi: 10.1007/s12195-020-00623-2.

Song, Y. S. *et al.* (2008) 'The role of Akt signaling in oxidative stress mediates NF- $\kappa$ B activation in mild transient focal cerebral ischemia', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 28(12), pp. 1917–1926. doi: 10.1038/jcbfm.2008.80.

Spaide, R. F., Ooto, S. and Curcio, C. A. (2018) 'Subretinal drusenoid deposits AKA pseudodrusen', *Survey of Ophthalmology*. Elsevier, pp. 782–815. doi: 10.1016/j.survophthal.2018.05.005.

Sridharan, S., Jain, K. and Basu, A. (2011) 'Regulation of Autophagy by Kinases', *Cancers*, 3(2), pp. 2630–2654. doi: 10.3390/cancers3022630.

Stahl, A. (2020) 'The Diagnosis and Treatment of Age-Related Macular Degeneration', *Deutsches Arzteblatt Online*, 117, pp. 513–520. doi: 10.3238/arztebl.2020.0513.

Steele, J. G. *et al.* (1991) 'Adhesion and growth of cultured human endothelial cells on perfluorosulphonate: role of vitronectin and fibronectin in cell attachment.', *Biomaterials*, 12(6), pp. 531–9. doi: 10.1016/0142-9612(91)90046-d.

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

Steinberg, R. H. (1985) 'Interactions between the retinal pigment epithelium and the neural retina', *Documenta Ophthalmologica*, 60(4), pp. 327–346. doi: 10.1007/BF00158922.

Stepanek, O. *et al.* (2011) 'Interaction of Late Apoptotic and Necrotic Cells with

## Literaturverzeichnis

- Vitronectin', *PLoS ONE*. Edited by B. Ryffel, 6(5), p. e19243. doi: 10.1371/journal.pone.0019243.
- Stockmann, A. *et al.* (1993) 'Multimeric vitronectin. Identification and characterization of conformation-dependent self-association of the adhesive protein.', *The Journal of biological chemistry*, 268(30), pp. 22874–22882. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7693680>.
- Sun, B. B. *et al.* (2018) 'Genomic atlas of the human plasma proteome', *Nature*, 558(7708), pp. 73–79. doi: 10.1038/S41586-018-0175-2.
- Swaroop, A. *et al.* (2009) 'Unraveling a multifactorial late-onset disease: From genetic susceptibility to disease mechanisms for age-related macular degeneration', *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. doi: 10.1146/annurev.genom.9.081307.164350.
- 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), pp. e2367–e2367. doi: 10.1038/cddis.2016.133.
- Tadayoni, R. *et al.* (2021) 'Brolucizumab: A Newly Developed Anti-VEGF Molecule for the Treatment of Neovascular Age-Related Macular Degeneration', *Ophthalmologica*. S. Karger AG, pp. 93–101. doi: 10.1159/000513048.
- Tanida, I. and Waguri, S. (2010) 'Measurement of Autophagy in Cells and Tissues', in *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., pp. 193–214. doi: 10.1007/978-1-60761-756-3\_13.
- Taylor, D. J. *et al.* (2016) 'How does age-related macular degeneration affect real-world visual ability and quality of life? A systematic review', *BMJ Open*, 6(12), p. e011504. doi: 10.1136/bmjopen-2016-011504.
- Thomas, C. J., Mirza, R. G. and Gill, M. K. (2021) 'Age-Related Macular Degeneration', *Medical Clinics of North America*, pp. 473–491. doi: 10.1016/j.mcna.2021.01.003.
- Tollefsen, D. M., Weigel, C. J. and Kabeer, M. H. (1990) 'The presence of methionine or threonine at position 381 in vitronectin is correlated with proteolytic cleavage at arginine 379', *Journal of Biological Chemistry*, 265(17), pp. 9778–9781. doi: 10.1016/s0021-9258(19)38738-1.
- Tsai, A. S. H. *et al.* (2017) 'Retinal angiomatous proliferation', *Survey of Ophthalmology*. *Surv Ophthalmol*, pp. 462–492. doi: 10.1016/j.survophthal.2017.01.008.
- Tsang, S. H. *et al.* (1997) 'Retarding photo-receptor degeneration in Pdegtm1/Pdegtm1 mice by an apoptosis suppressor gene', *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 38(943–950).
- Velez-Montoya, R. *et al.* (2013) 'Current knowledge and trends in age-related macular degeneration: Today's and future treatments', *Retina*. *Retina*, pp. 1487–1502. doi: 10.1097/IAE.0b013e318271f265.
- Velilla, S. *et al.* (2013) 'Smoking and age-related macular degeneration: Review and update', *Journal of Ophthalmology*. Hindawi Limited, p. 11. doi:

