

Aus dem Lehrstuhl für Humangenetik der Universität Regensburg

Prof. Dr. rer. nat. Bernhard Weber

der Fakultät für Medizin

der Universität Regensburg

Untersuchungen zur Homöostase der extrazellulären Matrix in iPSC-RPE

mit definiertem genetischem Risiko für die altersbedingte

Makuladegeneration (AMD)

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Fakultät für Medizin

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Dario Glanz

2024

Aus dem Lehrstuhl für Humangenetik der Universität Regensburg

Prof. Dr. rer. nat. Bernhard Weber

der Fakultät für Medizin

der Universität Regensburg

**Untersuchungen zur Homöostase der extrazellulären Matrix in iPSC-RPE
mit definiertem genetischem Risiko für die altersbedingte
Makuladegeneration (AMD)**

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Fakultät für Medizin

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Dario Glanz

2024

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Bernhard Weber

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Eugen Kerkhoff

Tag der mündlichen Prüfung: 26.02.2025

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Altersbedingte Makuladegeneration	1
1.1.1	Epidemiologie der AMD	1
1.1.2	Individuelle und gesamtgesellschaftliche Bedeutung einer AMD	2
1.1.3	Risikofaktoren für die AMD	3
1.1.4	Pathologie, Symptomatik und Therapie der AMD	4
1.1.5	Molekulare Pathogenese der AMD	8
1.2	Verschiedene Proteine und deren Bedeutung für die AMD-Pathogenese	13
1.2.1	Fibronectin	13
1.2.2	Elastin	14
1.2.3	Vitronectin	14
1.2.4	Laminin und Kollagen IV	15
1.2.5	TIMP 3	15
1.2.6	Kollagen V	16
1.2.7	ApoE und Lipide	16
1.2.8	α -Crystallin	17
1.2.9	β -Amyloid	17
1.3	hiPSC-RPE als Zellmodell in der AMD-Forschung	17
1.4	Ziel der Arbeit	18
2	Material	20
2.1	Reagenzien und Chemikalien	20
2.2	Lösungen und Puffer	21
2.3	Verbrauchsmaterialien	22
2.4	Laborgeräte	24
2.5	Software	25
2.6	hiPSC-RPE Zelllinien	26
2.7	Zellkulturmedien und Supplements	26

2.8	Antikörper	27
2.8.1	Primäre Antikörper	27
2.8.2	Sekundäre Antikörper	28
2.9	Molekülmassenstandards	29
2.10	Oligonukleotide	29
2.11	Kit-Systeme	29
3	Methoden	30
3.1	Kultivierung der hiPSC-RPE Zelllinien	30
3.2	Messung des transepithelialen Widerstands	31
3.3	Induktion von metabolischem und oxidativem Stress durch POS-Fütterung	31
3.3.1	POS-Isolierung	31
3.3.2	POS-Konzentrationsbestimmung <i>via</i> Bradford-Assays	32
3.3.3	POS-Fütterung	33
3.4	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	33
3.5	Gelatine-Zymographie MMPs	34
3.6	Western-Blot Analyse MMPs	35
3.7	ELISA-Analyse MMP2	36
3.8	Immunhistochemische Analyse der Zellen und der EZM	36
3.8.1	Dezellularisierung	36
3.8.2	ICC – Flatmount der Filter	36
3.8.3	ICC – Anfertigung von Kryo-Schnitten	37
3.8.4	Mikroskopie und Auswertung der Bilder in ImageJ	38
3.8.5	Statistische Auswertung	39
3.9	RNA-Ernte und Isolation	39
3.9.1	Zelllysate-Ernte und RNA-Isolation	39
3.10	cDNA-Synthese	40
3.11	Expressionsanalyse in hiPSC-RPE mithilfe von quantitativer Real-Time PCR (qRT-PCR)	40

4	Ergebnisse	42
4.1	Untersuchung der hiPSC-RPE Qualität und POS-Phagozytose	42
4.2	Einfluss des genetischen Hintergrunds und von POS-Fütterung auf die immunhistochemische Analyse der EZM und drusenähnlicher Ablagerungen von hiPSC-RPE	44
4.2.1	ICC-Analyse von Strukturproteinen der EZM	45
4.2.2	ICC-Analyse von AMD-typischen Proteinen und Lipiden als Bestandteil von Drusen	50
4.3	Einfluss von POS-Fütterung und des genetischen Hintergrunds auf die Sekretion von MMPs durch hiPSC-RPE	61
4.3.1	Gelatine-Zymographie	61
4.3.2	Western-Blot-Analyse der MMPs und ELISA gegen MMP2	63
4.4	Einfluss von POS-Fütterung und des genetischen Hintergrunds auf intrazelluläre mRNA-Expression von Markern für oxidativen Stress, mitochondriale Aktivität und das Komplementsystem	65
5	Diskussion	67
5.1	Untersuchung der hiPSC-RPE Qualität und Verifizierung der POS-Phagozytose	67
5.2	Einfluss des genetischen Hintergrunds und von POS-Fütterung auf die immunhistochemische Analyse der EZM von hiPSC-RPE	69
5.3	Einfluss des genetischen Hintergrunds und von POS-Fütterung auf die Sekretion von MMPs durch die hiPSC-RPE	74
5.4	Einfluss des genetischen Hintergrunds und von POS-Fütterung auf die Expression AMD-assoziiierter Gene	77
5.5	Fazit	79
6	Zusammenfassung	80
7	Abstract	82
8	Abkürzungsverzeichnis	83
9	Tabellenverzeichnis	85
10	Abbildungsverzeichnis	86
11	Literaturverzeichnis	89

12	Danksagung	110
13	Lebenslauf	111
14	Selbstständigkeitserklärung	112
15	Appendix	113
15.1	ICC-Analyse von Strukturproteinen der EZM	114
15.2	ICC-Analyse von AMD-typischen Proteinen als Bestandteil von Drusen	119

1 Einleitung

1.1 Die Altersbedingte Makuladegeneration

Die altersbedingte Makuladegeneration (AMD) ist eine häufige, chronisch-progrediente Erkrankung der zentralen Netzhaut im Bereich der Makula und des darunterliegenden, retinalen Pigmentepithels (RPE) (Bressler et al., 1988; Lim et al., 2012). Das Erkrankungsgeschehen wird in ein frühes und spätes Stadium unterteilt. Während die Frühform in der Regel noch symptomarm ist, kann es im Verlauf bis zum vollständigen Sehverlust kommen (Lim et al., 2012; Ferris et al., 2013). Zudem wird beim späten Stadium anhand des retinalen Erscheinungsbildes eine trockene Form, auch geographische Atrophie (GA-AMD), von einer feuchten Form, auch neovaskuläre AMD (NV-AMD), unterschieden (Ding et al., 2009; Holz et al., 2014). Obwohl AMD in den Industrienationen die häufigste Ursache für Erblindung im Alter ist, sind aktuell nur begrenzte Therapiemöglichkeiten für die AMD vorhanden, welche des Weiteren nur für Subgruppen der Patienten geeignet sind (Resnikoff et al., 2004; Van Lookeren Campagne et al., 2014).

Die AMD ist eine komplexe Erkrankung mit genetischen und exogenen Risikofaktoren und ist gekennzeichnet durch die Entstehung von extrazellulären, lipidreichen Ablagerungen („Drusen“) und lokaler Inflammation (Fritsche et al., 2014; Curcio, 2018b). Die Pathomechanismen der AMD sind nur unzureichend geklärt, deswegen bedarf es aufgrund der hohen individuellen und gesamtgesellschaftlichen Bedeutung der AMD weiterer Forschungsanstrengungen (Brown et al., 2005).

1.1.1 Epidemiologie der AMD

Im Jahr 2002 waren weltweit 37 Mio. Menschen erblindet, 8,7% der Fälle konnten auf eine AMD Erkrankung zurückgeführt werden. Damit stellt AMD, nach Katarakt und Glaukom, den dritthäufigsten Grund für Erblindung weltweit dar. In entwickelten Ländern wie Westeuropa und den USA ist AMD mit ca. 50% sogar die häufigste Ursache für Erblindung (Resnikoff et al., 2004). Auch eine Meta-Analyse basierend auf Populationsstudien bis zum Jahr 2012 ergab ähnliche Tendenzen (Jonas et al., 2014).

Die Analyse von fast 130.000 Individuen hat ergeben, dass 8,7% der 45- bis 85-jährigen weltweit von AMD betroffen sind, dabei haben die meisten (8,0%) eine frühe Form der AMD. Lediglich 0,4% in dieser Altersgruppe sind von den späten, Visus-bedrohenden Formen der AMD, GA-AMD und NV-AMD, betroffen (Wong et al., 2014; Jonas et al., 2017). Dabei steigt die Prävalenz mit dem Alter der betrachteten Population stark an (Klein et al., 1995; Friedman

et al., 1999; Li et al., 2020). Dies hat zur Folge, dass aufgrund der alternden Weltbevölkerung ein klarer Anstieg der von AMD Betroffenen erwartet wird, so wurden für das Jahr 2020 noch 196 Mio., für das Jahr 2040 hingegen schon 288 Mio. Betroffene prognostiziert (Wong et al., 2014).

In Europa liegt die Prävalenz der frühen AMD bei den über 70-jährigen bei 13,2%, die der Spätformen bei 3,0% (Colijn et al., 2017). Auch in Europa besteht ein klarer Zusammenhang mit dem Alter, bei den über 85-Jährigen liegt die Prävalenz der Frühform bei 17,6% bzw. der Spätformen bei 9,8%, während bei den 55-59 Jährigen nur 3,5% bzw. nahezu 0% betroffen sind (Colijn et al., 2017). Rudnicka und Kollegen haben gezeigt, dass sich mit jeder Lebensdekade die Chance, an AMD zu erkranken, vervierfacht (Rudnicka et al., 2012). Von den weltweit im Jahr 2040 erwarteten 288 Mio. AMD-Erkrankten werden ungefähr 70 Mio. in Europa erwartet, wobei die Prognosen je nach Quelle und betrachtetem Szenario erheblich schwanken (Wong et al., 2014; Colijn et al., 2017; Li et al., 2020).

Interessanterweise hängt das Risiko an AMD zu erkranken auch von der Ethnizität ab, in Populationen europäischer Herkunft liegt die Prävalenz der frühen Form bei 11,2%, während diese bei asiatischer bzw. afrikanischer Herkunft nur bei 6,8% bzw. 7,1% liegt (Kawasaki et al., 2010; Wong et al., 2014; Jonas et al., 2017). Das Geschlecht scheint, trotz teilweise widersprüchlicher Daten, keinen oder nur geringen Einfluss auf das Erkrankungsrisiko zu haben (Rudnicka et al., 2012; Wong et al., 2014; Jonas et al., 2017).

1.1.2 Individuelle und gesamtgesellschaftliche Bedeutung einer AMD

Die Belastung für den Einzelnen durch eine AMD-Erkrankung ist sehr hoch. So ist eine milde AMD-Ausprägung verbunden mit einem Verlust an Lebensqualität von 17% (vergleichbar mit moderater Angina pectoris), moderate und schwere AMD schon mit einem Verlust von jeweils 32% bzw. 53% und sehr schwere AMD mit einem Verlust von 60% (vergleichbar mit einem schweren Schlaganfall mit anschließender Bettlägerigkeit) (Brown et al., 2005). Zwar beruhen die von Brown und Kollegen in dieser Studie erhobenen Zahlen in hohem Maße auf subjektiven Angaben der Patienten, dennoch unterstreichen sie die hohe, individuelle Belastung durch eine AMD-Erkrankung. In Folge ist unter AMD-Patienten die Rate an Depressionserkrankungen erhöht, die Teilnahme an gesellschaftlichen Tätigkeiten eingeschränkt, die Patienten sind auf Hilfe bei der Alltagsbewältigung angewiesen und es kommt gehäuft zu Stürzen und Folgeverletzungen (Rovner, 2002; Brown et al., 2005; Cruess et al., 2008). Neben diesen individuellen Negativeinflüssen führt AMD auch zu hohen gesamtgesellschaftlichen Kosten. Durch eine erhöhte Rate an Arbeitslosigkeit bzw. einem erniedrigten Lohnniveau unter AMD-

Patienten kommt es zu signifikanten Verlusten am Bruttoinlandsprodukt, hinzu kommen hohe Kosten für die medizinische Behandlung und Unterstützung der Patienten im Alltag (Brown et al., 2005; Rein et al., 2006; Cruess et al., 2008; Kim et al., 2019). Dies zeigt die Wichtigkeit der AMD Forschung und gleichzeitig die potenziellen finanziellen Einsparungen, die durch Entwicklung von Präventions- und Therapiemöglichkeiten erreicht werden können (Saxena et al., 2016).

1.1.3 Risikofaktoren für die AMD

AMD als komplexe Erkrankung hat eine ganze Reihe von Risikofaktoren, darunter endogene und exogene, die in unterschiedlichem Ausmaß und durch kombinatorische Effekte das individuelle Erkrankungsrisiko beeinflussen. Während die exogenen Faktoren teilweise vermeidbarer Natur sind, tragen die endogenen Faktoren ohne die Möglichkeit einer direkten Einflussnahme zum Risiko bei.

Einer der stärksten endogenen Faktoren ist das Alter, welches stark mit dem Auftreten der Krankheit assoziiert ist (Age-Related Eye Disease Study Research Group, 2000; Buch et al., 2005; Klein et al., 2007; Chen et al., 2010). Grund dafür könnten Veränderungen auf Ebene der Zellen und der extrazellulären Matrix (EZM) der Retina und ihrer versorgenden Strukturen sein, im Allgemeinen kommt es mit zunehmendem Alter z. B. zur Akkumulation von DNA-Schäden, epigenetischen Veränderungen oder mitochondrialer Dysfunktion (Ardeljan et al., 2013). Typisch für das RPE ist eine mit dem Alter vermehrte Ablagerung von Lipofuszin in den postmitotischen Zellen, einem schädlichen Abfallprodukt der Phagozytose von Photorezeptor-Außensegmenten (photoreceptor outer segments, POS) durch das RPE (Feeney-Burns et al., 1984; Delori et al., 2001). Zudem kommt es im Alter zu einer Verdickung der Bruchmembran (BrM), verbunden mit der Einlagerung von Lipiden (Curcio, 2018b; Murali et al., 2020).

Ein weiterer wichtiger endogener Faktor ist die individuelle genetische Konstitution, welcher je nach Studie ein Beitrag von 46% bis zu 71% zum individuellen AMD-Erkrankungsrisiko zugeschrieben wird. Bei ungünstiger Konstellation kann ein 44-faches Erkrankungsrisiko gegenüber Individuen mit einem günstigeren genetischen Profil resultieren (Seddon et al., 2005; Fritsche et al., 2016). In der aktuellsten und bis heute größten genomweiten Assoziationsstudie von Fritsche und Kollegen wurden im Jahr 2016 insgesamt 52 unabhängige Varianten in 34 Genloci identifiziert, die mit protektiven oder krankheitsfördernden Effekten assoziiert sind (Fritsche et al., 2016). Die stärksten Assoziationen gab es dabei mit bereits bekannten Varianten im *ARMS2/HTRA1* (age-related maculopathy susceptibility 2/high-temperature requirement A serine peptidase 1)-Lokus und *CFH* (Komplementfaktor H)-Lokus (Edwards et al., 2005;

Haines et al., 2005; Jakobsdottir et al., 2005; Klein et al., 2005; Rivera et al., 2005; Fritsche et al., 2008), aber auch schwächere und teilweise neue Assoziationen mit Varianten in oder in der Nähe von Genen wurden bestätigt bzw. neu gefunden, wie z. B. für die Gene kodierend für Komplementfaktor 3 (*C3*), Komplementfaktor 9 (*C9*), Gewebsinhibitor der Matrix-Metalloproteinasen-3 (*TIMP3*), Vitronectin (*VTN*), Kollagen IV (*COL4A3*) und Apolipoprotein E (*APOE*) (Fritsche et al., 2016). Eine assoziierte Variante in der Nähe des Matrix-Metalloproteinase-9 (*MMP9*)-Genortes ist dabei zudem die erste Variante, die spezifisch mit einem der beiden Subtypen, der NV-AMD, in Verbindung gebracht werden konnte (Fritsche et al., 2016). Zudem konnte gezeigt werden, dass ein hohes genetisches Risiko nicht nur mit der Erkrankungsschwere korreliert, sondern auch mit einem gehäuften Auftreten von Hochrisikomerkmale für eine rasche Progression bei bestehender Erkrankung (Garzone et al., 2024). Diese Gene sind an den verschiedensten Stoffwechselwegen und Prozessen beteiligt, darunter die Regulation des Komplementsystems, Angiogenese, EZM-Organisation und Lipidmetabolismus (Fritsche et al., 2013, 2014, 2016).

Auch verschiedene Umweltfaktoren spielen eine Rolle für das Erkrankungsrisiko. Rauchen ist sowohl mit der Entstehung der AMD assoziiert, als auch mit der Progression von der Frühform zu einer der Spätformen, so dass Raucher ein etwa doppeltes Risiko für die Entwicklung einer der Spätformen haben (Vinding et al., 1992; Smith et al., 2001; Tomany, Wang, et al., 2004; Swaroop et al., 2009; Lambert et al., 2016). Als mögliche Ursachen werden Infarkte retinaler und choroidaler Gefäße, Hypoxie oder vermehrter oxidativer Stress diskutiert (Solberg et al., 1998; Ding et al., 2009). Neben dem Rauchen wurden auch Sonnenlichtexposition, Bluthochdruck, kardiovaskuläre Erkrankungen, Übergewicht und Ernährung mit AMD assoziiert, wobei hier die Datenlage häufig inkonsistent ist (Cruickshanks et al., 1993; Smith et al., 2001; Klein et al., 2003; Tomany, Cruickshanks, et al., 2004; Chen et al., 2010; Lambert et al., 2016). Eine fettreiche Ernährung scheint z. B. die Progression der AMD zu begünstigen, während eine Anreicherung von Zink und Antioxidantien in der Nahrung das Fortschreiten der Erkrankung verringert (Kassoff et al., 2001; Seddon et al., 2003; Francisco et al., 2020).

1.1.4 Pathologie, Symptomatik und Therapie der AMD

Durch die klinische Untersuchung des Augenhintergrunds, z. B. durch Funduskopie oder optische Kohärenztomografie, lassen sich die Charakteristika der AMD darstellen (Chakravarthy et al., 2010; Lim et al., 2012). Die Erkrankung lässt sich anhand dieser Untersuchungen, je nach verwendetem Klassifikationssystem, in ein frühes/intermediäres Stadium und ein spätes/fortgeschrittenes Stadium unterteilen (Davis et al., 2005; Ferris et al.,

2013; Van Lookeren Campagne et al., 2014). Die frühe/intermediäre AMD ist die häufigste Form, sie verläuft oft asymptomatisch und nur langsam progredient (Ferris et al., 2005; Wong et al., 2014). Erste Symptome können eine reduzierte Sehschärfe, eine verringerte Kontrastsensitivität, Beeinträchtigung der Dunkeladaptation und verschwommene Sicht sein (Stangos et al., 1995; Jager et al., 2008; Lim et al., 2012; Haider et al., 2014). Gekennzeichnet ist sie durch Pigmentveränderungen (Hypo- oder Hyperpigmentierung) des RPE vor allem im Bereich der Makula und Bildung von extrazellulären, lipid- und proteinreichen Aggregaten (Drusen) zwischen der Basalmembran des RPE und der inneren kollagenen Schicht der BrM (**Abb. 1, B**) (Green et al., 1985; Hageman et al., 1999; Van Leeuwen et al., 2003; Jager et al., 2008; Crabb, 2014; Fritsche et al., 2014). Die Drusen werden dabei in begrenzte, gelbliche Drusen mit einem Durchmesser von $<63\text{ }\mu\text{m}$ („harte“ Drusen) und größere, unscharf begrenzte, hellere Drusen („weiche“ Drusen) unterteilt. Während die harten Drusen eine gewöhnliche Alterserscheinung sind und nicht unbedingt mit einem erhöhten AMD-Risiko einhergehen, sind weiche Drusen ein signifikanter Risikofaktor für die Entstehung einer der Spätformen der AMD (Ding et al., 2009; Curcio, 2018b). Brandl und Kollegen konnten des Weiteren eine signifikante Verdickung der BrM und eine Verdünnung der Photorezeptorenschicht bei AMD-Patienten zeigen (Brandl et al., 2019).

Die beiden Spätformen der AMD, GA-AMD und NV-AMD, können isoliert auftreten. Bei vielen Patienten treten aber auch Mischformen bzw. beide Spätformen gleichzeitig auf, sodass die Spätformen zunehmend als ein Erkrankungskontinuum angesehen werden (Ambati et al., 2003; Ding et al., 2009; Lim et al., 2012; Holz et al., 2014; Brandl et al., 2018). Symptomatisch kommt es zu einer Verschlechterung der Sehschärfe, zentralen Skotomen (Gesichtsfeldausfällen), Metamorphopsien (subjektive Sehstörungen mit verzerrter Wahrnehmung der Umwelt) und Bildung von disciformen, fibrovaskulären Narben (Campochiaro et al., 1999; Sarks et al., 2006; Lim et al., 2012). Beide Spätformen können sich dabei bis zum vollständigen Sehverlust entwickeln (Lim et al., 2012). Die zentralen Sehverluste führen bei den Betroffenen zu starken Einschränkungen im Alltag, so kommt es zu Schwierigkeiten beim Lesen, Autofahren und Erkennen von Gesichtern (Brown et al., 2005; Banerjee et al., 2008; Cruess et al., 2008; Chakravarthy et al., 2010).

Bei der GA-AMD kommt es im zentralen Netzhautbereich zu Arealen von Atrophie und Degeneration des RPE, was sekundär auch zum Absterben der angrenzenden Photorezeptoren und zur Degeneration der unterliegenden Choriocapillaris führt (**Abb. 1, C**) (Dunaief et al., 2002; Ding et al., 2009; Mcleod et al., 2009; Bhutto et al., 2012). Diese Atrophiefelder stellen

sich in der Funduskopie als zum Teil scharf abgegrenzte, helle Areale fehlender Pigmentierung dar (Lim et al., 2012). Bei der NV-AMD hingegen kommt es zu einem Aussprießen neuer Gefäße aus der Choriocapillaris (und teilweise der retinalen Blutgefäße) in den Raum zwischen RPE und BrM und in den sub-/intraretinalen Raum (Green, 1999; Brancato et al., 2002; Kent, 2014; Van Lookeren Campagne et al., 2014). Da diese pathologischen Gefäße unreif und verstärkt permeabel sind, kommt es in Folge oft zu Austritt von serösen Flüssigkeiten oder Hämorrhagien zwischen BrM und RPE bzw. zwischen RPE und Photorezeptoren (**Abb. 1, D**) (Campochiaro et al., 1999; Grossniklaus et al., 2004; Chen et al., 2010; Lim et al., 2012). NV-AMD führt, im Gegensatz zur GA-AMD, daher oft zu einem akut auftretenden, schnell fortschreitenden Sehverlust (Ambati et al., 2012).

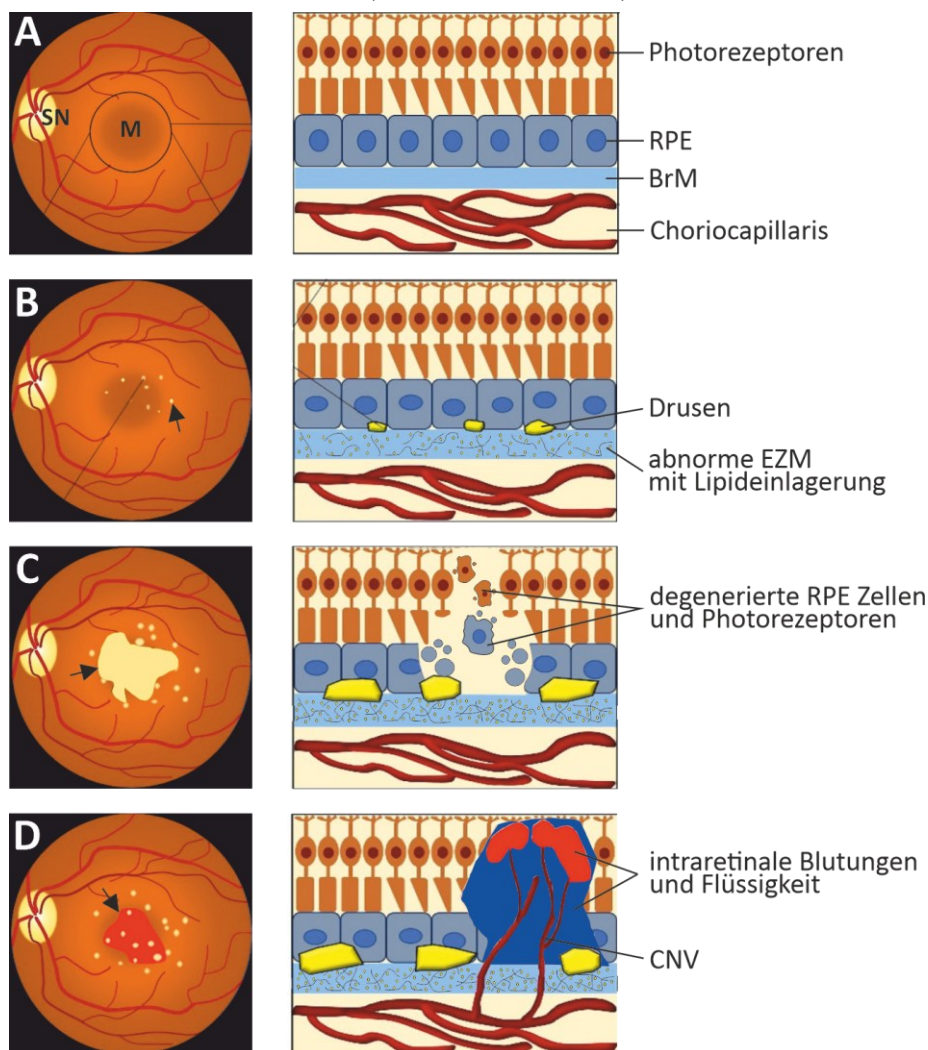


Abbildung 1: Schematische Fundusaufnahmen und Darstellungen einer gesunden Retina und Retinae mit verschiedenen Formen der AMD. (A) Darstellung einer normalen, gesunden Retina. SN = Sehnerv, M = Makula (B) Entstehung einer abnormen EZM und von Drusen unter dem RPE bei der frühen/intermediären AMD. Die Drusen sind in der Fundusaufnahme (Pfeil) als gelbe Punkte sichtbar. (C) Retina mit GA-AMD: in der Fundusaufnahme zeigen sich die atrophierten Areale als scharf abgegrenzte Bereiche mit Verlust der Pigmentierung (Pfeil) und große Drusen, schematische Darstellung der GA-AMD mit Verlust der RPE-Zellen und der darüberliegenden Photorezeptoren. (D) Retina mit NV-AMD: es kommt zu intraretinalen Einblutungen (Pfeil) und Flüssigkeitsaustritt, schematische Darstellung von Gefäßen, die durch die BrM und das RPE bis in die Photorezeptorenschicht einwachsen (choroidale Neovaskularisation, CNV). Abbildung modifiziert nach Ruan et al., 2021

Ein weiteres, auffälliges Merkmal in der retinalen Bildgebung von AMD-Patienten sind sogenannte reticuläre Pseudodrusen (RPD; auch subretinal drusenoid deposits (SDD) genannt). Dies sind extrazelluläre Ablagerungen, ähnlich zu den klassischen Drusen, jedoch zwischen dem RPE und den Photorezeptoren gelegen (Spaide et al., 2018; Wightman et al., 2019). Zwar unterscheiden sich RPD von den sub-RPE Drusen in ihrer Lipidzusammensetzung, sie enthalten jedoch typische Proteine der sub-RPE Drusen, darunter ApoE, CFH und VTN (Rudolf et al., 2008; Oak et al., 2014; Wightman et al., 2019). Die ermittelte Prävalenz von RPD schwankt aufgrund einer starken Abhängigkeit von der verwendeten Bildgebungsmethode und einer fehlenden, einheitlichen Klassifizierung stark (Klein et al., 2008; Sivaprasad et al., 2016; Wu et al., 2016). Während die Ätiologie der RPD weiterhin unklar ist, konnten mehrere Studien eine klare Assoziation von RPD und dem Erkrankungsrisiko bzw. dem Fortschreiten von AMD zeigen (Marsiglia et al., 2013, 2015; Finger et al., 2014, 2016; Domalpally et al., 2019).

Die Sehbeeinträchtigungen, vor allem durch die Spätformen der AMD, sind weitgehend irreversibel. Zur Therapie von NV-AMD zugelassen sind bislang ausschließlich intravitreale Injektionen neutralisierender Antikörper gegen den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren (vascular endothelial growth factor, VEGF), z. B. Ranibizumab (Stahl, 2020). Diese, je nach Behandlungsregime monatlich bis mehrmals jährlich durchgeführten, anti-VEGF Injektionen verzögern das Fortschreiten der Sehverluste, eine Verbesserung der Symptomatik wird jedoch nur selten erreicht (Rosenfeld et al., 2011; Ba et al., 2015; Park et al., 2017; Stahl, 2020). Zudem sind diese Injektionen sehr teuer für das Gesundheitssystem, belastend für den einzelnen Patienten und bergen ein gewisses Infektionsrisiko (Day et al., 2011; The Lancet, 2018; Stahl, 2020). Schließlich sprechen NV-AMD-Patienten unterschiedlich gut auf die anti-VEGF Therapie an, es gibt auch Patienten bei denen diese nicht erfolgreich ist (Rosenfeld et al., 2011; McKibbin et al., 2012). Für die GA-AMD gab es in den USA 2023 Neuzulassungen für Inhibitoren der Komplementfaktoren 3 und 5, die zu einer signifikanten Verlangsamung des Wachstums der GA-Läsionen bei Patienten führen (Heier et al., 2023; Khanani et al., 2023, Nadeem et al., 2023). Zudem konnte teilweise eine Wirkung von präventiven Maßnahmen, wie die Nahrungsergänzung durch Vitamin- und Antioxidantienpräparate, gezeigt werden (Meleth et al., 2011; Evans et al., 2017a, 2017b; Moschos et al., 2018). Viele neuartige Therapiemöglichkeiten werden derzeit exploriert, so wird z. B. an chirurgischer Transplantation von gesundem RPE oder weiteren Eingriffen in das Komplementsystems geforscht (Binder et al., 2007; Schmitz-Valckenberg et al., 2010; Da Cruz et al., 2018; Nebbioso et al., 2019).

1.1.5 Molekulare Pathogenese der AMD

Die verschiedenen Formen der Makuladegeneration, darunter die AMD, werden als Störung des RPE-BrM-Choroidea-Komplexes angesehen. Viele der normalen, altersbedingten Veränderungen dieses Komplexes sind in verstärkter Form auch typische Veränderungen bei AMD-Patienten und tragen vermutlich zur AMD-Pathogenese bei (Zarbin, 2004).

Die BrM ist eine spezialisierte Schicht extrazellulärer Matrix zwischen dem RPE und der Choroidea, wobei die Zellen des RPE diverse Proteine der BrM sezernieren und dadurch an der Regulation des EZM Umsatzes der BrM beteiligt sind (Campochiaro et al., 1986; Aisenbrey et al., 2006). Mit zunehmendem Alter und stärker noch bei AMD-Patienten kommt es zur Bildung von fokalen Drusen unter dem RPE und einer Verdickung der BrM mit Ablagerungen in der BrM (basal linear deposits, BLinD) und zwischen RPE und BrM (basal laminar deposits, BLamD) (Kliffen et al., 1997; Fernandez-Godino et al., 2016; Curcio, 2018b; Brandl et al., 2019). Diese Ablagerungen werden außerdem von Veränderungen in der Proteinzusammensetzung, Proteinvernetzung, einer erhöhten Glykosaminoglykangröße und erhöhtem Lipidgehalt der BrM begleitet (Tyl Hewitt et al., 1989; Karwatowski et al., 1995; Pauleikhoff et al., 2000). Grund hierfür könnten primär dysfunktionale RPE-Zellen sein, die abnorme Mengen an EZM-Proteinen, inflammatorischen Faktoren und Lipiden produzieren.

Gleichzeitig könnte ein eingeschränkter Abbau der EZM zur Verdickung der BrM beitragen, dieser Abbau wird vor allem durch Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) bewerkstelligt (Liva et al., 2019). MMPs sind eine Familie von zinkabhängigen Proteasen, die fähig sind, die Strukturproteine der EZM abzubauen, gleichzeitig aber auch an der Prozessierung von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Zellmembranrezeptoren beteiligt sind und so Einfluss auf verschiedenste Signalwege nehmen (Chang et al., 2001; Hu et al., 2006; Van Lint et al., 2007). Die Aktivität der MMPs wird durch Gewebsinhibitoren der Metalloproteinasen (TIMPs) reguliert, sowohl MMPs als auch TIMPs werden durch die Zellen des RPE produziert (Alexander et al., 1990; Vranka et al., 1997). Ungleichgewichte in der Aktivität von MMPs und TIMPs sind an vielen humanen Pathologien beteiligt, darunter Tumorbildung, kardiovaskuläre und neurodegenerative Erkrankungen (Cabral-Pacheco et al., 2020). Unter den neurodegenerativen Erkrankungen mit Dysregulation des MMP/TIMP-Systems ist z. B. die Sorsby-Fundusdystrophie (SFD), bei der pathologische Mutationen im *TIMP3* Gen zur Akkumulation von TIMP3 in der EZM der BrM führt (Weber et al., 1994; Li et al., 2005). SFD ist eine Makuladegeneration mit einem sehr ähnlichen Phänotyp zur AMD, gekennzeichnet durch die Akkumulation von abnormalem, extrazellulärem Material in der BrM (Christensen et

al., 2017). Auch bei der AMD sind Varianten im *TIMP3*- und *MMP9*-Lokus bekannt, die mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko assoziiert sind (Fritsche et al., 2016). In vielen Studien sind bei AMD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen die Konzentrationen von TIMP3 und den MMPs im RPE und den umliegenden Geweben verändert, jedoch sind die Daten teilweise widersprüchlich (Guo et al., 1999; Kamei et al., 1999; Lambert et al., 2003; Chau et al., 2008; Hussain et al., 2011; García-Onrubia et al., 2020). Den MMPs kommt dabei unter anderem eine Rolle bei der Angiogenese und Entstehung von CNVs zu (González-Zamora et al., 2022; González-Zamora et al., 2023). Weiter führt der Abbau von EZM-Proteinen (z. B. Kollagen IV, Fibronectin und Elastin) durch MMPs zur Bildung von Matrikinen, welche chemotaktische Wirkung auf Immunzellen haben und inflammatorische Reaktionen auslösen können (Adair-Kirk et al., 2008). Solche Matrikine sind Bestandteile von sub-RPE Ablagerungen und könnten so eine Verbindung zwischen der aberranten EZM und der chronischen Inflammation bei der AMD herstellen (Fernandez-Godino et al., 2016).

Ungleichgewichte in der EZM-Synthese und Metalloproteinasen-Aktivität führen neben einer Verdickung auch zu abnormen physiologischen Eigenschaften der BrM, so kommt es mit zunehmendem Alter zu einer exponentiellen Abnahme der hydraulischen Leitfähigkeit, dies liegt vermutlich an der Einlagerung von lipidreichem Material in die BrM (Moore et al., 1995; Starita et al., 1996, 1997). Dies könnte, in Verbindung mit dem verringerten Blutfluss in der Choroidea, zu einem erschwerten Transport von Nährstoffen und Vitaminen zum RPE und den Photorezeptoren führen und die Beseitigung von Abbauprodukten und Abfallstoffen der metabolisch hochaktiven Zellen der Retina behindern (Moore et al., 2001; Hussain et al., 2002, 2010).

Ein weiterer Einflussfaktor in der AMD-Pathogenese scheint eine chronische Überaktivierung des Komplementsystems, einem Teil des angeborenen Immunsystems, im RPE-BrM-Choroidea-Komplex zu sein, welche zu einer chronischen Inflammation führt (Johnson et al., 2000; Frederick et al., 2014; Kawa et al., 2014; Geerlings et al., 2017). Da das Auge immunprivilegiert ist, ist die Komplementkaskade in gesunden Personen lokal streng reguliert und die sog. Komplementfaktoren sind im Auge nur in geringen Konzentrationen vorhanden, die Hauptquellen der Expression sind dabei das RPE und die Mikroglia der Netzhaut (Xu et al., 2016). Das Komplementsystem kann über den klassischen Weg, den Mannose-bindenden Lektin-Weg und den alternativen Weg aktiviert werden. Alle drei Wege konvergieren in der Aktivierung von C3 und der anschließenden Aktivierung des Komplementfaktors 5 (C5) (Walport, 2001; Gadjeva, 2014; Maugeri et al., 2018). C5 bildet mit den Komplementfaktoren

C6-C9 einen Komplex, den Membranangriffskomplex (MAC), dieser MAC fördert die Entzündungsreaktion und ist entscheidend für Lyse von Pathogenen, kann jedoch unter pathologischen Umständen auch gegen körpereigene Zellen gerichtet sein (Carroll et al., 2011; Gadjeva, 2014). Die Komplementfragmente, die im Zuge der Kaskade entstehen, wie C3a bei der Spaltung von C3, sind wichtige Anaphylatoxine, die zur Anaphylaxie, Chemotaxis und Immunregulation beitragen (Coulthard et al., 2015; Mathern et al., 2015). Eine Dysregulation dieses streng kontrollierten Systems könnte zu einer verstärkten Komplementaktivierung in der Choriocapillaris und im RPE führen. Immunhistochemische Untersuchungen haben gezeigt, dass Komponenten des Komplementsystems, einschließlich C3, C5 und C9, wesentlicher Bestandteil der Drusen von AMD-Patienten sind (Crabb et al., 2002; Crabb, 2014). Auch Komplementfaktor B, CFH und der MAC wurden in Drusen und AMD-Läsionen nachgewiesen (Anderson et al., 2010). Weiter sind bei AMD-Patienten die Plasmaspiegel von Komplementfaktoren (wie C3a, C4a, C5a) und anderen Proteinen des Immunsystems (wie C-reaktives Protein, Interleukine) erhöht (Reynolds et al., 2009; Ambati et al., 2013; Kauppinen et al., 2016; Lechner et al., 2016). Die erhöhten Konzentrationen an Komplementkomponenten sowohl im Plasma als auch in der Nähe von AMD-Läsionen werfen jedoch die Frage auf, ob dies ein systemischer oder lokaler Effekt ist (Clark et al., 2018). Auch im Tiermodell gibt es Hinweise auf eine Beteiligung des angeborenen Immunsystems an der AMD-Pathogenese. So konnten durch die Hemmung von C3a, C5a, Komplementfaktor B, und des MAC Neovaskularisationen in laserinduzierten CNV-Mausmodellen unterdrückt werden (Bora et al., 2005; Nozaki et al., 2006; Lipo et al., 2013). Auch genetische Assoziationsstudien lassen eine Beteiligung des Komplementsystems an der AMD-Pathogenese vermuten, schon im Jahr 2005 stellten mehrere unabhängige Studien fest, dass der *CFH*-Lokus, kodierend für ein inhibitorisches Protein der Komplementkaskade, ein wichtiger Suszeptibilitätsloкус für AMD ist (Edwards et al., 2005; Hageman et al., 2005; Haines et al., 2005; Klein et al., 2005). Nachfolgende Studien haben auch in vielen anderen Genorten mit Beteiligung am Komplementsystem AMD-assoziierte Varianten identifizieren können, darunter z. B. die Gene *CFB*, *C2*, *C3*, *SERPING1*, *HTRA1* und *VTN* (Fritsche et al., 2013, 2016). Gleichzeitig scheint, dass eine Deletion der CFH-verwandten Gene 1 und 3 (*CFHR1* und *CFHR3*) protektiven Einfluss hat (Hughes et al., 2006). Aufgrund dieser Hinweise und nachfolgender Forschungsarbeit sind mehrere Medikamente, die in das Komplementsystem eingreifen, in der Erprobung zur AMD Behandlung, darunter die in den USA inzwischen zur Behandlung der GA-AMD zugelassenen Wirkstoffe Pegcetacoplan und Avacincaptad Pegol (Yehoshua et al., 2014; Heier et al., 2023; Khanani et al., 2023; Nadeem et al., 2023). Viele der klinischen Studien

haben jedoch auch nur begrenzte therapeutische Wirkungen gezeigt, was unter anderem auf den späten Zeitpunkt der therapeutischen Intervention, Probleme bei der individuellen Dosierung und Unterschiede in Tiermodellen im Vergleich zum Menschen zurückzuführen ist (Wu et al., 2019). Darum könnte es sinnvoll sein, das Komplementsystem in den früheren Stadien der AMD zu beeinflussen, bevor es zu GA-AMD oder NV-AMD kommt (Park et al., 2019).

Mit dem Alter und verstärkt bei AMD-Patienten kommt es zu Veränderungen der Choriocapillaris. Zum einen kommt es pro Lebensjahrzehnt zu einer Abnahme der Dicke des Choroids um 16-54 μm , gleichzeitig nimmt auch die Dichte und der Lumendurchmesser der Kapillaren ab (Margolis et al., 2009; Mcleod et al., 2009; Ding et al., 2011; de Carlo et al., 2015). So kommt es zu einer signifikanten Abnahme des choroidalen Blutflusses, vor allem bei AMD-Patienten (Grunwald et al., 1998, 2005; Metelitsina et al., 2008). Bislang ist unklar, ob diese Degeneration primär, unabhängig vom RPE stattfindet oder ob eine verminderte Produktion und Diffusion von proangiogenen Wachstumsfaktoren des RPE der Grund für die Atrophie ist (Mcleod et al., 2009; Bhutto et al., 2012; Manian et al., 2021). Gleichzeitig zu dieser choroidalen Degeneration kommt es bei der NV-AMD zu einer Neubildung von Gefäßen des Choroids und deren Durchbruch durch die BrM (Van Lookeren Campagne et al., 2014). Grund scheint eine erhöhte Konzentration von VEGF zu sein, dieser wird unter anderem vom RPE und retinalen Makrophagen und Fibroblasten unter pathologischen Bedingungen vermehrt synthetisiert (Kvanta et al., 1996; Yi et al., 1997). Für eine Beteiligung von VEGF an der Pathogenese sprechen auch mit AMD-assoziierte Varianten im *VEGFA*-Lokus (Fritsche et al., 2016) und das Ansprechen der Erkrankung auf Therapie mit VEGF-Inhibitoren (Ba et al., 2015).

Oxidativer Stress scheint ein weiterer wichtiger Faktor der AMD-Pathogenese zu sein (Beatty et al., 2000; Hollyfield et al., 2008; Bellezza, 2018; Ruan et al., 2021). Grund hierfür ist ein Überschuss an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (z. B: Hydroxyl-Radikale und Superoxide), wenn deren Bildung die Kapazitäten des antioxidativen Systems überfordert (Cheeseman et al., 1993; Yu et al., 2005). Die ROS reagieren mit Proteinen, Lipiden, Kohlenhydraten und Nukleinsäuren und führen so zu teilweise irreversiblen Schäden an Zellen und der EZM (Cheeseman et al., 1993; Finkel et al., 2000; Kaarniranta et al., 2019). Im RPE kommt es dabei zu einer besonders reichlichen Bildung von ROS, begünstigt durch den hohen O_2 -Partialdruck von 70-90 mmHG in der Umgebung des RPE (Winkler et al., 1999). Weiter sind die POS besonders reich an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, an deren Doppelbindungen es zu ROS-produzierenden Lipidperoxidationsreaktionen kommt (Anderson et al., 1974; Stone et al.,

1979). Auch die Phagozytose dieser POS durch das RPE führt zu weiterem oxidativem Stress (Tate et al., 1995; Beatty et al., 2000; Strauss, 2005). Schließlich ist die gesamte Retina erheblichen Mengen ionisierender Strahlung durch das einfallende Licht ausgesetzt, die daraus resultierende Bildung von ROS wird weiter noch durch Pigmente (z. B. Melanin, Rhodopsin, Lipofuszin) in der Retina verstärkt (Beatty et al., 2000; Sparrow et al., 2000; Chalam et al., 2011; Handa, 2012). In Einklang mit einer Beteiligung von oxidativem Stress an der Pathogenese konnte gezeigt werden, dass die Nahrungsergänzung mit Antioxidantien die Progression der AMD verlangsamen kann (Kassoff et al., 2001; Evans et al., 2017b). Rauchen hingegen, was die Konzentration von Antioxidantien verringert und zur Bildung von ROS führt, stellt einen wesentlichen Risikofaktor dar (Church et al., 1985; Chow et al., 1986). Zudem konnten Plestina-Borjan und Kollegen nachweisen, dass bei AMD-Patienten die Aktivität von Glutathion-Peroxidase, einem ROS-neutralisierendem Enzym, und die totale antioxidative Kapazität im Serum erniedrigt sind (Plestina-Borjan et al., 2015). Schließlich führen durch ROS oxidierte EZM Bestandteile zur Aktivierung von Komplementfaktoren und inflammatorischen Reaktionen (Gordiyenko et al., 2004; Curcio et al., 2011; Yadav et al., 2013; Kauppinen et al., 2016). Aufgrund dieser zahlreichen Hinweise auf eine Beteiligung von oxidativem Stress an der molekularen Pathogenese der AMD untersuchen viele Studien die dadurch induzierte Dysfunktion und Degeneration des RPE (Li et al., 2010; Hanus et al., 2015; Piippo et al., 2018; Brown et al., 2019).

Als weiterer Faktor in der Entstehung von AMD wird Lipofuszin diskutiert. Lipofuszin besteht aus autofluoreszierenden Lipid- und Protein-Aggregaten, die mit zunehmendem Alter in vielen Geweben des Körpers, insbesondere im postmitotischen RPE, akkumulieren (Beatty et al., 2000; Sparrow et al., 2005). Die Zusammensetzung und Herkunft dieser Aggregate variiert je nach Gewebe, im RPE ist dabei die Hauptquelle die Phagozytose von POS durch das RPE, bei der auch nicht abbaubare Stoffwechselprodukte der Photorezeptoren aufgenommen werden (Kennedy et al., 1995; Wihlmark et al., 1996; Sparrow et al., 2005). So nimmt Lipofuszin während des ersten Lebensjahrzehnts nur 1 %, im Alter von 80 Jahren hingegen 19 % des zytoplasmatischen Volumens der RPE-Zellen ein (Feeney-Burns et al., 1984). Dies führt zur Schädigung des RPE, so ist z. B. die phagozytische Aktivität beeinträchtigt und die lysosomale Integrität und Enzymaktivität gestört (Sundelin et al., 1998; Kaemmerer et al., 2007; Krohne et al., 2010). Zudem begünstigt Lipofuszin durch die Bildung von ROS oxidativen Stress (Beatty et al., 2000; Kaemmerer et al., 2007; Brandstetter et al., 2015), sodass in vielen Arbeiten die Phagozytose von POS durch RPE-Zellen (POS-Fütterung) als physiologischer Stressor in *in*

vitro RPE-Modelle integriert wird (Krohne et al., 2010; Keeling et al., 2020; Nachtigal et al., 2020).