10.1155/2013/895147.

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*, 45(7), pp. 813–817. doi: 10.1038/ng.2640.

Wang, L. *et al.* (2010) 'Abundant lipid and protein components of drusen.', *PloS one*. Edited by K.-W. Koch, 5(4), p. e10329. doi: 10.1371/journal.pone.0010329.

Wang, T., Lao, U. and Edgar, B. A. (2009) 'TOR-mediated autophagy regulates cell death in Drosophila neurodegenerative disease', *Journal of Cell Biology*, 186(5), pp. 703–711. doi: 10.1083/jcb.200904090.

Westenskow, P. D. *et al.* (2012) 'Using flow cytometry to compare the dynamics of photoreceptor outer segment phagocytosis in iPS-derived RPE cells', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 53(10), pp. 6282–6290. doi: 10.1167/iovs.12-9721.

Wightman, A. J. and Guymer, R. H. (2019) 'Reticular pseudodrusen: current understanding', *Clinical and Experimental Optometry*. Clin Exp Optom, pp. 455–462. doi: 10.1111/cxo.12842.

Williams, C. D. and Rizzolo, L. J. (1997) 'Remodeling of junctional complexes during the development of the outer blood-retinal barrier', *The Anatomical Record*, 249(3), pp. 380–388. doi: 10.1002/(SICI)1097-0185(199711)249:3<380::AID-AR9>3.0.CO;2-Y.

Winkler, B. S. *et al.* (1999) *Oxidative damage and age-related macular degeneration, Molecular Vision*.

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*, 2(2), pp. e106–e116. doi: 10.1016/S2214-109X(13)70145-1.

Wong, W. T. *et al.* (2013) 'Treatment of geographic atrophy with subconjunctival sirolimus: Results of a phase I/II clinical trial', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 54(4), pp. 2941–2950. doi: 10.1167/iovs.13-11650.

Wood, J. M. *et al.* (2011) 'Risk of falls, injurious falls, and other injuries resulting from visual impairment among older adults with age-related macular degeneration', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 52(8), pp. 5088–5092. doi: 10.1167/iovs.10-6644.

Wu, Y. *et al.* (2005) 'A role for Mer tyrosine kinase in  $\alpha v \beta 5$  integrin-mediated phagocytosis of apoptotic cells', *Journal of Cell Science*, 118(3), pp. 539–553. doi: 10.1242/jcs.01632.

Xiao, J. *et al.* (2021) 'Autophagy activation and photoreceptor survival in retinal detachment', *Experimental Eye Research*, 205. doi: 10.1016/j.exer.2021.108492.

Xie, P. *et al.* (2011) 'Suppression and regression of choroidal neovascularization in mice by a novel CCR2 antagonist, INCB3344', *PLoS ONE*, 6(12). doi: 10.1371/journal.pone.0028933.