Schließlich rücken auch zunehmend die Mitochondrien des RPE in den Fokus der AMD Forschung (Tong et al., 2022). Feher und Kollegen konnten eine verminderte Mitochondrienzahl im RPE von AMD-Patienten nachweisen (Feher et al., 2006). Folgende Arbeiten stellten zudem eine erhöhte Rate an Schäden im mitochondrialen Genom bei AMD-Patienten fest, wobei das Ausmaß dieser Schäden mit dem Schweregrad der AMD Erkrankung korreliert (Karunadharma et al., 2010; Terluk et al., 2015). Als mögliche Auswirkung dieser Schäden zeigt sich eine reduzierte mitochondriale Funktion in primären RPE-Zellen von AMD-Patienten (Ferrington et al., 2017; Golestaneh et al., 2017). Neben der zentralen Rolle im Energiestoffwechsel der Zellen sind Mitochondrien an der Produktion von ROS, der zellulären Calciumhomöostase und der Induktion von Entzündung und Apoptose beteiligt (Kaarniranta et al., 2020). Die gestörte mitochondriale Aktivität und Integrität im RPE könnten so auf vielfältige Weise an der AMD-Pathogenese beteiligt sein.

1.2 Verschiedene Proteine und Lipide und deren Bedeutung für die AMD-Pathogenese

1.2.1 Fibronectin

Fibronectin (FN) ist ein Protein, welches sowohl in löslicher Form in diversen Körperflüssigkeiten (z. B. Serum) vorkommt, aber vor allem in nicht löslicher Form Bestandteil der EZM ist (Pankov et al., 2002). Durch zahlreiche Interaktionspartner (Zelloberflächenrezeptoren, andere Proteine und Proteoglykane der EZM. u. v. m.) ist FN an einer Vielfalt von Prozessen beteiligt, darunter z. B. der Abbau von Kollagenen und die Haftung des RPE an dessen Basalmembran über die Interaktion mit Integrinen (Pankov et al., 2002; Nita et al., 2014). Des Weiteren ist FN bei der Bildung von neuer EZM eine der zuerst abgelagerten Komponenten und bildet das Grundgerüst für den Aufbau der EZM durch andere Proteine. Das Protein ist Bestandteil aller fünf Schichten der BrM (Miller et al., 2017). Die Datenlage zum Vorkommen von FN in Drusen ist teilweise widersprüchlich, es konnte jedoch gezeigt werden, dass *in vitro* Inhibition von FN die Ablagerung von Kollagen IV, einem wesentlichen Bestandteil von Drusen, verhindert, da dies vermutlich eine existierende FN Matrix voraussetzt (Miller et al., 2017). FN ist auch Bestandteil von BLamD, während der Anteil an der Basallamina des RPE, welche normal reich an FN ist, mit zunehmendem Alter abnimmt (Zarbin, 2004; Nita et al., 2014). Es wurde nachgewiesen, dass primäre RPE-Zellen von AMD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen mehr als doppelt an FN sezernieren und iPSC-RPE von AMD-Patienten, gestresst durch eine abnormale EZM, im Vergleich zu Kontroll-iPSC-RPE

vermehrt FN transkribieren (An et al., 2007; Gong et al., 2020). In einem CNV-Mausmodell wurde zudem gezeigt, dass FN eine wichtige Rolle bei der Entstehung der CNVs zukommt (Zhao et al., 2024).

1.2.2 Elastin

Elastische Fasern bilden das Grundgerüst von elastischen Geweben, Elastin ist dabei mit 90 % der Hauptbestandteil dieser stark vernetzten Fasern. Für die Bildung dieser Fasern orientiert sich sezerniertes Elastin an einem vorbestehenden Gerüst aus Mikrofibrillen (Mithieux et al., 2006). Elastin ist ein unlösliches und sehr langlebiges Biopolymer, welches aufgrund seiner starken Vernetzung nur in vernachlässigbarem Maße dem physiologischen EZM-Umsatz unterworfen ist. Wenn die elastischen Fasern keiner Schädigung unterworfen sind, kommt es in erwachsenen Geweben zu keinem nennenswerten Auf- und Abbau (Mithieux et al., 2006). Die elastische, mittlere Schicht der BrM besteht zum größten Teil aus Elastin, in dieser Schicht kommt es im Laufe der AMD-Pathogenese zu einer zunehmenden Fragmentierung und Kalzifizierung der Fasern (Del Priore et al., 2002; Booij et al., 2010). Die verminderte Dicke und der Strukturverlust der Elastinschicht, insbesondere im Bereich der Makula, könnten im Sinne eines Barriereverlusts, eine wichtige Voraussetzung für die Entstehung von CNVs sein (Chong et al., 2005; Navneet et al., 2022). Elastin ist weiter typischer Bestandteil von Drusen von AMD-Patienten und ist außerdem Substrat des bei AMD-Patienten dysregulierten MMP-Systems (Crabb et al., 2002; Cabral-Pacheco et al., 2020).

1.2.3 Vitronectin

Vitronectin (VTN) ist ein 75 kDa großes Protein, welches sowohl in löslicher Form im Blutplasma zu finden ist als auch über Bindungsdomänen für Kollagen und Glykosaminoglykane in der EZM verankert ist (Schvartz et al., 1999). Über Interaktion mit zellulären Integrinen und der umliegenden EZM beeinflusst es Adhäsion, Metabolismus und Genexpression von Zellen, spielt eine Rolle in der Angiogenese und hat einen inhibitorischen Effekt auf die zelllytische Wirkung des MAC des Komplementsystems (Schvartz et al., 1999; Leavesley et al., 2013). VTN als Bestandteil der inneren Kollagenfaserschicht der BrM könnte somit in der AMD-Pathogenese, in der all diese Prozessen beteiligt zu sein scheinen, eine wichtige Rolle zukommen. Weiter konnte mehrfach gezeigt werden, dass VTN sowohl *in vivo* in Drusen, als auch *in vitro* Bestandteil von drusenähnlichen Ablagerungen ist und im Zytoplasma von AMD-assoziierten RPE-Zellen akkumuliert (Hageman et al., 1999; Crabb et al., 2002; Zarbin, 2004; Galloway et al., 2017). Für eine kausale Beteiligung von VTN an der AMD-Pathogenese spricht zudem, dass eine signifikant mit AMD assoziierte Variante im *VTN*-

Einleitung

Gen zu veränderter Sekretion und Physiologie des Proteinprodukts führt (Fritsche et al., 2016; Biasella et al., 2020).

1.2.4 Laminin und Kollagen IV

Alle Basalmembranen im menschlichen Körper, auch die des RPE und der Choroidea, enthalten Laminin und Kollagen IV. Laminine sind Glykoproteine, bestehend aus drei, über Disulfidbrücken verbundenen, Polypeptidketten, deren Hauptaufgabe die feste Haftung von Zellen auf der Basallamina ist. Dafür interagieren sie zum einen mit in der Zellmembran verankerten Proteinen, zum anderen mit Kollagen IV in tieferen Schichten der Basalmembran (Aumailley, 2013). Laminin und Kollagen IV wurden als Bestandteil von Drusen *in vivo* identifiziert, gleichzeitig nimmt jedoch der Anteil an der Basallamina des RPE mit dem Alter ab (Newsome et al., 1987; Pauleikhoff et al., 2000; Crabb et al., 2002; Zarbin, 2004). Die Quelle der Proteine scheint dabei das RPE zu sein, RPE-Zellen in Kultur sezernieren Laminin bzw. lagern eine EZM bestehend aus Laminin und Kollagen IV, ähnlich der Basalmembran *in vivo*, ab (An et al., 2007; Galloway et al., 2017; Chinchilla et al., 2021). *In vitro* konnte in RPE-Zellen vor allem für Kollagen IV eine verstärkte Ablagerungen bei AMD-ähnlichen Makuladystrophien bzw. durch AMD-relevante Stressoren gezeigt werden (Galloway et al., 2017; Fernandez-Godino, Pierce, 2018; Chinchilla et al., 2021).

1.2.5 TIMP 3

TIMP3 ist ein, je nach Glykosylierung, 24-27 kDa großes Protein. Besonders ist, dass es im Gegensatz zu den anderen drei Mitglieder der TIMP Proteinfamilie an Proteoglykane der EZM bindet und so in diese integriert wird (Fan et al., 2020). Die Funktionen von TIMP3 sind vielfältig, neben der offensichtlichen inhibitorischen Wirkung auf MMPs ist es zudem auch an deren Aktivierung aus dem Proenzym beteiligt und spielt so eine Rolle bei der Homöostase von Auf- und Abbau der EZM (Fan et al., 2020). TIMP3 interagiert neben den MMPs auch mit anderen Proteinen, so inhibiert es z. B. auch die VEGF vermittelte Angiogenese durch kompetitive Bindung an den VEGF-Rezeptor (Fan et al., 2020). Dysregulation der Balance von MMPs und TIMPs führt zu Entzündungsreaktion, Gewebeerstörung, abnormaler Angiogenese und Aktivierung von Mikroglia, wichtigen Aspekten der AMD-Pathogenese (Cabral-Pacheco et al., 2020). Mutationen im *TIMP3* Gen führen zur SFD (Weber et al., 1994), einer Makuladegeneration mit einer sehr ähnlichen Manifestation wie der AMD, zudem konnte auch eine Variante im *TIMP3* Gen identifiziert werden, die mit der AMD assoziiert ist (Li et al., 2005; Fritsche et al., 2016). Der TIMP3 Gehalt der BrM ist bei AMD-Patienten erhöht und

Einleitung

TIMP3 konnte als Bestandteil von Drusen nachgewiesen werden (Kamei et al., 1999; Crabb et al., 2002).

1.2.6 Kollagen V

Kollagen V ist ein regulatorisches, fibrillenformendes Kollagen, welches mit anderen Proteinen der Kollagenfamilie (I, III, VI) interagiert und damit das Grundgerüst der EZM bildet, sein Anteil an der EZM ist dabei jedoch meist eher gering (Mak et al., 2016). Kollagen V ist Bestandteil der Basalmembranen des RPE und der Choroidea und der inneren und äußeren Kollagenfaserschicht (Nita et al., 2014; Miller et al., 2017). Eindeutige Hinweise auf eine Beteiligung an der AMD-Pathogenese gibt es keine, außer dass Crabb und Kollegen Kollagen V in Drusen nachweisen konnten (Crabb et al., 2002).

1.2.7 ApoE und Lipide

Im Laufe der AMD-Pathogenese kommt es zu einer Einlagerung von Lipiden in die BrM (Murali et al., 2020), auch die erkrankungstypischen Drusen bestehen zu ca. 40 % aus Lipiden, vor allem verestertem Cholesterin (Wang et al., 2010). Die Herkunft dieser Lipide ist noch ungeklärt, vermutet wird jedoch die Phagozytose von POS (reich an verestertem Cholesterin) durch das RPE und anschließende basale Sekretion überflüssiger Lipide (Curcio, 2018b). Für eine Beteiligung des RPE an dieser Lipidakkumulation spricht zudem, dass RPE-Zellen in Kultur drusenähnliche, lipidreiche Ablagerungen bilden (Pilgrim et al., 2017).

Unklar ist weiter die Rolle von ApoE, welches vermutlich für den Transport von Lipiden durch die BrM zur Choriocapillaris wichtig ist (Ishida et al., 2004). ApoE akkumuliert in RPE-Zellen in der Nähe von Drusen und ist ein prominenter Bestandteil von Drusen *in vivo* und auch *in vitro* im RPE Zellmodell (Anderson et al., 2001; Pilgrim et al., 2017). Zudem stellt für das *APOE*-Gen das *APOE2* Allel einen Risikofaktor für die Entwicklung von AMD dar. Das *APOE2* Allel führt dabei zu einer beeinträchtigten Bindung an entsprechende Rezeptoren, sodass es in Folge zu einer verminderten Beseitigung der Lipoproteine aus dem Plasma kommt (Hu et al., 2021). Die dadurch erhöhte Konzentration der Lipoproteine wird als Grund für die vermehrte Ablagerung von ApoE und Lipiden in der BrM und Drusen diskutiert. Passend dazu führen genetische Veränderungen im *APOE*-Gen in Mausmodellen zur Ausbildung von AMD ähnlichen Phänotypen mit BLamD und BLinD (Dithmar et al., 2000; Kliffen et al., 2000). Zudem interagiert ApoE z. B. mit dem Komplementsystem und hat so inflammationsmodulierende Wirkung, sodass ein komplexer Einfluss in der AMD-Pathogenese wahrscheinlich ist (Hu et al., 2021).

1.2.8 α -Crystallin

α -Crystalline, im Nachfolgenden nur Crystallin genannt, gehören zur Familie der kleinen Hitzeschockproteine und üben im Gesunden durch Schutz vor Proteinaggregation und Apoptose eine protektive Funktion aus (Nagaraj et al., 2016). So führt Stress, z. B. in Form von H_2O_2 - oder Hitzeexposition, im Sinne eines Schutzmechanismus zu einer erhöhten Expression von Crystallin in RPE-Zellen (Alge et al., 2002). Aufgrund einer erhöhten Expression von Crystallin im RPE bei Patienten mit NV- sowie GA-AMD *in vivo* sowie in RPE-Zellen von AMD-Patienten *in vitro* und dem Vorhandensein in Drusen wird eine Implikation in der AMD-Pathogenese diskutiert (Nakata et al., 2005; De et al., 2007). Erklärungsansatz könnte hier eine Beteiligung an Angiogenese und Erhöhung der Sekretion von VEGF sein, sodass die erhöhte Expression von Crystallin die Entstehung von CNV begünstigen könnte (Dimberg et al., 2008; Kannan et al., 2016). Im Einklang damit führt ein Crystallin Knockout im CNV-Mausmodell zu einer Reduktion der VEGF Sekretion und der Größe von CNV Läsionen (Kase et al., 2010). Andererseits übt Crystallin auch protektive Effekte auf das RPE aus, so dass auch denkbar ist, dass die erhöhte Expression nicht Ursache, sondern Folge der pathologischen Veränderungen in der AMD ist. Zudem wird Crystallin vom RPE im Gesunden nur apikal sezerniert, sodass bei einer basalen Akkumulation von einer vorherigen Schädigung des RPE, z. B. durch oxidativen Stress, ausgegangen werden muss (Kay et al., 2013).

1.2.9 β -Amyloid

β -Amyloid entsteht durch die proteolytische Abspaltung von Peptiden einer Länge von 37-49 Aminosäuren aus dem Amyloid-Vorläuferprotein und führt im Neocortex von Alzheimerpatienten zur Induktion von oxidativem Stress (Butterfield et al., 2013). β -Amyloid ist auch in der alternden Retina vermehrt vorhanden und konnte in Drusen von AMD-Patienten nachgewiesen werden, sodass von einer Beteiligung an der AMD-Pathogenese ausgegangen wird (Johnson et al., 2002; Ohno-Matsui, 2011). So führt die β -Amyloid Exposition von RPE-Zellen zu einer erhöhten Apoptoserate (Gao et al., 2018; Ye et al., 2018), chronischer Inflammation (Liu et al., 2013) und erhöhter Expression von VEGF, welches an der Entstehung von CNV beteiligt ist (Masuda et al., 2019).

1.3 **hiPSC-RPE als Zellmodell in der AMD-Forschung**

In diesem Projekt wurde mit einem Modellsystem von RPE-Zellen, differenziert aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen, (hiPSC-RPE) gearbeitet. Dieses Modellsystem wurde am Institut für Humangenetik Regensburg etabliert, dazu wurden in einem innovativen Verfahren hiPSC-RPE Zelllinien mit einem entweder besonders hohen oder ausgeprägt

niedrigen genetischen Risiko, an AMD zu erkranken, generiert. Somit ist es möglich, den Einfluss des genetischen Hintergrunds der Zellen auf verschiedenste Mechanismen und Stoffwechselwege in geeigneten experimentellen Szenarien zu untersuchen. Zur Etablierung dieser Zelllinien wurden 161 Individuen durch die Augenklinik des Universitätsklinikums Regensburg rekrutiert, nach ihrem AMD-Status (AMD-Patient/Probanden ohne jegliche Anzeichen auf AMD) eingeteilt und bezüglich 13 AMD-assoziiierter Varianten in 8 Loci (*CFH*, *ARMS2/HTRA1*, *CFB*, *C3*, *APOE*, *PLA2G1A*, *LIPC* und *TIMP3*) genotypisiert (Grassmann et al., 2012). Die starke Korrelation dieser Varianten mit dem AMD-Risiko (Fritsche et al., 2008, 2013, 2016) ermöglicht die Erhebung genetischer Risikoscores gemäß dem Modell von Grassmann et al., 2012. Es wurden 4 Individuen mit einem Risikoscore von 5 (hoch) und NV-AMD und 4 Individuen mit einem Risikoscore von 1 (niedrig) ohne jeglichen AMD-Phänotyp ausgewählt. Von diesen Probanden wurden Fibroblasten bzw. mononukleäre Zellen des peripheren Bluts gewonnen, diese zu iPSCs reprogrammiert und anschließend anhand des Protokolls von Brandl und Kollegen zu RPE-Zellen differenziert (Brandl et al., 2014). Somit haben diese hiPSC-RPE Zelllinien ein definiertes genetisches AMD-Risiko und stellen ein Modellsystem dar, um dessen Einfluss auf verschiedene AMD-bezogene Stoffwechselwege zu untersuchen.

1.4 Ziel der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein möglicher Einfluss des genetischen Hintergrunds von hiPSC-RPE Zelllinien auf verschiedene Zellprozesse untersucht werden, die in der AMD-Pathogenese *in vivo* möglicherweise eine Rolle spielen. Um einen der wichtigsten Risikofaktoren der AMD, das Alter, im Modellsystem zu replizieren, fand die finale Reifung der Zellen auf Transwellinserts dabei für über 90, im Vergleich zu den am Institut bisher üblichen 42, Tage statt. Darüber hinaus wurden bei einem Teil der hiPSC-RPE-Zellen POS zum Kultivierungsmedium hinzugegeben (POS-Fütterung), um die Wirkung eines physiologischen Stressors in das Modellsystem zu integrieren.

Analysiert wurde zum einen die EZM-Homöostase in den hiPSC-RPE. Dazu wurde immunhistochemisch die Ablagerung von verschiedenen Strukturproteinen der EZM (FN, Ela, Lam, Kollagen IV, Kollagen V) untersucht, um einen generellen Eindruck der durch die hiPSC-RPE gebildeten EZM zu gewinnen. Außerdem wurde die Ablagerung von Komponenten der AMD-spezifischeren Drusen analysiert (TIMP3, VTN, C9, ApoE, β -Amyloid, Crystallin und Lipide). Des Weiteren wurde die Sekretion und Aktivität von MMPs, essenziellen Proteasen im Rahmen der EZM-Remodellierung, durch die hiPSC-RPE betrachtet.

Einleitung

Zudem wurde die Genexpression auf mRNA-Ebene verschiedener AMD-assoziiierter Gene im hiPSC-RPE bestimmt. Dabei wurden als Marker für das bei AMD-Patienten überaktive Komplementsystem die Expression des *C3*- und *CFH*-Gens gewählt, als Marker für die oxidative Stressantwort dienten *HMOX1* und *NQO1*, dies sind Zielgene des NRF2 Signalwegs, einem Schlüsselement in der oxidativen Stressantwort aller Art von Zellen. Schließlich rücken immer mehr die Mitochondrien des RPE in den Fokus der AMD-Forschung, hierfür wurde die Expression von *COX4* untersucht, einem generellen Marker für mitochondriale Aktivität und Integrität.

2 Material

2.1 Reagenzien und Chemikalien

Tabelle 1: Dargestellt sind in der Arbeit verwendete Reagenzien und Chemikalien, sowie deren Herkunft.

Reagenz/Chemikalie	Herkunft
2x TaqMan Gene Expression Master Mix	Eurogentec, Seraing, Belgien
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)-Stain-Lösung	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Aceton, C ₃ H ₆ O	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ammoniak-Lösung (25%), NH ₃	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumperoxidsulfat (APS), (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Bromphenolblau Natriumsalz, C ₁₉ H ₉ Br ₄ O ₅ Na	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Calciumchlorid, CaCl ₂	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Clarity Max Western ECL Substrat	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland
Clarity Western ECL Substrat	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland
Coomassie-Brilliant Blue R, C ₄₅ H ₄₄ N ₃ NaO ₇ S ₂	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dako Eindeckmedium	Agilent, Santa Clara, CA, USA
dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	Genaxxon Bioscience, Ulm, Deutschland
Essigsäure (100%), C ₂ H ₄ O ₂	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Ethanol (≥99,8% p.a.), C ₂ H ₆ O	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Gelatine aus boviner Haut, Type B	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Glycin, C ₂ H ₅ NO ₂	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Glycerin (99,5%), C ₃ H ₈ O ₃	Chemikalienlager der Universität Regensburg
Isopropanol, C ₃ H ₈ O	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Methanol, CH ₃ OH	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (Sodium dodecyl sulfate – SDS) (≥99%), C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Nilrot, C ₂₀ H ₁₈ N ₂ O ₂	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Paraformylaldehyd (PFA), (CH ₂ O) _n	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Roti®-Quant 5x Konzentrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese® Gel (40%) Acrylamid/Bisacrylamid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

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

2.2 Lösungen und Puffer

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

Puffer/Lösung	Bestandteile	relative Menge
Antikörper-Lösung Western Blot	BSA 1x TBS-T	5 % w/v
Blocklösung Western Blot	Milchpulver 1x TBS-T	5 % w/v
ICC Antikörperlösung BSA	BSA Triton® X-100 (20%) DPBS	3 % w/v 0,5 % v/v
ICC Antikörperlösung Ziegenserum	Ziegenserum Triton® X-100 (20%) DPBS	2,5 % v/v 0,5 % v/v
ICC Blocklösung BSA	BSA Triton® X-100 (20%) DPBS	3 % w/v 1,5 % w/v
ICC Blocklösung Ziegenserum	Ziegenserum Triton® X-100 (20%) DPBS	10 % v/v 1,5 % v/v
Nicht reduzierender Lämmli-Puffer 5 x	Bromphenolblau Tris-HCl pH 6,8 β-Mercaptoethanol SDS Glycerin H ₂ O dest.	0,01 % w/v 60 mM 0 % v/v 2 % w/v 10 % v/v
PFA-Lösung	PFA DPBS	2 % w/v
Reduzierender Lämmli- Puffer 5x	Bromphenolblau Tris-HCl pH 6,8 β-Mercaptoethanol SDS Glycerin H ₂ O dest.	0,01 % w/v 60 mM 5 % v/v 2 % w/v 10 % v/v
SDS-Laufpuffer (pH 8,6)	Tris-HCl Glycin SDS	0,25 mM 0,2 M 1 % w/v

Material

	H ₂ O dest.	
TBS (pH 7,5)	Tris NaCl H ₂ O dest.	50 mM 150 mM
TBS-T	Tween® 20 TBS	0,1 % v/v
Towbin	Glycin Tris Methanol H ₂ O dest.	190 mM 0,25 mM 20% v/v
Triton® X-100 Lösung	Triton® X-100 H ₂ O dest.	1,5 % v/v
Zellysepuffer	Triton® X-100 (20%) Ammoniak-Lösung (25%) DPBS	2,5 % v/v 0,15% v/v
Zymographie- Entfärbelösung	Essigsäure Methanol H ₂ O dest.	10 % v/v 50 % v/v
Zymographie-Färbelösung	Coomassie-Brilliant Blue R Essigsäure Methanol H ₂ O dest.	0,25 % w/v 10 % v/v 50 % v/v
Zymographie- Inkubationspuffer	Triton® X-100 (25%) Tris-HCl, pH 7,5 CaCl ₂ H ₂ O dest.	4 % v/v 50 mM 5 mM
Zymographie-Waschpuffer	Triton® X-100 (25%) Tris-HCl, pH 7,5 CaCl ₂ H ₂ O dest.	10 % v/v 50 mM 5 mM

2.3 Verbrauchsmaterialien

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

Material	Herkunft
12-Well Zellkulturplatten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
38,5 ml Ultrazentrifugentubes	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
48-Well-Zellkulturplatten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Amicon® Ultra-4 10K Filtertubes	Merck Millipore Ltd., Tullagreen, Carrigtwohill, Irland
Deckgläschen (24x50 mm)	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland
Einweg Einbettformen, 7mm x 7 mm x 5 mm	PLANO GmbH, Wetzlar, Deutschland
Einwegpasteurpipetten (3 ml)	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland
Falcontube (15 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

Material

Falcontube (50 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Filterspitzen (10 µl)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Filterspitzen (100 µl)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Filterspitzen (1000 µl)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Handschuhe Nitril blau	Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
Küvetten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
MicroAmp™ Optical 384-well Reaction Plate	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
MicroAmp™ Optical 8-Tube Strip with Attached Optical Caps, (0,2 ml)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
MicroAmp™ Optical Adhesive Film	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
NEG 50TM Gefrierschnittmedium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Pipettenspitzen (10 µl)	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland
Pipettenspitzen (100 µl)	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland
Pipettenspitzen (1000 µl)	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland
PVDF Membran	(Millipore) Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
QIAshredder	QIAGEN N.V., Hilden, Deutschland
Reaktionsgefäß (0,5 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäß (1 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäß (1,5 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäß (2 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Roti®-Liquid Barrier Marker	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Rührfisch	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Serologische Pipette (10 ml) Greiner CELLSTAR®	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Skalpell No. 11	FEATHER® Safety Razor Co, Japan
Superfrost® Plus-Objektträger	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, 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
Zellschaber	Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgien

2.4 Laborgeräte

Tabelle 4: Dargestellt sind in der Arbeit verwendete Laborgeräte, sowie deren Herkunft.

Instrument	Herkunft
Abzug	Wesemann GmbH, Syk, Deutschland
AF100 Eismaschine	Scotsman Industries Inc, Vernon Hills, IL, USA
Autoklav V-150	Systec GmbH, Wettenberg, Deutschland
CO ₂ Inkubator	BINDER GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Epithelial Volt/Ohm Meter (EVOMX)	World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA
Eppendorf Research® plus 8 channel pipette	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Färbekammer, ABS Deckel	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland
Feinwaage Explorer	OHAUS Europe GmbH, Nänikon, Schweiz
FV3000 Fluoview, konfokales Laserscanmikroskop	Olympus Life Sciences, Hamburg, Deutschland
Integra Biosciences™ Vacusafe™ Comfort Aspiration system	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Kältemikrotom Leica CM1850	Leica, Solmis, Deutschland
Millipore Milli-Q-Synthesis Reinstwasseranlage	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
Mini-PROTEAN® Short Plates	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Mini-PROTEAN® Spacer Plates (1.5 mm)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
NanoDrop® ND1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Odyssey® FC Imager	LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA
Photometer Ultrospec 2100 pro	Amersham Biosciences, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Pipettierhilfe Accu-jet®	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
RM5 Rollschüttler	(Assistent®) Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim/Rhön, Deutschland
SW 40 Ti Swinging-Bucket Rotor	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
TECAN SPARK® Multimode Microplate Reader	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz
Thermocycler peqSTAR	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland

ThermoMixer® compact	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Titramax 101	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Transferpette™ Einzelkanalpipetten (10 µl/ 100 µl/ 1000 µl)	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, Deutschland
Ultraschallwasserbad SONOREX SUPER 10P	BANDELIN electronic GmbH & Co KG, Berlin, Deutschland
UVP Gel-Studio PLUS	Analytik Jena GmbH, Jena, Deutschland
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Waage	SCALTEC Instruments GmbH, Heiligenstadt, Deutschland
Wasserbad W12	Labortechnik Medingen, Arnsdorf, Deutschland
Wasserdestilliergerät	GFL GmbH, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge Biofuge fresco (Tischzentrifuge)	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Biofuge pico (Tischzentrifuge)	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 1.0R (Kühlzentrifuge)	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland

2.5 Software

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

Software	Herkunft
CorelDRAW Graphicssuite 2019	Corel Corporation, Ottawa, Ontario, Kanada
FV31S-SW	Olympus Life Sciences, Hamburg, Deutschland
Image Studio	LI-COR Biosciences GmbH, Lincoln, NE, USA
ImageJ	National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA
Microsoft Office	Microsoft Cooperation, Redmond, WA, USA
QuantStudio™ Design & Analysis Software	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
RStudio v3.6.0	R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich
VisionWorks®	Analytik Jena US, Upland, CA, USA

2.6 hiPSC-RPE Zelllinien

Tabelle 6: Dargestellt sind in der Arbeit verwendete aus hiPSC differenzierte RPE Zelllinien.

PBMCs/Fibroblasten stammen von einem einzelnen Individuum pro Zelllinie.

Für eine übersichtliche Darstellung wurden die Zelllinien mit den folgenden IDs versehen, wobei HR für „hohes Risiko (high risk)“ und LR für „geringes Risiko (low risk)“ steht. Unter dem Begriff HR-Zelllinien werden HR 1-4, unter LR-Zelllinien werden LR 1-4 zusammengefasst.

ID	Zelllinie	Ursprung	AMD-Status	Risikoscore
HR 1	AMD 2	Fibroblasten	NV-AMD	5 (hohes Risiko)
HR 2	AMD 5	PBMCs	NV-AMD	5 (hohes Risiko)
HR 3	AMD 6	PBMCs	NV-AMD	5 (hohes Risiko)
HR 4	AMD 8	Fibroblasten	NV-AMD	5 (hohes Risiko)
LR 1	AMD 7K	PBMCs	Kontrolle	1 (niedriges Risiko)
LR 2	AMD 10K	Fibroblasten	Kontrolle	1 (niedriges Risiko)
LR 3	AMD 11K	PBMCs	Kontrolle	1 (niedriges Risiko)
LR 4	AMD 12K	PBMCs	Kontrolle	1 (niedriges Risiko)

PBMCs = peripheral blood mononuclear cells; NV-AMD = neovascular AMD

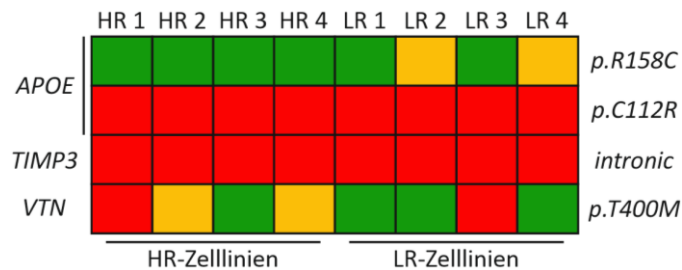


Abbildung 2: Genotypisierung der verwendeten hiPSC-RPE Zelllinien. Dargestellt sind die Genotypen der Zelllinien für die in der ICC untersuchten Proteine (grün=homozygot nicht-Risikoallel, gelb=heterozygot Risikoallel, rot=homozygot Risikoallel)

2.7 Zellkulturmedien und Supplements

Tabelle 7: Dargestellt sind in der Arbeit verwendete Zellkulturmedien und Supplements, sowie deren Herkunft.

Komponente	Herkunft
Corning® Matrigel® Growth Factor Reduced (GFR) Basement Membrane Matrix	Corning Inc., Corning, NY, USA
Gentamycin (50 mg/ml)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Gibco™ Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS), ohne Calcium, ohne Magnesium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Gibco™ KnockOut™ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Gibco™ KnockOut™ Serum Replacement (KOSR)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Gibco™ L-Glutamine 200 mM (100x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Gibco™ MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Gibco™ Opti-MEM® I Reduced Serum Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Gibco™ Penicillin-Streptomycin (10000 U/ml) (P/S)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Nicotinamid, C ₆ H ₆ N ₂ O	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

2.8 Antikörper

2.8.1 Primäre Antikörper

Tabelle 8: Dargestellt sind in der Arbeit verwendete primäre Antikörper, sowie deren Typ, Spezies, Verdünnung, Verwendung und Herkunft.

Antikörper	Typ	Spezies	Verdünnung	Verwendung	Herkunft
anti-ApoE	pAK	Kaninchen	1:500	ICC	Cell Signaling Technology, Cambridge, Vereinigtes Königreich
anti-ATP1A1	pAK	Kaninchen	1:100	ICC	Protein Tech Group Inc., Rosemont, IL, USA
anti-ATP1B1	pAK	Kaninchen	1:100	ICC	Protein Tech Group Inc., Rosemont, IL, USA
anti-Bestrophin	pAK	Kaninchen	1:250	ICC	immunoGlobe GmbH, Himmelstadt, Deutschland
anti-C9	mAK	Maus	1:100	ICC	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
anti-Col-IV	pAK	Kaninchen	1:100	ICC	Rockland Immunochemicals Inc., Limerick, PA, USA
anti-Col-V	pAK	Kaninchen	1:100	ICC	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
anti-CRYAA/B	pAK	Kaninchen	1:100	ICC	Enzo Life Sciences AG, Lausen, Schweiz
anti-Elastin	pAK	Kaninchen	1:100	ICC	Calbiochem, San Diego, CA, USA
anti-Fibronectin	mAK	Maus	1:100	ICC	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
anti-Laminin	pAK	Kaninchen	1:100	ICC	Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, Deutschland
anti-MMP2	mAK	Maus	1:200	WB	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA
anti-MMP9	mAK	Maus	1:125	WB	Calbiochem, San Diego, CA, USA

anti-Rho1D4	mAK	Maus	1:1.000	ICC	Prof. Dr. Robert Molday, Department of Ophthalmology and Visual Sciences, University of British Columbia, Canada
anti-TIMP3	mAK	Maus	1:100	ICC	EMD Millipore Corporation, Temecula, CA, USA
anti-VTN	mAK	Maus	1:250	ICC	R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA
anti-ZO-1	pAK	Kaninchen	1:200	ICC	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
anti- β -Amyloid	pAK	Kaninchen	1:100	ICC	Chemicon, Temecula, CA, USA
anti- β -Catenin	mAK	Maus	1:1.000	ICC	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland

ICC = Immunozytochemie; mAK = monoklonaler Antikörper; pAK = polyklonaler Antikörper; WB = Western Blot

2.8.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 9: Dargestellt sind in der Arbeit verwendete sekundäre Antikörper, sowie deren Verdünnung, Verwendungszweck und Herkunft.

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Verwendung	Herkunft
Anti-Kaninchen IgG, Alexa Fluor® 488	Ziege	1:800	ICC	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Anti-Kaninchen IgG, Alexa Fluor® 594	Ziege	1:800	ICC	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Anti-Kaninchen IgG, Peroxidase-Konjugat	Ziege	1:10.000	WB	(Calbiochem) Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
Anti-Maus IgG, Alexa Fluor® 488	Ziege	1:800	ICC	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Anti-Maus IgG, Alexa Fluor® 594	Ziege	1:800	ICC	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Anti-Maus IgG, Peroxidase-Konjugat	Ziege	1:10.000	WB	(Calbiochem) Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland

ICC = Immunozytochemie; WB = Western Blot

2.9 Molekülmassenstandards

Tabelle 10: Dargestellt sind in der Arbeit verwendete Molekülmassenstandards, sowie deren Verwendungszweck und Herkunft.

Standard	Verwendung	Herkunft
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	SDS-Page	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

2.10 Oligonukleotide

Tabelle 11: Dargestellt sind für die qRT-PCR Versuche verwendeten Primer, sowie deren 5'-3'-Sequenz.

Primernamen	5'-3'-Sequenz
<i>C3</i>	Forward: CAGCCAAAGATAAGAACCGC Reverse: CTCTGTTTCATTGAGCCAACG
<i>CFH</i>	Forward: ATCTATAGACGTTGCCTGCC Reverse: ACATGTTTTGACACGGATGC
<i>COX-4</i>	Forward: GCTTTGCTGAGATGAACAGG Reverse: CACCCACTCTTTGTCAAAGC
<i>HMOX-1</i>	Forward: ATAGAAGAGGCCAAGACTGC Reverse: ATCTTGCACTTTGTTGCTGG
<i>HPRT</i>	Forward: CTTTGCTTTCCTTGGTCAGG Reverse: TCAAATCCAACAAAGTCTGGC
<i>NQO-1</i>	Forward: AAGGTTGCCTGAAAAATGGG Reverse: TTGTGGATACTGTCTGAGAGC

2.11 Kit-Systeme

Tabelle 12: Dargestellt sind in der Arbeit verwendete Kit-Systeme und deren Herkunft.

Kit-System	Herkunft
Human MMP-2 ELISA Kit	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
PureLink® RNA Mini Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

3 Methoden

3.1 Kultivierung der hiPSC-RPE Zelllinien

Am Institut für Humangenetik Regensburg wurden nach dem Protokoll von Brandl und Kollegen hiPSC gewonnen, die anschließend zu RPE-Zellen ausdifferenziert wurden (Brandl et al., 2014). Die hiPSC wiederum stammen von humanen Fibroblasten der Haut bzw. mononukleären Zellen des peripheren Bluts von Individuen mit extrem hohem (Risikoscore 5) oder extrem geringem (Risikoscore 1) genetischem Risiko für AMD (nach Grassmann et al., 2012). Die hiPSC-RPE wurden in flüssigem Stickstoff kryokonserviert, nach dem Auftauen wurden sie auf mit Corning® Matrigel® Growth Factor Reduced (25 µg/ml) beschichtete 6-Well-Zellkulturplatten übertragen. Nach 14 Tagen wurden die Zellen im Verhältnis 1:6 passagiert und weitere 14 Tage kultiviert. Dann wurden die Zellen im Verhältnis 1:12 auf Corning® Matrigel® Growth Factor Reduced beschichtete ThinCerts™ Einsätze in 12-Well Platten transferiert. Um die Zellen abzulösen, wurden sie 15 min bei 37 °C mit TrypLE™ Express inkubiert, von den Platten gewaschen und 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert und dann im gewünschten Volumen des Zellkulturmediums resuspendiert.

Tabelle 13: Zusammensetzung des hiPSC-RPE Zellkulturmediums

KnockOut™ DMEM diente als Basis und wurde durch die folgenden Komponenten ergänzt:

Komponente	Konzentration
Gibco™ KnockOut™ Serum Replacement (KOSR)	5 % (v/v)
Gibco™ L-Glutamine 200 mM (100x)	2 mM
Gibco™ MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100x)	0,1 mM
Nikotinamid	10 mM
Gentamycin (50 mg/ml)	5 µg/ml
β-Mercaptoethanol	0,1 mM

Die hiPSC-RPE-Zellen wurden unter sterilen Bedingungen in einer Reinraumwerkbank gehandhabt. Die Kultivierung der hiPSC-RPE-Zellen erfolgte, sofern nicht anders angegeben, in KnockOut™ DMEM Medium, ergänzt durch die in **Tabelle 13** aufgeführten Komponenten. Alle Medien wurden bei 4 °C aufbewahrt und vor Verwendung auf Raumtemperatur aufgewärmt. Die Viabilität der Zellen und die Morphologie und Konfluenz des Zellrasens wurden regelmäßig während der Kultivierung und vor der Durchführung jeglicher Experimente lichtmikroskopisch kontrolliert, die Kultivierung fand bei 37 °C und 5 % CO₂ statt. Das Medium wurde 3-mal pro Woche (nach höchstens 72h) gewechselt, dabei wurde 0,75 ml

Zellkulturmedium in das apikale Kompartiment der Einsätze und 1 ml Zellkulturmedium unter die Einsätze gegeben, wenn nicht anders angegeben.

3.2 Messung des transepithelialen Widerstands

Der transepitheliale Widerstand (TEER) ist ein Maß für die Bildung von Tight Junctions im Monolayer der hiPSC-RPE und dient somit als Qualitätskontrolle für die Barrierefunktion des RPE (Brandl et al., 2014; Chen et al., 2015). Vor Messung wurde das Kultivierungsmedium der Zellen frisch gewechselt, um einheitliche Bedingungen für die Messungen zu erhalten. Gemessen wurde mit dem Epithelial Volt/Ohm Meter (EVOMX) nach Betriebsanweisung des Herstellers. Vor Messung wurden die Elektroden für 15 min in 70% Ethanol sterilisiert und anschließend in einer 150 mM NaCl Lösung equilibriert. Die längere Elektrode wurde zur Messung in das basale Kompartiment gehalten, die kurze in das apikale Kompartiment im Transwellinsert, dabei berührten die Elektroden weder die Wände des Wells/Transwellinserts noch die Zellen. Die Elektroden wurden nun ruhig gehalten, bis sich ein Wert für den Widerstand stabilisiert hatte und so für alle Wells einer Platte verfahren. Als Leerwiderstand wurde der Widerstand eines mit Matrigel-GFR beschichteten Transwellinserts ohne Zellen und mit dem gleichen Medium verwendet. Für die Auswertung wurde der Leerwiderstand von den gemessenen Werten abgezogen, um die zellspezifischen Widerstände zu erhalten und diese mit der Fläche der Transwellinserts multipliziert, um Werte der Dimension $\text{Ohm} \cdot \text{cm}^2$ zu erhalten (Brandl et al., 2014; Srinivasan et al., 2015).

3.3 Induktion von metabolischem und oxidativem Stress durch POS-Fütterung

3.3.1 POS-Isolierung

POS wurden aus Schweineretinae isoliert, gearbeitet wurde dabei stets auf Eis. Es wurden 72 frische, in kaltem Wasser gekühlte Schweineaugen mit einer Schere auf Höhe der Ora serrata halbiert und die Retinae vorsichtig aus dem Augenbecher gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die aufgetauten Retinae wurden in 30 ml Taurin-Puffer (siehe **Tabelle 14**) homogenisiert, zuerst indem sie durch poröses Material (Gazebinde) gefiltert wurden und anschließend durch Auf- und Abpipettieren mit 5 ml Pipetten.

Tabelle 14: Taurin-Puffer Zusammensetzung für POS-Isolierung.

Zur Herstellung des 100 mM Taurin wurden 1,25 g Taurin in 100 ml H_2O dest. gelöst.

Komponente	Volumen
5 M NaCl	5,2 ml
1 M MgCl_2	400 μl
1 M Tris-Puffer (pH = 7,5)	4 ml
100 mM Taurin	10 ml
H_2O dest.	auffüllen auf 200 ml

Tabelle 15: Zusammensetzung der Gradienten-Lösungen für die POS-Isolation

Für die 6 Gradienten wurden jeweils 36 ml der Gradienten-Lösungen vorbereitet.

%	Volumen Taurin-Puffer	Volumen 60 % Sucrose Lösung
20	24 ml	12 ml
27	19,8 ml	16,2 ml
33	16,2 ml	19.8 ml
41	11,4 ml	24,6 ml
50	6 ml	30 ml
60	-	36 ml

Als nächstes wurden 6 Dichtegradienten vorbereitet, verwendet wurden dafür die in **Tabelle 15** beschriebenen 20- bis 60-prozentigen Sucrose-Lösungen. Die Gradienten wurden in Ultrazentrifugentubes vorbereitet mit absteigender Sucrose-Konzentration von unten nach oben, indem sukzessive je 5 ml der vorbereiteten Lösungen (beginnend mit 20%) mit der nächsthöheren Konzentration unterschichtet wurden. Schließlich wurden die Gradienten mit je 5 ml der homogenisierten Retinae überschichtet und bei 26.000 rpm in einem SW 40 Ti Swinging-Bucket Rotor für 2 h gekühlt auf 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde die ringförmig angereicherte, pinke POS-Fraktion abgenommen und in ein 50 ml Falcon überführt. Dieses 50 ml Falcon wurde bei 7500 rpm für 20 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet mit den POS wurde für zwei weitere Waschschrte in 10 ml Opti-MEM® resuspendiert, erneut zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die aufgereinigten POS wurden schließlich in Opti-MEM® mit 1% Pen/Strep resuspendiert, in 2 ml Tubes aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.3.2 POS-Konzentrationsbestimmung *via* Bradford-Assays

Die Konzentration der aufgereinigten POS wurde *via* Bradford-Assay bestimmt. Als Proteinstandard diente dabei BSA. Eine 1.000 µg/ml BSA in H₂O-Lösung wurde dabei in Opti-MEM so verdünnt, dass BSA-Konzentrationen von 1.000 µg/ml, 900 µg/ml, 800 µg/ml, [...], 100 µg/ml, 50 µg/ml, 20 µg/ml, 12,5 µg/ml, 10 µg/ml und 0 µg/ml resultierten. 10 µl der jeweils zu vermessenden Probe wurden zu 990 µl 1:5 verdünntem Roti®-Quant gegeben und gevortext. Nach 20 min Inkubation bei RT wurde photometrisch die Absorbanz bei 595 nm gemessen, als Leerprobe diente dabei die 0 µg/ml BSA-Probe, und die POS Konzentration anhand der erhaltenen Eichkurve bestimmt.

3.3.3 POS-Fütterung

Für die Fütterung wurden POS in einer Konzentration von $4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ verwendet, das entspricht umgerechnet 20 POS pro hiPSC-RPE-Zelle, vergleichbar mit den Bedingungen anderer Arbeiten (Brandl et al., 2014; Singh et al., 2015; Dalvi et al., 2019; Nachtigal et al., 2020).

Die Menge an benötigten POS wurde aufgetaut, in einem 2 ml Tube mit Opti-MEM® auf 1 ml aufgefüllt und für 5 min bei einer Intensität von 10% in das Ultraschallbad gegeben. Die POS-Lösung wurde durch einen $40 \mu\text{m}$ Cell Strainer filtriert und dieser mit Opti-MEM® nachgespült, sodass keine POS im Cell Strainer verbleiben, bis das benötigte Endvolumen (0,5 ml pro gefüttertem Well) erreicht war. Die entsprechenden hiPSC-RPE wurden ab einer finalen Reifung auf Transwellinserts von 6 Wochen bis zur experimentellen Analyse (90 Tage) mit POS gefüttert, dafür wurde 2-mal pro Woche das Kultivierungsmedium entfernt und 0,5 ml der vorbereiteten POS-Lösung in das apikale Kompartiment gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 4 h im Inkubator (37°C , 5% CO_2) wurde die POS-Lösung vollständig abgesaugt und durch frisches Standard-Kultivierungsmedium ersetzt (siehe 3.1 Kultivierung der hiPSC-RPE Zelllinien).

3.4 **SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese**

Die Proteine in den zu untersuchenden Proben wurden mittels Elektrophorese in SDS-Polyacrylamid Gelen (mit inkorporierter Gelatine bei der Gelatine-Zymographie) ihrer Masse nach aufgetrennt. Die Gele setzten sich aus dem Sammelgel mit 3% Acrylamidgehalt und dem Trenngel mit unterschiedlicher Acrylamidkonzentration zusammen. Dazu wurden die Acrylamid-Lösungen wie in **Tabelle 16** dargestellt vorbereitet, direkt nach der Zugabe von TEMED und APS wurde die Trenngel-Lösung gut durchmischt, in die vorbereiteten Gel-Apparaturen gegossen und dann mit Isopropanol überschichtet, um die Bildung von Luftblasen zu verhindern. Dabei wurden für die Western Blot Gele 1,5 mm Spacer Platten verwendet, für die Zymographie Gele hingegen 0,75 mm Spacer Platten und in die Gele wurde außerdem Gelatine inkorporiert. Nach 45 min war das Trenngel vollständig auspolymerisiert, die Sammelgel-Lösung wurde vorbereitet und die Gele bis oben aufgefüllt. Sofort wurden die Kämme (10 Taschen pro Gel) hineingesteckt und das Sammelgel für weitere 45 min auspolymerisiert.

Die auspolymerisierten Gele wurden mit den zu untersuchenden Proben beladen (20 μl pro Tasche bei 0,75 mm-Gelen und 40 μl pro Tasche bei 1,5 mm-Gelen) und zur Orientierung wurde eine Tasche mit 3 μl des PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10-170 kDa, Thermo Fisher Scientific) Massenstandards befüllt. Die beladenen Gele wurden in

Methoden

Elektrophoresekammern eingespannt, diese mit 1x SDS-Laufpuffer aufgefüllt und die Proben unter Gleichspannung aufgetrennt. Die Gleichspannung betrug 50 V bis die Proben vom Sammelgel in das Trenngel eingelaufen waren, danach wurde die Spannung bis zum Ende der Elektrophorese auf 150 V erhöht.

Tabelle 16: Dargestellt sind die Bestandteile der SDS-Polyacrylamid Gele mit Trenngel (7,5% bzw. 12,5%) und Sammelgel (3%).

Bestandteil	Sammelgel (3%)	Trenngel Gelatine-Zymographie (7,5%, 0,75 mm)	Trenngel Western Blot (12,5%, 1,5 mm)
1M Tris/HCl (pH 6,8)	5,5 ml	--	--
1M Tris/HCl (pH 8,8)	--	2,5 ml	3,8 ml
H ₂ O dest.	3,4 ml	3,1 ml	3,0 ml
Gelatine (4 mg/ml)	--	2,5 ml	--
Acrylamid Lsg. (40%)	1,1 ml	1,9 ml	3,1 ml
SDS (20%)	100 µl	50 µl	100 µl
APS (10%)	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	20 µl	12,5 µl	10 µl

3.5 Gelatine-Zymographie MMPs

Zunächst wurde das Kultivierungsmedium abgesaugt und die obere und untere Kammer 2-mal mit DPBS gewaschen. Dann wurde in beide Kammern genau 1 ml KOSR-freies Medium (siehe 3.1 Kultivierung der hiPSC-RPE Zelllinien, ohne KOSR) gegeben und die Zellen für weitere 48 Stunden inkubiert, um die Sekretion der MMPs durch die hiPSC-RPE zu erlauben.

Ab hier wurde, soweit möglich, auf Eis gearbeitet. Von dem Überstand wurden jeweils apikal und basal 850 µl entnommen, in Amicon® Ultra-4 10K Filtertubes gegeben und 30 min bei 3.000 g und 4 °C zentrifugiert, bis der eingebaute Deadstop von 50 µl Endvolumen erreicht wurde. Von diesen aufkonzentrierten 50 µl wurden 16 µl mit 4 µl nicht reduzierendem Lämmli-Puffer 5x versetzt, die Gelatine-Zymographie Gele damit beladen und elektrophoretisch aufgetrennt.

Die gelaufenen Gele wurden in eine kleine Box transferiert und zweimal für 30 min unter Bewegung im Zymographie-Waschpuffer gewaschen, um das SDS aus den Gelen herauszuwaschen. Danach wurden die Gele für 10 min bei 37 °C unter Bewegung im Zymographie-Inkubationspuffer inkubiert, dieser nochmal gewechselt und die Gele für weitere 20 h bei 37 °C inkubiert. Der Inkubationspuffer enthält die nötigen Kofaktoren für die Gelatinasen und erlaubt so die proteolytische Degradierung der Gelatine. Daraufhin wurden die

Gele für eine Stunde unter Bewegung in der Zymographie-Färbelösung angefärbt, diese enthält Coomassie-Brilliant Blue R, welches unspezifisch die im Gel enthaltenen Proteine, insbesondere die Gelatine, anfärbt. Nachdem die Färbelösung entfernt wurde, wurden die Gele mit destilliertem Wasser gut abgespült und anschließend mit der Zymographie-Entfärbelösung so lange entfärbt (ca. 45 min, 3-maliger Wechsel der Entfärbelösung), bis die Bereiche, in denen die Gelatine degradiert wurde als helle Banden vor einem dunkelblauen Hintergrund sichtbar wurden. Die Gele wurden nun in destilliertes Wasser gegeben, um den Entfärbeprozess zu stoppen.

Die Gele wurden mit dem UVP Gel-Studio PLUS eingescannt, die weitere Analyse erfolgte mit der VisionWorks® Software. Quantifiziert wurde die mittlere Intensität der Banden, als Hintergrundkorrektur wurde die Fläche zwischen der 100 kDa und 130 kDa auf der gesamten Breite des Gels verwendet. Statistisch wurden die Daten mit RStudio mithilfe eines Mann-Whitney U-Test analysiert, wobei als zu testende Variablen das genetische AMD-Risiko, POS-Fütterung und die Richtung der Sekretion betrachtet wurden.

3.6 Western-Blot Analyse MMPs

Die Proben wurden, wie in 3.5 beschrieben, gewonnen und 32 µl der jeweiligen Probe mit 8 µl reduzierendem Lämmli-Puffer 5x versetzt. Die Proben wurden dann für 5 min bei 95 °C aufgeköcht und die Gele damit beladen. Nach der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine vom Gel auf eine PVDF Membran transferiert. Hierzu wurde die PVDF Membran zuerst 30 Sekunden in Methanol und 1x Towbin eingelegt. Daraufhin wurden Membran und Gel zwischen zwei mit Towbin getränkten Whatman Papierstücken (3 mm) in einer Kassette des Trans-Blot® Turbo™ Transfer System platziert. Zum Elektrotransfer wurde eine Spannung von 24 mV über einen Zeitraum von 40 min verwendet. Anschließend wurden die PVDF Membranen für 1 h unter Bewegung in Western Blot Blocklösung inkubiert. Daraufhin wurden die Membranen in Falcontubes (50 ml) platziert und die primäre Antikörper-Lösung für Western Blot mit dem jeweiligen primären Antikörper zugegeben. Nach der Inkubation über Nacht bei 4 °C in Bewegung auf dem RM5 Rollschüttler in der primären Antikörperlösung wurde die Membran 3-mal für 5 min mit TBS-T gewaschen, danach erfolgte die Zugabe der sekundären Antikörper-Lösung für Western Blot und eine einstündige Inkubation. Darauf folgten 3 weitere Waschschrte mit TBS-T. Die PVDF Membranen wurden zur Entwicklung mit Clarity™ Western Blotting Substrate bzw. Clarity Max™ Western Blotting Substrate gründlich befeuchtet und die Signaldetektion erfolgte abschließend mithilfe des Odyssey® Fc Imagers. Die Signalintensität wurde mit der Software Image Studio Software vermessen.

3.7 ELISA-Analyse MMP2

Die Proben wurden wie in 3.5 Gelatine-Zymographie MMPs beschrieben gewonnen und mithilfe des Human MMP-2-ELISA Kit von Sigma untersucht. Dabei wurde die Analyse entsprechend den Herstellerangaben zur Nutzung des Kits durchgeführt. Modifiziert wurde das Protokoll dadurch, dass aufgrund der begrenzten Probenmenge 80 µl statt 100 µl der Probe eingesetzt wurden und die Proben aufgrund der geringen erwarteten MMP2-Konzentration nicht verdünnt wurden. Die Absorbanz wurde mithilfe des TECAN SPARK® Multimode Microplate Reader gemessen und in Excel ausgewertet.

3.8 Immunhistochemische Analyse der Zellen und der EZM

3.8.1 Dezellularisierung

Zunächst wurden lichtmikroskopisch die Intaktheit und Morphologie der kultivierten hiPSC-RPE kontrolliert. Für die Charakterisierung der hiPSC-RPE und die qualitative Analyse der EZM durch Generierung von vertikalen Schnitten wurden die Zellen auf den Filtern belassen. Für die quantitative Analyse der sezernierten EZM wurden die Zellen vom Filter gelöst, hierfür wurden zwei verschiedene Methoden verwendet.

Für beide Methoden wurde das Kultivierungsmedium entfernt und die Zellen mit DPBS gewaschen und anschließend von der EZM abgelöst. Für die Dezellularisierung mit Zellysepuffer wurden die Zellen für 5 min bei 37 °C in Zellysepuffer (0,5 ml apikal, 1,5 ml basal) inkubiert, für die Dezellularisierung mit Trypsin wurden die Zellen für 20 min bei 37 °C in 1x Trypsin (0,5 ml apikal, 1,5 ml basal) inkubiert. Auf dem Filter verbliebene Zellen wurden durch mehrfaches, vorsichtiges Resuspendieren des Zellysepuffers bzw. der 1x Trypsin Lösung vollständig von der EZM gelöst. Der Überstand wurde nun abgesaugt, die Filter mit DPBS überschichtet und lichtmikroskopisch die vollständige Entfernung der Zellen kontrolliert.

3.8.2 ICC – Flatmount der Filter

Nachdem die Filter, abhängig vom Verwendungszweck, dezellularisiert wurden (für die quantitative Analyse der EZM, nicht für Charakterisierung der RPE-Zellen und die qualitative Analyse der EZM), wurden die Filter 5-mal mit DPBS gewaschen und anschließend für 10 min in 2% PFA-Lösung fixiert. Nach Abnehmen der PFA-Lösung wurde wiederum drei Mal mit DPBS gewaschen. Danach wurden die Filter mit einer Pinzette von den Transwell-Inserts abgelöst und mit einem Skalpell No. 11 von FEATHER® Safety Razor in 4-6 Teile geschnitten, um mehrere, verschiedene Färbungen an einem Filter zu ermöglichen. Ein einzelnes Filterstück wurde nun jeweils in ein Well einer 48-Well Zellkulturplatte gegeben.

Es folgte das Blocken der Filter mit je 300 µl der ICC-Blocklösung pro Well für 30 min bei Raumtemperatur. Danach erfolgte die Zugabe von 150 µl ICC-Antikörperlösung mit dem jeweiligen primären Antikörper (siehe **Tabelle 8**) und anschließender Inkubation bei 4 °C für 20 h. Am nächsten Tag wurde nach erneutem, dreimaligem Waschen mit DPBS 150 µl die ICC-Antikörperlösung mit dem jeweiligen sekundären Antikörper und DAPI zugegeben, 60 min bei Raumtemperatur inkubiert und erneut dreimalig mit DPBS gewaschen. Die gewaschenen Filterstücke wurden nun eingebettet, dazu wurde ein Tropfen Dako Eindeckmedium auf einen Objektträger gegeben, der Filter daraufgelegt, ein weiterer Tropfen Eindeckmedium auf den Filter gegeben und das Deckgläschen vorsichtig daraufgelegt. Die eingebetteten Filter wurden für mindestens 24 h bei 4 °C gelagert, um das Eindeckmedium erhärten zu lassen. Alle Schritte ab Zugabe des sekundären Antikörpers wurden aufgrund dessen Lichtempfindlichkeit im Dunkeln durchgeführt und die fertig eingebetteten Filter lichtgeschützt gelagert.

Für die quantitativen Färbungen wurden Antikörper gegen FN, Elastin, Laminin, VTN, Kollagen V, TIMP3, ApoE und C9 (Dezellularisierung mit Zellysepuffer) und Antikörper gegen Crystallin, C9, β -Amyloid, TIMP3, VTN und Kollagen IV (Dezellularisierung mit Trypsin) verwendet.

Für die Färbung mit Nilrot, einem Farbstoff der Lipide anfärbt, wurde mit den Filtern bis auf zwei Modifikationen gleich verfahren: Die Inkubation über Nacht erfolgte in primärer Antikörperlösung, jedoch ohne, dass dieser ein primärer Antikörper zugesetzt wurde. Weiter wurde statt der einstündigen Inkubation in sekundärer Antikörperlösung für eine halbe Stunde in 200 µl Nilrot-Färbelösung inkubiert. Für die quantitative Färbung wurden die Filter mit Trypsin dezellularisiert. Für die Nilrot-Färbelösung wurden 10 mg Nilrot in 1 ml Aceton gelöst und die erhaltene Lösung mit PBS 1:1000 verdünnt. Auch hier wurde ab Zugabe der Nilrot-Lösung im Dunkeln gearbeitet.

3.8.3 ICC – Anfertigung von Kryo-Schnitten

Für die Anfertigung von Kryoschnitten wurde die Filter 5-mal mit DPBS gewaschen und anschließend für 10 min in 2% PFA-Lösung fixiert. Nach Abnehmen der PFA-Lösung wurde wiederum drei Mal mit DPBS gewaschen. Danach wurden die Filter mit einer Pinzette von den Transwell-Inserts abgelöst und für 4 h unter Bewegung in 30% Sucrose-Lösung gelegt, um die Filter zu dehydrieren. Die Filter wurden anschließend vorsichtig in NEG 50TM Gefrierschnittmedium gewaschen. Aus dem zentralen Bereich des Filters wurde mit einem Skalpell No. 11 von FEATHER® Safety Razor ein ca. 1 mm² großes Stück ausgeschnitten und in NEG 50TM Gefrierschnittmedium eingebettet. Hierfür wurde eine Einweg Einbettform mit

Methoden

Gefrierschnittmedium befüllt, das Filterstück senkrecht darin platziert und die Einbettform auf Trockeneis gestellt, um das Gefrierschnittmedium erhitzen zu lassen. Nach Lagerung bei -80 °C für mindestens einen Tag wurden die Filter mit dem Kältemikrotom Leica CM1850 geschnitten. Hierzu wurde der Schnittblock so platziert, dass der eingebettete Filter senkrecht zur Schnittklinge steht und mit einer Schichtdicke von 10 µm geschnitten. Jeweils 8 Schnitte wurden auf einen Objektträger transferiert, auf diesem durch vorsichtiges Anwärmen fixiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Zum Färben wurde mit Roti®-Liquid Barrier Marker auf dem Objektträger eine Wasserbarriere um die Schnitte gezogen und die Schnitte mit 100 µl DPBS angefeuchtet. Anschließend wurden die Schnitte für 30 min bei RT in 100 µl ICC-Blocklösung pro Objektträger inkubiert. Nach Abnehmen der Blocklösung wurde mit der primären ICC-Antikörperlösung mit jeweiligem primärem AK über Nacht bei 4 °C inkubiert, anschließend 3-mal mit DPBS gewaschen und für eine Stunde bei RT mit sekundärer ICC-AK-Lösung mit jeweiligem sekundärem Antikörper inkubiert. Schließlich wurden die Schnitte noch drei Mal gewaschen, je ein Tropfen Dako Eindeckmedium auf jeden Schnitt gegeben und ein Deckgläschen daraufgelegt. Auch hier wurden alle Schritte ab Zugabe des sekundären Antikörpers aufgrund dessen Lichtempfindlichkeit im Dunkeln durchgeführt und die fertig eingebetteten Filter lichtgeschützt gelagert.

3.8.4 Mikroskopie und Auswertung der Bilder in ImageJ

Die Auswertung erfolgte durch konfokale Laserscanningmikroskopie mithilfe des Olympus FV 3000 Fluoview und der FV 31S-SW Software von Olympus Life Sciences. Für die quantitative Analyse wurde pro Bild eine Fläche von 1,6 mm² mit dem 10-fach-Objektiv aufgenommen, bei den Bildern zur qualitativen Analyse wurden eine Fläche von 5,6 x 10³ µm² mit dem 40-fach-Objektiv aufgenommen. Die sonstigen Einstellungen (Laserintensität, Detektorsensitivität, etc.) wurden aufgrund unterschiedlicher Intensität und Morphologie der Färbungen jeweils an das gefärbte Protein angepasst, jedoch für die Vergleichbarkeit für eine bestimmte Färbung zwischen allen Zelllinien konstant beibehalten.

Für die quantitative Analyse wurden jeweils 3 Bilder (Zellysepuffer) bzw. 2 Bilder (Trypsin) pro Filter aufgenommen und deren Mittelwerte gebildet, um die Varianz der Färbungen innerhalb eines Filters abzubilden. Die Analyse der Bilder wurde mit ImageJ vorgenommen, für jedes Bild wurden jeweils drei Parameter betrachtet. Zum einen wurde die mittlere Intensität als Maß für die Gesamtmenge an gefärbtem Protein ausgewertet, zum anderen wurden die Partikel analysiert, als Maß für lokale, drusenartige Anhäufung von Proteinen bzw. Lipiden.

Methoden

Betrachtet wurde bei der Partikelanalyse die durchschnittliche Fläche eines Partikels (in Bildpixel²) und die Zahl von Partikeln (pro mm²). Für die Partikelanalyse wurde dafür das Bild zuerst in ein 8-bit schwarz-weiß Bild konvertiert und die Intensitätsschwellenwerte für die Analyse der Partikel festgesetzt. Diese konnten zwischen den einzelnen Färbungen variieren, wurden jedoch für die Auswertung einer bestimmten Färbung konstant gehalten. Als Cut-Off für die Partikelgröße wurde für alle Färbungen eine Größe von 50 Quadratpixeln (entsprechend 4,5 µm²) festgesetzt.

3.8.5 Statistische Auswertung

Um den Effekt des genetischen AMD-Risikos und der POS-Fütterung auf die EZM zu untersuchen wurde ein lineares Regressionsmodell in RStudio v3.6.0 verwendet. Als Kovariablen wurden die Zelllinie sowie das experimentelle Replikat definiert. Im Falle der Berechnung des Einflusses der POS-Fütterung wurde zusätzlich das genetische AMD-Risiko, definiert als HR oder LR, als Kovariable mit einbezogen.

3.9 **RNA-Ernte und Isolation**

Die RNA Isolation erfolgte mit dem PureLink® RNA Mini Kit von Thermo Fisher Scientific. Wenn nicht anders angegeben, wurde entsprechend der Herstellerangaben verfahren.

3.9.1 Zelllysate-Ernte und RNA-Isolation

48 h vor der Ernte der RNA-Proben wurde das normale Kultivierungsmedium abgenommen, die Zellen mit DPBS gewaschen und anschließend mit KOSR-freiem Medium inkubiert, da der Überstand für andere Experimente (Analyse der MMPs) verwendet wurde. Am Tag der Ernte wurde das Medium abgenommen und die Zellen erneut mit DPBS gewaschen und 350 µl RNA-Lysepuffer mit 1 % v/v β-Mercaptoethanol auf jeden Filter gegeben. Ab diesem Zeitpunkt wurde auf Eis gearbeitet. Die Zellen wurden dann mit einem Schaber von den Transwellfiltern abgeschabt und lysiert und das so gewonnene Zelllysate in Eppendorftubes bis zur weiteren Prozessierung bei -80 °C weggefroren.

Zur RNA-Isolation wurde das Zelllysate zunächst in QIAshredder Säulen gegeben und für 2 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, um restliche Zellbestandteile zu zerkleinern. Danach erfolgte die Isolierung und Aufreinigung der enthaltenen RNA mithilfe des Kits, dabei wurde das Kit entsprechend den Herstellerangaben verwendet, mit der Modifikation, dass der Waschschrift mit 700 µl WashingBuffer 1 auf zwei Waschschriffe mit je 350 µl WashingBuffer 1 aufgeteilt wurde. Zwischen diesen beiden Waschschriffen wurde 10 µl DNase in 70 µl RDD-Puffer zugegeben. Abschließend wurde die aufgereinigte RNA mit 30 µl RNase-freiem Wasser

eluiert, die Konzentration der erhaltenen RNA spektrophotometrisch mithilfe des NanoDrop® ND1000 Spektrophotometer bestimmt und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung weggefroren.

3.10 cDNA-Synthese

Mithilfe des RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthese Kit wurde aus den isolierten RNA-Proben cDNA synthetisiert. Eingesetzt wurden hierfür 500 ng der aufgereinigten RNA-Probe und 1 µl Random Hexamere Primer, aufgefüllt auf 12,5 µl mit RNase-freiem H₂O. Nach einem Annealingschritt für 5 min bei 65 °C im Thermocycler wurde zum Reaktionsansatz 7,5 µl des cDNA-Synthese-Reaktionsreagenz (siehe **Tabelle 18**) gegeben. Die Proben wurden dann wieder in den Thermocycler gegeben und das cDNA-Synthese-Programm (siehe **Tabelle 17**) ab Schritt 2 fortgesetzt. Die fertige cDNA wurde bis zur weiteren Benutzung bei -20 °C aufbewahrt.

Tabelle 17: Thermocycler Programm für die cDNA-Synthese.

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer
Annealing (Schritt 1)	65 °C	5 min
cDNA-Synthese und Hitze-inaktivierung (Schritt 2)	25 °C	10 min
	42 °C	60 min
	70 °C	10 min

Tabelle 18: Zusammensetzung des cDNA-Synthese-Reaktionsreagenz.

Volumenangabe pro Probe.

Komponente	Volumen
RNase-freies H ₂ O	0,5 µl
5x Reaction Buffer	4 µl
dNTPs (jeweils 10 mM)	2 µl
RevertAid Rev. Transkriptase	1 µl

3.11 Expressionsanalyse in hiPSC-RPE mithilfe von quantitativer Real-Time PCR (qRT-PCR)

Die Genexpression auf mRNA-Ebene wurde mithilfe von quantitativer real-time PCR analysiert. Dazu wurde zu der zuvor synthetisierten cDNA 40 µl Millipore H₂O gegeben und für jedes zu untersuchende Gen ein separater Reaktionsansatz mit den genspezifischen Primern und Sonden hergestellt (Zusammensetzung siehe **Tabelle 19**). Die Proben wurden in einer 384-Well Messplatte in technischen Triplikaten pipettiert, als Housekeepergen diente dabei *HPRT1*. Das qRT-PCR Programm (Ablauf siehe **Tabelle 20**) wurde mit dem QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System durchgeführt und die erhaltenen Durchschnittswerte mit der Delta-Delta C_T Methode in Excel analysiert.

Methoden

Die statistische Auswertung erfolgte in R mit einem Mann-Whitney U-Test, wobei als Variablen das genetische AMD-Risiko und POS-Fütterung betrachtet wurden.

Tabelle 19: Zusammensetzung des qRT-PCR Reaktionsansatz.

Für die untersuchten Gene wurden genspezifische Primer und Sonden verwendet. Der Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 7,5 µl pro Probe wurde zu je 2,5 µl der verdünnten cDNA in eine 384-Well Messplatte gegeben.

Komponente	Volumen
2x TaqMan Gene Expression Master Mix	5 µl
Primer forward (50 µM)	1 µl
Primer reverse (50 µM)	1 µl
Sonde	0,125 µl
Millipore H ₂ O	0,375 µl

Tabelle 20: Ablauf des zur Amplifikation verwendeten qRT-PCR Programms.

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Schritt 1	90 °C	10 min	1 x
Schritt 2.1	90 °C	15 s	40 x
Schritt 2.2	60 °C	1 min	

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung der hiPSC-RPE Qualität und POS-Phagozytose

Um die Validität von hiPSC-RPE-Zellen als Modell für die AMD-Forschung abzuschätzen, ist es essenziell zu prüfen, ob die Merkmale und Reaktionen der Zellen auf verschiedene Stimuli denen des nativen RPE entsprechen. Daher wurde regelmäßig die Zellmorphologie lichtmikroskopisch analysiert, an Tag 90 der finalen Reifung auf Transwellinserts der TEER als Maß für die Barrierefunktion der Epithelschicht gemessen und immunzytochemisch gegen den RPE-spezifischen Marker Bestrophin 1 (BEST-1), beta-Catenin, Zonula occludens Protein 1 (ZO-1) und ATP1A1 gefärbt, um deren Expressionsmuster abzugleichen. Außerdem wurde gegen Rhodopsin gefärbt, um zu verifizieren, dass bei den POS-gefütterten Zellen eine Phagozytose der POS stattfand und damit die erwünschten Effekte eines Stressors erreicht wurde.

Lichtmikroskopisch bildeten die hiPSC-RPE durchgehend einen konfluenten Zellrasen mit einer polygonalen, Honigwaben-ähnlichen Morphologie, wie es typisch für RPE-Zellen ist. Zudem waren die hiPSC-RPE teilweise pigmentiert, sichtbar an den dunkleren Zellen (repräsentatives Bild **Abb. 3, A**). Des Weiteren wurde nach 90 Tagen der TEER gemessen. Der Widerstand über alle Zelllinien gemittelt betrug $121 (\pm 52) \Omega \cdot \text{cm}^2$. Die HR- und LR-Zelllinien verhielten sich dabei jeweils sehr ähnlich, auffällig war jedoch, dass die POS-gefütterten Zelllinien ($94 (\pm 36) \Omega \cdot \text{cm}^2$) einen niedrigeren Widerstand aufwiesen als die entsprechenden Kontrollen ($148 (\pm 54) \Omega \cdot \text{cm}^2$) (**Abb. 3, B**). Dieser Unterschied ist aufgrund der hohen Varianz der Messungen jedoch nicht statistisch signifikant.

Auch immunzytochemisch präsentierte jede Zelllinie die charakteristische polygonale RPE Struktur und formte einen durchgehenden Zellrasen. Dies zeigte das kontinuierliche Expressionsmuster ZO-1, einem Tight-Junction Protein, außerdem waren die Zellen in allen Zelllinien von ähnlicher Größe. Auch das RPE-spezifische, basolaterale Protein BEST-1 und β -Catenin wurden von allen Zelllinien nach typischem, polygonalem Muster basolateral exprimiert. Nur für BEST-1 zeigten einzelne Zelllinien eine sehr schwache Anfärbung (z. B. HR 1 mit POS) (**Abb. 3, C und D**). Zudem konnte durch die Färbung gegen Rhodopsin gesichert werden, dass die POS-gefütterten Zelllinien die POS phagozytiert hatten, während bei den nicht exponierten Zelllinien keine Färbung beobachtet werden konnte (**Abb. 3, C und D**). Schließlich wurde ATP1A1 von den hiPSC-RPE an der apikalen Zellmembran exprimiert, wie es für das RPE, im Gegensatz zu den meisten anderen Epithelien mit basaler Expression, charakteristisch ist (**Abb. 3, E**).

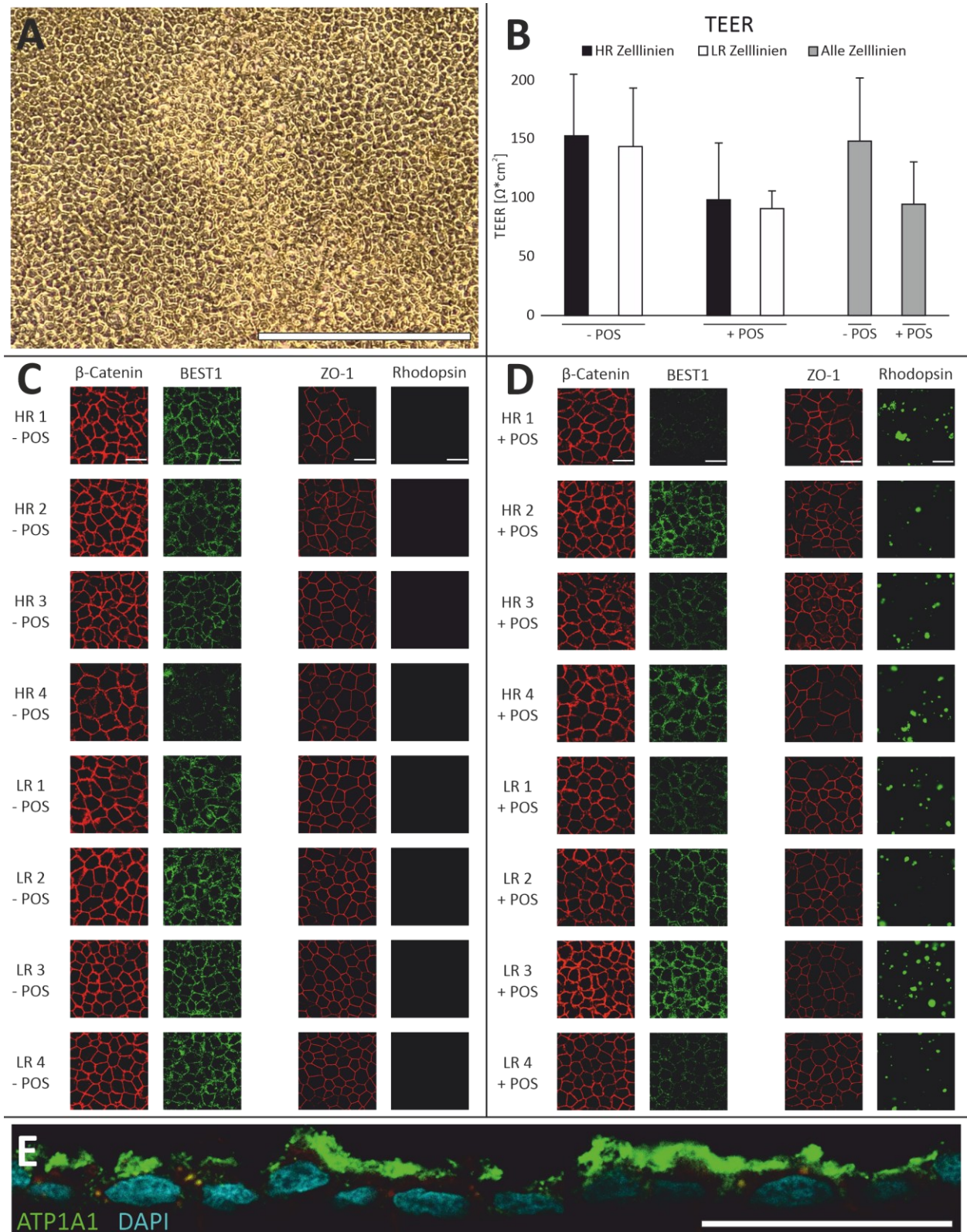


Abbildung 3: Charakterisierung der hiPSC-RPE Zelllinien und Bestätigung der POS-Phagozytose durch die POS-gefütterten Zelllinien. Es wurden je vier Zelllinien mit hohem (HR 1-4) und 4 Zelllinien mit niedrigem (LR 1-4) genetischem Risiko für 90 Tage auf Transwell Filtereinsätzen kultiviert, ab Tag 42 wurde ein Teil der Zellen regelmäßig mit POS gefüttert. Nach 90 Tagen wurden lichtmikroskopisch die Morphologie und Intaktheit des Zellmonolayers überprüft (Scale bar: 300 μm) (A). Außerdem wurde als Maß für die Barrierefunktion der transepitheliale, elektrische Widerstand (TEER) in $\Omega \cdot \text{cm}^2$ gemessen, dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen. Mit Ausnahme von HR 1, HR 2, LR 2 und LR 4 mit POS wurden für alle Konditionen zwei unabhängige Replikate vermessen (B). Weiter wurde immunhistochemisch mit Antikörpern gegen β -Catenin, BEST1, ZO-1, Rhodopsin und ATP1A1 gefärbt, die Bilder wurden mithilfe konfokaler Laserscanningmikroskopie bei 40x Vergrößerung aufgenommen, gezeigt sind repräsentative Bilder der Färbungen gegen β -Catenin, BEST1, ZO-1 und Rhodopsin der Zelllinien ohne (C) und mit (D) POS-Fütterung, sowie für die Färbung gegen ATP1A1 (E) (Scale bar: 20 μm).

4.2 Einfluss des genetischen Hintergrunds und von POS-Fütterung auf die immunhistochemische Analyse der EZM und drusenähnlicher Ablagerungen von hiPSC-RPE

Mithilfe immunhistochemischer Färbungen sollte die Menge, Morphologie und Zusammensetzung der von den hiPSC-RPE-Zellen deponierten EZM analysiert werden. Hierfür wurden zunächst die Zellschicht von der darunterliegenden EZM abgelöst und diese gegen verschiedene typische Strukturproteine der EZM und Bestandteile der Drusen bei AMD-Patienten gefärbt. Für die Ablösung der Zellschicht wurden zwei verschiedene Methoden benutzt. Im ersten methodischen Ansatz (Zelllysepuffer aus Triton® X-100 und Ammoniumhydroxid) wurde die Ablagerung von Strukturproteinen der EZM, darunter FN, Laminin, Elastin und Kollagen V untersucht. Zudem wurde die Färbung gegen ApoE, einem typischen Drusenprotein, mit der ersten Methode durchgeführt, da ApoE in der Etablierungsphase mit der Trypsinierungsmethode nicht detektierbar war. Des Weiteren wurde für C9, VTN und TIMP3 die Färbung mit beiden Methoden (Zelllysepuffer bzw. Ablösen der Zellen mit Trypsin) durchgeführt, um für diese Proteine einen möglichen Einfluss der Dezellularisierungsmethode auf die Färbung vergleichen zu können. Die Rationale für diese verschiedenen Herangehensweisen war, dass bei der Dezellularisierung mit Zelllysepuffer die flächige EZM weitestgehend geschont wird und intakt bleibt, während sie beim Ablösen der Zellen mit Trypsin in Teilen degradiert wird, sodass schlussendlich vor allem die fokalen, drusenartigen Ablagerungen verbleiben. Zudem wurde mit der zweiten Methode (Ablösen der Zellen mit Trypsin) gegen weitere drusentypische Proteine und Lipide gefärbt, darunter β -Amyloid, Crystallin und Färbung von Lipiden mit Nilrot. Zuletzt wurde mit der zweiten Methode die Färbung gegen das Strukturprotein Kollagen IV durchgeführt, welches in der Etablierung nur mit dieser Methode detektierbar war.

Als Kontrollen wurden Filter mit Matrigel-GFR beschichtet und für zwei Wochen auf gleiche Weise wie die Zellen kultiviert und nach dem Protokoll der jeweiligen Methode gefärbt. Außerdem wurden dezellularisierte Filter nach dem gleichen Protokoll wie die Proben gefärbt, jedoch ohne primären Antikörper in der primären ICC-Antikörperlösung, um eine unspezifische Bindung der sekundären Antikörper an Matrixkomponenten oder den Filtern auszuschließen. Die Auswertung erfolgte fluoreszenzmikroskopisch und durch anschließende Analyse mithilfe von ImageJ. Vermessen wurde zum einen die mittlere Farbintensität der Bilder, als Maß für die Menge an abgelagertem Protein. Je mehr Protein abgelagert wird, desto mehr Fluoreszenz wird gemessen und desto höher ist die mittlere Farbintensität. Des Weiteren wurden als Maß für die Bildung von drusenartigen, fokalen Ablagerungen die durchschnittliche

Größe und die Anzahl der Partikel pro mm^2 gemessen. Die Messpunkte für das erste Replikat von den HR-Zelllinien 1/2 mit POS und den LR-Zelllinien 2/4 mit POS fehlen dabei aufgrund von Problemen bei der Kultivierung.

Die Analyse sollte dabei zum einen zeigen, ob der genetische Hintergrund der hiPSC-RPE, speziell das unterschiedliche genetische Erkrankungsrisiko für AMD, einen Einfluss auf die Bildung von EZM und drusenartigen Ablagerungen hat. Weiter wurde untersucht, ob die Induktion von metabolischem und oxidativem Stress durch POS-Fütterung eine Wirkung auf die EZM-Bildung hat und ob das genetische AMD-Risiko einen Unterschied in der Suszeptibilität der Zellen für diesen Stressor bewirkt. Dafür wurde in einem linearen Regressionsmodell der Einfluss des genetischen AMD-Risikos (jeweils in den POS-/nicht POS-gefütterten Zelllinien) und der Einfluss von POS-Fütterung (jeweils in allen Zelllinien kombiniert und eingeschränkt auf die HR- bzw. LR-Zelllinien) untersucht. Es sei für die Interpretation der Forest-Plots darauf hingewiesen, dass aufgrund des verwendeten Modells die Effektstärke nicht wie meist üblich mit 95%-Konfidenzintervall, sondern mit Standardabweichung gezeigt ist.

4.2.1 ICC-Analyse von Strukturproteinen der EZM

Die EZM der BrM ist nicht nur für die strukturelle Integrität des RPE essenziell, sondern ist grundlegend am physiologischen Transport von Nähr- und Botenstoffen sowie der Regulation von Prozessen wie Proliferation, Migration und Zelladhäsion beteiligt. Die Funktion der EZM wird weitgehend durch ihre Zusammensetzung und Struktur bestimmt, so dass es hier durch Ungleichgewichte zu pathologischen Veränderungen kommt. Um ein umfassendes Bild der EZM der hiPSC-RPE zu gewinnen, wurden als Strukturproteine der EZM FN, Laminin, Elastin, Kollagen V, sowie Kollagen IV untersucht. Auf eine Präsentation der Fluoreszenzphotographien aller Färbungen und Zelllinien wird hier aus Platzgründen verzichtet, eine ausführliche Zusammenstellung ist im Appendix zu finden.

Die Färbung gegen FN zeigte eine prominente, netzförmig organisierte Bildung von Faserzügen durch die hiPSC-RPE auf dem gesamten Filter, während die Kontrollen nur schwache, desorganisierte bis gar keine Signale aufwiesen (**Abb. 4**). Die Auswertung der mittleren Intensität weist darauf hin, dass POS-Fütterung zu einer signifikanten Reduzierung der Intensität in allen ($p < 0,01$), in den HR- ($p < 0,05$) und in den LR- ($p < 0,05$) Zelllinien führt. In der Partikelgröße ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Bei der Partikelzahl führte POS-Fütterung zu einer signifikanten Reduzierung in allen ($p < 0,05$) und in den LR-Zelllinien

Ergebnisse

($p < 0,05$), nicht jedoch in den HR-Zelllinien. Das genetische Risiko hatte keinen signifikanten Einfluss auf die drei Parameter mittlere Intensität, Partikelgröße und Partikelzahl.

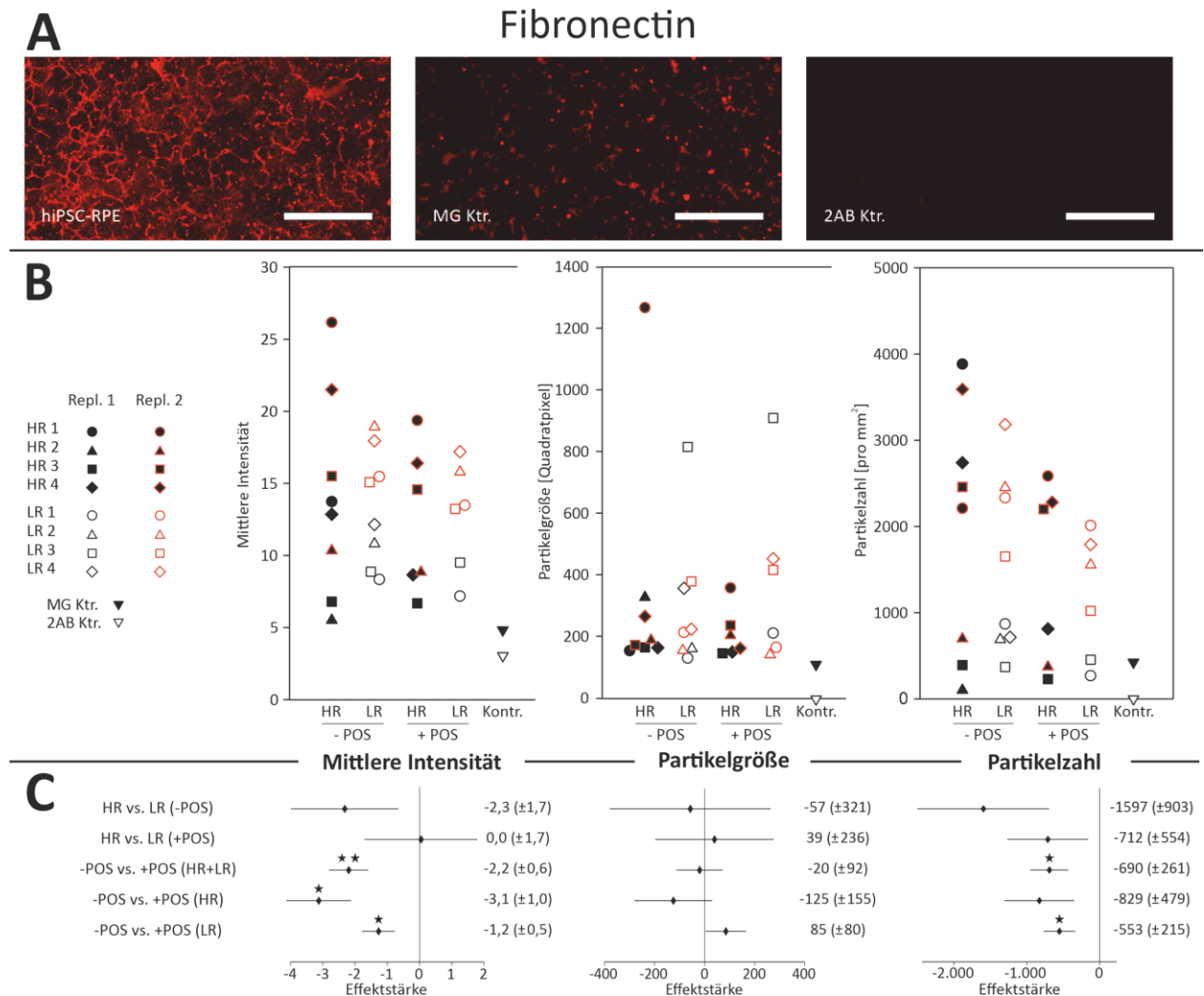


Abbildung 4: Effekt des genetischen Hintergrunds und POS-Fütterung als physiologischen Stressor auf die FN Ablagerung durch hiPSC-RPE. Es wurden 4 Hochrisiko (HR)-Zelllinien und 4 Niedrigrisiko (LR)-Zelllinien für 90 Tage auf Transwell Filtereinsätzen kultiviert, ab Tag 42 wurde ein Teil der Zellen (+ vs. -) regelmäßig mit Photorezeptor-Außensegmenten (POS) gefüttert. Nach 90 Tagen wurde die Filtereinsätze mit Zelllysepuffer dezellularisiert und mit Antikörpern gegen FN gefärbt. Die Bilder (A) wurden mithilfe konfokaler Laserscanningmikroskopie bei 10x Vergrößerung aufgenommen (Scale bars: 100 μm). Als Kontrollen dienten mit Matrigel-GFR beschichtete Einsätze (MG Ktr.) und dezellularisierte Filter, die ausschließlich mit dem Sekundärantikörper gefärbt wurden (2AB Ktr.). Die Fluoreszenzintensität, mittlere Partikelgröße und Partikelzahl pro mm^2 wurden mit ImageJ vermessen (B). Um den Effekt des genetischen Hintergrunds und POS-Fütterung auf die EZM zu untersuchen wurde ein lineares Regressionsmodell verwendet, gezeigt sind Effektstärken mit Standardfehler (C). Positive Effektstärken bedeuten höhere Werte in den LR-Zelllinien im Vergleich zu den HR-Zelllinien, bzw. höhere Werte in den POS-gefütterten im Vergleich zu den nicht POS-gefütterten und umgekehrt. Je nach Fragestellung bestehen die analysierten Daten aus 1-2 unabhängigen Experimenten mit je 2-8 biologischen Replikaten (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Auch die Färbung gegen Laminin zeigte deutliche netzartige, lamininhaltige Faserzüge in der EZM unter den hiPSC-RPE. Auffällig war die recht ausgeprägte, flächige Fluoreszenz, die auch in der Kontrolle des mit Matrigel-GFR beschichteten Filter zu sehen ist, vereinbar damit, dass Matrigel-GFR nach Herstellerangaben zu etwa 70 % aus Laminin besteht. Der klare Unterschied in der Morphologie deutet jedoch daraufhin, dass die hiPSC-RPE einen eigenen

Ergebnisse

Lamininumsatz haben (**Abb. 5**). In der statistischen Auswertung der Fluoreszenzintensität, Partikelgröße und Partikelzahl für Laminin ergaben sich keine signifikanten Unterschiede durch das genetische Risiko oder POS-Fütterung.

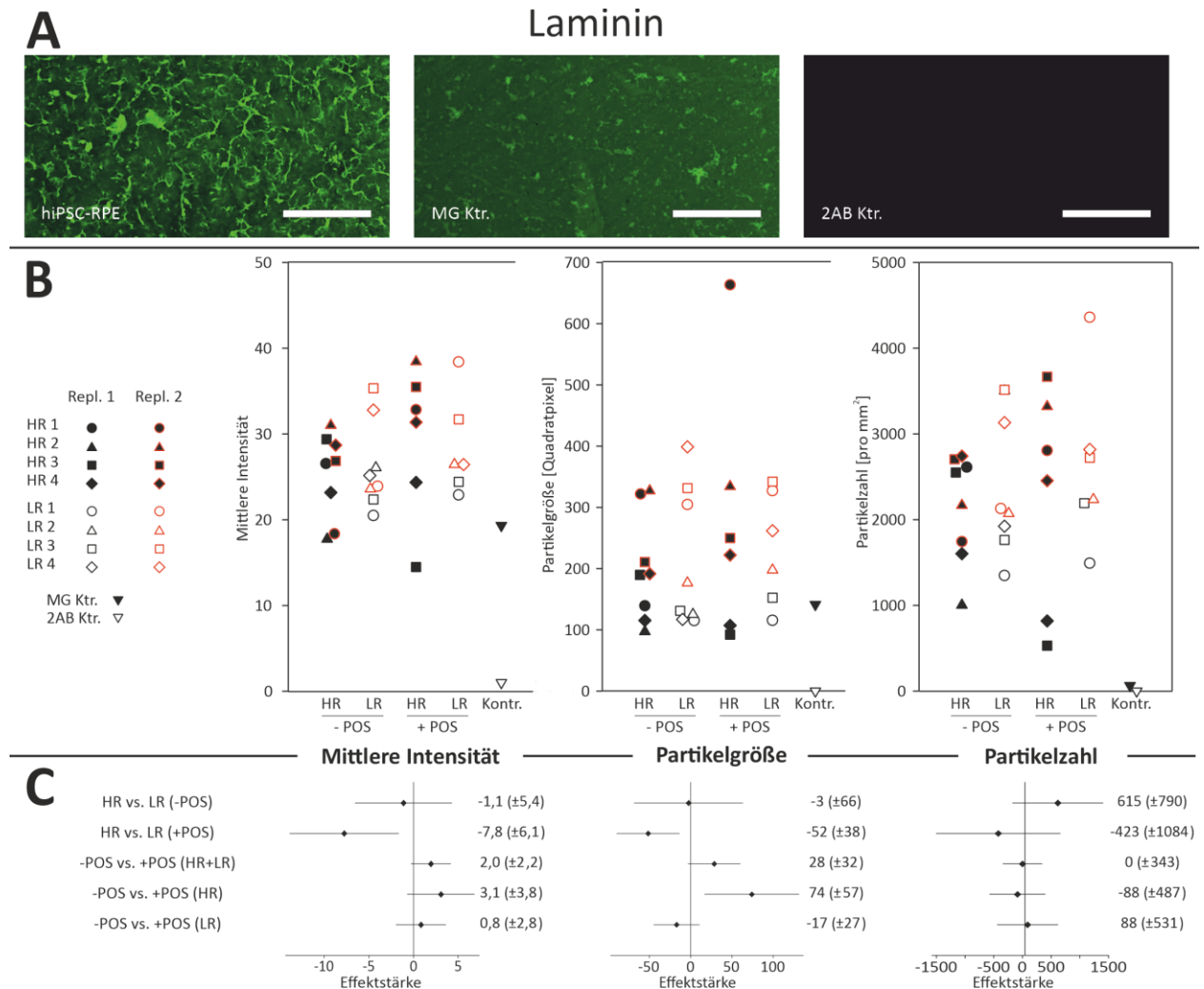


Abbildung 5: Effekt des genetischen Hintergrunds und POS-Fütterung als physiologischen Stressor auf die Laminin Ablagerung durch hiPSC-RPE. Es wurden 4 Hochrisiko (HR)-Zelllinien und 4 Niedrigisiko (LR)-Zelllinien für 90 Tage auf Transwell Filtereinsätzen kultiviert, ab Tag 42 wurde ein Teil der Zellen (+ vs. -) regelmäßig mit Photorezeptor-Außensegmenten (POS) gefüttert. Nach 90 Tagen wurde die Filtereinsätze mit Zellysepuffer dezellularisiert und mit Antikörpern gegen Laminin gefärbt. Die Bilder (**A**) wurden mithilfe konfokaler Laserscanningmikroskopie bei 10x Vergrößerung aufgenommen (Scale bars: 100 μ m). Als Kontrollen dienten mit Matrigel-GFR beschichtete Einsätze (MG Ktr.) und dezellularisierte Filter, die ausschließlich mit dem Sekundärantikörper gefärbt wurden (2AB Ktr.). Die Fluoreszenzintensität, mittlere Partikelgröße und Partikelzahl pro mm^2 wurden mit ImageJ vermessen (**B**). Um den Effekt des genetischen Hintergrunds und POS-Fütterung auf die EZM zu untersuchen wurde ein lineares Regressionsmodell verwendet, gezeigt sind Effektstärken mit Standardfehler (**C**). Positive Effektstärken bedeuten höhere Werte in den LR-Zelllinien im Vergleich zu den HR-Zelllinien, bzw. höhere Werte in den POS-gefütterten im Vergleich zu den nicht POS-gefütterten und umgekehrt. Je nach Fragestellung bestehen die analysierten Daten aus 1-2 unabhängigen Experimenten mit je 2-8 biologischen Replikaten (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Die Färbung gegen Elastin zeigte eine sehr flächige Ablagerung durch die hiPSC-RPE auf dem gesamten Filter, vereinzelt war auch die Bildung von netzartigen Faserzügen zu erkennen, während die Kontrollen nur schwache bis gar keine Signale aufwiesen (**Abb. 6**). Die Färbung gegen Kollagen V präsentierte wiederum eine netzartige Anordnung von Kollagen V-haltigen

Ergebnisse

Faserbündeln in der von den hiPSC-RPE gebildeten EZM (**Abb. 7**). Dabei ergaben sich in der statistischen Auswertung der Fluoreszenzintensität, Partikelgröße und Partikelzahl für Elastin und Kollagen V keine signifikanten Unterschiede durch das genetische Risiko oder POS-Fütterung.