Xing, C. *et al.* (2008) 'Complement factor H polymorphisms, renal phenotypes and

- age-related macular degeneration: The Blue Mountains Eye Study', *Genes and Immunity*, 9(3), pp. 231–239. doi: 10.1038/gene.2008.10.
- Xiong, L. *et al.* (2020) 'ER complex proteins are required for rhodopsin biosynthesis and photoreceptor survival in *Drosophila* and mice', *Cell Death and Differentiation*, 27(2), pp. 646–661. doi: 10.1038/s41418-019-0378-6.
- Xu, X. L. *et al.* (2014) 'Rb suppresses human cone-precursor-derived retinoblastoma tumours', *Nature*, 514(7522), pp. 385–388. doi: 10.1038/nature13813.
- Yan, W. *et al.* (2020) 'Cell Atlas of The Human Fovea and Peripheral Retina', *Scientific Reports*, 10(1), p. 9802. doi: 10.1038/s41598-020-66092-9.
- Yannuzzi, L. A. *et al.* (2001) 'Retinal angiomatous proliferation in age-related macular degeneration', *Retina*, 21(5), pp. 416–434. doi: 10.1097/00006982-200110000-00003.
- Yao, J. *et al.* (2016) 'Autophagy-mediated catabolism of visual transduction proteins prevents retinal degeneration', *Autophagy*, 12(12), pp. 2439–2450. doi: 10.1080/15548627.2016.1238553.
- Ye, X. *et al.* (2021) 'Quantitative proteomic analysis of MDCK cell adhesion', *Molecular Omics*, 17(1), pp. 121–129. doi: 10.1039/d0mo00055h.
- Yee, K. L., Weaver, V. M. and Hammer, D. A. (2008) 'Integrin-mediated signalling through the MAP-kinase pathway', *IET Systems Biology*, 2(1), pp. 8–15. doi: 10.1049/iet-syb:20060058.
- Yoshida, T. *et al.* (2005) 'The potential role of amyloid beta in the pathogenesis of age-related macular degeneration.', *The Journal of clinical investigation*, 115(10), pp. 2793–800. doi: 10.1172/JCI24635.
- 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*. Elsevier, pp. 81–114. doi: 10.1016/j.preteyeres.2010.11.002.
- Yu, L. *et al.* (2004) 'Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8', *Science*, 304(5676), pp. 1500–1502. doi: 10.1126/science.1096645.
- Yue, J. and López, J. M. (2020) 'Understanding MAPK signaling pathways in apoptosis', *International Journal of Molecular Sciences*. doi: 10.3390/ijms21072346.
- Zacks, D. N. *et al.* (2007) 'Role of the fas-signaling pathway in photoreceptor neuroprotection', *Archives of Ophthalmology*, 125(10), pp. 1389–1395. doi: 10.1001/archophth.125.10.1389.
- Zhang, M. *et al.* (2020) 'Dysregulated metabolic pathways in age-related macular degeneration', *Scientific Reports*, 10(1), pp. 1–14. doi: 10.1038/s41598-020-59244-4.
- Zhang, Q. Y. *et al.* (2016) 'Overweight, obesity, and risk of age-related macular degeneration', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 57(3), pp. 1276–1283. doi: 10.1167/iovs.15-18637.
- Zhang, S.-M. *et al.* (2023) 'Oxidative Stress-Involved Mitophagy of Retinal Pigment Epithelium and Retinal Degenerative Diseases', *Cellular and Molecular Neurobiology*. doi: 10.1007/s10571-023-01383-z.

Zhang, Z.-Y. *et al.* (2020) 'Autophagy in Age-Related Macular Degeneration: A Regulatory Mechanism of Oxidative Stress', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, pp. 1–13. doi: 10.1155/2020/2896036.

Zhao, C. *et al.* (2011) 'mTOR-mediated dedifferentiation of the retinal pigment epithelium initiates photoreceptor degeneration in mice', *Journal of Clinical Investigation*, 121(1), pp. 369–383. doi: 10.1172/JCI44303.

Zhao, X. and Guan, J.-L. (2011) 'Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(8), pp. 610–615. doi: 10.1016/j.addr.2010.11.001.

Zheng, D. Q. *et al.* (2000) 'Substrate specificity of  $\alpha(v)\beta3$  integrin-mediated cell migration and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway activation', *Journal of Biological Chemistry*, 275(32), pp. 24565–24574. doi: 10.1074/jbc.M002646200.