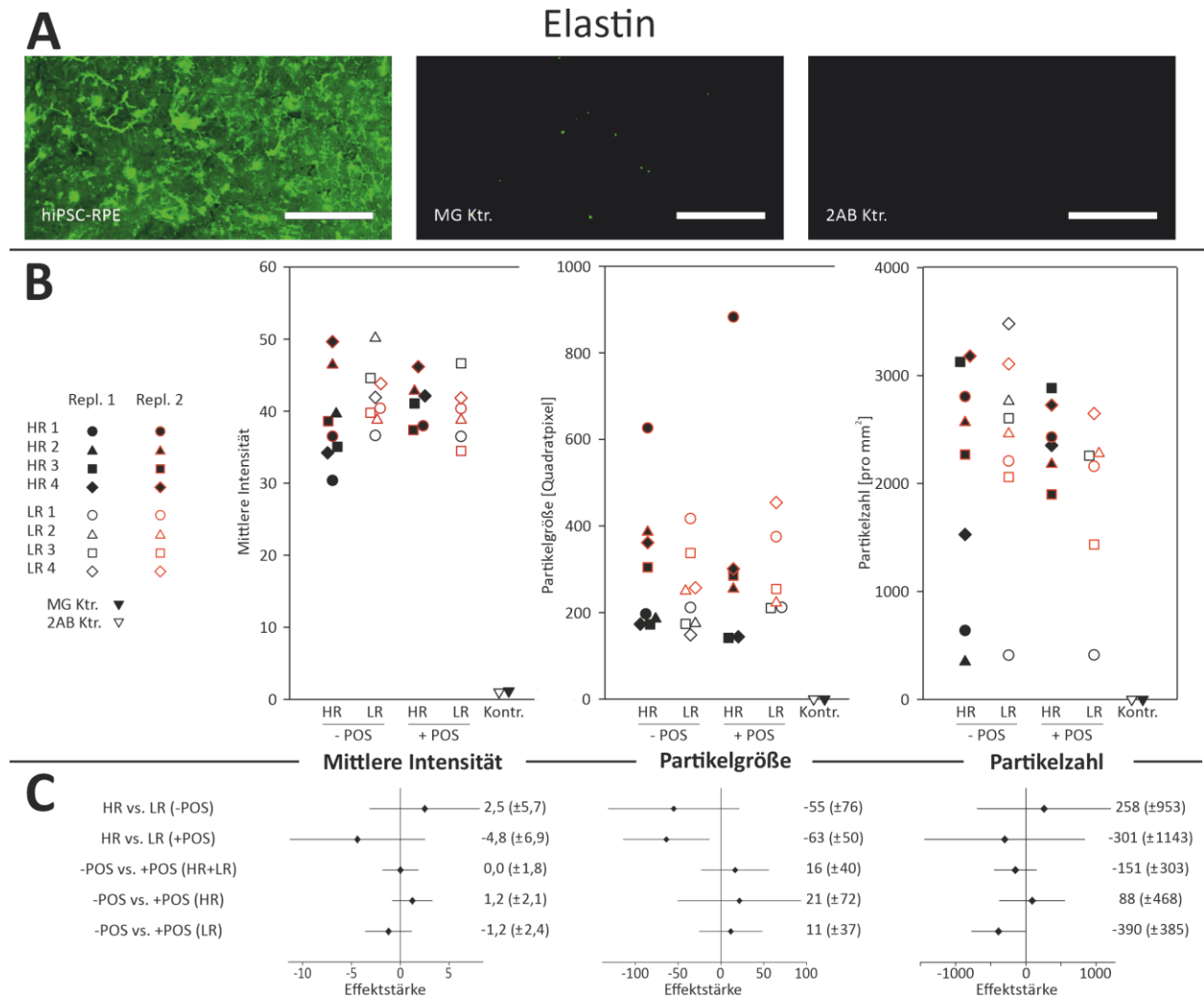


Abbildung 6: Effekt des genetischen Hintergrunds und POS-Fütterung als physiologischen Stressor auf die Elastin Ablagerung durch hiPSC-RPE. Es wurden 4 Hochrisiko (HR)-Zelllinien und 4 Niedrigisiko (LR)-Zelllinien für 90 Tage auf Transwell Filtereinsätzen kultiviert, ab Tag 42 wurde ein Teil der Zellen (+ vs. -) regelmäßig mit Photorezeptor-Außensegmenten (POS) gefüttert. Nach 90 Tagen wurde die Filtereinsätze mit Zellysepuffer dezellularisiert und mit Antikörpern gegen Elastin gefärbt. Die Bilder (A) wurden mithilfe konfokaler Laserscanningmikroskopie bei 10x Vergrößerung aufgenommen (Scale bars: 100 µm). Als Kontrollen dienten mit Matrigel-GFR beschichtete Einsätze (MG Ktr.) und dezellularisierte Filter, die ausschließlich mit dem Sekundärantikörper gefärbt wurden (2AB Ktr.). Die Fluoreszenzintensität, mittlere Partikelgröße und Partikelzahl pro mm² wurden mit ImageJ vermessen (B). Um den Effekt des genetischen Hintergrunds und POS-Fütterung auf die EZM zu untersuchen wurde ein lineares Regressionsmodell verwendet, gezeigt sind Effektstärken mit Standardfehler (C). Positive Effektstärken bedeuten höhere Werte in den LR-Zelllinien im Vergleich zu den HR-Zelllinien, bzw. höhere Werte in den POS-gefütterten im Vergleich zu den nicht POS-gefütterten und umgekehrt. Je nach Fragestellung bestehen die analysierten Daten aus 1-2 unabhängigen Experimenten mit je 2-8 biologischen Replikaten (*p<0,05; **p<0,01).

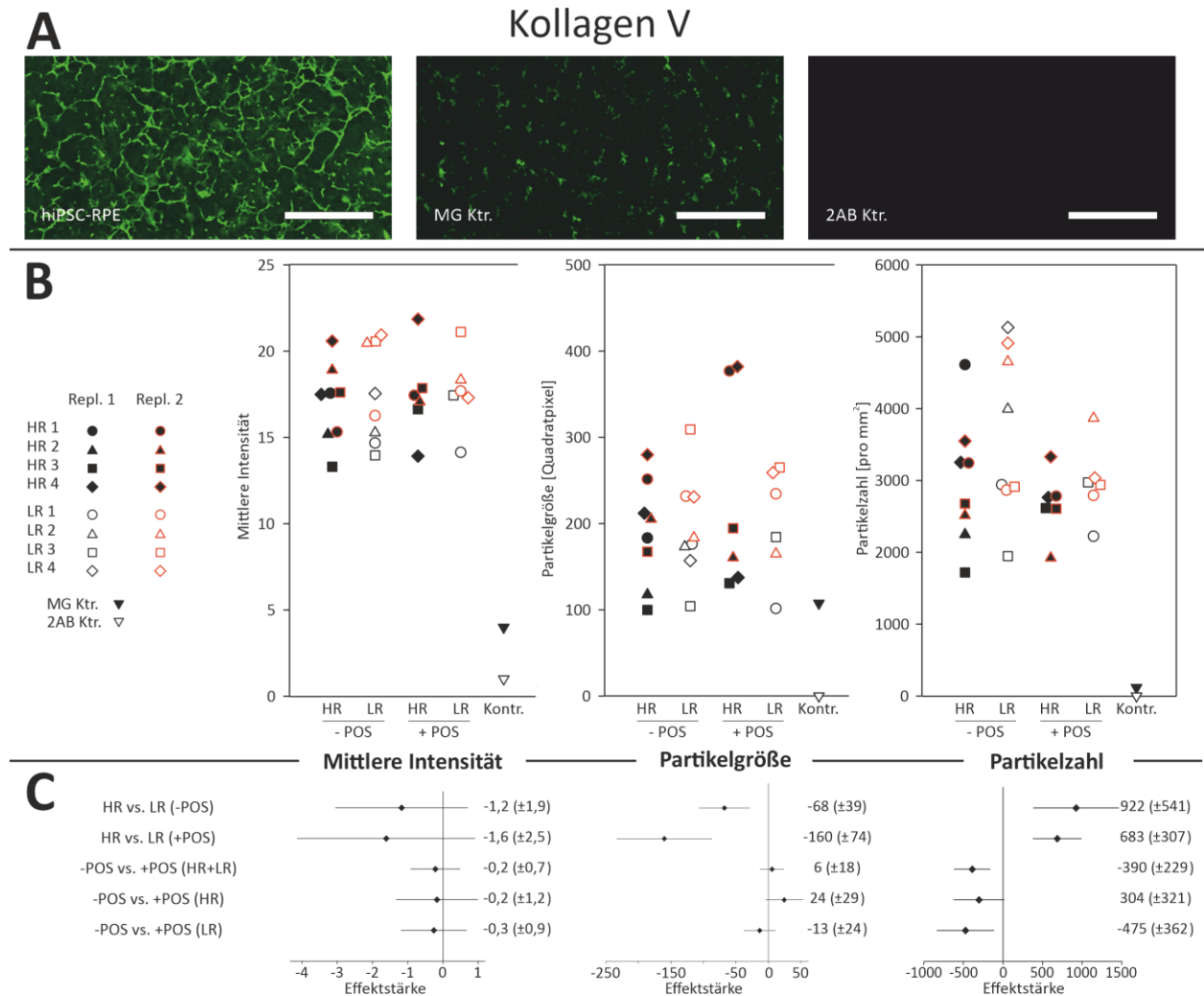


Abbildung 7: Effekt des genetischen Hintergrunds und POS-Fütterung als physiologischen Stressor auf die Kollagen V Ablagerung durch hiPSC-RPE. Es wurden 4 Hochrisiko (HR)-Zelllinien und 4 Niedrigrisiko (LR)-Zelllinien für 90 Tage auf Transwell Filtereinsätzen kultiviert, ab Tag 42 wurde ein Teil der Zellen (+ vs. -) regelmäßig mit Photorezeptor-Außensegmenten (POS) gefüttert. Nach 90 Tagen wurde die Filtereinsätze mit Zellysepuffer dezellularisiert und mit Antikörpern gegen Kollagen V gefärbt. Die Bilder (A) wurden mithilfe konfokaler Laserscanningmikroskopie bei 10x Vergrößerung aufgenommen (Scale bars: 100 μ m). Als Kontrollen dienten mit Matrigel-GFR beschichtete Einsätze (MG Ktr.) und dezellularisierte Filter, die ausschließlich mit dem Sekundärantikörper gefärbt wurden (2AB Ktr.). Die Fluoreszenzintensität, mittlere Partikelgröße und Partikelzahl pro mm² wurden mit ImageJ vermessen (B). Um den Effekt des genetischen Hintergrunds und POS-Fütterung auf die EZM zu untersuchen wurde ein lineares Regressionsmodell verwendet, gezeigt sind Effektstärken mit Standardfehler (C). Positive Effektstärken bedeuten höhere Werte in den LR-Zelllinien im Vergleich zu den HR-Zelllinien, bzw. höhere Werte in den POS-gefütterten im Vergleich zu den nicht POS-gefütterten und umgekehrt. Je nach Fragestellung bestehen die analysierten Daten aus 1-2 unabhängigen Experimenten mit je 2-8 biologischen Replikaten (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Als letztes Strukturprotein der EZM wurde Kollagen IV untersucht, das Fluoreszenzsignal der hiPSC-RPE produzierten EZM war hier jedoch schwach und von einer ähnlichen Intensität wie das Signal der Kontrollen. Weiter war morphologisch nahezu keine Bildung von Aggregaten, Faserbündeln oder ähnlichem zu erkennen, was sich auch in der sehr geringen Partikelzahl widerspiegelt (Abb. 8). Ob hier also eine spezifische Detektion von Kollagen IV oder ein unspezifisches Fluoreszenzsignal zu sehen war, bedarf weiterer Untersuchung. Dennoch führte POS-Fütterung zu einer signifikant kleineren Partikelgröße in den LR-Zelllinien ($p < 0,05$).

Ergebnisse

Ansonsten konnte kein signifikanter Einfluss von genetischem Risiko und POS-Fütterung auf die mittlere Intensität, die Partikelgröße und Partikelzahl festgestellt werden.

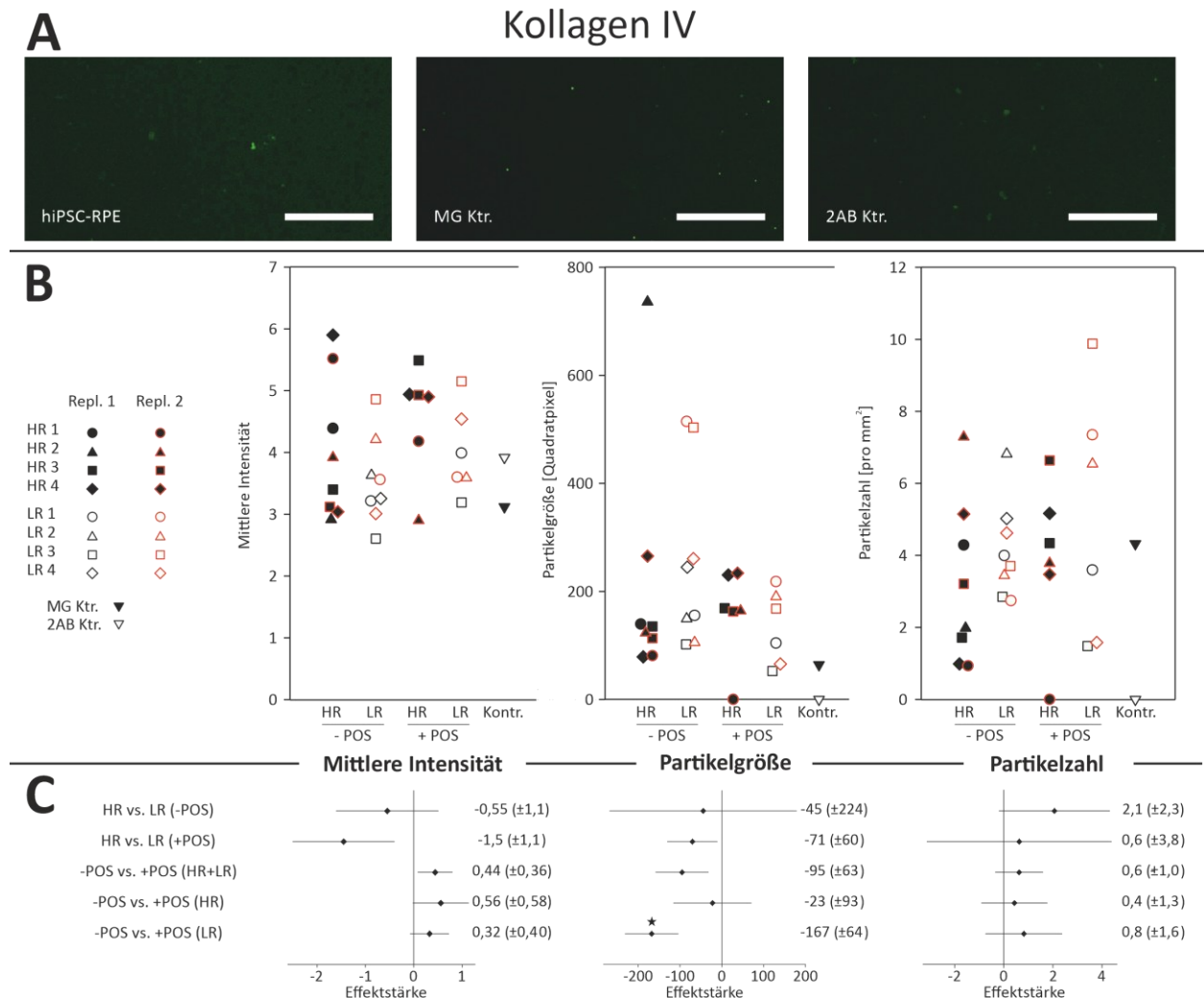


Abbildung 8: Effekt des genetischen Hintergrunds und POS-Fütterung als physiologischen Stressor auf die Kollagen IV Ablagerung durch hiPSC-RPE. Es wurden 4 Hochrisiko (HR)-Zelllinien und 4 Niedrigrisiko (LR)-Zelllinien für 90 Tage auf Transwell Filtereinsätzen kultiviert, ab Tag 42 wurde ein Teil der Zellen (+ vs. -) regelmäßig mit Photorezeptor-Außensegmenten (POS) gefüttert. Nach 90 Tagen wurde die Filtereinsätze mit Trypsin dezellularisiert und mit Antikörpern gegen Kollagen IV gefärbt. Die Bilder (A) wurden mithilfe konfokaler Laserscanningmikroskopie bei 10x Vergrößerung aufgenommen (Scale bars: 100 μ m). Als Kontrollen dienten mit Matrigel-GFR beschichtete Einsätze (MG Ktr.) und dezellularisierte Filter, die ausschließlich mit dem Sekundärantikörper gefärbt wurden (2AB Ktr.). Die Fluoreszenzintensität, mittlere Partikelgröße und Partikelzahl pro mm^2 wurden mit ImageJ vermessen (B). Um den Effekt des genetischen Hintergrunds und POS-Fütterung auf die EZM zu untersuchen wurde ein lineares Regressionsmodell verwendet, gezeigt sind Effektstärken mit Standardfehler (C). Positive Effektstärken bedeuten höhere Werte in den LR-Zelllinien im Vergleich zu den HR-Zelllinien, bzw. höhere Werte in den POS-gefütterten im Vergleich zu den nicht POS-gefütterten und umgekehrt. Je nach Fragestellung bestehen die analysierten Daten aus 1-2 unabhängigen Experimenten mit je 2-8 biologischen Replikaten (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

4.2.2 ICC-Analyse von AMD-typischen Proteinen und Lipiden als Bestandteil von Drusen

Neben den allgemeinen Veränderungen der EZM bei AMD-Patienten ist die Bildung von Drusen zwischen dem RPE und der BrM charakteristisch, die Pathomechanismen die zur Entstehung dieser Drusen führen sind nicht vollständig klar. Als typische Bestandteile der Proteinfraction solcher Drusen wurden C9, VTN, TIMP3, APOE, β -Amyloid und Crystallin

gefunden (Crabb, 2014). Drei der Proteine (C9, VTN und TIMP3) wurden mit zwei unterschiedlichen Methoden untersucht. Ziel war über eine schonende Dezellularisierung mit Zelllysepuffer die gesamte EZM zu erhalten, während bei der Trypsinierung neben dem Ablösen der Zellen auch die feine EZM angegriffen wird, und so eventuell eine genauere Analyse der verbleibenden, größeren drusenartigen Aggregate möglich ist. Weiter bestehen Drusen zu einem sehr großen Teil aus verschiedenen neutralen Lipiden, Phospholipiden und Cholesterinderivaten. Diese wurden mit dem unspezifischen Lipid-Farbstoff Nilrot angefärbt. Auf eine Präsentation der Fluoreszenzphotographien aller Färbungen und Zelllinien wird hier aus Platzgründen verzichtet, eine ausführliche Zusammenstellung ist im Appendix zu finden.

Die Färbung gegen C9 zeigte für beide Dezellularisierungsmethoden eine vergleichbare, relativ schwache Intensität (Zelllysepuffer: **Abb. 9**, Trypsinierung: **Abb. 10**). Auch morphologisch ähnelten sich die Färbungen für die beiden methodischen Ansätze: zu sehen waren fokale punktförmige Signale, passend zu einer Bildung von drusenartigen Aggregaten. Bei der Dezellularisierung mit Trypsin schien die Partikelzahl und vor allem die Partikelgröße höher zu sein. Bei der Dezellularisierung mit Zelllysepuffer zeigte sich durch POS-Fütterung eine signifikant erhöhte Fluoreszenzintensität in allen Zelllinien ($p < 0,05$). Dieser Effekt war auch isoliert in den LR- ($p < 0,05$), nicht jedoch in den HR-Zelllinien zu sehen. Auch bei der Dezellularisierung mit Trypsin führte POS-Fütterung zu einer Erhöhung der Intensität ($p < 0,05$) und der Partikelzahl ($p < 0,05$) in allen Zelllinien, dieser Trend durch die POS-Fütterung zeigte sich auch in den HR-Zelllinien, erreichte hier aber keine Signifikanz.

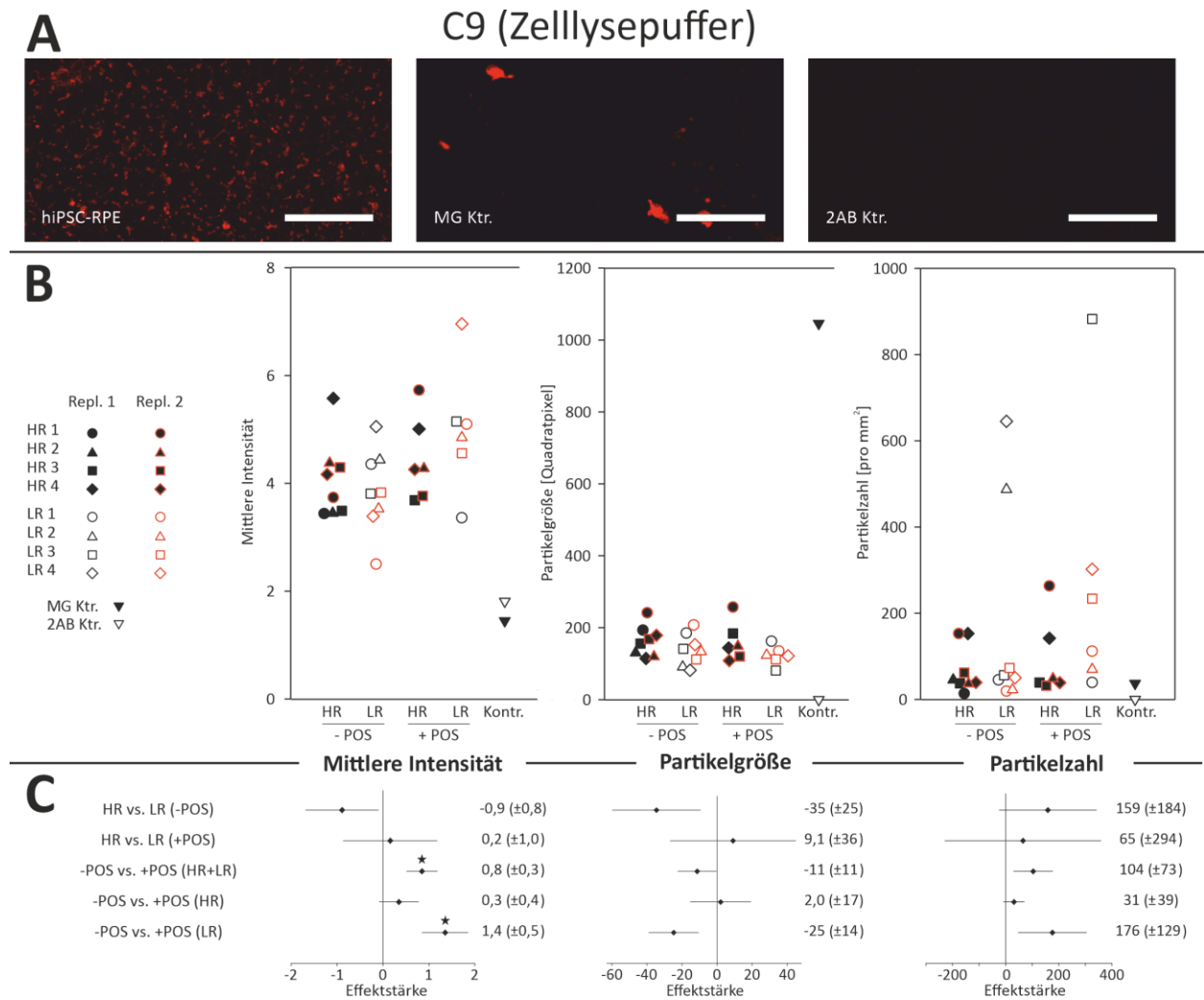


Abbildung 9: Effekt des genetischen Hintergrunds und POS-Fütterung als physiologischen Stressor auf die Ablagerung von C9 durch hiPSC-RPE. Es wurden 4 Hochrisiko (HR)-Zelllinien und 4 Niedrigisiko (LR)-Zelllinien für 90 Tage auf Transwell Filtereinsätzen kultiviert, ab Tag 42 wurde ein Teil der Zellen (+ vs. -) regelmäßig mit Photorezeptor-Außensegmenten (POS) gefüttert. Nach 90 Tagen wurde die Filtereinsätze mit Zelllysepuffer dezellularisiert und mit Antikörpern gegen C9 gefärbt. Die Bilder (A) wurden mithilfe konfokaler Laserscanningmikroskopie bei 10x Vergrößerung aufgenommen (Scale bars: 100 μ m). Als Kontrollen dienten mit Matrigel-GFR beschichtete Einsätze (MG Ktr.) und dezellularisierte Filter, die ausschließlich mit dem Sekundärantikörper gefärbt wurden (2AB Ktr.). Die Fluoreszenzintensität, mittlere Partikelgröße und Partikelzahl pro mm^2 wurden mit ImageJ vermessen (B). Um den Effekt des genetischen Hintergrunds und POS-Fütterung auf die EZM zu untersuchen wurde ein lineares Regressionsmodell verwendet, gezeigt sind Effektstärken mit Standardfehler (C). Positive Effektstärken bedeuten höhere Werte in den LR-Zelllinien im Vergleich zu den HR-Zelllinien, bzw. höhere Werte in den POS-gefütterten im Vergleich zu den nicht POS-gefütterten und umgekehrt. Je nach Fragestellung bestehen die analysierten Daten aus 1-2 unabhängigen Experimenten mit je 2-8 biologischen Replikaten (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

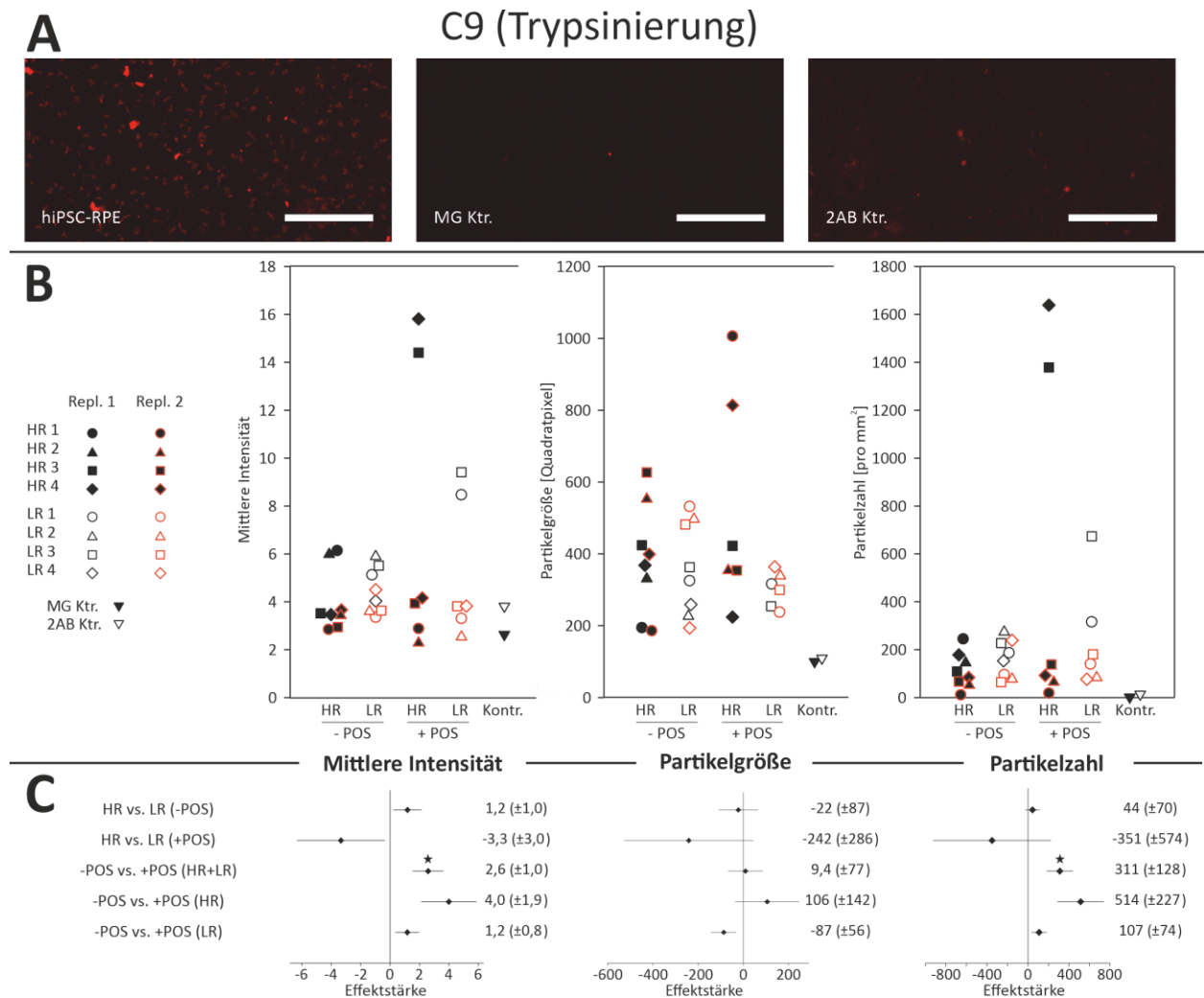


Abbildung 10: Effekt des genetischen Hintergrunds und POS-Fütterung als physiologischen Stressor auf die Ablagerung von C9 durch hiPSC-RPE. Es wurden 4 Hochrisiko (HR)-Zelllinien und 4 Niedrigisiko (LR)-Zelllinien für 90 Tage auf Transwell Filtereinsätzen kultiviert, ab Tag 42 wurde ein Teil der Zellen (+ vs. -) regelmäßig mit Photorezeptor-Außensegmenten (POS) gefüttert. Nach 90 Tagen wurde die Filtereinsätze mit Trypsin dezellularisiert und mit Antikörpern gegen C9 gefärbt. Die Bilder (A) wurden mithilfe konfokaler Laserscanningmikroskopie bei 10x Vergrößerung aufgenommen (Scale bars: 100 µm). Als Kontrollen dienten mit Matrigel-GFR beschichtete Einsätze (MG Ktr.) und dezellularisierte Filter, die ausschließlich mit dem Sekundärantikörper gefärbt wurden (2AB Ktr.). Die Fluoreszenzintensität, mittlere Partikelgröße und Partikelzahl pro mm² wurden mit ImageJ vermessen (B). Um den Effekt des genetischen Hintergrunds und POS-Fütterung auf die EZM zu untersuchen wurde ein lineares Regressionsmodell verwendet, gezeigt sind Effektstärken mit Standardfehler (C). Positive Effektstärken bedeuten höhere Werte in den LR-Zelllinien im Vergleich zu den HR-Zelllinien, bzw. höhere Werte in den POS-gefütterten im Vergleich zu den nicht POS-gefütterten und umgekehrt. Je nach Fragestellung bestehen die analysierten Daten aus 1-2 unabhängigen Experimenten mit je 2-8 biologischen Replikaten (*p<0,05; **p<0,01).

Bei der Färbung gegen VTN unterschied sich die Morphologie der Färbungen je nach Dezellularisierungsmethode. Bei der Dezellularisierung mit Zelllysepuffer (Abb. 11) zeigte sich in der EZM der hiPSC-RPE neben lokalen Aggregaten die Bildung von einzelnen Faserzügen, die Matrigelkontrolle wies eine flächig homogene Färbung auf. Bei der Dezellularisierung mit Trypsin (Abb. 12) waren vor allem lokale Aggregate zu erkennen, einzelne davon sehr groß. Bei der Dezellularisierung mit Zelllysepuffer wies die quantitative Auswertung eine signifikante Erhöhung der Fluoreszenzintensität durch POS-Fütterung in allen Zelllinien (p<0,05) auf. Ansonsten konnte bei beiden Methoden kein signifikanter Einfluss von

Ergebnisse

genetischem Risiko und POS-Fütterung auf die mittlere Intensität, die Partikelgröße und Partikelzahl festgestellt werden.

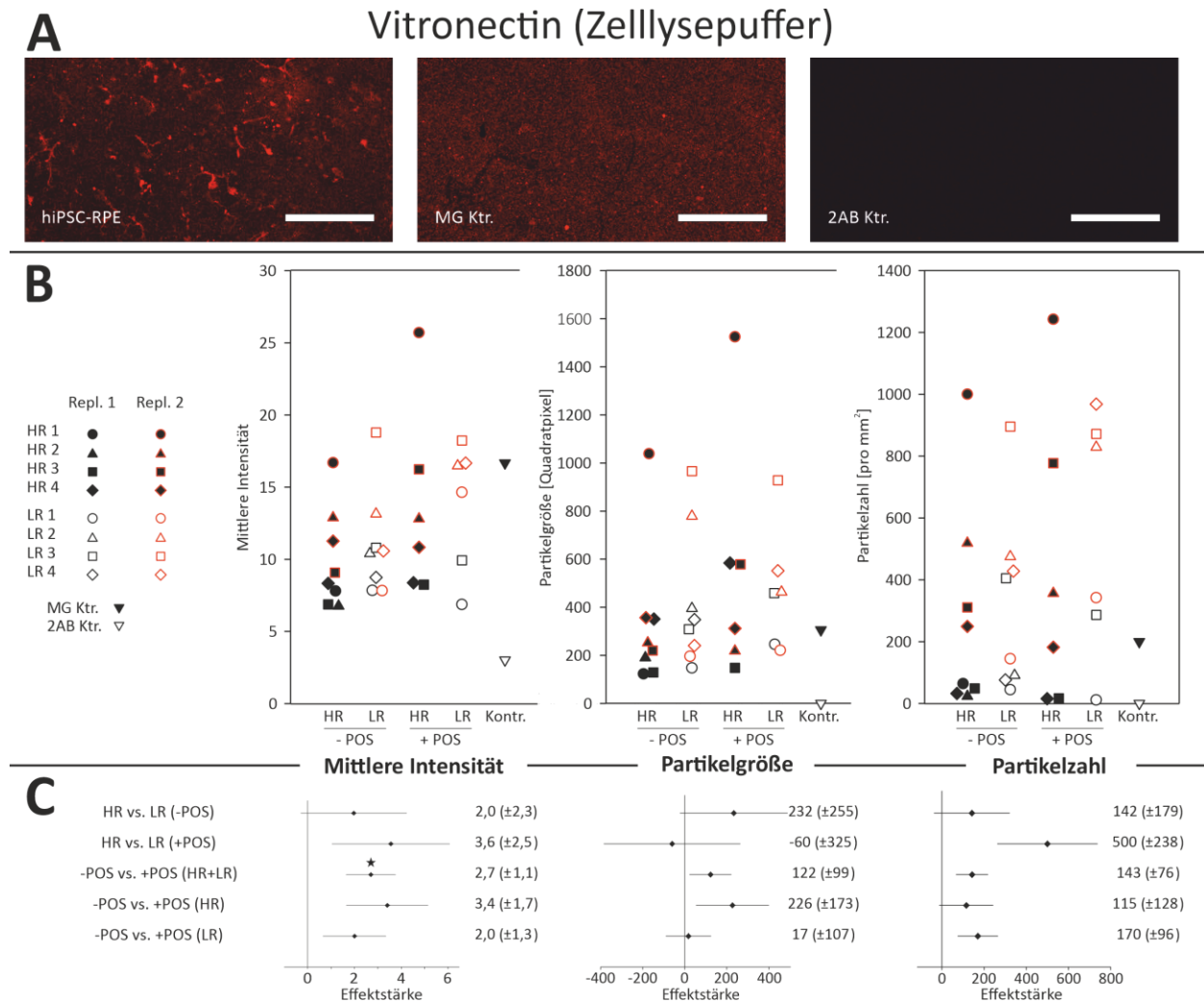


Abbildung 11: Effekt des genetischen Hintergrunds und POS-Fütterung als physiologischen Stressor auf die Ablagerung von VTN durch hiPSC-RPE. Es wurden 4 Hochrisiko (HR)-Zelllinien und 4 Niedrigrisiko (LR)-Zelllinien für 90 Tage auf Transwell Filtereinsätzen kultiviert, ab Tag 42 wurde ein Teil der Zellen (+ vs. -) regelmäßig mit Photorezeptor-Außensegmenten (POS) gefüttert. Nach 90 Tagen wurde die Filtereinsätze mit Zellysepuffer dezellularisiert und mit Antikörpern gegen VTN gefärbt. Die Bilder (A) wurden mithilfe konfokaler Laserscanningmikroskopie bei 10x Vergrößerung aufgenommen (Scale bars: 100 µm). Als Kontrollen dienten mit Matrigel-GFR beschichtete Einsätze (MG Ktr.) und dezellularisierte Filter, die ausschließlich mit dem Sekundärantikörper gefärbt wurden (2AB Ktr.). Die Fluoreszenzintensität, mittlere Partikelgröße und Partikelzahl pro mm² wurden mit ImageJ vermessen (B). Um den Effekt des genetischen Hintergrunds und POS-Fütterung auf die EZM zu untersuchen wurde ein lineares Regressionsmodell verwendet, gezeigt sind Effektstärken mit Standardfehler (C). Positive Effektstärken bedeuten höhere Werte in den LR-Zelllinien im Vergleich zu den HR-Zelllinien, bzw. höhere Werte in den POS-gefütterten im Vergleich zu den nicht POS-gefütterten und umgekehrt. Je nach Fragestellung bestehen die analysierten Daten aus 1-2 unabhängigen Experimenten mit je 2-8 biologischen Replikaten (*p<0,05; **p<0,01).

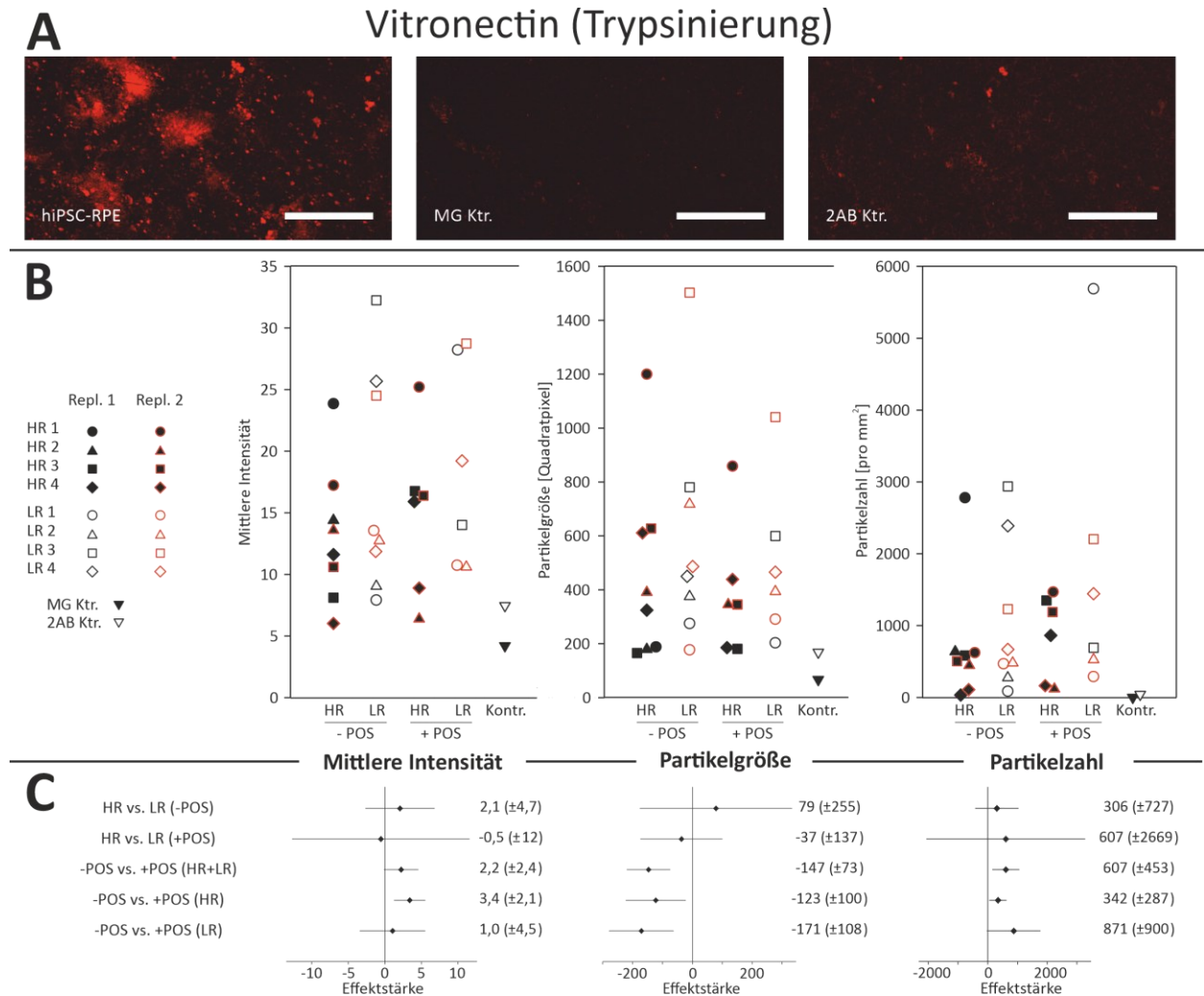


Abbildung 12: Effekt des genetischen Hintergrunds und POS-Fütterung als physiologischen Stressor auf die Ablagerung von VTN durch hiPSC-RPE. Es wurden 4 Hochrisiko (HR)-Zelllinien und 4 Niedrigrisiko (LR)-Zelllinien für 90 Tage auf Transwell Filtereinsätzen kultiviert, ab Tag 42 wurde ein Teil der Zellen (+ vs. -) regelmäßig mit Photorezeptor-Außensegmenten (POS) gefüttert. Nach 90 Tagen wurde die Filtereinsätze mit Trypsin dezellularisiert und mit Antikörpern gegen VTN gefärbt. Die Bilder (A) wurden mithilfe konfokaler Laserscanningmikroskopie bei 10x Vergrößerung aufgenommen (Scale bars: 100 μ m). Als Kontrollen dienten mit Matrigel-GFR beschichtete Einsätze (MG Ktr.) und dezellularisierte Filter, die ausschließlich mit dem Sekundärantikörper gefärbt wurden (2AB Ktr.). Die Fluoreszenzintensität, mittlere Partikelgröße und Partikelzahl pro mm^2 wurden mit ImageJ vermessen (B). Um den Effekt des genetischen Hintergrunds und POS-Fütterung auf die EZM zu untersuchen wurde ein lineares Regressionsmodell verwendet, gezeigt sind Effektstärken mit Standardfehler (C). Positive Effektstärken bedeuten höhere Werte in den LR-Zelllinien im Vergleich zu den HR-Zelllinien, bzw. höhere Werte in den POS-gefütterten im Vergleich zu den nicht POS-gefütterten und umgekehrt. Je nach Fragestellung bestehen die analysierten Daten aus 1-2 unabhängigen Experimenten mit je 2-8 biologischen Replikaten (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Bei der Färbung gegen TIMP3 (Zelllysepuffer: **Abb. 13**, Trypsinierung: **Abb. 14**) zeigten sich bei beiden Methoden lokale Aggregate mit starker Fluoreszenz, wobei sich bei der Dezellularisierung mit Zelllysepuffer zusätzlich ein flächiges netzförmiges Signal detektiert wurde. Unter den POS-gefütterten Zelllinien führte hier ein niedriges genetisches AMD-Risiko der Zelllinien zu einer signifikant verringerten Partikelzahl ($p < 0,01$) und -größe ($p < 0,05$). Bei der Dezellularisierung mit Trypsin führte in den LR-Zelllinien POS-Fütterung zu einer signifikanten Erhöhung der mittleren Fluoreszenzintensität ($p < 0,05$). Ansonsten konnte bei

Ergebnisse

beiden Methoden kein signifikanter Einfluss von genetischem Risiko und POS-Fütterung auf die mittlere Intensität, die Partikelgröße und Partikelzahl festgestellt werden.

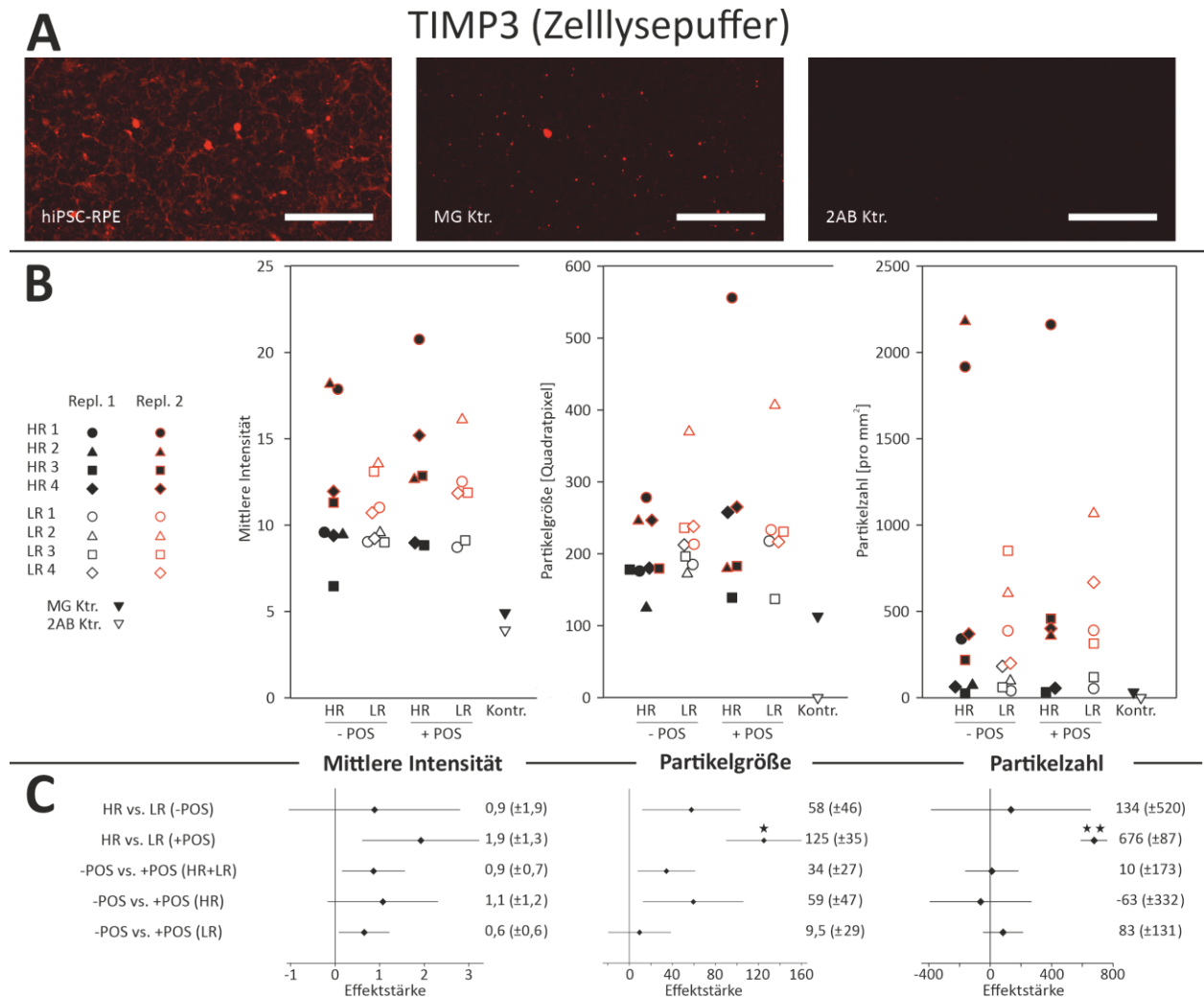


Abbildung 13: Effekt des genetischen Hintergrunds und POS-Fütterung als physiologischen Stressor auf die Ablagerung von TIMP3 durch hiPSC-RPE. Es wurden 4 Hochrisiko (HR)-Zelllinien und 4 Niedrigisiko (LR)-Zelllinien für 90 Tage auf Transwell Filtereinsätzen kultiviert, ab Tag 42 wurde ein Teil der Zellen (+ vs. -) regelmäßig mit Photorezeptor-Außensegmenten (POS) gefüttert. Nach 90 Tagen wurde die Filtereinsätze mit Zelllysepuffer dezellularisiert und mit Antikörpern gegen TIMP3 gefärbt. Die Bilder (A) wurden mithilfe konfokaler Laserscanningmikroskopie bei 10x Vergrößerung aufgenommen (Scale bars: 100 μm). Als Kontrollen dienten mit Matrigel-GFR beschichtete Einsätze (MG Ktr.) und dezellularisierte Filter, die ausschließlich mit dem Sekundärantikörper gefärbt wurden (2AB Ktr.). Die Fluoreszenzintensität, mittlere Partikelgröße und Partikelzahl pro mm^2 wurden mit ImageJ vermessen (B). Um den Effekt des genetischen Hintergrunds und POS-Fütterung auf die EZM zu untersuchen wurde ein lineares Regressionsmodell verwendet, gezeigt sind Effektstärken mit Standardfehler (C). Positive Effektstärken bedeuten höhere Werte in den LR-Zelllinien im Vergleich zu den HR-Zelllinien, bzw. höhere Werte in den POS-gefütterten im Vergleich zu den nicht POS-gefütterten und umgekehrt. Je nach Fragestellung bestehen die analysierten Daten aus 1-2 unabhängigen Experimenten mit je 2-8 biologischen Replikaten (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

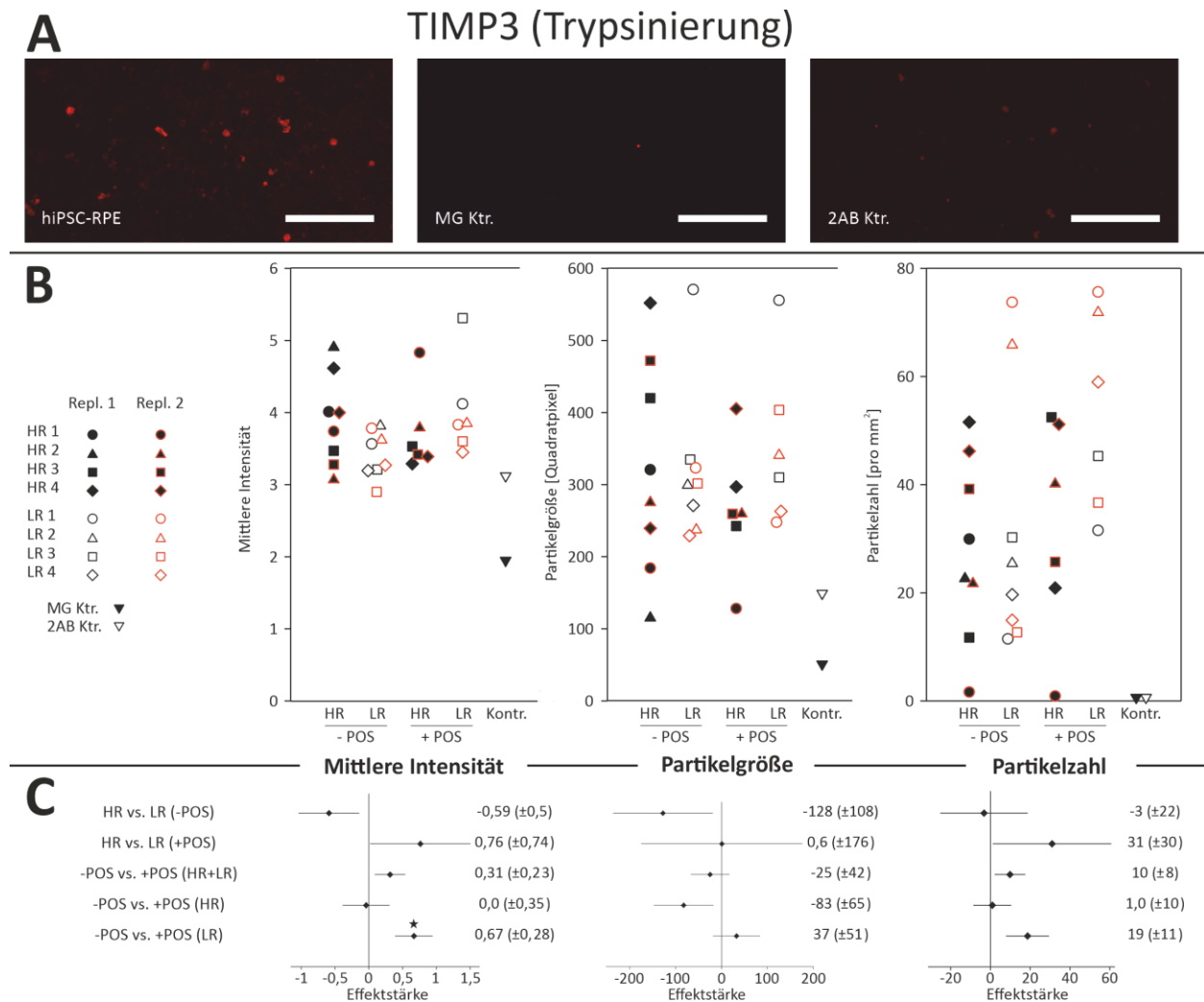


Abbildung 14: Effekt des genetischen Hintergrunds und POS-Fütterung als physiologischen Stressor auf die Ablagerung von TIMP3 durch hiPSC-RPE. Es wurden 4 Hochrisiko (HR)-Zelllinien und 4 Niedrigrisiko (LR)-Zelllinien für 90 Tage auf Transwell Filtereinsätzen kultiviert, ab Tag 42 wurde ein Teil der Zellen (+ vs. -) regelmäßig mit Photorezeptor-Außensegmenten (POS) gefüttert. Nach 90 Tagen wurde die Filtereinsätze mit Trypsin dezellularisiert und mit Antikörpern gegen TIMP3 gefärbt. Die Bilder (A) wurden mithilfe konfokaler Laserscanningmikroskopie bei 10x Vergrößerung aufgenommen (Scale bars: 100 µm). Als Kontrollen dienten mit Matrigel-GFR beschichtete Einsätze (MG Ktr.) und dezellularisierte Filter, die ausschließlich mit dem Sekundärantikörper gefärbt wurden (2AB Ktr.). Die Fluoreszenzintensität, mittlere Partikelgröße und Partikelzahl pro mm² wurden mit ImageJ vermessen (B). Um den Effekt des genetischen Hintergrunds und POS-Fütterung auf die EZM zu untersuchen wurde ein lineares Regressionsmodell verwendet, gezeigt sind Effektstärken mit Standardfehler (C). Positive Effektstärken bedeuten höhere Werte in den LR-Zelllinien im Vergleich zu den HR-Zelllinien, bzw. höhere Werte in den POS-gefütterten im Vergleich zu den nicht POS-gefütterten und umgekehrt. Je nach Fragestellung bestehen die analysierten Daten aus 1-2 unabhängigen Experimenten mit je 2-8 biologischen Replikaten (*p<0,05; **p<0,01).

Bei der Färbung gegen ApoE (Abb. 15) zeigten sich fokale Ablagerungen, eine flächige Färbung war nicht zu erkennen. Unter den POS-gefütterten Zelllinien führte ein niedriges genetisches AMD-Risiko zu signifikant geringeren Werten in allen drei betrachteten Parametern, der mittleren Intensität (p<0,05), Partikelgröße (p<0,05) und Partikelzahl (p<0,05). Ansonsten konnte kein signifikanter Einfluss von genetischem Risiko und POS-Fütterung auf die mittlere Intensität, die Partikelgröße und Partikelzahl festgestellt werden.

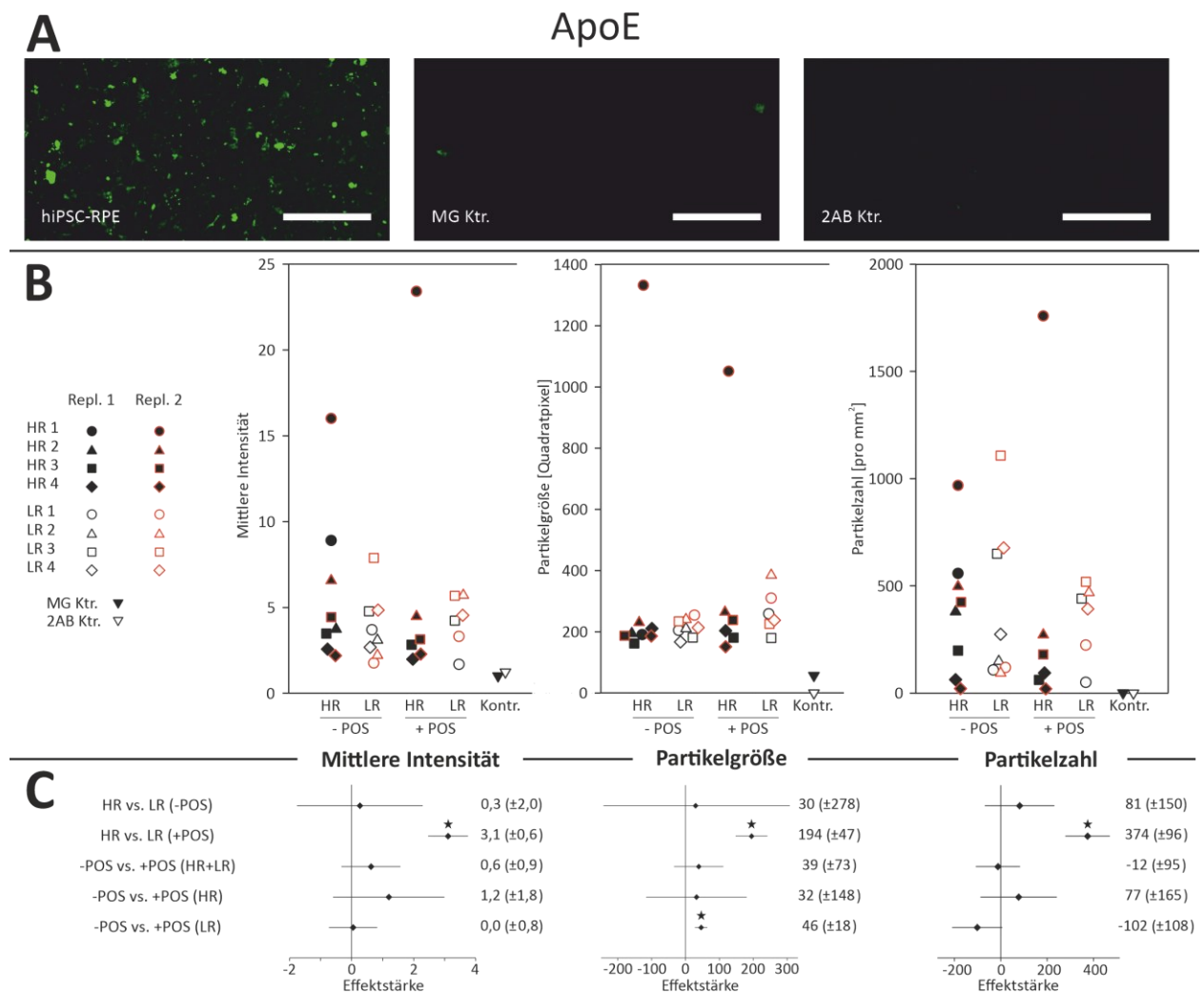


Abbildung 15: Effekt des genetischen Hintergrunds und POS-Fütterung als physiologischen Stressor auf die Ablagerung von ApoE durch hiPSC-RPE. Es wurden 4 Hochrisiko (HR)-Zelllinien und 4 Niedrigrisiko (LR)-Zelllinien für 90 Tage auf Transwell Filtereinsätzen kultiviert, ab Tag 42 wurde ein Teil der Zellen (+ vs. -) regelmäßig mit Photorezeptor-Außensegmenten (POS) gefüttert. Nach 90 Tagen wurde die Filtereinsätze mit Zellysepuffer dezellularisiert und mit Antikörpern gegen ApoE gefärbt. Die Bilder (A) wurden mithilfe konfokaler Laserscanningmikroskopie bei 10x Vergrößerung aufgenommen (Scale bars: 100 µm). Als Kontrollen dienten mit Matrigel-GFR beschichtete Einsätze (MG Ktr.) und dezellularisierte Filter, die ausschließlich mit dem Sekundärantikörper gefärbt wurden (2AB Ktr.). Die Fluoreszenzintensität, mittlere Partikelgröße und Partikelzahl pro mm² wurden mit ImageJ vermessen (B). Um den Effekt des genetischen Hintergrunds und POS-Fütterung auf die EZM zu untersuchen wurde ein lineares Regressionsmodell verwendet, gezeigt sind Effektstärken mit Standardfehler (C). Positive Effektstärken bedeuten höhere Werte in den LR-Zelllinien im Vergleich zu den HR-Zelllinien, bzw. höhere Werte in den POS-gefütterten im Vergleich zu den nicht POS-gefütterten und umgekehrt. Je nach Fragestellung bestehen die analysierten Daten aus 1-2 unabhängigen Experimenten mit je 2-8 biologischen Replikaten (*p<0,05; **p<0,01).

Bei den Immunfärbungen gegen β -Amyloid (Abb. 16) und Crystallin (Abb. 17) und der Färbung mit Nilrot (Abb. 18) zeigten sich in der EZM unter den hiPSC-RPE lokale Aggregate, welche in den Kontrollen kleiner oder gar nicht vorhanden waren. Eine flächige Färbung konnte hingegen nicht oder nur schwach beobachtet werden. Bei der Auswertung der drei Färbungen ergaben sich für keinen der betrachteten Parameter signifikante Unterschiede durch das genetische Risiko der Zelllinien oder durch POS-Fütterung.

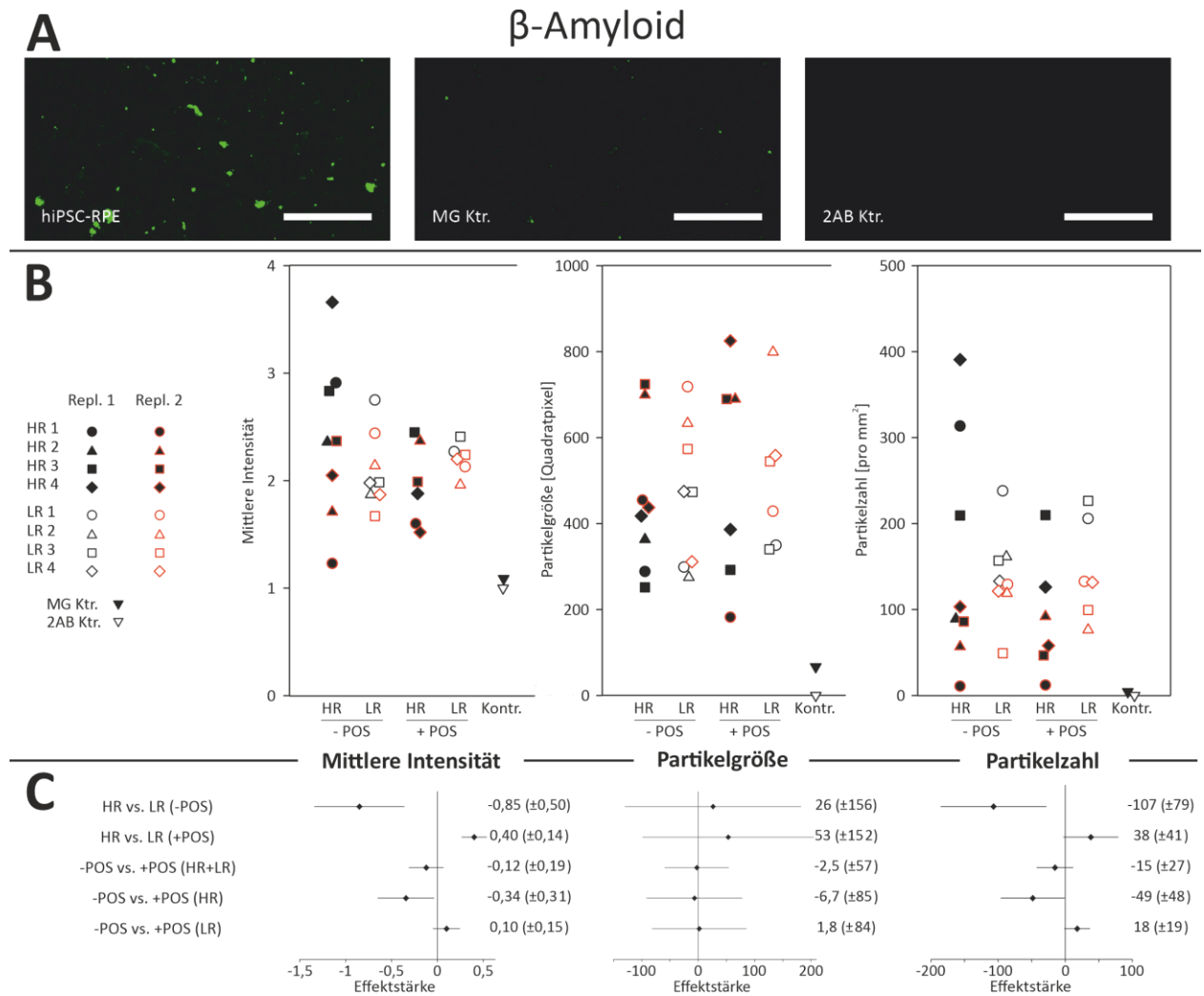


Abbildung 16: Effekt des genetischen Hintergrunds und POS-Fütterung als physiologischen Stressor auf die Ablagerung von β -Amyloid durch hiPSC-RPE. Es wurden 4 Hochrisiko (HR)-Zelllinien und 4 Niedrigisiko (LR)-Zelllinien für 90 Tage auf Transwell Filtereinsätzen kultiviert, ab Tag 42 wurde ein Teil der Zellen (+ vs. -) regelmäßig mit Photorezeptor-Außensegmenten (POS) gefüttert. Nach 90 Tagen wurde die Filtereinsätze mit Trypsin dezellularisiert und mit Antikörpern gegen β -Amyloid gefärbt. Die Bilder (A) wurden mithilfe konfokaler Laserscanningmikroskopie bei 10x Vergrößerung aufgenommen (Scale bars: 100 μ m). Als Kontrollen dienten mit Matrigel-GFR beschichtete Einsätze (MG Ktr.) und dezellularisierte Filter, die ausschließlich mit dem Sekundärantikörper gefärbt wurden (2AB Ktr.). Die Fluoreszenzintensität, mittlere Partikelgröße und Partikelzahl pro mm^2 wurden mit ImageJ vermessen (B). Um den Effekt des genetischen Hintergrunds und POS-Fütterung auf die EZM zu untersuchen wurde ein lineares Regressionsmodell verwendet, gezeigt sind Effektstärken mit Standardfehler (C). Positive Effektstärken bedeuten höhere Werte in den LR-Zelllinien im Vergleich zu den HR-Zelllinien, bzw. höhere Werte in den POS-gefütterten im Vergleich zu den nicht POS-gefütterten und umgekehrt. Je nach Fragestellung bestehen die analysierten Daten aus 1-2 unabhängigen Experimenten mit je 2-8 biologischen Replikaten (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

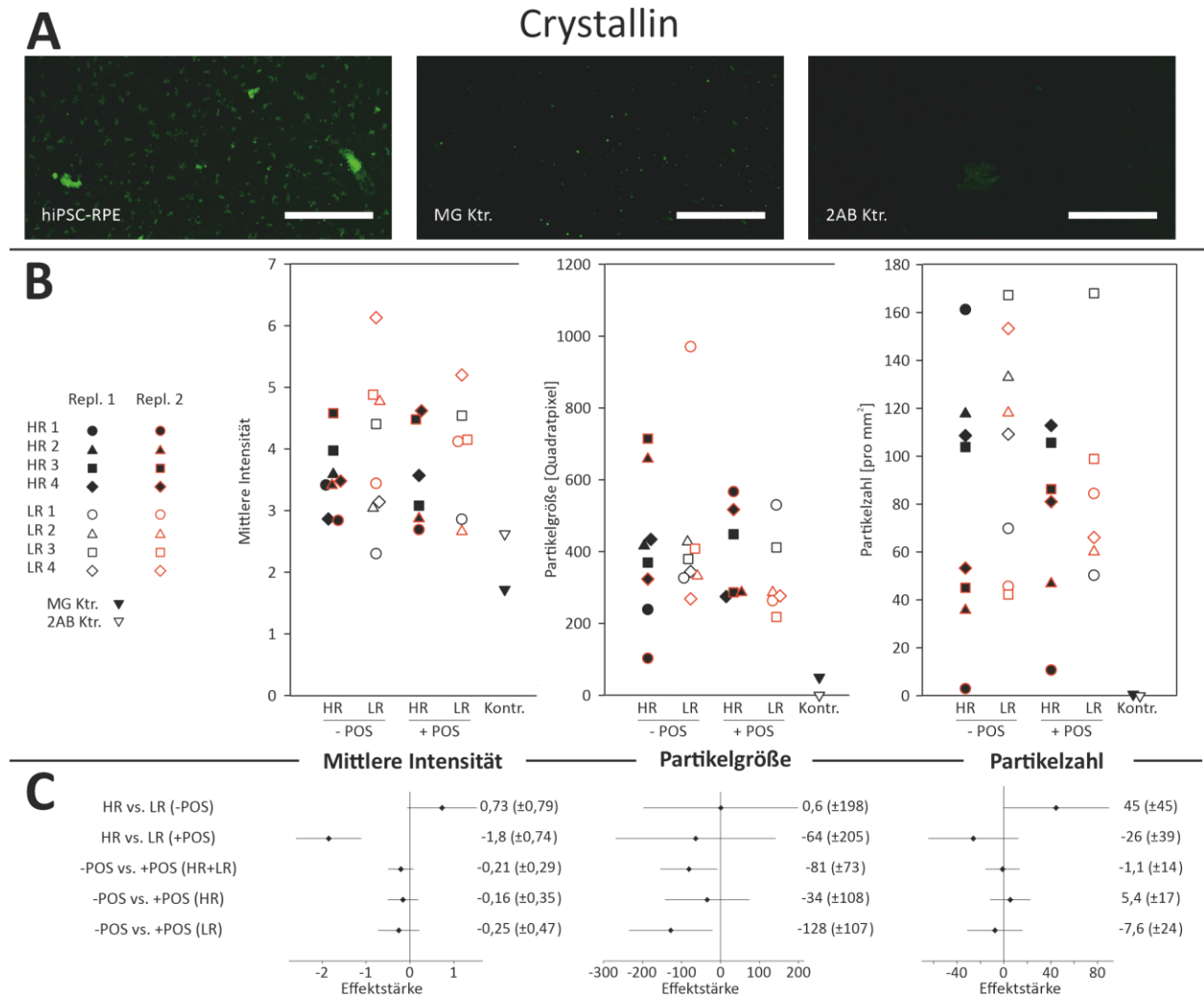


Abbildung 17: Effekt des genetischen Hintergrunds und POS-Fütterung als physiologischen Stressor auf die Ablagerung von Crystallin durch hiPSC-RPE. Es wurden 4 Hochrisiko (HR)-Zelllinien und 4 Niedrigisiko (LR)-Zelllinien für 90 Tage auf Transwell Filtereinsätzen kultiviert, ab Tag 42 wurde ein Teil der Zellen (+ vs. -) regelmäßig mit Photorezeptor-Außensegmenten (POS) gefüttert. Nach 90 Tagen wurde die Filtereinsätze mit Trypsin dezellularisiert und mit Antikörpern gegen Crystallin gefärbt. Die Bilder (A) wurden mithilfe konfokaler Laserscanningmikroskopie bei 10x Vergrößerung aufgenommen (Scale bars: 100 μ m). Als Kontrollen dienten mit Matrigel-GFR beschichtete Einsätze (MG Ktr.) und dezellularisierte Filter, die ausschließlich mit dem Sekundärantikörper gefärbt wurden (2AB Ktr.). Die Fluoreszenzintensität, mittlere Partikelgröße und Partikelzahl pro mm^2 wurden mit ImageJ vermessen (B). Um den Effekt des genetischen Hintergrunds und POS-Fütterung auf die EZM zu untersuchen wurde ein lineares Regressionsmodell verwendet, gezeigt sind Effektstärken mit Standardfehler (C). Positive Effektstärken bedeuten höhere Werte in den LR-Zelllinien im Vergleich zu den HR-Zelllinien, bzw. höhere Werte in den POS-gefütterten im Vergleich zu den nicht POS-gefütterten und umgekehrt. Je nach Fragestellung bestehen die analysierten Daten aus 1-2 unabhängigen Experimenten mit je 2-8 biologischen Replikaten (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

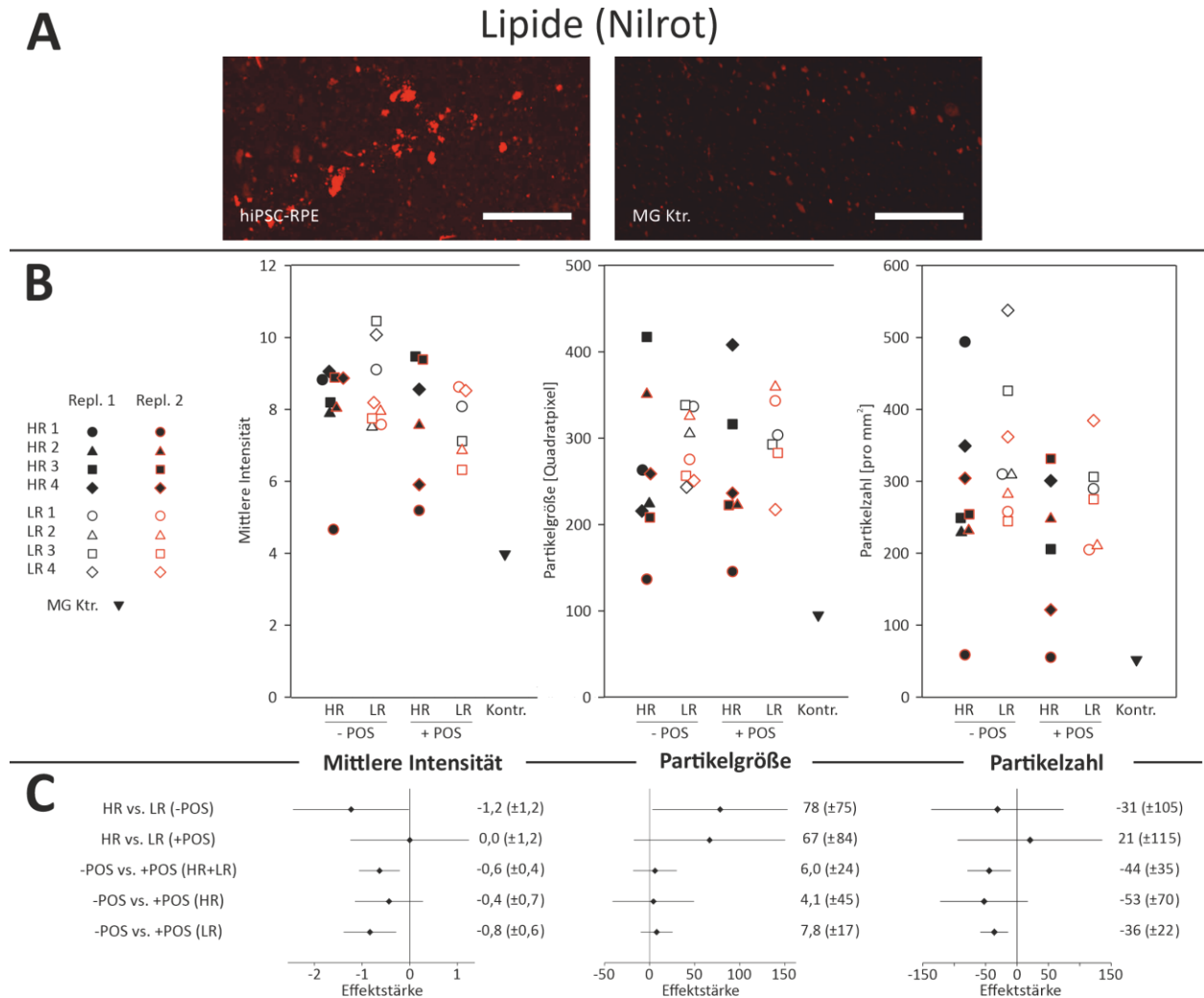


Abbildung 18: Effekt des genetischen Hintergrunds und POS-Fütterung als physiologischen Stressor auf die Ablagerung von Lipiden durch hiPSC-RPE. Es wurden 4 Hochrisiko (HR)-Zelllinien und 4 Niedrigisiko (LR)-Zelllinien für 90 Tage auf Transwell Filtereinsätzen kultiviert, ab Tag 42 wurde ein Teil der Zellen (+ vs. -) regelmäßig mit Photorezeptor-Außensegmenten (POS) gefüttert. Nach 90 Tagen wurde die Filtereinsätze mit Trypsin dezellularisiert und mit Nilrot, einer Verbindung welche unspezifisch Lipide färbt, behandelt. Die Bilder (A) wurden mithilfe konfokaler Laserscanningmikroskopie bei 10x Vergrößerung aufgenommen (Scale bars: 100 μ m). Als Kontrollen dienten mit Matrigel-GFR beschichtete Einsätze (MG Ktr.). Die Fluoreszenzintensität, mittlere Partikelgröße und Partikelzahl pro mm^2 wurden mit ImageJ vermessen (B). Um den Effekt des genetischen Hintergrunds und POS-Fütterung auf die EZM zu untersuchen wurde ein lineares Regressionsmodell verwendet, gezeigt sind Effektstärken mit Standardfehler (C). Positive Effektstärken bedeuten höhere Werte in den LR-Zelllinien im Vergleich zu den HR-Zelllinien, bzw. höhere Werte in den POS-gefütterten im Vergleich zu den nicht POS-gefütterten und umgekehrt. Je nach Fragestellung bestehen die analysierten Daten aus 1-2 unabhängigen Experimenten mit je 2-8 biologischen Replikaten (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

4.3 Einfluss von POS-Fütterung und des genetischen Hintergrunds auf die Sekretion von MMPs durch hiPSC-RPE

4.3.1 Gelatine-Zymographie

MMP2 und MMP9, auch Gelatinase A und B genannt, degradieren Gelatine. Bei der Gelatine-Zymographie wird im Anschluss an eine SDS-PAGE die enzymatische Proteolyse von Gelatine (Kollagen I) genutzt, um die Aktivität der entsprechenden Enzyme nachzuweisen. Dabei werden sowohl die aktivierten Formen nachgewiesen, aber auch die *in vivo* inaktiven Proenzyme können in entsprechenden Konzentrationen nachgewiesen werden, da sie durch die

SDS-vermittelte Denaturierung partiell aktiviert werden. Die Banden des Gelatineverdaus wurden durch Coomassie-Blau Färbung als helle Banden vor blauem Hintergrund sichtbar gemacht und anschließend densitometrisch ausgewertet.

MMP2-Aktivität konnte für alle Zelllinien nachgewiesen werden, sichtbar durch die Degradierung der Gelatine auf Höhe des entsprechenden Molekulargewichts von 64 kDa (**Abb. 19, A**). Dabei konnte sowohl in der unbehandelten als auch in der POS-gefütterten Gruppe eine differenzielle MMP2-Aktivität abhängig von der Sekretionsrichtung nachgewiesen werden, im apikalen Medium war die proteolytische Aktivität signifikant höher als im basalen Medium ($p < 0,001$) (**Abb. 19, B**). Außerdem fiel auf, dass unabhängig von POS-Fütterung bei den LR-Zelllinien eine geringere Aktivität von MMP2 im apikalen Medium vorhanden war als bei den HR-Zelllinien. Zudem führte sowohl bei den HR-Zelllinien als auch bei den LR-Zelllinien POS-Fütterung zu einer erhöhten Aktivität im apikalen Medium, diese Unterschiede erreichten jedoch keine statistische Signifikanz (**Abb. 19, C**).

Aktivität von pro-MMP2, MMP9 und pro-MMP9 konnte mithilfe der Zymographie bei keiner der Zelllinien nachgewiesen werden, unabhängig vom genetischen Risiko, von POS-Fütterung und der Sekretionsrichtung.

Ergebnisse

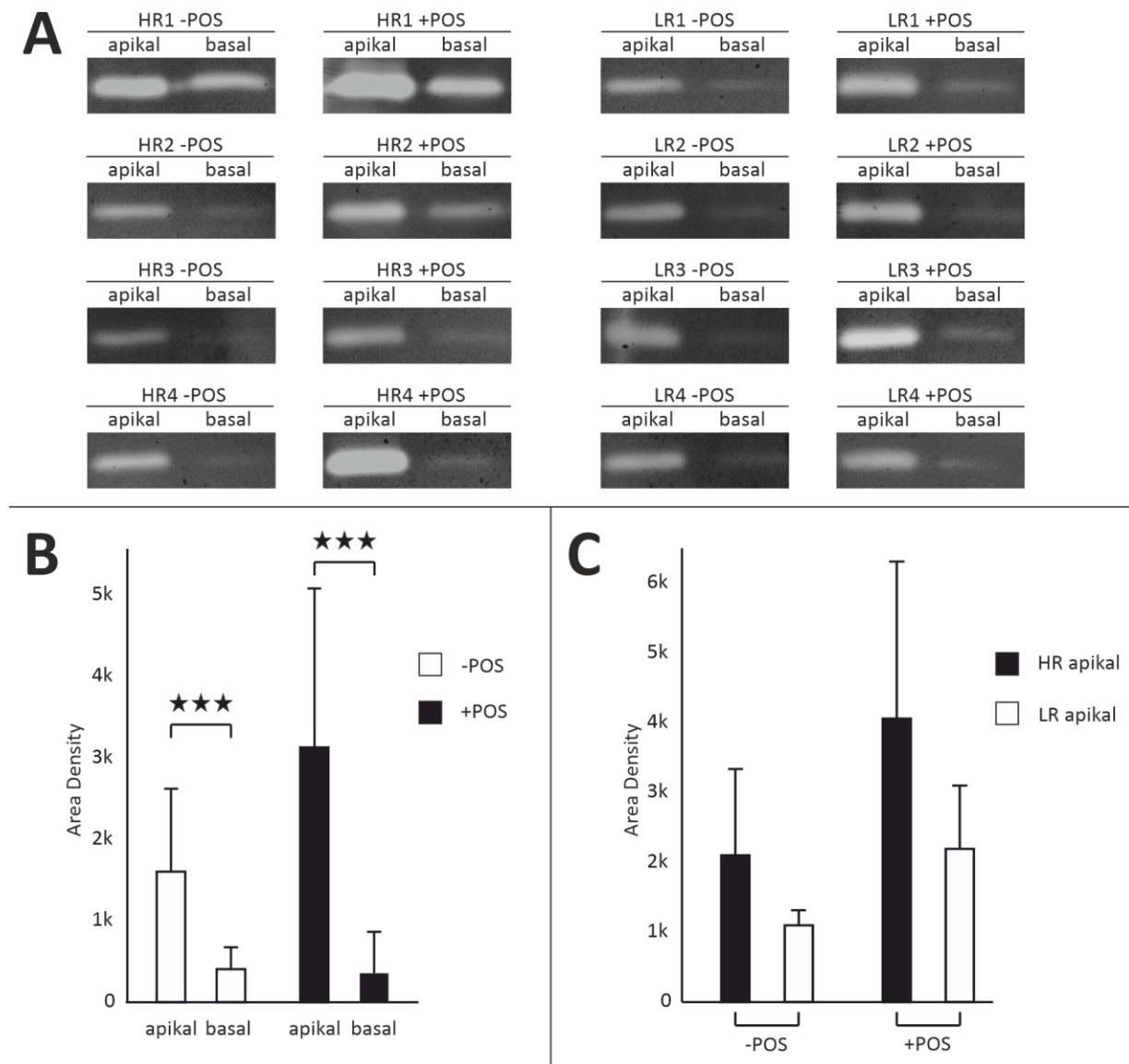


Abbildung 19: Effekt des genetischen Hintergrunds und POS-Fütterung als physiologischen Stressor auf die Sekretion von MMP2 durch hiPSC-RPE. Es wurden 4 Hochrisiko (HR)-Zelllinien und 4 Niedrigisiko (LR)-Zelllinien für 90 Tage auf Transwell Filtereinsätzen kultiviert, ab Tag 42 wurde ein Teil der Zellen (+ vs. -) regelmäßig mit Photorezeptor-Außensegmenten (POS) gefüttert. An Tag 90 der Kultivierung wurde das apikale und basale Medium abgenommen und *via* Gelatine-Zymographie die Aktivität von MMPs im Medium analysiert, in A gezeigt sind repräsentative Aufnahmen dieser Gele. Ausgewertet wurde die mittlere Area Density der Banden, gezeigt sind Mittelwerte mit Standardabweichung. Auf Unterschiede zwischen den Gruppen wurde mit einem Mann-Whitney U-Test getestet. Dabei wurde die gerichtete Sekretion untersucht (B, 8 biologische Replikate pro Gruppe) und der Einfluss des genetischen Risikos und von POS-Fütterung auf die apikale Sekretion (C, 4 biologische Replikate pro Gruppe) (***) $p < 0,001$.

4.3.2 Western-Blot-Analyse der MMPs und ELISA gegen MMP2

Um die in der Zymographie beobachtete Aktivität eindeutig den jeweiligen Enzymen zuordnen zu können und einen Abbau der Gelatine durch andere proteolytische Enzyme mit ähnlichem Molekulargewicht auszuschließen, wurden Western-Blot-Analysen der gesammelten Überstände mit Antikörpern gegen (pro-)MMP2 und (pro-)MMP9 durchgeführt.

Auch bei der Western-Blot-Analyse (Abb. 20) konnte in allen Zelllinien die aktive Form von MMP2 bei 64 kDa nachgewiesen werden, im Gegensatz zur Zymographie wurden teilweise

zusätzlich Banden bei 72 kDa sichtbar, entsprechend dem Molekulargewicht von pro-MMP2. Im Gegensatz zur Zymographie war kein deutlicher Unterschied in der Bandenintensität zwischen dem apikalen und basalen Kompartiment zu erkennen. Schließlich ist auffallend, dass pro-MMP2 Banden vor allem bei den POS-gefütterten Zelllinien zu sehen waren, während bei den entsprechenden Kontrollen nur schwache bis keine Banden sichtbar waren. Aufgrund der relativ schlechten Qualität der Blots und in Ermangelung eines sezernierten Housekeeperproteins wurde hier jedoch keine quantitativ-statistische Analyse der Banden durchgeführt. MMP9 war in der Western-Blot-Analyse im Einklang mit den Ergebnissen der Zymographie weder als Proenzym noch in der aktiven Form nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

Schließlich ist mit der Gelatine-Zymographie nur ein relativer Vergleich der Aktivität der MMP2 möglich, im Gegensatz dazu erlaubt die Untersuchung *via* ELISA mit Normierung auf einen Standard eine Aussage über die absolute Menge von (pro)-MMP2 im Kultivierungsmedium der hiPSC-RPE. Hierfür wurde das Human MMP2 ELISA Kit von Sigma-Aldrich entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Mit dieser Methode konnte jedoch kein Nachweis von (pro)-MMP2 erfolgen und dementsprechend auch keine quantitative Aussage über die absoluten Mengen von (pro)-MMP2 in den Überständen getroffen werden.

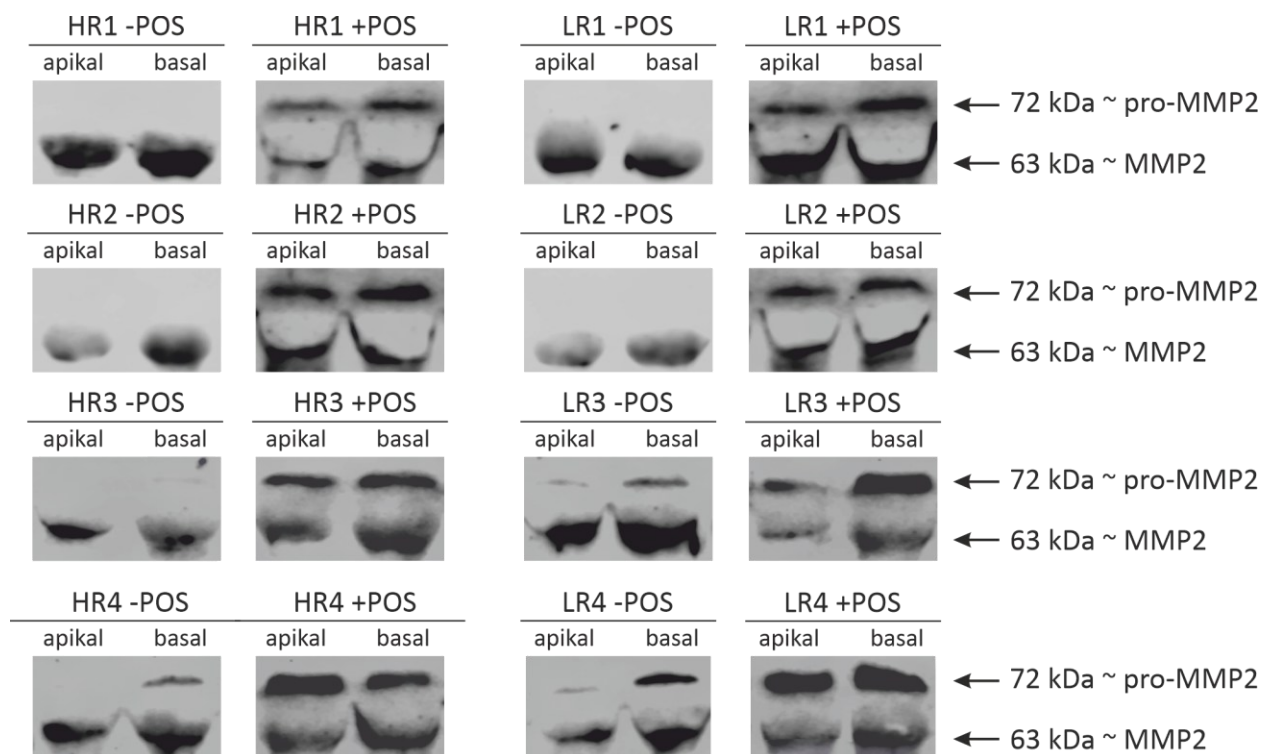


Abbildung 20: Effekt des genetischen Hintergrunds und POS-Fütterung als physiologischen Stressor auf die Sekretion von MMP2 durch hiPSC-RPE. Es wurden 4 Hochrisiko (HR)-Zelllinien und 4 Niedrigisiko (LR)-Zelllinien für 90 Tage auf Transwell Filtereinsätzen kultiviert, ab Tag 42 wurde ein Teil der Zellen (+ vs. -) regelmäßig mit Photorezeptor-Außensegmenten (POS) gefüttert. An Tag 90 der Kultivierung wurde das apikale und basale Medium abgenommen, *via* Western-Blot-Verfahren aufgetrennt und mit Antikörpern gegen (pro)-MMP2 gefärbt.

4.4 Einfluss von POS-Fütterung und des genetischen Hintergrunds auf intrazelluläre mRNA-Expression von Markern für oxidativen Stress, mitochondriale Aktivität und das Komplementsystem

Um den Einfluss des genetischen Risikos und des Stressors POS-Fütterung auf intrazelluläre Signalwege zu analysieren, wurde mithilfe der qRT-PCR die Expression verschiedener AMD-assoziiierter Gene auf mRNA-Ebene untersucht. Die Expression dieser Gene wurde in vorhergehenden Arbeiten am Institut getestet, jedoch konnten bisher keine Unterschiede in der oxidativen Stressantwort zwischen HR- und LR-Zelllinien festgestellt werden, weder unter basalen Kulturbedingungen noch nach artifizieller Stressinduktion mit chemischen Stressoren. Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun eruiert werden, ob die verlängerte Kultivierung, verbunden mit einem Alterungsprozess der Zellen, oder die Langzeitfütterung mit POS mögliche Unterschiede besser zum Vorschein bringt.

Als Marker für oxidativen Stress wurde die Expression der antioxidativen Gene Heme oxygenase 1 (*HMOX1*) und NAD(P)H dehydrogenase (guinone) 1 (*NQO1*) analysiert. Dies sind Zielgene des Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2)-Signalwegs, einem Schlüsselsignalweg der oxidativen Stressantwort in allen Zellarten. Als Marker für das Komplementsystem wurde die Expression von *C3*, einem Gen der Komplementkaskade, und *CFH*, einem regulatorischen Protein des Komplementsystems, untersucht. Zuletzt wurde als Marker für die mitochondriale Aktivität und Integrität die Expression von Cytochrome C Oxidase 4 (*COX4*) betrachtet.