Zhou, H. *et al.* (2018) 'Association between sunlight exposure and risk of age-related macular degeneration: A meta-analysis', *BMC Ophthalmology*, 18(1), pp. 1–8. doi: 10.1186/s12886-018-1004-y.

Zhou, Y. Y. *et al.* (2015) 'MAPK/JNK signalling: A potential autophagy regulation pathway', *Bioscience Reports*, 35(3), pp. 1–10. doi: 10.1042/BSR20140141.

Zhou, Z. *et al.* (2015) 'Autophagy supports survival and phototransduction protein levels in rod photoreceptors', *Cell Death and Differentiation*, 22(3), pp. 488–498. doi: 10.1038/cdd.2014.229.

Zou, M. *et al.* (2021) 'Variations and trends in global disease burden of age-related macular degeneration: 1990-2017', *Acta Ophthalmologica*, 99(3), pp. e330–e335. doi: 10.1111/aos.14589.

## 12 Selbstständigkeitserklärung

Ich, Niklas Negele, geboren am 20.09.1998 in Kaufbeuren, erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

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

Ort, Datum

eigenhändige Unterschrift

des Promovenden

## 13 Danksagung

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Bernhard Weber danke ich für die Möglichkeit meine Doktorarbeit am Institut für Humangenetik durchzuführen und hier eine produktive und inspirierende Arbeitsumgebung bereitzustellen, ebenso, wie für seine Vorschläge und Ideen zur Verwirklichung dieser Arbeit.

Zudem möchte ich Frau Prof. Dr. med. Caroline Brandl für die Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Ein großes Dankeschön auch an Frau PD Dr. rer. nat. Ulrike Friedrich, für die exzellente Betreuung sowohl in organisatorischer als auch fachlicher Hinsicht, bei der man mit Fragen und Anliegen immer auf ein offenes Ohr stieß, für die große Geduld und die vielen Ideen und die Unterstützung während meiner Zeit als Doktorand am Institut.

Mein spezieller Dank gilt auch Frau Dr. rer. physiol. Fabiola Biasella für die großartige Zusammenarbeit, den hilfreichen Austausch auf fachlicher und persönlicher Ebene und die intensive Unterstützung im Labor.

Weiter möchte ich auch Frau Martina Esser für die exzellente und unverzichtbare technische Unterstützung im Labor danken.

Frau Dr. rer. nat. Verena Schmid und Frau Dr. rer. physiol. Karolina Plössl möchte ich für die gute Einarbeitung und die Ideen in der Durchführung der Tunel- und Phagocytose-Assays danken, ebenso Frau Andrea Milenkovic für die technische Anleitung bei der Isolation der Photorezeptor-Außensegmente.

Danke an alle Kollegen des Instituts für Humangenetik, für die lehrreiche und angenehme Arbeitsumgebung und für Unterstützung, wann immer sie nötig war.

Danke an meine Familie und Freunde für die Unterstützung und Motivation während des Verfassens dieser Arbeit und während meines gesamten Studiums.

## 14 Lebenslauf

### Zur Person:

Name: Negele  
Vorname: Niklas  
Geburtsdatum: 20. September 1998  
Geburtsort: Kaufbeuren

### Beruflicher Werdegang:

Seit 2023 Assistenzarzt für Dermatologie und Venerologie an der Hautklinik des Universitätsklinikums Heidelberg, Direktor: Prof. Dr. med. Alexander Enk  
2018 - 2022 Praxishilfe in der betriebsmedizinischen Praxis Dr. med. Udo Reisp in Regensburg

### Universitäre Ausbildung:

2023 Approbation zum Arzt  
2022 - 2023 Praktisches Jahr mit Aufhalten am Universitätsklinikum Regensburg und am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein der Universität zu Lübeck  
2018 - 2022 klinisches Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg  
2016 - 2018 vorklinisches Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg

### Schulische Ausbildung:

2008 - 2016 Besuch des Jakob-Brucker-Gymnasiums in Kaufbeuren mit Erreichen der allgemeinen Hochschulreife (Abitur) 2016  
2004 - 2008 Besuch der Volksschule Stöttwang-Westendorf in Westendorf