Für die Expressionsanalyse wurde die intrazelluläre RNA aufgereinigt und die komplementäre cDNA synthetisiert. Mit dieser cDNA wurden mithilfe von qRT-PCR und anschließender Auswertung mittels der Delta-Delta C_T Methode die relativen intrazellulären mRNA-Expression der oben beschriebenen Gene analysiert. Der Einfluss des genetischen AMD-Risikos ist in **Abb. 21, A**, der Einfluss der POS-Fütterung in **Abb. 21, B** dargestellt. Bei den Markern für das Komplementsystem führte ein hohes genetisches AMD-Risiko und POS-Fütterung zu einer erhöhten Expression von *C3*, ebenso führten bei den Markern für oxidativen Stress ein hohes genetisches AMD-Risiko und POS-Fütterung zu einer erhöhten Expression von *NQO1*. Diese Unterschiede erreichten jedoch keine statistische Signifikanz, für die anderen Marker (*CFH*, *HMOX1* und *COX4*) zeigten sich keine klaren Tendenzen.

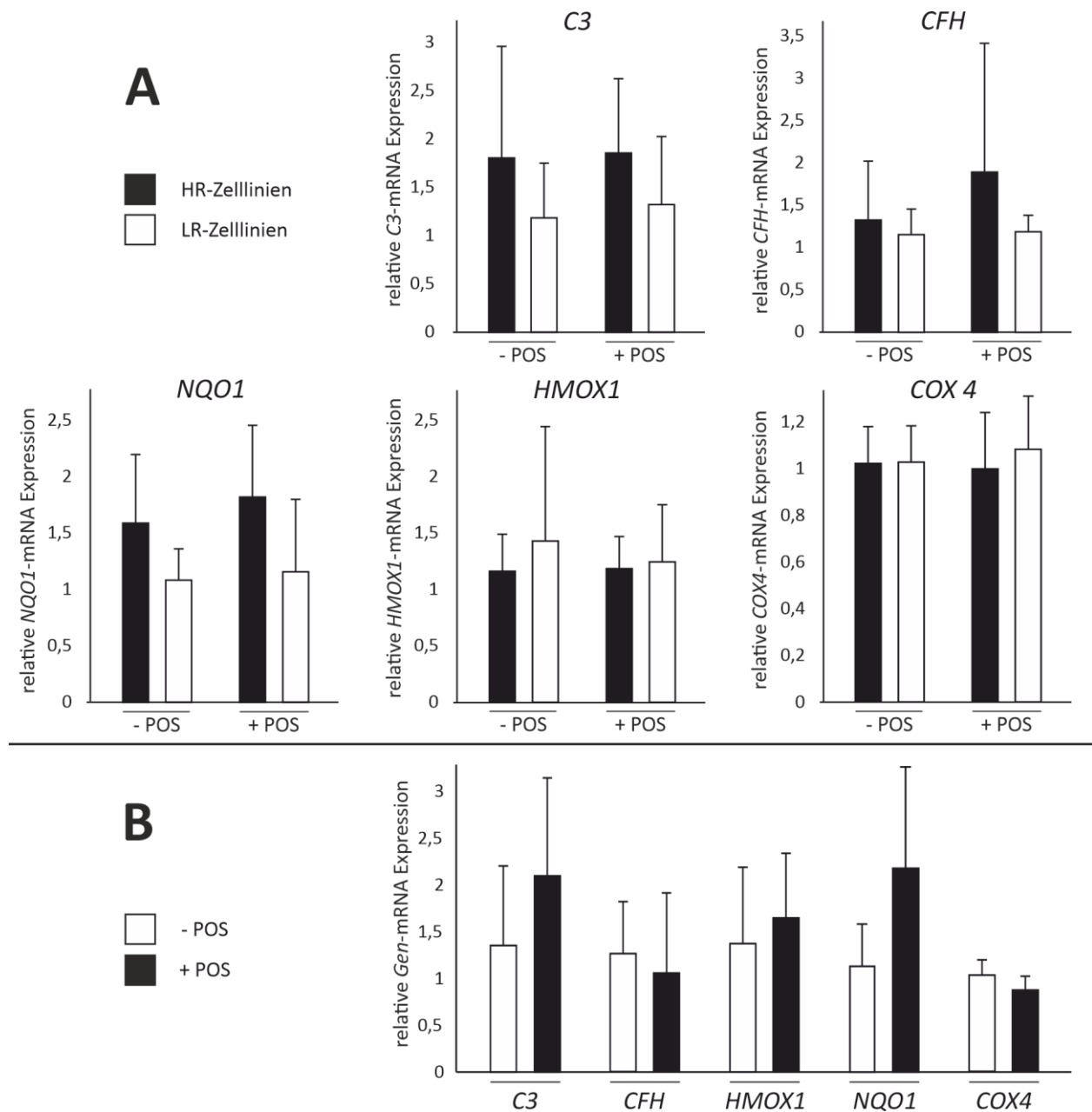


Abbildung 21: Effekt des genetischen Hintergrunds und POS-Fütterung als physiologischen Stressor auf intrazelluläre mRNA-Expression verschiedener Gene. Es wurden 4 Hochrisiko (HR)-Zelllinien und 4 Niedrigrisiko (LR)-Zelllinien für 90 Tage auf Transwell Filtereinsätzen kultiviert, ab Tag 42 wurde ein Teil der Zellen (+ vs. -) regelmäßig mit Photorezeptor-Außensegmenten (POS) gefüttert. Nach 90 Tagen wurde RNA aus den Zellen isoliert, die komplementäre cDNA synthetisiert und mithilfe von qRT-PCR und der Delta-Delta C_T Methode die relative intrazelluläre mRNA-Expression bestimmt, dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung. Auf signifikante Einflüsse des genetischen AMD-Risikos (A) und POS-Fütterung (B) wurde mithilfe einem Mann-Whitney U-Test analysiert, je nach Fragestellung bestehen die analysierten Daten aus 1-2 unabhängigen Experimenten mit je 2-8 biologischen Replikaten (* $p < 0,05$).

5 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Einflüsse des genetischen Hintergrunds von hiPSC-RPE-Zellen und POS-Fütterung, einem physiologischen Stressor, auf verschiedene mit der AMD-Pathogenese assoziierte Prozesse untersucht werden. Zu diesen Prozessen gehört die Bildung einer veränderten EZM und von Drusen (Nita et al., 2014; Fernandez-Godino et al., 2016), die veränderte Sekretion von MMPs (Hussain et al., 2011; García-Onrubia et al., 2020) und eine veränderte Expression von Genen des Komplementsystems (Frederick et al., 2014; Geerlings et al., 2017), der oxidativen Stressantwort (Bellezza, 2018; Ruan et al., 2021) und der mitochondrialen Aktivität (Fisher et al., 2018; Kaarniranta et al., 2020).

Konkret wurde immunhistochemisch die Ablagerung von EZM-Strukturproteinen (FN, Laminin, Elastin, Kollagen V und Kollagen IV) und typischer Bestandteile von Drusen bei AMD-Patienten (TIMP3, VTN, C9, ApoE, β -Amyloid, Crystallin und Lipide) nachgewiesen. Dabei konnten bei FN, Kollagen IV, TIMP3, VTN, C9 und ApoE signifikante Unterschiede aufgrund des genetischen AMD Risikos bzw. der POS-Fütterung festgestellt werden. Weiter wurde mittels der Gelatine-Zymographie die Aktivität von MMPs bestimmt, hier zeigte sich eine differenzielle MMP2-Aktivität abhängig von der Sekretionsrichtung mit einer höheren Aktivität im apikalen Kompartiment und Hinweise auf eine gesteigerte Aktivität von MMP2 bei höherem genetischem AMD-Risiko und POS-Fütterung. Zuletzt wurde die Expression des *C3*- und *CFH*-Gens als Marker für das Komplementsystem, des *HMOX1*- und *NQO1*-Gens als Marker für die oxidative Stressantwort und des *COX4*-Gens als Marker für die mitochondriale Aktivität und Integrität auf mRNA-Ebene untersucht. Hier hatten jedoch weder das genetische Risiko noch POS-Fütterung als Stressor einen signifikanten Einfluss auf die Expression, lediglich für *C3* und *NQO1* zeigte sich die Tendenz zu einer höheren Expression bei hohem genetischem AMD-Risiko bzw. durch den Stressor POS-Fütterung.

5.1 Untersuchung der hiPSC-RPE Qualität und Verifizierung der POS-Phagozytose

Die Gewinnung der am Institut für Humangenetik Regensburg für diese Arbeit verwendeten hiPSC-RPE-Zellen, sowie deren Ähnlichkeit zu den Zellen des RPE *in vivo* hinsichtlich struktureller und funktioneller Eigenschaften sind im Detail in der Publikation von Brandl und Kollegen beschrieben (Brandl et al., 2014). Da die Validität des hiPSC-RPE Zellkulturmodells darauf beruht, dass die Merkmale der Zellen und Reaktionen auf verschiedene Stimuli möglichst nahe denen des nativen RPE sind (Bharti et al., 2011), wurden auch in dieser Arbeit verschieden molekulare und funktionale Eigenschaften der hiPSC-RPE untersucht. Die hierzu durchgeführte TEER-Messung ist zwar von vielen Variablen, wie der Anzahl der Zellpassagen

und Dauer der Zellkultur oder auch der Temperatur und Elektrodenpositionierung, abhängig, dennoch stellt sie eine einfache, zellerhaltende Methode zur Bestimmung der Barrierefunktion von Epithelien wie dem RPE dar, die vor allem eine qualitative Aussage, weniger jedoch eine quantitative Aussage erlaubt (Brandl et al., 2014; Srinivasan et al., 2015). Die in dieser Arbeit gemessenen Widerstände sind in der für RPE-Zellen üblichen Größenordnung (Singh et al., 2013; Galloway et al., 2017). Zudem konnte die für das RPE jeweils typische Expression von ZO-1 (Stevenson et al., 1986; Tarau et al., 2019) bzw. BEST1, β -Catenin und ATP1A1 (Marmorstein et al., 2000; Brandl et al., 2014) gezeigt werden. Es kann also davon ausgegangen werden, dass es sich bei den für die Experimente verwendeten Zellen um hochdifferenzierte hiPSC-RPE handelte, die ein valides Modellsystem für die RPE-Zellen *in vivo* darstellen. Dieses Zellsystem bietet zudem klare Vorteile gegenüber anderen Modellsystemen, wie z. B. verschiedenen Mausmodellen, so ist unter den stark kontrollierten Kultivierungsbedingungen die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse höher und es ist besser möglich, Veränderungen der Ergebnisse direkt mit gezielten Eingriffen oder dem genetischen Hintergrund zu korrelieren (Forest et al., 2015; Malek et al., 2018). Weiter kann durch die Verwendung von humanen Zelllinien ein Einfluss von genetischen und physiologischen Unterschieden zwischen den Arten vermieden werden (Hornof et al., 2005). Gleichzeitig muss jedoch auch auf die daraus entstehenden Limitationen hingewiesen werden, so fehlt in der Zellkultur jeglicher systemischer Einfluss auf die RPE-Zellen durch umliegende Gewebe und im Serum enthaltene Faktoren (Forest et al., 2015; Malek et al., 2018). Zudem ist das chronologische Alter des RPE, mit den entsprechend bedingten Veränderungen, bei Krankheitsbeginn um ein Vielfaches höher als die Differenzierungsdauer der hiPSC-RPE. Dies wurde in dieser Arbeit zumindest durch eine verlängerte Kultivierungsdauer berücksichtigt, die finale Ausreifung der Zellen auf Transwellinserts wurde auf über 90 statt der am Institut üblichen 42 Tage erweitert.

Lipofuszinbildung wird im RPE zu großen Teilen durch POS-Phagozytose induziert (Birch et al., 2007). Bei den POS-exponierten Zelllinien war auch nach mehreren Waschschritten die Färbung gegen Rhodopsin positiv, es kann also von einer effizienten Phagozytose der POS durch die hiPSC-RPE ausgegangen werden. Diese Fähigkeit bestätigt zum einen zusätzlich die Ähnlichkeit der *in vitro* Zellkultur zu den nativen RPE-Zellen (Kwon et al., 2020), außerdem war diese Färbung auch 3-5 Tage nach der letzten Fütterung positiv. Zu diesem Zeitpunkt sollte der Abbau der POS schon weitestgehend abgeschlossen sein, dies könnte also für eine phagolysosomale Akkumulation der POS ähnlich zur Bildung von Lipofuszin *in vivo* sprechen (z. B. auch gezeigt von Singh et al., 2015). Diese Akkumulation in den hiPSC-RPE könnte

somit, neben dem direkten metabolischen und oxidativen Stress bei der Phagozytose (Chen et al., 2016), ein Erklärungsansatz für die durch POS-Fütterung induzierten Unterschiede in den nachfolgenden Experimenten darstellen. Durch Verwendung von modifizierten POS, die deren Abbau weiter erschweren, könnte in zukünftigen Untersuchungen dieser Effekte der phagolysosomalen Akkumulation noch weiter verstärkt werden (Sundelin et al., 1998; Kaemmerer et al., 2007).

5.2 Einfluss des genetischen Hintergrunds und von POS-Fütterung auf die immunhistochemische Analyse der EZM von hiPSC-RPE

Bei AMD-Patienten kommt es zu vielen Veränderungen der EZM der BrM, so kommt es zu einer diffusen Verdickung durch Ablagerung verschiedener Lipide und Proteine, dieses Material aggregiert außerdem lokal zu AMD typischen Drusen (Fernandez-Godino et al., 2016; Curcio, 2018a). Auch wenn die AMD-Pathologie die funktionelle Einheit aus Retina, RPE und Choriocapillaris betrifft, wird der Ort der primären Läsion auf Ebene des RPE vermutet (Zarbin, 2004). Abzielend auf ein tieferes Verständnis der durch das RPE gebildeten EZM wurde, wie auch schon durch andere Arbeitsgruppen, die durch hiPSC-RPE gebildete EZM untersucht. Dazu wurde immunhistochemisch gegen Strukturproteine der EZM (FN, Laminin, Elastin, Kollagen V und IV) und verschiedene, typische Bestandteile von Drusen (TIMP3, VTN, C9, ApoE, β -Amyloid, Crystallin und Lipide) gefärbt, da bekannt ist, dass RPE-Zellen *in vitro* in der Lage sind drusenähnliche Ablagerungen zu bilden (Johnson et al., 2011; Galloway et al., 2017; Pilgrim et al., 2017). Im Gegensatz zu den meisten vorherigen Arbeiten zur EZM wurde es durch Integration von Zelllinien hohen und niedrigen genetischen Risikos im Rahmen dieser Arbeit möglich, nicht nur den Effekt exogener Stressoren (z. B. Johnson et al., 2011; Fernandez-Godino, Bujakowska, et al., 2018) und von starken genetischen Veränderungen, wie dominanten Mutationen (z. B. Galloway et al., 2017) und Knock-Outs (z. B. Chinchilla et al., 2021), zu untersuchen, sondern den wesentlich feineren und komplexen genetischen Einfluss multipler, krankheitsassoziierter genetischer Varianten bei der AMD abzubilden.

Signifikante Unterschiede in den analysierten Parametern durch POS-Fütterung gab es bei den Färbungen gegen FN, Kollagen IV, TIMP3, VTN, C9 und ApoE, während das genetische Risiko nur zu signifikanten Unterschieden in zwei der Färbungen, gegen TIMP3 und ApoE, führte. Dies legt nahe, dass in dem betrachteten Modellsystem die POS-Fütterung als implementierter Stressor einen wesentlich stärkeren Effekt auf die EZM Homöostase der hiPSC-RPE ausübt als der genetische Hintergrund der Zelllinien. Außerdem auffällig ist auch, dass Unterschiede begründet im genetischen Risiko lediglich in der POS-gefütterten Gruppe

vorhanden waren. In Einklang mit der verbreiteten Auffassung von AMD als Folge von kumulativem Stress über lange Zeit könnte es also sein, dass die genetischen Einflüsse auf die EZM Homöostase von ungestressten Zellen nur sehr gering oder gar nicht vorhanden sind, ein geeigneter Stressor diese Unterschiede jedoch verstärkt oder sogar erst triggert. Auch andere Gruppen konnten das Auftreten von Veränderungen in AMD-assoziierten Zelllinien teilweise erst durch die Implementation eines Stressors nachweisen (Golestaneh et al., 2016; Saini et al., 2018; Gong et al., 2020). Denkbar wäre also, dass eine verstärkte Fütterung mit POS diese Unterschiede noch prominenter werden lässt bzw. es besteht die Möglichkeit, dass für die untersuchten Proteine, bei denen sich kein Einfluss des Risikos zeigte, lediglich der Stressor inadäquat war. So kommen Lu und Kollegen zu dem Schluss, dass verschiedene Induktoren von oxidativem Stress zu einem unterschiedlichen Schädigungsmuster an RPE-Zellen führen (Lu et al., 2006) und schlussendlich auch über differenzielle Mechanismen zum Zelltod führen (Tong et al., 2020). Eine Wiederholung der entsprechenden Experimente mit verschiedenen AMD-assoziierten Stressoren in unterschiedlichen Intensitäten könnte hier Klarheit verschaffen. Weiter konnten Pilgrim und Kollegen nachweisen, dass mit zunehmender Kulturdauer die drusenähnlichen Ablagerungen unter RPE-Zellen *in vitro* nach 4-6 Wochen kaum vorhanden sind, über den Zeitraum von 12 bis 26 Wochen jedoch immer weiter zunehmen und sich in ihrer Zusammensetzung verändern (Galloway et al., 2017; Pilgrim et al., 2017). Dementsprechend sollte eine Analyse der Auswirkung des genetischen AMD-Risikos auf die EZM zu verschiedenen Zeitpunkten in Betracht gezogen werden. So ist es denkbar, dass bei stärker gealterten Zellen die Unterschiede deutlicher hervortreten und dass das Wissen über den zeitlichen Ablauf zu einem tieferen Verständnis der Kausalitäten für die EZM-Veränderungen beiträgt.

Bei den untersuchten Strukturproteinen der EZM wurden signifikante Unterschiede für FN und Kollagen IV gezeigt. Bei FN führte POS-Fütterung zu einer signifikanten Verringerung der mittleren Intensität und der Partikelzahl. Es scheint also, als würde der im Modell implementierte Stress zu einer verminderten Produktion und Organisation von FN durch hiPSC-RPE führen. Bei der Bildung der EZM ist FN eine der zuerst gebildeten Komponenten. *In vitro* Studien haben ergeben, dass der Einbau anderer Proteine in die EZM von einer zuvor gebildeten FN Matrix abhängt (Sottile et al., 2002; Kadler et al., 2008). So wäre es denkbar, dass eine verminderte, unorganisierte Bildung der FN Matrix einen frühen Schritt in der Bildung einer dysfunktionalen, pathologischen EZM und Proteinakkumulation darstellt, wie sie bei AMD-Patienten zu sehen sind. Weiter nimmt mit dem Alter der Anteil von FN an der Basallamina des RPE ab (Pauleikhoff et al., 2000), auch dies könnte mit der verminderten

Produktion durch die mit zunehmendem Alter gestressten Zellen des RPE begründet sein. Auch Godino und Kollegen haben gezeigt, dass gestresste RPE-Zellen (hier durch Kultivierung auf abnormer EZM) vermindert FN ablagern (Fernandez-Godino, Bujakowska, et al., 2018). Andererseits stehen diese Daten im Widerspruch zu Ergebnissen anderer Gruppen, dass RPE-Zellen von AMD-Patienten mehr als doppelt so viel FN transkribieren bzw. sezernieren (An et al., 2007; Gong et al., 2020). Es könnte demnach sein, dass der verminderten FN Ablagerung nicht eine mangelnde Produktion durch das RPE, sondern eine gestörte Integration in die EZM oder ein verstärkter Abbau zu Grunde liegen. Zudem ist zu berücksichtigen, dass das RPE *in vivo* kein isoliertes System darstellt. So spielt zum Beispiel eine gesteigerte FN Expression der Choroidea eine zentrale Rolle bei der Entstehung von CNVs in CNV-Mausmodellen (Zhao et al, 2024). Dies verdeutlicht gleichzeitig die Limitationen aber auch die Notwendigkeit von Modellsystemen, wie den hier verwendeten hiPSC-RPE, um diese differenziellen Unterschiede präzise zu erfassen und herauszuarbeiten.

Bei der Färbung gegen Kollagen IV zeigte sich in den LR-Zelllinien nach POS-Fütterung eine signifikant verringerte Partikelgröße. Dies steht im Einklang mit Daten, dass auch der Anteil von Kollagen IV an der Basallamina des RPE mit dem Alter abnimmt (Pauleikhoff et al., 2000) und der Notwendigkeit einer bestehenden FN-Matrix für die Ablagerung von Kollagen IV (Miller et al., 2014). Dieser Effekt eines Stressors auf die Kollagen IV Ablagerung steht jedoch im Widerspruch zu den Ergebnissen vergleichbarer Arbeiten (Galloway et al., 2017; Fernandez-Godino, Pierce, 2018; Chinchilla et al., 2021) und die zugrundeliegenden Färbungen sind subjektiv-morphologisch sowie objektiv-quantitativ nicht von den dazugehörigen Kontrollen abgrenzbar. Dementsprechend stellt sich die Frage, ob es sich hier lediglich um zufällige, unspezifische Ergebnisse handelt, sodass vor Schlussfolgerungen über die Beteiligung von Kollagen IV an der AMD-Pathogenese eine Wiederholung der Experimente notwendig ist. Dabei sollten vor allem die Bedingungen der ICC-Färbungen optimiert werden, um eine spezifische Anfärbung von Kollagen IV sicherzustellen.

Bei den untersuchten AMD-typischen Drusenkomponenten wurden signifikante Unterschiede für TIMP3, VTN, C9 und ApoE festgestellt. Bei TIMP3 zeigte sich dabei in der EZM Färbung ein Einfluss des genetischen Risikos in den POS-gefütterten Zelllinien. Im Gegensatz dazu führte in der Drusen-Färbung POS-Fütterung zu einer Erhöhung der Mittleren Intensität in den LR-Zelllinien, während das genetische Risiko keinen Einfluss hatte. Das könnte bedeuten, dass das genetische Risiko vor allem einen Einfluss auf die Integration von TIMP3 in die EZM hat, während der Stressor POS-Fütterung vermehrt auf die Bildung von drusenähnlichen

Ablagerungen wirkt. Da alle verwendeten Zelllinien homozygot für die bekannte AMD-assoziierten Risikovarianten im *TIMP3*-Lokus sind (**Abb. 2**), ist zudem anzumerken, dass die genetisch bedingten Unterschiede zwischen den HR- und LR-Zelllinien durch den Einfluss des weiteren genetischen Kontexts entstehen und nicht primär durch Varianten im *TIMP3* Gen. Dies passt zu der komplexen Natur der AMD und könnte bedeuten, dass Risikovarianten in unterschiedlichen Genen über ähnliche Mechanismen zur Krankheitsentstehung führen. *TIMP3* wirkt inhibitorisch auf MMPs, deren Aktivität für den EZM Abbau im Rahmen von Einsprossung neuer Gefäße bei NV-AMD essenziell zu sein scheint (Berglin et al., 2003; Lambert et al., 2003). Zudem hat *TIMP3* einen direkt antiangiogenen Effekt durch kompetitive Hemmung der Bindung von VEGF an den VEGF-Rezeptor (Qi et al., 2003, 2013). *TIMP3* kommt somit mutmaßlich eine entscheidende Rolle darin zu, eine pathologische NV der Retina zu verhindern. Dafür spricht auch, dass Nielsen und Kollegen zeigen konnten, dass bei NV-AMD-Patienten der *TIMP3* Spiegel und das *TIMP3*/MMP2-Verhältnis im Serum im Vergleich zu gesunden Probanden bzw. GA-AMD-Patienten erniedrigt sind (Krogh Nielsen et al., 2019). Passend dazu präsentierten die HR-Zelllinien, die alle von NV-AMD-Patienten stammen, in der EZM Färbung verminderte Signale für *TIMP3*, insbesondere eine verringerte Partikelgröße und -zahl. Andererseits ergaben diverse Studien, dass der *TIMP3* Gehalt der BrM bei AMD und phänotypisch ähnlichen Makuladystrophien wie z. B. SFD erhöht ist (Kamei et al., 1999; Christensen et al., 2017), zudem ist *TIMP3* auch ein prominenter Bestandteil der für AMD charakteristischen Drusen (Crabb, 2014). Passend hierzu führte POS-Fütterung zu einer erhöhten Fluoreszenz in den LR-Zelllinien. Zusammenfassend muss gesagt werden, dass es vielfältige Daten gibt, die auf eine Dysregulation der MMPs und TIMPs in der AMD-Pathogenese hinweisen, jedoch deuten diese teilweise in entgegengesetzte Richtungen (Guo et al., 1999; Kamei et al., 1999; Lambert et al., 2003; Hussain et al., 2011; Krogh Nielsen et al., 2019). Begründet ist dies womöglich in der untersuchten Region der Retina (Makula vs. Peripherie), den analysierten Proben (BrM, Interphotorezeptormatrix, Serum), dem Stadium und der Spätform, was eine profunde Einordnung der in dieser Arbeit auftretenden Unterschiede jedoch nur schwer möglich macht.

VTN nimmt durch seine zahlreichen Interaktionspartner unter anderem Einfluss auf Angiogenese, das Komplementsystem und den Umsatz der EZM (Schvartz et al., 1999; Leavesley et al., 2013). Eine grundlegende Beteiligung dieser Prozesse an der AMD-Pathogenese und eine Akkumulation von VTN in Zellen des RPE und Drusen *in vivo* und *in vitro* implizieren eine Rolle von VTN im Krankheitsgeschehen (Johnson et al., 2001; Crabb, 2014; Galloway et al., 2017). Auch Gong und Kollegen konnten eine erhöhte Expression von

VTN in hiPSC-RPE von AMD-Patienten nachweisen (Gong et al., 2020). In meiner Arbeit blieb der genetische Hintergrund ohne Einfluss auf die VTN Färbungen, hingegen führte der Stressor POS-Fütterung zu einer signifikanten Erhöhung der mittleren Intensität in der EZM Färbung. Andererseits führte POS-Fütterung zu keinen Unterschieden in der Drusen-Färbung. Dies impliziert, dass POS-Fütterung zunächst nur einen Einfluss auf die Ablagerung von VTN in die EZM, nicht jedoch die Bildung von Drusen hat und es eventuell erst sekundär zu einer Inkorporation von VTN in Drusen kommt. Ähnlich dazu haben Pilgrim und Kollegen gezeigt, dass nach einer zu der in meiner Arbeit vergleichbaren Kultivierungsdauer die RPE-Zellen vor allem diffus verteilte und nur wenig drusenähnliche Ablagerungen bilden, während nach 190 Tagen reichlich drusenartige Ablagerungen zu sehen sind. Eine Wiederholung meiner Untersuchungen zu einem vergleichbar späten Zeitpunkt könnte hier aufschlussreich sein. Dabei sollte zudem beachtet werden, dass die hier verwendeten hiPSC-RPE Zelllinien eine heterogene Verteilung bezüglich der *p.T400M* Risikovariante im *VTN*-Gen aufweisen (**Abb. 2**). Für diese genetische Variante konnten Biasella und Kollegen eine gesteigerte Sekretion und EZM-Ablagerung von VTN in ARPE-19 Zellen, eine vom RPE abstammende Zelllinie, nachweisen (Biasella et al., 2020). Dies sollte in zukünftigen Versuchen zu VTN Ablagerungen in der Planung und statistischen Auswertung berücksichtigt werden.

Weiter ergaben die Färbungen gegen C9 eine Erhöhung der Mittleren Intensität und der Partikelzahl durch POS-Fütterung. Diese vermehrte Ablagerung unter Stressbedingungen passt zu der erhöhten Expression von Komplementfaktoren durch iPSC-RPE *in vitro* und Ablagerung von diversen Komplementfaktoren, insbesondere C9, als Bestandteil von Drusen (Crabb et al., 2002; Crabb, 2014; Saini et al., 2018). Die Herkunft der Komplementbestandteile von Drusen *in vivo* ist nicht abschließend geklärt, umso interessanter ist die hier gezeigte Ablagerung von C9 durch die hiPSC-RPE, zudem gesteigert durch POS-Fütterung. Dies impliziert, dass diese Komplementbestandteile von Drusen zumindest in Teilen vom RPE selbst und nicht zwingend aus dem Serum, von Zellen des Immunsystems oder der Choroidea stammen, wie teilweise angenommen (Penfold et al., 2001; Curcio, 2018b). Entsprechend wäre es interessant mit den in dieser Arbeit etablierten Methoden zu untersuchen, ob auch andere Proteine des Komplementsystems von den hiPSC-RPE in die EZM abgelagert werden. Insbesondere C3 und C5 wären potenzielle Kandidaten, da die Wirksamkeit ihrer Inhibitoren bei der GA-AMD eine wesentliche Rolle in der Pathogenese nahelegen (Heier et al, 2023; Khanani et al, 2023).

Schließlich zeigte die Färbung gegen ApoE, dass in der POS-gefütterten Gruppe ein erhöhtes AMD Risiko zu einer signifikanten Verringerung von Mittlerer Intensität, Partikelgröße und -

zahl führt. Für die genetische Variante *p.C112R* sind alle Zelllinien homozygot für die Risikovariante, während für die *p.R158C* Variante der Großteil homozygot für die nicht-Risikovariante ist und LR 2 und LR 4 heterozygot sind (**Abb. 2**). Diese relativ homogene Genetik im *APOE*-Gen sowie das Auftreten der Tendenzen auch in LR 1 und LR 3 lassen auch hier eher einen Einfluss des übrigen genetischen Kontexts vermuten. ApoE ist bei AMD-Patienten ein prominenter Bestandteil der erkrankungstypischen Drusen (Crabb et al., 2002; Wang et al., 2010). Passend dazu konnten Galloway und Kollegen in hiPSC-RPE-Zellen von phänotypisch AMD-ähnlichen Makuladegenerationen eine erhöhte ApoE Ablagerung nachweisen (Galloway et al., 2017). Auch bei den HR-Zelllinien würde man dementsprechend im Kontrast zu den hier erlangten Ergebnissen eine gesteigerte Partikelgröße und -zahl erwarten. Gründe für diese widersprüchlichen Ergebnisse könnten die *in vitro* Bedingungen sein, die von den physiologischen Bedingungen *in vivo* offensichtlich abweichen. So konnten Pilgrim und Kollegen zeigen, dass Unterschiede der Oberflächenbeschaffenheit des in der Zellkultur verwendeten Transwellfilters zu signifikanten Veränderungen in der Morphologie der ApoE-Ablagerungen führen (Pilgrim et al., 2017). Variationen der gewählten Bedingungen, wie Kultivierungsdauer, Stressor und Intensität des Stressors, könnten dazu beitragen, die physiologischen Bedingungen *in vivo* besser abzubilden. So führte in anderen Arbeiten z. B. oxidativer Stress durch ROS zu einer verminderten ApoE Sekretion durch RPE-Zellen (Meyer et al., 2019), während Stress durch Aktivierung des Komplementsystems zu einer gesteigerten ApoE Akkumulation beiträgt (Yang et al., 2017).

5.3 Einfluss des genetischen Hintergrunds und von POS-Fütterung auf die Sekretion von MMPs durch die hiPSC-RPE

Zur EZM Homöostase gehört ein fein-reguliertes Wechselspiel von Auf- und Abbau der Matrixkomponenten. Dementsprechend gibt es Hinweise, dass an den bei AMD-Patienten beobachteten EZM-Veränderungen auch ein dysregulierter, proteolytischer Abbau beteiligt ist. Maßgeblich an diesem EZM-Umsatz beteiligt ist die Enzymfamilie der MMPs, die deshalb im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde. Es konnte mit Gelatine-Zymographie und mithilfe von Western-Blot-Analyse die aktive Form von MMP2 im apikalen und basalen Überstand der hiPSC-RPE nachgewiesen werden, während das für MMP9 mit keinem der Verfahren gelang. Dies stimmt mit bereits veröffentlichten Daten überein, im Allgemeinen wird eine deutliche MMP2-Sekretion beobachtet, während keine oder nur geringe Mengen von MMP9 im Überstand von RPE-Zellen gefunden werden (Eichler et al., 2002; Hoffmann et al., 2006; Juuti-Uusitalo et al., 2015). Weiter konnte gezeigt werden, dass die hiPSC-RPE eine apikal wesentlich stärkere, proteolytische Aktivität von MMP2 aufweisen, auch dies steht im Einklang

mit vorherigen Arbeiten (Padgett et al., 1997; Greene et al., 2017). Jedoch könnte Grund hierfür auch der Filtereinsatz als mechanische Barriere sein, der eine Diffusion in das basale Kompartiment verhindert. Zwar haben Padgett und Kollegen belegt, dass bei einer Porengröße von 3 µm MMP2 nahezu frei durch die Einsätze diffundieren kann (Padgett et al., 1997), die in meiner Arbeit verwendeten Filter haben mit 0,4 µm aber zum einen wesentlich kleinere Poren, des Weiteren kommt es auch zu Ablagerungen von EZM und Lipiden durch die hiPSC-RPE in die Poren, was eine Diffusion weiter erschwert (Pilgrim et al., 2017).

Bei NV-AMD-Patienten scheint eine erhöhte Aktivität von MMPs signifikant zum Einwachsen der neuen Gefäße beizutragen. Bei NV-AMD-Patienten ist das MMP2/TIMP3 Verhältnis im Serum signifikant erhöht (Krogh Nielsen et al., 2019) und auch in NV-AMD Mausmodellen konnte eine klare Beteiligung von MMP2 an der Entstehung von CNVs gezeigt werden (Kvanta et al., 2000; Berglin et al., 2003; Lambert et al., 2003). Zudem berichteten An und Kollegen über eine gesteigerte MMP2 Sekretion in primären RPE-Zellen von AMD-Patienten (An et al., 2007). Passend dazu präsentierten die HR-Zelllinien in dieser Arbeit eine erhöhte Aktivität von MMP2 im apikalen Kompartiment. Außerdem führte in den HR- wie auch in den LR-Zelllinien die POS-Fütterung zu einer Erhöhung der MMP2-Aktivität im apikalen Überstand, wiederum ein Hinweis darauf, dass die RPE-Zellen auf Stress im Zuge der AMD-Pathogenese mit einer veränderten MMP2 Sekretion reagieren könnten. Diese erhöhte MMP2 Produktion konnte auch für andere, AMD-typische Stressoren wie oxidativen Stress, Zytokine, Komplementfaktoren und mechanische Schädigung belegt werden (Eichler et al., 2002; Marin-Castaño et al., 2005; Wang et al., 2012; Greene et al., 2017; Fernandez-Godino, Pierce, 2018). Somit wäre es denkbar, dass durch eine Inhibition der in den NV-AMD-Patienten verstärkten MMP Expression der Krankheitsfortschritt gebremst werden könnte, Studien mit entsprechenden Medikamenten sind bis jetzt jedoch nur wenig erfolgreich (Liva et al., 2019). Hier muss bedacht werden, dass die proteolytische Aktivität von MMPs nicht nur am Umbau der EZM bei Neovaskularisation beteiligt ist, sondern auch der übermäßigen Akkumulation von extrazellulärem Material, wie es bei AMD-Patienten der Fall ist, entgegenwirkt. So konnten z. B. Amin und Kollegen zeigen, dass MMP2 die Bildung von drusenartigen Ablagerungen unter RPE-Zellen *in vitro* signifikant reduziert (Amin et al., 2004). Abschließend muss jedoch beachtet werden, dass bei der Zymographie während der Elektrophorese die MMPs von ihren endogenen Inhibitoren, den TIMPs, getrennt werden. Das heißt der in dieser Arbeit gesteigerten Aktivität von MMP2 bei hohem genetischen AMD-Risiko bzw. durch POS-Fütterung wird im Überstand der Zellen womöglich durch eine gesteigerte Konzentration der TIMPs entgegengewirkt, sodass die Nettoaktivität unverändert bleibt. Für mehr Klarheit ist

dementsprechend eine Aktivitätsanalyse in den Überständen ohne vorherige Auftrennung durchzuführen oder zusätzliche eine Analyse der TIMPs in den Überständen, z. B. *via* ELISA, nötig. Zusammenfassend ist somit unbedingt ein tieferes Verständnis des komplexen Systems aus MMPs und TIMPs, auf welchen Mechanismen die reaktiven Veränderungen der Sekretion beruhen und welche Rolle sie in der AMD-Pathogenese spielen, notwendig.

Die Western-Blot-Analyse von MMP2 steht teilweise im Widerspruch zu den Resultaten der Gelatine-Zymographie. Zum einen waren hier, vor allem bei den POS-gefütterten Zelllinien, pro-MMP2 Banden zu erkennen. Da es bei der Zymographie aber nur zu einer partiellen Aktivierung des Proenzym mit nur ca. 35% der Aktivität kommt (Ren et al., 2017), ist es denkbar, dass hier zwar durchaus eine gewisse Proteolyse der Gelatine stattfindet, diese jedoch unter der Detektionsgrenze bleibt. Zudem war in den Western-Blots kein klarer Unterschied der Proteinmenge abhängig von der Sekretionsrichtung zu sehen, dies könnte Folge der unterschiedlichen Nachweisprinzipien sein. Während bei der Western-Blot-Analyse ein reiner Nachweis des antigenen Epitops, korrelierend mit der Proteinmenge, erfolgt, ist für die Zymographie zudem die proteolytische Funktionalität essenziell. Das könnte bedeuten, dass den in der Zymographie beobachteten Unterschieden zwischen dem apikalen und basalen Überstand kein absoluter Mengenunterschied des Proteins zugrunde liegt, sondern ein Unterschied im Aktivierungsgrad der Enzyme. Gründe für solche Aktivitätsunterschiede von MMP2 sind vielfältig, sie können z. B. durch Phosphorylierung, Glykosylierung oder sonstige posttranslationale Modifikation des Proteins entstehen (Jacob-Ferreira et al., 2013; Madzharova et al., 2019). Des Weiteren schien bei der Western-Blot-Analyse auch das genetische AMD-Risiko keinen eindeutigen Einfluss auf die Bandenintensität zu haben, die Aktivitätsunterschiede in der Zymographie könnten demnach auch hier in einer veränderten Funktionalität und Aktivierung von MMP2, abhängig vom genetischen AMD-Risiko, begründet sein. Durch POS-Fütterung sieht man hingegen in der Western-Blot-Analyse deutliche Unterschiede, so ist die pro-MMP2 Bande bei den nicht gestressten Zelllinien nicht oder nur schwach zu erkennen, während sie bei allen POS-gefütterten Zelllinien deutlich hervortritt. Dies könnte dafür sprechen, dass die in der Zymographie beobachtete Zunahme der MMP2-Aktivität durch POS-Fütterung nicht nur in einer veränderten Funktionalität und Aktivität, sondern auch in einer vermehrten Sekretion des Proenzym und anschließenden Aktivierung zum reifen Enzym begründet ist. Um diesen Hypothesen weiter nachzugehen, wäre es sinnvoll zum einen die zugrunde liegenden Experimente zu replizieren, um die beobachteten Ergebnisse zu verifizieren. Des Weiteren sollte für die genauere Einordnung eine Bestimmung der absoluten Proteinmengen durchgeführt werden, indem z. B. die ELISA Bedingungen

optimiert werden oder beim Western-Blot Referenzproben mit definierter Proteinmenge geladen werden.

5.4 Einfluss des genetischen Hintergrunds und von POS-Fütterung auf die Expression AMD-assoziierter Gene

Eine chronische Überaktivierung des Komplementsystems scheint ein entscheidender Faktor in der AMD-Pathogenese zu sein (Frederick et al., 2014; Geerlings et al., 2017). Das Auge ist dabei in gesunden Personen ein immunprivilegiertes Organ, sodass das RPE eine der Hauptquellen für die Proteine des Komplementsystems darstellt (Xu et al., 2016). Studien haben belegt, dass RPE-Zellen von AMD-Patienten und ähnlichen degenerativen Makulaveränderungen bzw. unter Einfluss verschiedener AMD-assoziierter Stressoren eine differentielle Expression verschiedener Gene des Komplementsystems aufweisen (McHarg et al., 2016; Galloway et al., 2017; Saini et al., 2018). In den hier präsentierten Ergebnissen zeigte sich eine erhöhte Expression des *C3*-Gens bei den Zelllinien mit hohem genetischen Risiko für AMD, dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant. Genauso führte POS-Fütterung zu einem Anstieg der *C3*-Expression. Für das regulatorische Protein CFH zeigten sich keine Trends. Dies könnte bedeuten, dass die genetische Suszeptibilität für AMD und POS-Fütterung keinen oder einen nur geringen Einfluss auf die Expression dieser beiden Gene haben. Andererseits ist auch denkbar, dass die gewählten Bedingungen nicht geeignet waren, um entsprechende Unterschiede hervorzubringen. Eine noch längere Kultivierung könnte Alterungsprozesse der hiPSC-RPE weiter betonen, wie es auch in anderen Arbeiten zur EZM von RPE-Zellen *in vitro* der Fall ist (Galloway et al., 2017; Pilgrim et al., 2017). Die POS-Phagozytose und der damit verbundene metabolische und oxidative Stress könnten durch eine häufigere Fütterung verstärkt werden, während die POS-Fütterung in dieser Arbeit 2-mal pro Woche stattfand, wurden in anderen Arbeiten dem Medium zum Teil täglich POS zugesetzt (Krohne et al., 2010; Dalvi et al., 2019; Nachtigal et al., 2020). Saini und Kollegen konnten außerdem zeigen, dass der Zelldifferenzierungsfaktor Nikotinamid im Kultivierungsmedium die Ausprägung eines Phänotyps in Form einer erhöhten Expression von Genen des Komplementsystems in hiPSC-RPE von AMD-Patienten verhindert (Saini et al., 2018). Nikotinamid war auch in meiner Arbeit im Kulturmedium der Zellen enthalten, eine Wiederholung der Experimente ohne den Zusatz von Nikotinamid könnte dementsprechend eventuell Unterschiede in der Expression von Komplementgenen, aber auch anderen hier untersuchten Aspekten wie der EZM Homöostase, hervorbringen.

Ein weiterer Faktor der AMD-Pathogenese sind oxidative Schäden durch freie Radikale am RPE und an den umliegenden Geweben. Um dies abzubilden, wurde die Expression von *HMOX1* und *NQO1*, zwei wichtigen, antioxidativen Zielgenen des NRF2 Signalwegs, betrachtet (Zhang, 2006; Sachdeva et al., 2014). Unter den in dieser Arbeit etablierten Bedingungen war die Expression von *NQO1* in den HR-Zelllinien etwas erhöht, dieser Trend zeigte sich auch schon in vorherigen Untersuchungen der Zelllinien am Institut. Dies könnte bedeuten, dass es in den HR-Zelllinien, wie auch im RPE von AMD-Patienten, zu vermehrtem oxidativen Stress kommt. In dem verwendeten Zellmodellsystem gab es keine systemischen Einflüsse, die diesen erhöhten oxidativen Stress erklären könnten, die Quelle wären demnach intrinsischer Natur. So wäre eine erhöhte Entstehung von ROS durch einen gestörten Metabolismus oder aufgrund geschädigter Mitochondrien denkbar. Auch eine veränderte EZM kann sowohl zu einer gesteigerten intrazellulären ROS Produktion führen (Huang et al., 2017), als auch Zellen für extrazelluläre ROS sensibilisieren (Chittiboyina et al., 2018). Andererseits ist denkbar, dass die erhöhte *NQO1*-Expression in den HR-Zelllinien nicht primäre Konsequenz von oxidativem Stress ist, sondern eine konstitutiv gesteigerte Expression vorliegt. Dies könnte bedeuten, dass die HR-Zelllinien über gesteigerte antioxidative Kapazitäten verfügen, so konnte z. B. nachgewiesen werden, dass RPE-Zellen von AMD-Patienten zwar initial einen reduzierten Energiemetabolismus aufweisen, dieser jedoch resistenter gegen den Negativeinfluss von oxidativem Stress ist (Ferrington et al., 2017). Für das zweite Zielgen, *HMOX1*, zeigten sich hingegen keine Hinweise auf einen Einfluss durch das genetische AMD-Risiko oder POS-Fütterung. Auch hier stellt sich die Frage, ob solche Einflüsse nicht oder nur gering vorhanden sind oder ob die gewählten Bedingungen nicht geeignet waren, um existierende Unterschiede klar hervorzubringen.

Zuletzt stellt sich die Frage, über welche Mechanismen die POS-Fütterung als Stressor wirkt. Bei der immunhistologischen Untersuchung des abgelagerten EZM führte POS-Fütterung zu mehreren signifikanten Unterschieden und die Aktivität von MMP2 im Kultivierungsmedium wurde gesteigert. POS führt zum einen direkt bei der Phagozytose zu metabolischem Stress, zum anderen trägt das Verbleiben von nicht degradierbaren Anteilen zur Bildung von Lipofuszin in den Zellen des RPE bei, dieses Alterspigment begünstigt wiederum unter anderem oxidativen Stress (Gaillard et al., 1995; Kaemmerer et al., 2007). POS-Fütterung führte im betrachteten Zellmodell zu einer gesteigerten Expression des antioxidativen Gens *NQO1* und des Komplementfaktors *C3*. Womöglich führte die Bildung von Lipofuszin also zu einer chronisch erhöhten Bildung von ROS, resultierend in oxidativem Stress und einer chronischen Inflamationsreaktion. Oxidativer Stress und chronische Inflammation führt dabei

auch in anderen Erkrankungen zu einer erhöhten MMP Expression (Kameda et al., 2003; Ali et al., 2009) und reaktiven Veränderungen in der EZM (Mack, 2018; Shu et al., 2020), was die durch POS-Fütterung induzierten Unterschiede in den anderen Experimenten erklären könnte. Die Klärung solcher Kausalitäten bedarf jedoch weiterer Untersuchung.

5.5 Fazit

In dieser Arbeit wurde der Einfluss des genetischen Hintergrunds von hiPSC-RPE-Zellen und einem implementierten Stressor, POS-Fütterung, auf die Bildung von EZM und drusenähnlichen Ablagerungen, die Sekretion von MMPs und die Expression AMD-assoziierter Gene untersucht. Bei der Analyse der EZM und der drusenähnlichen Ablagerungen zeigten sich signifikante Einflüsse durch POS-Fütterung und in geringerem Maße auch durch den genetischen Hintergrund. Weiter führte POS-Fütterung und der genetische Hintergrund zu einer differentiellen Aktivität von MMPs und leicht erhöhten Expression von *C3* und *NQO1*, diese erreichten jedoch keine statistische Signifikanz. Insgesamt liefern die hier vorgestellten Ergebnisse einen Beitrag zur Klärung der Pathomechanismen der AMD, insbesondere unter Berücksichtigung der genetischen AMD-Suszeptibilität. Darüber hinaus stehen die im Rahmen dieser Arbeit etablierten, reproduzierbaren Versuchsprotokolle für weitere Forschung zu der EZM Homöostase der hiPSC-RPE Zelllinien zur Verfügung.

6 Zusammenfassung

Die AMD ist eine häufige, chronisch-progrediente Erkrankung der zentralen Netzhaut und der häufigste Grund für Erblindung in der westlichen Welt (Resnikoff et al., 2004). AMD zählt zu den komplexen Erkrankungen, die individuelle Genetik trägt dabei erheblich zum Erkrankungsrisiko bei (Seddon et al., 2005; Fritsche et al., 2016). Zu den typischen Veränderungen im Rahmen der Pathogenese gehört eine Anreicherung einer veränderten EZM und die Bildung von lipid- und proteinreichen Drusen basal und apikal vom RPE. Zudem scheinen eine chronische Überaktivierung des Komplementsystems und oxidativer Stress an der Pathogenese beteiligt zu sein (Bhutto et al., 2012; Ruan et al., 2021). Die genauen Pathomechanismen, die zu diesen Veränderungen führen, sind bislang jedoch nicht vollständig verstanden.

In dieser Arbeit wurden zwei der Risikofaktoren für die Entstehung von AMD, genetische Prädisposition und metabolisch-oxidativer Stress, in einem *in vitro* RPE Zellmodell kombiniert. Dazu wurden hiPSC-RPE-Zellen, abgeleitet von an AMD erkrankten Patienten bzw. Kontrollen mit definiertem, genetischem Risiko verwendet. Zudem wurde bei einem Teil der Zellen durch die Langzeitfütterung mit POS ein physiologischer Stressor implementiert. Um einen weiteren wichtigen Risikofaktor, fortgeschrittenes Alter, adäquat zu berücksichtigen, wurden die Zellen vor der Durchführung der Experimente länger als bisher am Institut üblich kultiviert. Im Rahmen der Arbeit wurde zunächst bestätigt, dass die Qualität der hiPSC-RPE-Zellen durch die veränderten Kultivierungsbedingungen nicht beeinträchtigt wurde, da die Differenzierung und Intaktheit der Zellen essenziell für die Validität des Modells zur AMD Forschung ist. Des Weiteren wurden geeignete experimentelle Protokolle für die Analyse der durch die Zellen gebildeten EZM und Ablagerungen etabliert. Mithilfe von Laserscanningmikroskopie wurde die Ablagerung von Strukturproteinen der EZM (FN, Laminin, Elastin, Kollagen IV und V) und von typischen Drusenkomponenten (C9, VTN, TIMP3, ApoE, β -Amyloid, Crystallin, Lipide) untersucht. Hier konnten, abhängig vom betrachteten Protein, Einflüsse des genetischen Risikos und des Stressors POS-Fütterung auf die Menge und Morphologie der Ablagerungen gezeigt werden. Auffällig schien dabei, dass vor allem POS-Fütterung Einfluss nimmt, während das genetische Risiko eher geringe Effekte auf die Bildung von EZM und drusenartigen Ablagerungen hatte. Als wichtigen Faktor für den physiologischen Auf- und Abbau der EZM wurde zudem die Sekretion und Aktivität von MMPs durch die hiPSC-RPE analysiert. Hier war im apikalen Kompartiment wesentlich stärkere Aktivität von MMP2 vorhanden, die durch ein hohes genetisches AMD Risiko und POS-Fütterung weiter gesteigert wurde. In einem zusätzlichen Projekt wurden *via* qRT-PCR die Expression von Genen der oxidativen Stressantwort (*HMOX1*, *NQO1*), des Komplementsystems (*C3*, *CFH*) und der mitochondrialen Aktivität und Integrität (*COX4*) untersucht. Hier führte ein hohes genetisches AMD Risiko und POS-Fütterung zu einer geringfügig gesteigerten Expression von *NQO1* und *C3*.

Zusammenfassung

Inwiefern die in dieser Arbeit gezeigten Veränderungen kausal zusammenhängen oder parallele, voneinander unabhängige, Phänomene sind und inwieweit sie zur AMD-Pathogenese beitragen, bedarf weiterer Untersuchungen.

7 Abstract

AMD is a common, degenerative disease of the central retina and the most common cause of blindness in the western world (Resnikoff et al., 2004). AMD is a complex disease, with individual genetics contributing significantly to the risk of disease (Seddon et al., 2005; Fritsche et al., 2016). Typical changes in the pathogenesis include an accumulation of an altered ECM and the formation of lipid- and protein-rich drusen basal and apical to the RPE. In addition, chronic overactivation of the complement system and oxidative stress appear to be involved in the pathogenesis (Bhutto et al., 2012; Ruan et al., 2021). However, the exact pathomechanisms leading to these changes are not yet fully understood.

In this study, two of the risk factors for the development of AMD, genetic predisposition and metabolic-oxidative stress, were combined in an *in vitro* RPE cell model. For this purpose, hiPSC-RPE cells derived from AMD patients and controls with defined genetic risk were used. In addition, a physiological stressor was implemented in some of the cells by long-term feeding of POS. In order to adequately take into account another important risk factor, advanced age, the cells were cultivated for a longer time period than in previous investigations at the institute before the experiments were carried out. In the course of the work, it was first confirmed that the quality of the hiPSC-RPE cells was not affected by the changed cultivation conditions, as the integrity of the cells is essential for the validity of the model for AMD research. Furthermore, suitable experimental protocols were established for the analysis of the ECM and deposits formed by the cells. Using laser scanning microscopy, the deposition of structural proteins of the ECM (FN, laminin, elastin, collagen IV and V) and of typical drusen components (C9, VTN, TIMP3, ApoE, β -amyloid, crystallin, lipids) was investigated. Here, depending on the protein examined, influences of the genetic risk and the stressor POS-feeding on the quantity and morphology of the deposits could be shown. It was striking that POS-feeding in particular had an influence, while genetic risk had only a minor effect on the formation of ECM and drusen-like deposits. Furthermore, the secretion and activity of MMPs by the hiPSC-RPE was investigated, as MMPs play an important role in the physiological formation and degradation of the ECM. A much stronger activity of MMP2 in the apical compartment could be shown, which was further increased by a high genetic AMD risk and POS-feeding.

In an additional project, the expression of genes of the oxidative stress response (*HMOX1*, *NQO1*), the complement system (*C3*, *CFH*) and mitochondrial activity and health (*COX4*) were investigated *via* qRT-PCR. Here, high genetic AMD risk and POS-feeding led to slightly increased expression of *NQO1* and *C3*. The extent to which the changes shown in this work are causally related or are parallel, independent phenomena and to what extent they contribute to AMD pathogenesis requires further investigation.

8 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
Abb.	Abbildung
AMD	altersbedingte Makuladegeneration
ApoE	Apolipoprotein E
AREDS	age-related eye disease study
ARMS2/HTRA1	age-related maculopathy susceptibility 2/high-temperature requirement A serine peptidase 1
ATP1A1	ATPase Na ⁺ /K ⁺ Transporting Subunit Alpha 1
BEST-1	Bestrophin 1
BLamD	basal laminar deposits
BLinD	basal linear deposits
BrM	Bruchmembran
C1-9	Komplementfaktor 1-9
CFH	Komplementfaktor H
CNV	choroidale Neovaskularisation
COX4	Cytochrome C Oxidase 4
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EZM	extrazelluläre Matrix
FN	Fibronectin
GA-AMD	geographische Atrophie, trockene AMD
hiPSC	humane, induziert pluripotente Stammzellen
HMOX1	Heme oxygenase 1
HR	Hochrisiko, hohes genetisches AMD-Risiko
ICC	Immunzytochemie
LR	Niedrigrisiko, geringes genetisches AMD-Risiko
MAC	Membranangriffskomplex
MMP	Matrix-Metalloproteinase
NQO1	NAD(P)H dehydrogenase (guinone) 1
NRF2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
NV-AMD	Neovaskuläre AMD

Abkürzungsverzeichnis

POS	photoreceptor outer segments, äußere Photorezeptorensegmente
qRT-PCR	quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion
ROS	reactive oxygen species, reaktive Sauerstoffspezies
RPD	Reticular Pseudodrusen
RPE	retinales Pigmentepithel
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese
SFD	Sorsby-Fundusdystrophie
TEER	transepithelialer elektrischer Widerstand
TIMP	tissue inhibitor of matrixmetalloproteinases
TBS(-T)	Tris-buffered saline (with Tween® 20)
VEGF	vascular endothelial growth factor
VTN	Vitronectin
z. B.	zum Beispiel
ZO-1	Zonula occludens Protein 1

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Dargestellt sind in der Arbeit verwendete Reagenzien und Chemikalien, sowie deren Herkunft.	20
Tabelle 2: Dargestellt sind in der Arbeit verwendete Puffer und Lösungen, deren Bestandteile, sowie die relative Menge.....	21
Tabelle 3: Dargestellt sind in der Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien, sowie deren Herkunft.	22
Tabelle 4: Dargestellt sind in der Arbeit verwendete Laborgeräte, sowie deren Herkunft.....	24
Tabelle 5: Dargestellt ist in der Arbeit verwendete Software, sowie deren Herkunft.	25
Tabelle 6: Dargestellt sind in der Arbeit verwendete aus hiPSC differenzierte RPE Zelllinien.	26
Tabelle 7: Dargestellt sind in der Arbeit verwendete Zellkulturmedien und Supplements, sowie deren Herkunft.....	26
Tabelle 8: Dargestellt sind in der Arbeit verwendete primäre Antikörper, sowie deren Typ, Spezies, Verdünnung, Verwendung und Herkunft.....	27
Tabelle 9: Dargestellt sind in der Arbeit verwendete sekundäre Antikörper, sowie deren Verdünnung, Verwendungszweck und Herkunft.	28
Tabelle 10: Dargestellt sind in der Arbeit verwendete Molekülmassenstandards, sowie deren Verwendungszweck und Herkunft.	29
Tabelle 11: Dargestellt sind für die qRT-PCR Versuche verwendeten Primer, sowie deren 5'-3'-Sequenz.	29
Tabelle 12: Dargestellt sind in der Arbeit verwendete Kit-Systeme und deren Herkunft.	29
Tabelle 13: Zusammensetzung des hiPSC-RPE Zellkulturmediums.....	30
Tabelle 14: Taurin-Puffer Zusammensetzung für POS-Isolierung.	31
Tabelle 15: Zusammensetzung der Gradienten-Lösungen für die POS-Isolation.....	32
Tabelle 16: Dargestellt sind die Bestandteile der SDS-Polyacrylamid Gele mit Trenngel (7,5% bzw. 12,5%) und Sammelgel (3%).....	34
Tabelle 17: Thermocycler Programm für die cDNA-Synthese.....	40
Tabelle 18: Zusammensetzung des cDNA-Synthese-Reaktionsreagenz.	40
Tabelle 19: Zusammensetzung des qRT-PCR Reaktionsansatz.	41
Tabelle 20: Ablauf des zur Amplifikation verwendeten qRT-PCR Programms.....	41

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Fundusaufnahmen und Darstellungen einer gesunden Retina und Retinae mit verschiedenen Formen der AMD.....	6
Abbildung 2: Genotypisierung der verwendeten hiPSC-RPE Zelllinien.....	26
Abbildung 3: Charakterisierung der hiPSC-RPE Zelllinien und Bestätigung der POS-Phagozytose durch die POS-gefütterten Zelllinien.....	43
Abbildung 4: Effekt des genetischen Hintergrunds und POS-Fütterung als physiologischen Stressor auf die FN Ablagerung durch hiPSC-RPE.....	46
Abbildung 5: Effekt des genetischen Hintergrunds und POS-Fütterung als physiologischen Stressor auf die Laminin Ablagerung durch hiPSC-RPE.....	47
Abbildung 6: Effekt des genetischen Hintergrunds und POS-Fütterung als physiologischen Stressor auf die Elastin Ablagerung durch hiPSC-RPE.....	48
Abbildung 7: Effekt des genetischen Hintergrunds und POS-Fütterung als physiologischen Stressor auf die Kollagen V Ablagerung durch hiPSC-RPE.....	49
Abbildung 8: Effekt des genetischen Hintergrunds und POS-Fütterung als physiologischen Stressor auf die Kollagen IV Ablagerung durch hiPSC-RPE.....	50
Abbildung 9: Effekt des genetischen Hintergrunds und POS-Fütterung als physiologischen Stressor auf die Ablagerung von C9 durch hiPSC-RPE.....	52
Abbildung 10: Effekt des genetischen Hintergrunds und POS-Fütterung als physiologischen Stressor auf die Ablagerung von C9 durch hiPSC-RPE.....	53
Abbildung 11: Effekt des genetischen Hintergrunds und POS-Fütterung als physiologischen Stressor auf die Ablagerung von VTN durch hiPSC-RPE.....	54
Abbildung 12: Effekt des genetischen Hintergrunds und POS-Fütterung als physiologischen Stressor auf die Ablagerung von VTN durch hiPSC-RPE.....	55
Abbildung 13: Effekt des genetischen Hintergrunds und POS-Fütterung als physiologischen Stressor auf die Ablagerung von TIMP3 durch hiPSC-RPE.....	56
Abbildung 14: Effekt des genetischen Hintergrunds und POS-Fütterung als physiologischen Stressor auf die Ablagerung von TIMP3 durch hiPSC-RPE.....	57
Abbildung 15: Effekt des genetischen Hintergrunds und POS-Fütterung als physiologischen Stressor auf die Ablagerung von ApoE durch hiPSC-RPE.....	58
Abbildung 16: Effekt des genetischen Hintergrunds und POS-Fütterung als physiologischen Stressor auf die Ablagerung von β -Amyloid durch hiPSC-RPE.....	59
Abbildung 17: Effekt des genetischen Hintergrunds und POS-Fütterung als physiologischen Stressor auf die Ablagerung von Crystallin durch hiPSC-RPE.....	60

Abbildung 18: Effekt des genetischen Hintergrunds und POS-Fütterung als physiologischen Stressor auf die Ablagerung von Lipiden durch hiPSC-RPE.....	61
Abbildung 19: Effekt des genetischen Hintergrunds und POS-Fütterung als physiologischen Stressor auf die Sekretion von MMP2 durch hiPSC-RPE.	63
Abbildung 20: Effekt des genetischen Hintergrunds und POS-Fütterung als physiologischen Stressor auf die Sekretion von MMP2 durch hiPSC-RPE.	64
Abbildung 21: Effekt des genetischen Hintergrunds und POS-Fütterung als physiologischen Stressor auf intrazelluläre mRNA-Expression verschiedener Gene.	66
Abbildung 22: Ausführliche Zusammenstellung der Fluoreszenzphotographien der Färbung gegen FN.	114
Abbildung 23: Ausführliche Zusammenstellung der Fluoreszenzphotographien der Färbung gegen Laminin.	115
Abbildung 24: Ausführliche Zusammenstellung der Fluoreszenzphotographien der Färbung gegen Elastin.	116
Abbildung 25: Ausführliche Zusammenstellung der Fluoreszenzphotographien der Färbung gegen Kollagen V.	117
Abbildung 26: Ausführliche Zusammenstellung der Fluoreszenzphotographien der Färbung gegen Kollagen IV.	118
Abbildung 27: Ausführliche Zusammenstellung der Fluoreszenzphotographien der Färbung gegen C9 bei Ablösen der Zellen mit Zelllysepuffer.	119
Abbildung 28: Ausführliche Zusammenstellung der Fluoreszenzphotographien der Färbung gegen C9 bei Ablösen der Zellen mit Trypsin.	120
Abbildung 29: Ausführliche Zusammenstellung der Fluoreszenzphotographien der Färbung gegen VTN bei Ablösen der Zellen mit Zelllysepuffer.	121
Abbildung 30: Ausführliche Zusammenstellung der Fluoreszenzphotographien der Färbung gegen VTN bei Ablösen der Zellen mit Trypsin.	122
Abbildung 31: Ausführliche Zusammenstellung der Fluoreszenzphotographien der Färbung gegen TIMP3 bei Ablösen der Zellen mit Zelllysepuffer.	123
Abbildung 32: Ausführliche Zusammenstellung der Fluoreszenzphotographien der Färbung gegen TIMP3 bei Ablösen der Zellen mit Trypsin.	124
Abbildung 33: Ausführliche Zusammenstellung der Fluoreszenzphotographien der Färbung gegen ApoE.	125
Abbildung 34: Ausführliche Zusammenstellung der Fluoreszenzphotographien der Färbung gegen β -Amyloid.	126

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 35: Ausführliche Zusammenstellung der Fluoreszenzphotographien der Färbung gegen Crystallin.....	127
Abbildung 36: Ausführliche Zusammenstellung der Fluoreszenzphotographien der Färbung von Lipiden mit dem Farbstoff Nilrot.	128

11 Literaturverzeichnis

Adair-Kirk, T.L. and Senior, R.M. (2008) 'Fragments of extracellular matrix as mediators of inflammation', *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. doi:10.1016/j.biocel.2007.1

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

Aisenbrey, S., Zhang, M., Bacher, D., Yee, J., Brunken, W.J. and Hunter, D.D. (2006) 'Retinal pigment epithelial cells synthesize laminins, including laminin 5, and adhere to them through α 3- and α 6-containing integrins', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. doi:10.1167/iovs.05-1590.

Alexander, J.P., Bradley, J.M.B., Gabourel, J.D. and Acott, T.S. (1990) 'Expression of matrix metalloproteinases and inhibitor by human retinal pigment epithelium', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*.

Alge, C.S., Priglinger, S.G., Neubauer, A.S., Kampik, A., Zillig, M., Bloemendal, H. and Welge-Lussen, U. (2002) 'Retinal pigment epithelium is protected against apoptosis by α B-crystallin', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 43(11).

Ali, M.A.M. and Schulz, R. (2009) 'Activation of MMP-2 as a key event in oxidative stress injury to the heart', *Frontiers in Bioscience*. doi:10.2741/3274.

Ambati, J., Ambati, B.K., Yoo, S.H., Ianchulev, S. and Adamis, A.P. (2003) 'Age-related macular degeneration: Etiology, pathogenesis, and therapeutic strategies', *Survey of Ophthalmology*. doi:10.1016/S0039-6257(03)00030-4.

Ambati, J., Atkinson, J.P. and Gelfand, B.D. (2013) 'Immunology of age-related macular degeneration', *Nature Reviews Immunology*. doi:10.1038/nri3459.

Ambati, J. and Fowler, B.J. (2012) 'Mechanisms of age-related macular degeneration', *Neuron*. doi:10.1016/j.neuron.2012.06.018.

Amin, S., Chong, N.H.V., Bailey, T.A., Zhang, J., Knupp, C., Cheetham, M.E., Greenwood, J. and Luthert, P.J. (2004) 'Modulation of sub-RPE deposits in vitro: A potential model for age-related macular degeneration', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. doi:10.1167/iovs.03-0671.

An, E., Lu, X., Flippin, J., Devaney, J.M., Halligan, B., Hoffman, E., Csaky, K. and Hathout, Y. (2007) 'Erratum: Secreted proteome profiling in human RPE cell cultures derived from donors with age related macular degeneration and age matched healthy donors (Journal of Proteome Research (2006) 5, (2599-2610) DOI:10.1021/pr078003z)', *Journal of Proteome Research*, 6(4), p. 1615. doi:10.1021/pr078003z.

Anderson, D.H., Ozaki, S., Nealon, M., Neitz, J., Mullins, R.F., Hageman, G.S. and Johnson, L. V. (2001) 'Local cellular sources of apolipoprotein E in the human retina and retinal pigmented epithelium: Implications for the process of drusen formation', *American Journal of Ophthalmology*, 131(6). doi:10.1016/S0002-9394(00)00961-2.

Anderson, D.H., Radeke, M.J., Gallo, N.B., Chapin, E.A., Johnson, P.T., Curletti, C.R., Hancox, L.S., Hu, J., Ebright, J.N., Malek, G., Hauser, M.A., Bowes Rickman, C., *et al.* (2010) 'The pivotal role of the complement system in aging and age-related macular degeneration: Hypothesis re-visited', *Progress in Retinal and Eye Research*. doi:10.1016/j.preteyeres.2009.11.003.

Anderson, R.E., Benolken, R.M., Dudley, P.A., Landis, D.J. and Wheeler, T.G. (1974) 'Polyunsaturated fatty acids of photoreceptor membranes', *Experimental Eye Research*. doi:10.1016/0014-4835(74)90149-3.

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*. doi:10.1016/j.preteyeres.2013.07.003.

Aumailley, M. (2013) 'The laminin family', *Cell Adhesion and Migration*, 7(1), pp. 48–55.

doi:10.4161/cam.22826.

Ba, J., Peng, R.S., Xu, D., Li, Y.H., Shi, H., Wang, Q. and Yu, J. (2015) 'Intravitreal anti-VEGF injections for treating wet age-related macular degeneration: A systematic review and meta-analysis', *Drug Design, Development and Therapy*. doi:10.2147/DDDT.S86269.

Banerjee, A., Kumar, S., Kulhara, P. and Gupta, A. (2008) 'Prevalence of depression and its effect on disability in patients with age-related macular degeneration', *Indian Journal of Ophthalmology*. doi:10.4103/0301-4738.42643.

Beatty, S., Koh, H.H., Phil, M., Henson, D. and Boulton, M. (2000) 'The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration', *Survey of Ophthalmology*. doi:10.1016/S0039-6257(00)00140-5.

Bellezza, I. (2018) 'Oxidative stress in age-related macular degeneration: NRF2 as therapeutic target', *Frontiers in Pharmacology*. doi:10.3389/fphar.2018.01280.

Berglin, L., Sarman, S., Van der Ploeg, I., Steen, B., Ming, Y., Itohara, S., Seregard, S. and Kvanta, A. (2003) 'Reduced choroidal neovascular membrane formation in matrix metalloproteinase-2-deficient mice', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. doi:10.1167/iovs.02-0180.

Bharti, K., Miller, S.S. and Arnheiter, H. (2011) 'The new paradigm: Retinal pigment epithelium cells generated from embryonic or induced pluripotent stem cells', *Pigment Cell and Melanoma Research*. doi:10.1111/j.1755-148X.2010.00772.x.

Bhutto, I. and Luty, G. (2012) 'Understanding age-related macular degeneration (AMD): Relationships between the photoreceptor/retinal pigment epithelium/Bruch's membrane/choriocapillaris complex', *Molecular Aspects of Medicine*. doi:10.1016/j.mam.2012.04.005.

Biasella, F., Plössl, K., Karl, C., Weber, B.H.F. and Friedrich, U. (2020) 'Altered protein function caused by AMD-associated variant rs704 links vitronectin to disease pathology', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. doi:10.1167/IOVS.61.14.2.

Binder, S., Stanzel, B. V., Krebs, I. and Glittenberg, C. (2007) 'Transplantation of the RPE in AMD', *Progress in Retinal and Eye Research*. doi:10.1016/j.preteyeres.2007.02.002.

Birch, D.G. and Liang, F.Q. (2007) 'Age-related macular degeneration: a target for nanotechnology derived medicines', *International Journal of Nanomedicine*. doi:10.2147/nano.2007.2.1.65.

Booij, J.C., Baas, D.C., Beisekeeva, J., Gorgels, T.G.M.F. and Bergen, A.A.B. (2010) 'The dynamic nature of Bruch's membrane', *Progress in Retinal and Eye Research*, 29(1), pp. 1–18. doi:10.1016/j.preteyeres.2009.08.003.

Bora, P.S., Sohn, J.-H., Cruz, J.M.C., Jha, P., Nishihori, H., Wang, Y., Kaliappan, S., Kaplan, H.J. and Bora, N.S. (2005) 'Role of Complement and Complement Membrane Attack Complex in Laser-Induced Choroidal Neovascularization', *The Journal of Immunology*. doi:10.4049/jimmunol.174.1.491.

Brancato, R., Intorini, U., Pierro, L., Setaccioli, M., Forti, M., Bolognesi, G. and Tremolada, G. (2002) 'Optical coherence tomography (OCT) in retinal angiomatous proliferation (RAP)', *European Journal of Ophthalmology*. doi:10.1177/112067210201200604.

Brandl, C., Brücklmayer, C., Günther, F., Zimmermann, M.E., Küchenhoff, H., Helbig, H., Weber, B.H.F., Heid, I.M. and Stark, K.J. (2019) 'Retinal layer thicknesses in early age-related macular degeneration: Results from the German AugUR study', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. doi:10.1167/iovs.18-25332.

Brandl, C., Zimmermann, M.E., Günther, F., Barth, T., Olden, M., Schelter, S.C., Kronenberg, F., Loss, J., Küchenhoff, H., Helbig, H., Weber, B.H.F., Stark, K.J., *et al.* (2018) 'On the impact of different approaches to classify age-related macular degeneration: Results from the German AugUR study', *Scientific Reports*. doi:10.1038/s41598-018-26629-5.

- Brandl, C., Zimmermann, S.J., Milenkovic, V.M., Rosendahl, S.M.G., Grassmann, F., Milenkovic, A., Hehr, U., Federlin, M., Wetzel, C.H., Helbig, H. and Weber, B.H.F. (2014) 'In-depth characterisation of retinal pigment epithelium (RPE) cells derived from human induced pluripotent stem cells (hiPSC)', *NeuroMolecular Medicine*. doi:10.1007/s12017-014-8308-8.
- Brandstetter, C., Mohr, L.K.M., Latz, E., Holz, F.G. and Krohne, T.U. (2015) 'Light induces NLRP3 inflammasome activation in retinal pigment epithelial cells via lipofuscin-mediated photooxidative damage', *Journal of Molecular Medicine*, 93(8). doi:10.1007/s00109-015-1275-1.
- Bressler, N.M., Bressler, S.B. and Fine, S.L. (1988) 'Age-related macular degeneration', *Survey of Ophthalmology*. doi:10.1016/0039-6257(88)90052-5.
- Brown, E.E., DeWeerd, A.J., Ildefonso, C.J., Lewin, A.S. and Ash, J.D. (2019) 'Mitochondrial oxidative stress in the retinal pigment epithelium (RPE) led to metabolic dysfunction in both the RPE and retinal photoreceptors', *Redox Biology*. doi:10.1016/j.redox.2019.101201.
- Brown, G.C., Brown, M.M., Sharma, S., Stein, J.D., Roth, Z., Campanella, J., Beauchamp, G.R., Ferris, F.L., Lindstrom, R.L., Wilson, M.E., Traboulsi, E.I., Anderson, D.R., *et al.* (2005) 'The burden of age-related macular degeneration: A value-based medicine analysis', *Transactions of the American Ophthalmological Society*, 103, pp. 173–186.
- Buch, H., Vinding, T., la Cour, M., Jensen, G.B., Prause, J.U. and Nielsen, N. V. (2005) 'Risk factors for age-related maculopathy in a 14-year follow-up study: The Copenhagen City Eye Study', *Acta Ophthalmologica Scandinavica*. doi:10.1111/j.1600-0420.2005.00492.x.
- Butterfield, D.A., Swomley, A.M. and Sultana, R. (2013) 'Amyloid β -Peptide (1-42)-induced oxidative stress in alzheimer disease: Importance in disease pathogenesis and progression', *Antioxidants and Redox Signaling*. doi:10.1089/ars.2012.5027.
- Cabral-Pacheco, G.A., Garza-Veloz, I., Rosa, C.C.D. La, Ramirez-Acuña, J.M., Perez-Romero, B.A., Guerrero-Rodriguez, J.F., Martinez-Avila, N. and Martinez-Fierro, M.L. (2020) 'The roles of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human diseases', *International Journal of Molecular Sciences*. doi:10.3390/ijms21249739.
- Campochiaro, P.A., Jerdan, J.A. and Glaser, B.M. (1986) 'The extracellular matrix of human retinal pigment epithelial cells in vivo and its synthesis in vitro', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*.
- Campochiaro, P.A., Soloway, P., Ryan, S.J. and Miller, J.W. (1999) 'The pathogenesis of choroidal neovascularization in patients with age-related macular degeneration.', *Molecular vision*.
- de Carlo, T.E., Romano, A., Waheed, N.K. and Duker, J.S. (2015) 'A review of optical coherence tomography angiography (OCTA)', *International Journal of Retina and Vitreous*. doi:10.1186/s40942-015-0005-8.
- Carroll, M. V. and Sim, R.B. (2011) 'Complement in health and disease', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(12), pp. 965–975. doi:10.1016/j.addr.2011.06.005.
- Chakravarthy, U., Evans, J. and Rosenfeld, P.J. (2010) 'Age related macular degeneration', *BMJ (Online)*. doi:10.1136/bmj.c981.
- Chalam, K. V., Khetpal, V., Rusovici, R. and Balaiya, S. (2011) 'A review: Role of ultraviolet radiation in age-related macular degeneration', *Eye and Contact Lens*. doi:10.1097/ICL.0b013e31821fbd3e.
- Chang, C. and Werb, Z. (2001) 'The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis', *Trends in Cell Biology*, 11(11), pp. S37–S43. doi:10.1016/S0962-8924(01)02122-5.
- Chau, K.Y., Sivaprasad, S., Patel, N., Donaldson, T.A., Luthert, P.J. and Chong, N. V. (2008) 'Plasma levels of matrix metalloproteinase-2 and -9 (MMP-2 and MMP-9) in age-related macular degeneration', *Eye*. doi:10.1038/sj.eye.6702722.

- Cheeseman, K.H. and Slater, T.F. (1993) 'An introduction to free radical biochemistry', *British Medical Bulletin*. doi:10.1093/oxfordjournals.bmb.a072625.
- Chen, M., Rajapakse, D., Fraczek, M., Luo, C., Forrester, J. V. and Xu, H. (2016) 'Retinal pigment epithelial cell multinucleation in the aging eye - a mechanism to repair damage and maintain homeostasis', *Aging Cell*, 15(3). doi:10.1111/acel.12447.
- Chen, S., Einspanier, R. and Schoen, J. (2015) 'Transepithelial electrical resistance (TEER): a functional parameter to monitor the quality of oviduct epithelial cells cultured on filter supports', *Histochemistry and Cell Biology*. doi:10.1007/s00418-015-1351-1.
- Chen, Y., Bedell, M. and Zhang, K. (2010) 'Age-related macular degeneration: Genetic and environmental factors of disease', *Molecular Interventions*. doi:10.1124/mi.10.5.4.
- Chinchilla, B. and Fernandez-godino, R. (2021) 'AMD-Like Substrate Causes Epithelial Mesenchymal Transition in iPSC-Derived Retinal Pigment Epithelial Cells Wild Type but Not C3 -Knockout'.
- Chittiboyina, S., Rahimi, R., Atrian, F., Ochoa, M., Ziaie, B. and Lelièvre, S.A. (2018) 'Gradient-on-a-Chip with Reactive Oxygen Species Reveals Thresholds in the Nucleus Response of Cancer Cells Depending on the Matrix Environment', *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 4(2). doi:10.1021/acsbmaterials.7b00087.
- Chong, N. H., Keonin, J., Luthert, P. J., Frennesson, C. I., Weingeist, D. M., Wolf, R. L., Mullins, R. F., & Hageman, G. S. (2005). 'Decreased thickness and integrity of the macular elastic layer of Bruch's membrane correspond to the distribution of lesions associated with age-related macular degeneration' *The American journal of pathology*, 166(1), 241–251. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)62248-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62248-1)
- Chow, C.K., Thacker, R.R., Changchit, C., Bridges, R.B., Rehm, S.R., Humble, J. and Turbek, J. (1986) 'Lower Levels of Vitamin C and Carotenes In Plasma of Cigarette Smokers', *Journal of the American College of Nutrition*. doi:10.1080/07315724.1986.10720134.
- Christensen, D.R.G., Brown, F.E., Cree, A.J., Ratnayaka, J.A. and Lotery, A.J. (2017) 'Sorsby fundus dystrophy – A review of pathology and disease mechanisms', *Experimental Eye Research*. doi:10.1016/j.exer.2017.08.014.
- Church, D.F. and Pryor, W.A. (1985) 'Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications', *Environmental Health Perspectives*. doi:10.1289/ehp.8564111.
- Clark, S.J. and Bishop, P.N. (2018) 'The eye as a complement dysregulation hotspot', *Seminars in Immunopathology*. doi:10.1007/s00281-017-0649-6.
- Colijn, J.M., Buitendijk, G.H.S., Prokofyeva, E., Alves, D., Cachulo, M.L., Khawaja, A.P., Cougnard-Gregoire, A., Merle, B.M.J., Korb, C., Erke, M.G., Bron, A., Anastasopoulos, E., *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.
- Coulthard, L.G. and Woodruff, T.M. (2015) 'Is the Complement Activation Product C3a a Proinflammatory Molecule? Re-evaluating the Evidence and the Myth', *The Journal of Immunology*. doi:10.4049/jimmunol.1403068.
- Crabb, J.W. (2014) 'The proteomics of drusen', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. doi:10.1101/cshperspect.a017194.
- Crabb, J.W., Miyagi, M., Gu, X., Shadrach, K., West, K.A., Sakaguchi, H., Kamei, M., Hasan, A., Yan, L., Rayborn, M.E., Salomon, R.G. and Hollyfield, J.G. (2002) 'Drusen proteome analysis: An approach to the etiology of age-related macular degeneration', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(23), pp. 14682–14687. doi:10.1073/pnas.222551899.
- Cruess, A.F., Zlateva, G., Xu, X., Soubrane, G., Pauleikhoff, D., Lotery, A., Mones, J., Buggage, R., Schaefer, C., Knight, T. and Goss, T.F. (2008) 'Economic burden of bilateral neovascular age-related

macular degeneration: Multi-country observational study', *PharmacoEconomics*, 26(1), pp. 57–73. doi:10.2165/00019053-200826010-00006.

Cruickshanks, K.J., Klein, R. and Klein, B.E.K. (1993) 'Sunlight and Age-Related Macular Degeneration: The Beaver Dam Eye Study', *Archives of Ophthalmology*. doi:10.1001/archophth.1993.01090040106042.

Da Cruz, L., Fynes, K., Georgiadis, O., Kerby, J., Luo, Y.H., Ahmado, A., Vernon, A., Daniels, J.T., Nommiste, B., Hasan, S.M., Gooljar, S.B., Carr, A.J.F., *et al.* (2018) 'Phase 1 clinical study of an embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium patch in age-related macular degeneration', *Nature Biotechnology*. doi:10.1038/nbt.4114.

Curcio, C.A. (2018a) 'Antecedents of soft drusen, the specific deposits of age-related macular degeneration, in the biology of human macula', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. doi:10.1167/iovs.18-24883.

Curcio, C.A. (2018b) 'Soft drusen in age-related macular degeneration: Biology and targeting via the oil spill strategies', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. doi:10.1167/iovs.18-24882.

Curcio, C.A., Johnson, M., Rudolf, M. and Huang, J.D. (2011) 'The oil spill in ageing Bruch membrane', *British Journal of Ophthalmology*. doi:10.1136/bjophthalmol-2011-300344.

Dalvi, S., Galloway, C.A., Winschel, L., Hashim, A., Soto, C., Tang, C., MacDonald, L.A. and Singh, R. (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.

Davis, M.D., Gangnon, R.E., Lee, L.Y., Hubbard, L.D., Klein, B.E.K., Klein, R., Ferris, F.L., Bressler, S.B. and Milton, R.C. (2005) 'The age-related eye disease study severity scale for age-related macular degeneration: AREDS report no. 17', *Archives of Ophthalmology*. doi:10.1001/archophth.123.11.1484.

Day, S., Acquah, K., Lee, P.P., Mruthyunjaya, P. and Sloan, F.A. (2011) 'Medicare costs for neovascular age-related macular degeneration, 1994-2007', *American Journal of Ophthalmology*. doi:10.1016/j.ajo.2011.05.008.

De, S., Rabin, D.M., Salero, E., Lederman, P.L., Temple, S. and Stern, J.H. (2007) 'Human retinal pigment epithelium cell changes and expression of α B-crystallin: A biomarker for retinal pigment epithelium cell change in age-related macular degeneration', *Archives of Ophthalmology*, 125(5). doi:10.1001/archophth.125.5.641.

Delori, F.C., Goger, D.G. and Dorey, C.K. (2001) 'Age-related accumulation and spatial distribution of lipofuscin in RPE of normal subjects', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*.

Dimberg, A., Rylova, S., Dieterich, L.C., Olsson, A.K., Schiller, P., Wikner, C., Bohman, S., Botling, J., Lukinius, A., Wawrousek, E.F. and Claesson-Welsh, L. (2008) ' α B-crystallin promotes tumor angiogenesis by increasing vascular survival during tube morphogenesis', *Blood*, 111(4). doi:10.1182/blood-2007-04-087841.

Ding, X., Li, J., Zeng, J., Ma, W., Liu, R., Li, T., Yu, S. and Tang, S. (2011) 'Choroidal thickness in healthy Chinese subjects', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. doi:10.1167/iovs.11-8076.

Ding, X., Patel, M. and Chan, C.C. (2009) 'Molecular pathology of age-related macular degeneration', *Progress in Retinal and Eye Research*. doi:10.1016/j.preteyeres.2008.10.001.

Dithmar, S., Curcio, C.A., Le, N.A., Brown, S. and Grossniklaus, H.E. (2000) 'Ultrastructural changes in Bruch's membrane of apolipoprotein E- deficient mice', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 41(8).

Domalpally, A., Agrón, E., Pak, J.W., Keenan, T.D., Ferris, F.L., Clemons, T.E. and Chew, E.Y. (2019) 'Prevalence, Risk, and Genetic Association of Reticular Pseudodrusen in Age-related Macular Degeneration: Age-Related Eye Disease Study 2 Report 21', in *Ophthalmology*.

doi:10.1016/j.ophtha.2019.07.022.

Dunaief, J.L., Dentchev, T., Ying, G.S. and Milam, A.H. (2002) 'The role of apoptosis in age-related macular degeneration', *Archives of Ophthalmology*. doi:10.1001/archophth.120.11.1435.

Edwards, A.O., Ritter, R., Abel, K.J., Manning, A., Panhuysen, C. and Farrer, L.A. (2005) 'Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration', *Science*. doi:10.1126/science.1110189.

Eichler, W., Friedrichs, U., Thies, A., Tratz, C. and Wiedemann, P. (2002) 'Modulation of matrix metalloproteinase and TIMP-1 expression by cytokines in human RPE cells', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*.

Evans, J.R. and Lawrenson, J.G. (2017a) 'Antioxidant vitamin and mineral supplements for preventing age-related macular degeneration', *Cochrane Database of Systematic Reviews*. doi:10.1002/14651858.CD000253.pub4.

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

Fan, D. and Kassiri, Z. (2020) 'Biology of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 3 (TIMP3), and Its Therapeutic Implications in Cardiovascular Pathology', *Frontiers in Physiology*, 11(June), pp. 1–16. doi:10.3389/fphys.2020.00661.

Feeney-Burns, L., Hilderbrand, E.S. and Eldridge, S. (1984) 'Aging human RPE: Morphometric analysis of macular, equatorial, and peripheral cells', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*.

Feher, J., Kovacs, I., Artico, M., Cavallotti, C., Papale, A. and Balacco Gabrieli, C. (2006) 'Mitochondrial alterations of retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration', *Neurobiology of Aging*, 27(7). doi:10.1016/j.neurobiolaging.2005.05.012.

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*. doi:10.1093/hmg/ddx392.

Fernandez-Godino, R. and Pierce, E.A. (2018) 'C3a triggers formation of sub-retinal pigment epithelium deposits via the ubiquitin proteasome pathway', *Scientific Reports*, 8(1), pp. 1–14. doi:10.1038/s41598-018-28143-0.

Fernandez-Godino, R., Pierce, E.A. and Garland, D.L. (2016) 'Extracellular matrix alterations and deposit formation in AMD', in *Advances in Experimental Medicine and Biology*. doi:10.1007/978-3-319-17121-0_8.

Ferrington, D.A., Ebeling, M.C., Kapphahn, R.J., Terluk, M.R., Fisher, C.R., Polanco, J.R., Roehrich, H., Leary, M.M., Geng, Z., Dutton, J.R. and Montezuma, S.R. (2017) 'Altered bioenergetics and enhanced resistance to oxidative stress in human retinal pigment epithelial cells from donors with age-related macular degeneration', *Redox Biology*, 13. doi:10.1016/j.redox.2017.05.015.

Ferris, F.L., Davis, M.D., Clemons, T.E., Lee, L.Y., Chew, E.Y., Lindblad, A.S., Milton, R.C., Bressler, S.B. and Klein, R. (2005) 'A simplified severity scale for age-related macular degeneration: AREDS report no. 18', *Archives of Ophthalmology*. doi:10.1001/archophth.123.11.1570.

Ferris, F.L., Wilkinson, C.P., Bird, A., Chakravarthy, U., Chew, E., Csaky, K. and Sadda, S.R. (2013) 'Clinical classification of age-related macular degeneration', *Ophthalmology*. doi:10.1016/j.ophtha.2012.10.036.

Finger, R.P., Chong, E., McGuinness, M.B., Robman, L.D., Aung, K.Z., Giles, G., Baird, P.N. and Guymer, R.H. (2016) 'Reticular pseudodrusen and their association with age-related macular degeneration the melbourne collaborative cohort study', *Ophthalmology*. doi:10.1016/j.ophtha.2015.10.029.

- Finger, R.P., Wu, Z., Luu, C.D., Kearney, F., Ayton, L.N., Lucci, L.M., Hubbard, W.C., Hageman, J.L., Hageman, G.S. and Guymer, R.H. (2014) 'Reticular pseudodrusen: A risk factor for geographic atrophy in fellow eyes of individuals with unilateral choroidal neovascularization', *Ophthalmology*. doi:10.1016/j.ophtha.2013.12.034.
- Finkel, T. and Holbrook, N.J. (2000) 'Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing', *Nature*. doi:10.1038/35041687.
- Fisher, C.R. and Ferrington, D.A. (2018) 'Perspective on AMD pathobiology: A bioenergetic crisis in the RPE', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. doi:10.1167/iovs.18-24289.
- Forest, D.L., Johnson, L. V. and Clegg, D.O. (2015) 'Cellular models and therapies for age-related macular degeneration', *DMM Disease Models and Mechanisms*. doi:10.1242/dmm.017236.
- Francisco, S.G., Smith, K.M., Aragonès, G., Whitcomb, E.A., Weinberg, J., Wang, X., Bejarano, E., Taylor, A. and Rowan, S. (2020) 'Dietary patterns, carbohydrates, and age-related eye diseases', *Nutrients*. doi:10.3390/nu12092862.
- Frederick, P.A. and Kleinman, M.E. (2014) 'The Immune System and AMD', *Current Ophthalmology Reports*. doi:10.1007/s40135-013-0037-x.
- Friedman, D.S., Katz, J., Bressler, N.M., Rahmani, B. and Tielsch, J.M. (1999) 'Racial differences in the prevalence of age-related macular degeneration: The Baltimore Eye Survey', *Ophthalmology*, 106(6), pp. 1049–1055. doi:10.1016/S0161-6420(99)90267-1.
- Fritsche, L.G., Chen, W., Schu, M., Yaspan, B.L., Yu, Y., Thorleifsson, G., Zack, D.J., Arakawa, S., Cipriani, V., Ripke, S., Igo, R.P., Buitendijk, G.H.S., *et al.* (2013) 'Seven new loci associated with age-related macular degeneration', *Nature Genetics*. doi:10.1038/ng.2578.
- Fritsche, L.G., Fariss, R.N., Stambolian, D., Abecasis, G.R., Curcio, C.A. and Swaroop, A. (2014) 'Age-related macular degeneration: Genetics and biology coming together', *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. doi:10.1146/annurev-genom-090413-025610.
- Fritsche, L.G., Igl, W., Bailey, J.N.C., Grassmann, F., Sengupta, S., Bragg-Gresham, J.L., Burdon, K.P., Hebbaring, S.J., Wen, C., Gorski, M., Kim, I.K., Cho, D., *et al.* (2016) 'A large genome-wide association study of age-related macular degeneration highlights contributions of rare and common variants', *Nature Genetics*. doi:10.1038/ng.3448.
- Fritsche, L.G., Loenhardt, T., Janssen, A., Fisher, S.A., Rivera, A., Keilhauer, C.N. and Weber, B.H.F. (2008) 'Age-related macular degeneration is associated with an unstable ARMS2 (LOC387715) mRNA', *Nature Genetics*. doi:10.1038/ng.170.
- Gadjeva, M. (2014) 'The complement system. Overview.', *Methods Mol Biol.*, pp. 1–9. doi:10.1007/978-1-62703-724-2_1.
- Gaillard, E.R., Atherton, S.J., Eldred, G. and Dillon, J. (1995) 'PHOTOPHYSICAL STUDIES ON HUMAN RETINAL LIPOFUSCIN', *Photochemistry and Photobiology*. doi:10.1111/j.1751-1097.1995.tb02343.x.
- Galloway, C.A., Dalvi, S., Hung, S.S.C., MacDonald, L.A., Latchney, L.R., Wong, R.C.B., Guymer, R.H., Mackey, D.A., Williams, D.S., Chung, M.M., Gamm, D.M., Pébay, A., *et al.* (2017) 'Drusen in patient-derived hiPSC-RPE models of macular dystrophies', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi:10.1073/pnas.1710430114.
- Gao, J., Cui, J.Z., To, E., Cao, S. and Matsubara, J.A. (2018) 'Evidence for the activation of pyroptotic and apoptotic pathways in RPE cells associated with NLRP3 inflammasome in the rodent eye', *Journal of Neuroinflammation*, 15(1). doi:10.1186/s12974-018-1062-3.
- García-Onrubia, L., Valentín-Bravo, F.J., Coco-Martin, R.M., González-Sarmiento, R., Pastor, J.C., Usategui-Martín, R. and Pastor-Idoate, S. (2020) 'Matrix metalloproteinases in age-related macular degeneration (Amd)', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(16), pp. 1–32.

doi:10.3390/ijms21165934.

Garzone, D., Imtiaz, M. A., Mauschitz, M. M., Aziz, N. A., Holz, F. G., Breteler, M. M. B., & Finger, R. P. (2024). 'Age-Related Macular Degeneration and Its Genetic Risk: A Population-based Study.' *Current eye research*, 1–5. Advance online publication. <https://doi.org/10.1080/02713683.2024.2388692>

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*. doi:10.1016/j.molimm.2016.11.016.

Golestaneh, N., Chu, Y., Cheng, S.K., Cao, H., Poliakov, E. and Berinstein, D.M. (2016) 'Repressed sirt1/pgc-1 α pathway and mitochondrial disintegration in ipsc-derived rpe disease model of age-related macular degeneration', *Journal of Translational Medicine*, 14(1). doi:10.1186/s12967-016-1101-8.

Golestaneh, N., Chu, Y., Xiao, Y.Y., Stoleru, G.L. and Theos, A.C. (2017) 'Dysfunctional autophagy in RPE, a contributing factor in age-related macular degeneration', *Cell Death and Disease*, 8(1). doi:10.1038/cddis.2016.453.

Gong, J., Cai, H., Noggle, S., Paull, D., Rizzolo, L.J., Del Priore, L. V. and Fields, M.A. (2020) 'Stem cell-derived retinal pigment epithelium from patients with age-related macular degeneration exhibit reduced metabolism and matrix interactions', *Stem Cells Translational Medicine*. doi:10.1002/sctm.19-0321.

González-Zamora, J., Hernandez, M., Recalde, S., Bezunartea, J., Montoliu, A., Bilbao-Malavé, V., Orbe, J., Rodríguez, J. A., Llorente-González, S., Fernández-Robredo, P., & García-Layana, A. (2022) 'Matrix Metalloproteinase 10 Contributes to Choroidal Neovascularisation', *Biomedicines*, 10(7), 1557. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10071557>

González-Zamora, J., Hernandez, M., Recalde, S., Bezunartea, J., Montoliu, A., Bilbao-Malavé, V., Llorente-González, S., García-Layana, A., & Fernández-Robredo, P. (2023) 'Matrix Metalloproteinase 13 Is Associated with Age-Related Choroidal Neovascularization', *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 12(4), 884. <https://doi.org/10.3390/antiox12040884>

Gordiyenko, N., Campos, M., Lee, J.W., Fariss, R.N., Sztein, J. and Rodriguez, I.R. (2004) 'RPE cells internalize low-density lipoprotein (LDL) and oxidized LDL (oxLDL) in large quantities in vitro and in vivo', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. doi:10.1167/iovs.04-0074.

Grassmann, F., Fritsche, L.G., Keilhauer, C.N., Heid, I.M. and Weber, B.H.F. (2012) 'Modelling the genetic risk in age-related macular degeneration', *PLoS ONE*. doi:10.1371/journal.pone.0037979.

Green, W.R. (1999) 'Histopathology of age-related macular degeneration.', *Molecular vision*.

Green, W.R., McDonnell, P.J. and Yeo, J.H. (1985) 'Pathologic Features of Senile Macular Degeneration', *Ophthalmology*. doi:10.1016/S0161-6420(85)33993-3.

Greene, W.A., Burke, T.A., Kaini, R.R., Por, E.D. and Wang, H.C. (2017) 'Polarized Secretion of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors by Retinal Pigment Epithelium Derived from Induced Pluripotent Stem Cells during Wound Healing', in *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. doi:10.1089/jop.2016.0070.

Grossniklaus, H.E. and Green, W.R. (2004) 'Choroidal neovascularization', *American Journal of Ophthalmology*. doi:10.1016/j.ajo.2003.09.042.

Grunwald, J.E., Hariprasad, S.M., DuPont, J., Maguire, M.G., Fine, S.L., Brucker, A.J., Maguire, A.M. and Ho, A.C. (1998) 'Foveolar choroidal blood flow in age-related macular degeneration', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*.

Grunwald, J.E., Metelitsina, T.I., DuPont, J.C., Ying, G.S. and Maguire, M.G. (2005) 'Reduced foveolar choroidal blood flow in eyes with increasing AMD severity', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. doi:10.1167/iovs.04-1050.

- Guo, L., Hussain, A.A., Limb, G.A. and Marshall, J. (1999) 'Age-dependent variation in metalloproteinase activity of isolated human Bruch's membrane and choroid', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*.
- Hageman, G.S., Anderson, D.H., Johnson, L. V., Hancox, L.S., Taiber, A.J., Hardisty, L.I., Hageman, J.L., Stockman, H.A., Borchardt, J.D., Gehrs, K.M., Smith, R.J.H., Silvestri, G., *et al.* (2005) 'A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi:10.1073/pnas.0501536102.
- Hageman, G.S. and Mullins, R.F. (1999) 'Molecular composition of drusen as related to substructural phenotype.', *Molecular vision*.
- Haider, N.B., Cruz, N.M., Allocca, M. and Yuan, J. (2014) 'Pathobiology of the Outer Retina: Genetic and Nongenetic Causes of Disease', in *Pathobiology of Human Disease: A Dynamic Encyclopedia of Disease Mechanisms*. doi:10.1016/B978-0-12-386456-7.04706-7.
- Haines, J.L., Hauser, M.A., Schmidt, S., Scott, W.K., Olson, L.M., Gallins, P., Spencer, K.L., Shu, Y.K., Nouredine, M., Gilbert, J.R., Schnetz-Boutaud, N., Agarwal, A., *et al.* (2005) 'Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration', *Science*. doi:10.1126/science.1110359.
- Handa, J.T. (2012) 'How does the macula protect itself from oxidative stress?', *Molecular Aspects of Medicine*. doi:10.1016/j.mam.2012.03.006.
- Hanus, J., Anderson, C. and Wang, S. (2015) 'RPE necroptosis in response to oxidative stress and in AMD', *Ageing Research Reviews*. doi:10.1016/j.arr.2015.09.002.
- Heier, J. S., Lad, E. M., Holz, F. G., Rosenfeld, P. J., Guymer, R. H., Boyer, D., Grossi, F., Bauman, C. R., Korobelnik, J. F., Slakter, J. S., Waheed, N. K., Metlapally, R., Pearce, I., OAKS and DERBY study investigators (2023) 'Pegcetacoplan for the treatment of geographic atrophy secondary to age-related macular degeneration (OAKS and DERBY): two multicentre, randomised, double-masked, sham-controlled, phase 3 trials', *Lancet (London, England)*, 402(10411), 1434–1448. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(23\)01520-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)01520-9)
- Hoffmann, S., He, S., Ehren, M., Ryan, S.J., Wiedemann, P. and Hinton, D.R. (2006) 'MMP-2 and MMP-9 secretion by RPE is stimulated by angiogenic molecules found in choroidal neovascular membranes', *Retina*. doi:10.1097/00006982-200604000-00012.
- Hollyfield, J.G., Bonilha, V.L., Rayborn, M.E., Yang, X., Shadrach, K.G., Lu, L., Ufret, R.L., Salomon, R.G. and Perez, V.L. (2008) 'Oxidative damage-induced inflammation initiates age-related macular degeneration', *Nature Medicine*. doi:10.1038/nm1709.
- Holz, F.G., Strauss, E.C., Schmitz-Valckenberg, S. and Van Lookeren Campagne, M. (2014) 'Geographic atrophy: Clinical features and potential therapeutic approaches', *Ophthalmology*. doi:10.1016/j.ophtha.2013.11.023.
- Hornof, M., Toropainen, E. and Urtti, A. (2005) 'Cell culture models of the ocular barriers', in *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. doi:10.1016/j.ejpb.2005.01.009.
- Hu, M.L., Quinn, J. and Xue, K. (2021) 'Interactions between apolipoprotein e metabolism and retinal inflammation in age-related macular degeneration', *Life*. doi:10.3390/life11070635.
- Hu, Y. and Ivashkiv, L.B. (2006) 'Costimulation of Chemokine Receptor Signaling by Matrix Metalloproteinase-9 Mediates Enhanced Migration of IFN- α Dendritic Cells', *The Journal of Immunology*. doi:10.4049/jimmunol.176.10.6022.
- Huang, H., Du, W. and Brekken, R.A. (2017) 'Extracellular Matrix Induction of Intracellular Reactive Oxygen Species', *Antioxidants and Redox Signaling*. doi:10.1089/ars.2017.7305.
- Hughes, A.E., Orr, N., Esfandiary, H., Diaz-Torres, M., Goodship, T. and Chakravarthy, U. (2006) 'A common CFH haplotype, with deletion of CFHR1 and CFHR3, is associated with lower risk of age-

related macular degeneration', *Nature Genetics*. doi:10.1038/ng1890.

Hussain, A.A., Lee, Y., Zhang, J.J. and Marshall, J. (2011) 'Disturbed matrix metalloproteinase activity of Bruch's membrane in age-related macular degeneration', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 52(7), pp. 4459–4466. doi:10.1167/iovs.10-6678.

Hussain, A.A., Rowe, L. and Marshall, J. (2002) 'Age-related alterations in the diffusional transport of amino acids across the human Bruch's-choroid complex', *Journal of the Optical Society of America A*. doi:10.1364/josaa.19.000166.

Hussain, A.A., Starita, C., Hodgetts, A. and Marshall, J. (2010) 'Macromolecular diffusion characteristics of ageing human Bruch's membrane: Implications for age-related macular degeneration (AMD)', *Experimental Eye Research*. doi:10.1016/j.exer.2010.02.013.

Ishida, B.Y., Bailey, K.R., Duncan, K.G., Chalkley, R.J., Burlingame, A.L., Kane, J.P. and Schwartz, D.M. (2004) 'Regulated expression of apolipoprotein E by human retinal pigment epithelial cells', *Journal of Lipid Research*, 45(2). doi:10.1194/jlr.M300306-JLR200.

Jacob-Ferreira, A.L., Kondo, M.Y., Baral, P.K., James, M.N.G., Holt, A., Fan, X. and Schulz, R. (2013) 'Phosphorylation Status of 72 kDa MMP-2 Determines Its Structure and Activity in Response to Peroxynitrite', *PLoS ONE*, 8(8). doi:10.1371/journal.pone.0071794.

Jager, R.D., Mieler, W.F. and Miller, J.W. (2008) 'Medical progress: Age-related macular degeneration', *New England Journal of Medicine*.

Jakobsdottir, J., Conley, Y.P., Weeks, D.E., Mah, T.S., Ferrell, R.E. and Gorin, M.B. (2005) 'Susceptibility genes for age-related maculopathy on chromosome 10q26', *American Journal of Human Genetics*. doi:10.1086/444437.

Johnson, L. V., Forest, D.L., Banna, C.D., Radeke, C.M., Maloney, M.A., Hu, J., Spencer, C.N., Walker, A.M., Tsie, M.S., Bok, D., Radeke, M.J. and Anderson, D.H. (2011) 'Cell culture model that mimics drusen formation and triggers complement activation associated with age-related macular degeneration', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi:10.1073/pnas.1109703108.

Johnson, L. V., Leitner, W.P., Rivest, A.J., Staples, M.K., Radeke, M.J. and Anderson, D.H. (2002) 'The Alzheimer's A β -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). doi:10.1073/pnas.192203399.

Johnson, L. V., Leitner, W.P., Staples, M.K. and Anderson, D.H. (2001) 'Complement activation and inflammatory processes in drusen formation and age related macular degeneration', *Experimental Eye Research*. doi:10.1006/exer.2001.1094.

Johnson, L. V., Ozaki, S., Staples, M.K., Erickson, P.A. and Anderson, D.H. (2000) 'A potential role for immune complex pathogenesis in drusen formation', *Experimental Eye Research*. doi:10.1006/exer.1999.0798.

Jonas, J.B., Bourne, R.R.A., White, R.A., Flaxman, S.R., Keeffe, J., Leasher, J., Naidoo, K., Pesudovs, K., Price, H., Wong, T.Y., Resnikoff, S. and Taylor, H.R. (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*, 6(6), pp. 493–497. doi:10.22608/APO.2017251.

Juuti-Uusitalo, K., Nieminen, M., Treumer, F., Ampuja, M., Kallioniemi, A., Klettner, A. and Skottman, H. (2015) 'Effects of cytokine activation and oxidative stress on the function of the human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelial cells', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. doi:10.1167/iovs.15-17333.

- Kaarniranta, K., Pawlowska, E., Szczepanska, J., Jablkowska, A. and Blasiak, J. (2019) 'Role of mitochondrial dna damage in ros-mediated pathogenesis of age-related macular degeneration (Amd)', *International Journal of Molecular Sciences*. doi:10.3390/ijms20102374.
- Kaarniranta, K., Uusitalo, H., Blasiak, J., Felszeghy, S., Kannan, R., Kauppinen, A., Salminen, A., Sinha, D. and Ferrington, D. (2020) 'Mechanisms of mitochondrial dysfunction and their impact on age-related macular degeneration', *Progress in Retinal and Eye Research*. doi:10.1016/j.preteyeres.2020.100858.
- Kadler, K.E., Hill, A. and Canty-Laird, E.G. (2008) 'Collagen fibrillogenesis: fibronectin, integrins, and minor collagens as organizers and nucleators', *Current Opinion in Cell Biology*. doi:10.1016/j.ceb.2008.06.008.
- Kaemmerer, E., Schutt, F., Krohne, T.U., Holz, F.G. and Kopitz, J. (2007) 'Effects of lipid peroxidation-related protein modifications on RPE lysosomal functions and POS phagocytosis', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. doi:10.1167/iovs.06-0549.
- Kameda, K., Matsunaga, T., Abe, N., Hanada, H., Ishizaka, H., Ono, H., Saitoh, M., Fukui, K., Fukuda, I., Osanai, T. and Okumura, K. (2003) 'Correlation of oxidative stress with activity of matrix metalloproteinase in patients with coronary artery disease. Possible role for left ventricular remodelling', *European Heart Journal*. doi:10.1016/j.ehj.2003.09.022.
- Kamei, M. and Hollyfield, J.G. (1999) 'TIMP-3 in Bruch's membrane: Changes during aging and in age-related macular degeneration', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*.
- Kannan, R., Sreekumar, P.G. and Hinton, D.R. (2016) 'Alpha crystallins in the retinal pigment epithelium and implications for the pathogenesis and treatment of age-related macular degeneration', *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. doi:10.1016/j.bbagen.2015.05.016.
- Karunadharma, P.P., Nordgaard, C.L., Olsen, T.W. and Ferrington, D.A. (2010) 'Mitochondrial DNA damage as a potential mechanism for Age-Related macular Degeneration', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 51(11). doi:10.1167/iovs.10-5429.
- Karwatowski, W.S.S., Jeffries, T.E., Duance, V.C., Albon, J., Bailey, A.J. and Easty, D.L. (1995) 'Preparation of Bruch's membrane and analysis of the age-related changes in the structural collagens', *British Journal of Ophthalmology*. doi:10.1136/bjo.79.10.944.
- Kase, S., He, S., Sonoda, S., Kitamura, M., Spee, C., Wawrousek, E., Ryan, S.J., Kannan, R. and Hinton, D.R. (2010) 'αB-crystallin regulation of angiogenesis by modulation of VEGF', *Blood*, 115(16). doi:10.1182/blood-2009-01-197095.
- Kassoff, A., Kassoff, J., Buehler, J., Eglow, M., Kaufman, F., Mehu, M., Kieval, S., Mairs, M., Graig, B., Quattrocchi, A., Jones, D., Locatelli, J., *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*. doi:10.1001/archophth.119.10.1417.
- Kauppinen, A., Paterno, J.J., Blasiak, J., Salminen, A. and Kaarniranta, K. (2016) 'Inflammation and its role in age-related macular degeneration', *Cellular and Molecular Life Sciences*. doi:10.1007/s00018-016-2147-8.
- Kawa, M.P., Machalinska, A., Roginska, D. and Machalinski, B. (2014) 'Complement System in Pathogenesis of AMD: Dual Player in Degeneration and Protection of Retinal Tissue', *Journal of Immunology Research*. doi:10.1155/2014/483960.
- Kawasaki, R., Yasuda, M., Song, S.J., Chen, S.J., Jonas, J.B., Wang, J.J., Mitchell, P. and Wong, T.Y. (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.
- Kay, P., Yang, Y.C. and Paraoan, L. (2013) 'Directional protein secretion by the retinal pigment epithelium: Roles in retinal health and the development of age-related macular degeneration', *Journal*

of Cellular and Molecular Medicine, 17(7), pp. 833–843. doi:10.1111/jcmm.12070.

Keeling, E., Culling, A.J., Johnston, D.A., Chatelet, D.S., Page, A., Tumbarello, D.A., Lotery, A.J. and Arjuna Ratnayaka, J. (2020) ‘An in-vitro cell model of intracellular protein aggregation provides insights into rpe stress associated with retinopathy’, *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18). doi:10.3390/ijms21186647.

Kennedy, C.J., Rakoczy, P.E. and Constable, I.J. (1995) ‘Lipofuscin of the retinal pigment epithelium: A review’, *Eye (Basingstoke)*. doi:10.1038/eye.1995.192.

Kent, D.L. (2014) ‘Age-related macular degeneration: Beyond anti-angiogenesis’, *Molecular Vision*.

Khanani, A. M., Patel, S. S., Staurengi, G., Tadayoni, R., Danzig, C. J., Eichenbaum, D. A., Hsu, J., Wykoff, C. C., Heier, J. S., Lally, D. R., Monés, J., Nielsen, J. S., Sheth, V. S., Kaiser, P. K., Clark, J., GATHER2 trial investigators (2023). ‘Efficacy and safety of avacincaptad pegol in patients with geographic atrophy (GATHER2): 12-month results from a randomised, double-masked, phase 3 trial.’ *Lancet (London, England)*, 402(10411), 1449–1458. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(23\)01583-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)01583-0)

Kim, S., Park, S.J., Byun, S.J., Park, K.H. and Suh, H.S. (2019) ‘Incremental economic burden associated with exudative age-related macular degeneration: a population-based study’, *BMC Health Services Research*. doi:10.1186/s12913-019-4666-0.

Klein, R., Klein, B.E.K., Knudtson, M.D., Meuer, S.M., Swift, M. and Gangnon, R.E. (2007) ‘Fifteen-Year Cumulative Incidence of Age-Related Macular Degeneration. The Beaver Dam Eye Study’, *Ophthalmology*. doi:10.1016/j.ophtha.2006.10.040.

Klein, R., Klein, B.E.K., Tomany, S.C. and Cruickshanks, K.J. (2003) ‘The association of cardiovascular disease with the long-term incidence of age-related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study.’, *Ophthalmology*. doi:10.1016/S0161-6420(03)00599-2.

Klein, R., Meuer, S.M., Knudtson, M.D., Iyengar, S.K. and Klein, B.E.K. (2008) ‘The Epidemiology of Retinal Reticular Drusen’, *American Journal of Ophthalmology*. doi:10.1016/j.ajo.2007.09.008.

Klein, R., Wang, Q., Klein, B.E.K., Moss, S.E. and Meuer, S.M. (1995) ‘The relationship of age-related maculopathy, cataract, and glaucoma to visual acuity’, *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 36(1), pp. 182–191.

Klein, R.J., Zeiss, C., Chew, E.Y., Tsai, J.Y., Sackler, R.S., Haynes, C., Henning, A.K., SanGiovanni, J.P., Mane, S.M., Mayne, S.T., Bracken, M.B., Ferris, F.L., *et al.* (2005) ‘Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration’, *Science*. doi:10.1126/science.1109557.

Kliffen, M., Lutgens, E., Daemen, M.J.A.P., De Muinck, E.D., Mooy, C.M. and De Jong, P.T.V.M. (2000) ‘The APO*E3-Leiden mouse as an animal model for basal laminar deposit’, *British Journal of Ophthalmology*, 84(12). doi:10.1136/bjo.84.12.1415.

Kliffen, M., Van Der Schaft, T.L., Mooy, C.M. and De Jong, P.T.V.M. (1997) ‘Morphologic changes in age-related maculopathy’, *Microscopy Research and Technique*. doi:10.1002/(SICI)1097-0029(19970115)36:2<106::AID-JEMT4>3.0.CO;2-N.

Krogh Nielsen, M., Subhi, Y., Rue Molbech, C., Nilsson, L.L., Nissen, M.H. and Sørensen, T.L. (2019) ‘Imbalances in tissue inhibitors of metalloproteinases differentiate choroidal neovascularization from geographic atrophy’, *Acta Ophthalmologica*. doi:10.1111/aos.13894.

Krohne, T.U., Stratmann, N.K., Kopitz, J. and Holz, F.G. (2010) ‘Effects of lipid peroxidation products on lipofuscinogenesis and autophagy in human retinal pigment epithelial cells’, *Experimental Eye Research*. doi:10.1016/j.exer.2009.12.011.

Kvanta, A., Algvere, P. V., Berglin, L. and Seregard, S. (1996) ‘Subfoveal fibrovascular membranes in age-related macular degeneration express vascular endothelial growth factor’, *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. doi:10.1016/s0002-9394(14)70522-7.

- Kvanta, A., Shen, W.Y., Sarman, S., Seregard, S., Steen, B. and Rakoczy, E. (2000) 'Matrix metalloproteinase (MMP) expression in experimental choroidal neovascularization', *Current Eye Research*. doi:10.1076/0271-3683(200009)2131-RFT684.
- Kwon, W. and Freeman, S.A. (2020) 'Phagocytosis by the Retinal Pigment Epithelium: Recognition, Resolution, Recycling', *Frontiers in Immunology*. doi:10.3389/fimmu.2020.604205.
- Lambert, N.G., ElShelmani, H., Singh, M.K., Mansergh, F.C., Wride, M.A., Padilla, M., Keegan, D., Hogg, R.E. and Ambati, B.K. (2016) 'Risk factors and biomarkers of age-related macular degeneration', *Progress in Retinal and Eye Research*. doi:10.1016/j.preteyeres.2016.04.003.
- Lambert, V., Wielockx, B., Munaut, C., Galopin, C., Jost, M., Itoh, T., Werb, Z., Baker, A., Libert, C., Krell, H.-W., Foidart, J.-M., Noël, A., *et al.* (2003) 'MMP-2 and MMP-9 synergize in promoting choroidal neovascularization', *The FASEB Journal*. doi:10.1096/fj.03-0113fje.
- Leavesley, D.I., Kashyap, A.S., Croll, T., Sivaramakrishnan, M., Shokoohmand, A., Hollier, B.G. and Upton, Z. (2013) 'Vitronectin - Master controller or micromanager?', *IUBMB Life*. doi:10.1002/iub.1203.
- Lechner, J., Chen, M., Hogg, R.E., Toth, L., Silvestri, G., Chakravarthy, U. and Xu, H. (2016) 'Higher plasma levels of complement C3a, C4a and C5a increase the risk of subretinal fibrosis in neovascular age-related macular degeneration', *Immunity and Ageing*. doi:10.1186/s12979-016-0060-5.
- Van Leeuwen, R., Klaver, C.C.W., Vingerling, J.R., Hofman, A. and De Jong, P.T.V.M. (2003) 'Epidemiology of age-related maculopathy: A review', *European Journal of Epidemiology*. doi:10.1023/A:1025643303914.
- Li, G.Y., Fan, B. and Zheng, Y.C. (2010) 'Calcium overload is a critical step in programmed necrosis of ARPE-19 cells induced by high-concentration H₂O₂', *Biomedical and Environmental Sciences*. doi:10.1016/S0895-3988(10)60078-5.
- Li, J.Q., Welchowski, T., Schmid, M., Mauschitz, M.M., Holz, F.G. and Finger, R.P. (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, Z., Clarke, M.P., Barker, M.D. and McKie, N. (2005) 'TIMP3 mutation in Sorsby's fundus dystrophy: Molecular insights', *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 7(24). doi:10.1017/S1462399405010045.
- Lim, L.S., Mitchell, P., Seddon, J.M., Holz, F.G. and Wong, T.Y. (2012) 'Age-related macular degeneration', *The Lancet*. doi:10.1016/S0140-6736(12)60282-7.
- Van Lint, P. and Libert, C. (2007) 'Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinases and its effect on leukocyte migration and inflammation', *Journal of Leukocyte Biology*. doi:10.1189/jlb.0607338.
- Lipo, E., Cashman, S.M. and Kumar-Singh, R. (2013) 'Aurintricarboxylic acid inhibits complement activation, membrane attack complex, and choroidal neovascularization in a model of macular degeneration', *Investigative ophthalmology & visual science*. doi:10.1167/iovs.13-12923.
- Liu, R.T., Gao, J., Cao, S., Sandhu, N., Cui, J.Z., Chou, C.L., Fang, E. and Matsubara, J.A. (2013) 'Inflammatory mediators induced by amyloid-beta in the retina and RPE In Vivo: Implications for inflammasome activation in age-related macular degeneration', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 54(3). doi:10.1167/iovs.12-10849.
- Liva, F., Cuffaro, D., Nuti, E., Nencetti, S., Orlandini, E., Vozzi, G. and Rossello, A. (2019) 'Age-related Macular Degeneration: Current Knowledge of Zinc Metalloproteinases Involvement', *Current Drug Targets*, 20(9), pp. 903–918. doi:10.2174/1389450120666190122114857.
- Van Lookeren Campagne, M., Lecouter, J., Yaspan, B.L. and Ye, W. (2014) 'Mechanisms of age-related macular degeneration and therapeutic opportunities', *Journal of Pathology*. doi:10.1002/path.4266.

- Lu, L., Hackett, S.F., Mincey, A., Lai, H. and Campochiaro, P.A. (2006) 'Effects of different types of oxidative stress in RPE cells', *Journal of Cellular Physiology*, 206(1). doi:10.1002/jcp.20439.
- Mack, M. (2018) 'Inflammation and fibrosis', *Matrix Biology*. doi:10.1016/j.matbio.2017.11.010.
- Madzharova, E., Kastl, P., Sabino, F. and auf dem Keller, U. (2019) 'Post-translational modification-dependent activity of matrix metalloproteinases', *International Journal of Molecular Sciences*. doi:10.3390/ijms20123077.
- Mak, K.M., Png, C.Y.M. and Lee, D.J. (2016) 'Type V Collagen in Health, Disease, and Fibrosis', *Anatomical Record*, 299(5), pp. 613–629. doi:10.1002/ar.23330.
- Malek, G., Busik, J., Grant, M.B. and Choudhary, M. (2018) 'Models of retinal diseases and their applicability in drug discovery', *Expert Opinion on Drug Discovery*. doi:10.1080/17460441.2018.1430136.
- Manian, K. V., Galloway, C.A., Dalvi, S., Emanuel, A.A., Mereness, J.A., Black, W., Winschel, L., Soto, C., Li, Y., Song, Y., DeMaria, W., Kumar, A., *et al.* (2021) '3D iPSC modeling of the retinal pigment epithelium-choriocapillaris complex identifies factors involved in the pathology of macular degeneration', *Cell Stem Cell*, 28(5), pp. 846-862.e8. doi:10.1016/j.stem.2021.02.006.
- Margolis, R. and Spaide, R.F. (2009) 'A Pilot Study of Enhanced Depth Imaging Optical Coherence Tomography of the Choroid in Normal Eyes', *American Journal of Ophthalmology*. doi:10.1016/j.ajo.2008.12.008.
- Marin-Castaño, M.E., Csaky, K.G. and Cousins, S.W. (2005) 'Nonlethal oxidant injury to human retinal pigment epithelium cells causes cell membrane blebbing but decreased MMP-2 activity', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. doi:10.1167/iovs.04-1224.
- Marmorstein, A.D., Marmorstein, L.Y., Rayborn, M., Wang, X., Hollyfield, J.G. and Petrukhin, K. (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*. doi:10.1073/pnas.220402097.
- Marsiglia, M., Boddu, S., Bearely, S., Xu, L., Breau, B.E., Freund, K.B., Yannuzzi, L.A. and Smith, R.T. (2013) 'Association between geographic atrophy progression and reticular pseudodrusen in eyes with dry age-related macular degeneration', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. doi:10.1167/iovs.12-11073.
- Marsiglia, M., Boddu, S., Chen, C.Y., Jung, J.J., Mrejen, S., Gallego-Pinazo, R. and Freund, K.B. (2015) 'Correlation between neovascular lesion type and clinical characteristics of nonneovascular fellow eyes in patients with unilateral, neovascular age-related macular degeneration', *Retina*. doi:10.1097/IAE.0000000000000460.
- Masuda, N., Tsujinaka, H., Hirai, H., Yamashita, M., Ueda, T. and Ogata, N. (2019) 'Effects of concentration of amyloid β (A β) on viability of cultured retinal pigment epithelial cells', *BMC Ophthalmology*, 19(1). doi:10.1186/s12886-019-1076-3.
- Mathern, D.R. and Heeger, P.S. (2015) 'Molecules great and small: The complement system', *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. doi:10.2215/CJN.06230614.
- Maugeri, A., Barchitta, M., Mazzone, M.G., Giuliano, F. and Agodi, A. (2018) 'Complement system and age-related macular degeneration: Implications of gene-environment interaction for preventive and personalized medicine', *BioMed Research International*. doi:10.1155/2018/7532507.
- McHarg, S., Brace, N., Perveen, R., Unwin, R. and Hageman, G.S. (2016) 'The expression of complement genes by retinal pigment epithelial cells from donors with and without AMD.', *Investigative ophthalmology & visual science*, 57(12).
- McKibbin, M., Ali, M., Bansal, S., Baxter, P.D., West, K., Williams, G., Cassidy, F. and Inglehearn, C.F. (2012) 'CFH, VEGF and HTRA1 promoter genotype may influence the response to intravitreal

- ranibizumab therapy for neovascular age-related macular degeneration', *British Journal of Ophthalmology*. doi:10.1136/bjo.2010.193680.
- McLeod, D.S., Grebe, R., Bhutto, I., Merges, C., Baba, T. and Luty, G.A. (2009) 'Relationship between RPE and choriocapillaris in age-related macular degeneration', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. doi:10.1167/iovs.09-3639.
- Meleth, A.D., Wong, W.T. and Chew, E.Y. (2011) 'Treatment for atrophic macular degeneration', *Current Opinion in Ophthalmology*. doi:10.1097/ICU.0b013e32834594b0.
- Metelitsina, T.I., Grunwald, J.E., DuPont, J.C., Ying, G.S., Brucker, A.J. and Dunaief, J.L. (2008) 'Foveolar choroidal circulation and choroidal neovascularization in age-related macular degeneration', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. doi:10.1167/iovs.07-0526.
- Meyer, J.G., Garcia, T.Y., Schilling, B., Gibson, B.W. and Lamba, D.A. (2019) 'Proteome and Secretome Dynamics of Human Retinal Pigment Epithelium in Response to Reactive Oxygen Species', *Scientific Reports*, 9(1). doi:10.1038/s41598-019-51777-7.
- Miller, C.G., Budoff, G., Prenner, J.L. and Schwarzbauer, J.E. (2017) 'Minireview: Fibronectin in retinal disease', *Experimental Biology and Medicine*. doi:10.1177/1535370216675245.
- Miller, C.G., Pozzi, A., Zent, R. and Schwarzbauer, J.E. (2014) 'Effects of high glucose on integrin activity and fibronectin matrix assembly by mesangial cells', *Molecular Biology of the Cell*. doi:10.1091/mbc.E14-03-0800.
- Mithieux, B.S.M. and Weiss, A.S. (2006) 'Elastin is a key extracellular matrix protein that is critical to the elasticity I. Elastic Fiber The extracellular matrix imparts structural integrity on the tissues and', *Advances*, 70(04), pp. 437–461. doi:10.1016/S0065-3233(04)70013-3.
- Moore, D.J. and Clover, G.M. (2001) 'The effect of age on the macromolecular permeability of human Bruch's membrane', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*.
- Moore, D.J., Hussain, A.A. and Marshall, J. (1995) 'Age-related variation in the hydraulic conductivity of Bruch's membrane', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*.
- Moschos, M.M., Laios, K., Androudi, S., Ladas, D.S. and Chatziralli, I.P. (2018) 'Anti-platelet effects of vitamin supplements in age-related macular degeneration: an in vitro study', *Cutaneous and Ocular Toxicology*. doi:10.1080/15569527.2017.1409754.
- Murali, A., Krishnakumar, S., Subramanian, A. and Parameswaran, S. (2020) 'Bruch's membrane pathology: A mechanistic perspective', *European Journal of Ophthalmology*, 30(6), pp. 1195–1206. doi:10.1177/1120672120919337.
- Nachtigal, A.L., Milenkovic, A., Brandl, C., Schulz, H.L., Duerr, L.M.J., Lang, G.E., Reiff, C., Herrmann, P., Kellner, U. and Weber, B.H.F. (2020) 'Mutation-dependent pathomechanisms determine the phenotype in the bestrophinopathies', *International Journal of Molecular Sciences*. doi:10.3390/ijms21051597.
- Nadeem A, Malik IA, Shariq F, Afridi EK, Taha M, Raufi N, Naveed AK, Iqbal J, Habte A. (2023) 'Advancements in the treatment of geographic atrophy: focus on pegcetacoplan in age-related macular degeneration.' *Ann Med Surg (Lond)*, doi: 10.1097/MS9.0000000000001466.
- Nagaraj, R.H., Nahomi, R.B., Mueller, N.H., Raghavan, C.T., Ammar, D.A. and Petrash, J.M. (2016) 'Therapeutic potential of α -crystallin', *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. doi:10.1016/j.bbagen.2015.03.012.
- Nakata, K., Crabb, J.W. and Hollyfield, J.G. (2005) 'Crystallin distribution in Bruch's membrane-choroid complex from AMD and age-matched donor eyes', *Experimental Eye Research*, 80(6). doi:10.1016/j.exer.2004.12.011.
- Navneet, S., & Rohrer, B. (2022). 'Elastin turnover in ocular diseases: A special focus on age-related

macular degeneration.’ *Experimental eye research*, 222, 109164.
<https://doi.org/10.1016/j.exer.2022.109164>

Nebbioso, M., Lambiase, A., Cerini, A., Limoli, P.G., La Cava, M. and Greco, A. (2019) ‘Therapeutic approaches with intravitreal injections in geographic atrophy secondary to age-related macular degeneration: Current drugs and potential molecules’, *International Journal of Molecular Sciences*. doi:10.3390/ijms20071693.

Newsome, D.A., Hewitt, A.T., Huh, W., Robey, P.G. and Hassell, J.R. (1987) ‘Detection of specific extracellular matrix molecules in drusen, Bruch’s membrane, and ciliary body’, *American Journal of Ophthalmology*, 104(4), pp. 373–381. doi:10.1016/0002-9394(87)90227-3.

Nita, M., Strzałka-Mrozik, B., Grzybowski, A., Mazurek, U. and Romaniuk, W. (2014) ‘Age-related macular degeneration and changes in the extracellular matrix’, *Medical Science Monitor*. doi:10.12659/MSM.889887.

Nozaki, M., Raisler, B.J., Sakurai, E., Sarma, J.V., Barnum, S.R., Lambris, J.D., Chen, Y., Zhang, K., Ambati, B.K., Baffi, J.Z. and Ambati, J. (2006) ‘Drusen complement components C3a and C5a promote choroidal neovascularization’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi:10.1073/pnas.0408835103.

Oak, A.S.W., Messinger, J.D. and Curcio, C.A. (2014) ‘Subretinal drusenoid deposits: Further characterization by lipid histochemistry’, *Retina*. doi:10.1097/IAE.000000000000121.

Ohno-Matsui, K. (2011) ‘Parallel findings in age-related macular degeneration and Alzheimer’s disease’, *Progress in Retinal and Eye Research*, 30(4), pp. 217–238. doi:10.1016/j.preteyeres.2011.02.004.

Padgett, L.C., Lui, G.M., Werb, Z. and Lavail, M.M. (1997) ‘Matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in the retinal pigment epithelium and interphotoreceptor matrix: Vectorial secretion and regulation’, *Experimental Eye Research*. doi:10.1006/exer.1997.0287.

Pankov, R. and Yamada, K.M. (2002) ‘Fibronectin at a glance’, *Journal of Cell Science*, 115(20), pp. 3861–3863. doi:10.1242/jcs.00059.

Park, D.H., Connor, K.M. and Lambris, J.D. (2019) ‘The challenges and promise of complement therapeutics for ocular diseases’, *Frontiers in Immunology*. doi:10.3389/fimmu.2019.01007.

Park, D.H., Sun, H.J. and Lee, S.J. (2017) ‘A comparison of responses to intravitreal bevacizumab, ranibizumab, or aflibercept injections for neovascular age-related macular degeneration’, *International Ophthalmology*. doi:10.1007/s10792-016-0391-4.

Pauleikhoff, D., Wojtecki, S., Müller, D., Bornfeld, N. and Heiligenhaus, A. (2000) ‘Adhäsionseigenschaften der Basalmembranen der Bruchschen Membran. Immunhistochemische Untersuchungen der altersabhängigen Veränderungen von Adhäsionsmolekülen und Lipidablagerungen’, *Ophthalmologe*. doi:10.1007/s003470050520.

Penfold, P.L., Madigan, M.C., Gillies, M.C. and Provis, J.M. (2001) ‘Immunological and aetiological aspects of macular degeneration’, *Progress in Retinal and Eye Research*. doi:10.1016/S1350-9462(00)00025-2.

Piippo, N., Korhonen, E., Hytti, M., Kinnunen, K., Kaarniranta, K. and Kauppinen, A. (2018) ‘Oxidative Stress is the Principal Contributor to Inflammasome Activation in Retinal Pigment Epithelium Cells with Defunct Proteasomes and Autophagy’, *Cellular Physiology and Biochemistry*. doi:10.1159/000492886.

Pilgrim, M.G., Lengyel, I., Lanzirrotti, A., Newville, M., Fearn, S., Emri, E., Knowles, J.C., Messinger, J.D., Read, R.W., Guidry, C. and Curcio, C.A. (2017) ‘Subretinal pigment epithelial deposition of drusen components including hydroxyapatite in a primary cell culture model’, *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. doi:10.1167/iovs.16-21060.

- Plestina-Borjan, I., Katusic, D., Medvidovic-Grubisic, M., Supe-Domic, D., Bucan, K., Tandara, L. and Rogosic, V. (2015) 'Association of age-related macular degeneration with erythrocyte antioxidant enzymes activity and serum total antioxidant status', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. doi:10.1155/2015/804054.
- Del Priore, L. V., Geng, L., Tezel, T.H. and Kaplan, H.J. (2002) 'Extracellular matrix ligands promote RPE attachment to inner Bruch's membrane', *Current Eye Research*, 25(2), pp. 79–89. doi:10.1076/ceyr.25.2.79.10158.
- Qi, J.H., Ebrahim, Q., Ali, M., Cutler, A., Bell, B., Prayson, N., Sears, J., Knauper, V., Murphy, G. and Anand-Apte, B. (2013) 'Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-3 Peptides Inhibit Angiogenesis and Choroidal Neovascularization in Mice', *PLoS ONE*. doi:10.1371/journal.pone.0055667.
- Qi, J.H., Ebrahim, Q., Moore, N., Murphy, G., Claesson-Welsh, L., Bond, M., Baker, A. and Anand-Apte, B. (2003) 'A novel function for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3): Inhibition of angiogenesis by blockage of VEGF binding to VEGF receptor-2', *Nature Medicine*. doi:10.1038/nm846.
- Rein, D.B., Zhang, P., Wirth, K.E., Lee, P.P., Hoerger, T.J., McCall, N., Klein, R., Tielsch, J.M., Vijan, S. and Saaddine, J. (2006) 'The economic burden of major adult visual disorders in the United States', *Archives of Ophthalmology*, 124(12), pp. 1754–1760. doi:10.1001/archophth.124.12.1754.
- Ren, Z., Chen, J. and Khalil, R.A. (2017) 'Zymography as a research tool in the study of matrix metalloproteinase inhibitors', *Methods in Molecular Biology*, 1626(617), pp. 79–102. doi:10.1007/978-1-4939-7111-4_8.
- Resnikoff, S., Pascolini, D., Etya'ale, D., Kocur, I., Pararajasegaram, R., Pokharel, G.P. and Mariotti, S.P. (2004) 'Global data on visual impairment in the year 2002', *Bulletin of the World Health Organization*, 82(11), pp. 844–851. doi:/S0042-96862004001100009.
- Reynolds, R., Hartnett, M.E., Atkinson, J.P., Giclas, P.C., Rosner, B. and Seddon, J.M. (2009) 'Plasma complement components and activation fragments: Associations with age-related macular degeneration genotypes and phenotypes', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. doi:10.1167/iovs.09-3928.
- Rivera, A., Fisher, S.A., Fritsche, L.G., Keilhauer, C.N., Lichtner, P., Meitinger, T. and Weber, B.H.F. (2005) 'Hypothetical LOC387715 is a second major susceptibility gene for age-related macular degeneration, contributing independently of complement factor H to disease risk', *Human Molecular Genetics*. doi:10.1093/hmg/ddi353.
- Rosenfeld, P.J., Shapiro, H., Tuomi, L., Webster, M., Elledge, J. and Blodi, B. (2011) 'Characteristics of patients losing vision after 2 years of monthly dosing in the phase III ranibizumab clinical trials', *Ophthalmology*. doi:10.1016/j.ophtha.2010.07.011.
- Rovner, B.W. (2002) 'Activity Loss and Depression in Age-Related Macular Degeneration', *American Journal of Geriatric Psychiatry*. doi:10.1176/appi.ajgp.10.3.305.
- Ruan, Y., Jiang, S. and Gericke, A. (2021) 'Age-related macular degeneration: Role of oxidative stress and blood vessels', *International Journal of Molecular Sciences*. doi:10.3390/ijms22031296.
- Rudnicka, A.R., Jarrar, Z., Wormald, R., Cook, D.G., Fletcher, A. and Owen, C.G. (2012) 'Age and gender variations in age-related macular degeneration prevalence in populations of European ancestry: A meta-analysis', *Ophthalmology*, 119(3), pp. 571–580. doi:10.1016/j.ophtha.2011.09.027.
- Rudolf, M., Malek, G., Messinger, J.D., Clark, M.E., Wang, L. and Curcio, C.A. (2008) 'Sub-retinal drusenoid deposits in human retina: Organization and composition', *Experimental Eye Research*. doi:10.1016/j.exer.2008.07.010.
- Sachdeva, M.M., Cano, M. and Handa, J.T. (2014) 'Nrf2 signaling is impaired in the aging RPE given an oxidative insult', *Experimental Eye Research*. doi:10.1016/j.exer.2013.10.024.

- Saini, J.S., Corneo, B., Miller, J.D., Kiehl, T.R., Wang, Q., Boles, N.C., Blenkinsop, T.A., Stern, J.H. and Temple, S. (2018) 'Model of Age-related Macular Degeneration', 20(5), pp. 635–647. doi:10.1016/j.stem.2016.12.015.Nicotinamide.
- Sarks, J., Tang, K., Killingsworth, M., Arnold, J. and Sarks, S. (2006) 'Development of atrophy of the retinal pigment epithelium around disciform scars', *British Journal of Ophthalmology*. doi:10.1136/bjo.2005.083022.
- Saxena, N., George, P.P., Hoon, H.B., Han, L.T. and Onn, Y.S. (2016) 'Burden of Wet Age-Related Macular Degeneration and Its Economic Implications in Singapore in the Year 2030', *Ophthalmic Epidemiology*, 23(4), pp. 232–237. doi:10.1080/09286586.2016.1193617.
- Schmitz-Valckenberg, S., Mößner, A., Fleckenstein, M., Wiedemann, P. and Holz, F.G. (2010) 'Therapieansätze bei geographischer Atrophie', *Der Ophthalmologe*. doi:10.1007/s00347-010-2160-5.
- Schwartz, I., Seger, D. and Shaltiel, S. (1999) 'Vitronectin', 31, pp. 539–544.
- Seddon, J.M., Cote, J., Page, W.F., Aggen, S.H. and Neale, M.C. (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.
- Seddon, J.M., Cote, J. and Rosner, B. (2003) 'Progression of Age-Related Macular Degeneration: Association with Dietary Fat, Transunsaturated Fat, Nuts, and Fish Intake', *Archives of Ophthalmology*. doi:10.1001/archophth.121.12.1728.
- Shu, D.Y., Butcher, E. and Saint-Geniez, M. (2020) 'EMT and ENDMT: Emerging roles in age-related macular degeneration', *International Journal of Molecular Sciences*. doi:10.3390/ijms21124271.
- Singh, R., Kuai, D., Guziewicz, K.E., Meyer, J., Wilson, M., Lu, J., Smith, M., Clark, E., Verhoeven, A., Aguirre, G.D. and Gamm, D.M. (2015) 'Pharmacological modulation of photoreceptor outer segment degradation in a human iPS cell model of inherited macular degeneration', *Molecular Therapy*. doi:10.1038/mt.2015.141.
- Singh, R., Phillips, M.J., Kuai, D., Meyer, J., Martin, J.M., Smith, M.A., Perez, E.T., Shen, W., Wallace, K.A., Capowski, E.E., Wright, L.S. and Gamm, D.M. (2013) 'Functional analysis of serially expanded human iPS cell-derived RPE cultures', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. doi:10.1167/iovs.13-11943.
- Sivaprasad, S., Bird, A., Nitiahpapand, R., Nicholson, L., Hykin, P. and Chatziralli, I. (2016) 'Perspectives on reticular pseudodrusen in age-related macular degeneration', *Survey of Ophthalmology*. doi:10.1016/j.survophthal.2016.02.005.
- Smith, W., Assink, J., Klein, R., Mitchell, P., Klaver, C.C.W., Klein, B.E.K., Hofman, A., Jensen, S., Wang, J.J. and De Jong, P.T.V.M. (2001) 'Risk factors for age-related macular degeneration: Pooled findings from three continents', *Ophthalmology*. doi:10.1016/S0161-6420(00)00580-7.
- Solberg, Y., Rosner, M. and Belkin, M. (1998) 'The association between cigarette smoking and ocular diseases. [Review] [162 refs]', *Survey of Ophthalmology*.
- Sottile, J. and Hocking, D.C. (2002) 'Fibronectin polymerization regulates the composition and stability of extracellular matrix fibrils and cell-matrix adhesions', *Molecular Biology of the Cell*. doi:10.1091/mbc.E02-01-0048.
- Spaide, R.F., Ooto, S. and Curcio, C.A. (2018) 'Subretinal drusenoid deposits AKA pseudodrusen', *Survey of Ophthalmology*. doi:10.1016/j.survophthal.2018.05.005.
- Sparrow, J.R. and Boulton, M. (2005) 'RPE lipofuscin and its role in retinal pathobiology', *Experimental Eye Research*. doi:10.1016/j.exer.2005.01.007.
- Sparrow, J.R., Nakanishi, K. and Parish, C.A. (2000) 'The lipofuscin fluorophore A2E mediates blue light-induced damage to retinal pigmented epithelial cells', *Investigative Ophthalmology and Visual*

Science.

Srinivasan, B., Kolli, A.R., Esch, M.B., Abaci, H.E., Shuler, M.L. and Hickman, J.J. (2015) 'TEER Measurement Techniques for In Vitro Barrier Model Systems', *Journal of Laboratory Automation*. doi:10.1177/2211068214561025.

Stahl, A. (2020) 'The Diagnosis and Treatment of Age-Related Macular Degeneration', *Deutsches Ärzteblatt Online*. doi:10.3238/arztebl.2020.0513.

Stangos, N., Voutas, S., Topouzis, F. and Karampatakis, V. (1995) 'Contrast sensitivity evaluation in eyes predisposed to age-related macular degeneration and presenting normal visual acuity', *Ophthalmologica*. doi:10.1159/000310612.

Starita, C., Hussain, A.A., Pagliarini, S. and Marshall, J. (1996) 'Hydrodynamics of ageing Bruch's membrane: Implications for macular disease', *Experimental Eye Research*. doi:10.1006/exer.1996.0066.

Starita, C., Hussain, A.U.A., Patmore, A. and Marshall, J. (1997) 'Localization of the site of major resistance to fluid transport in Bruch's membrane', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*.

Stevenson, B.R., Siliciano, J.D., Mooseker, M.S. and Goodenough, D.A. (1986) 'Identification of ZO-1: A high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (Zonula Occludens) in a variety of epithelia', *Journal of Cell Biology*. doi:10.1083/jcb.103.3.755.

Stone, W.L., Farnsworth, C.C. and Dratz, E.A. (1979) 'A reinvestigation of the fatty acid content of bovine, rat and frog retinal rod outer segments', *Experimental Eye Research*. doi:10.1016/0014-4835(79)90114-3.

Strauss, O. (2005) 'The retinal pigment epithelium in visual function', *Physiological Reviews*. doi:10.1152/physrev.00021.2004.

Sundelin, S., Wihlmark, U., Nilsson, S.E.G. and Brunk, U.T. (1998) 'Lipofuscin accumulation in cultured retinal pigment epithelial cells reduces their phagocytic capacity', *Current Eye Research*. doi:10.1076/ceyr.17.8.851.5146.

Swaroop, A., Chew, E.Y., Rickman, C.B. and Abecasis, G.R. (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.

Tarau, I.S., Berlin, A., Curcio, C.A. and Ach, T. (2019) 'The Cytoskeleton of the Retinal Pigment Epithelium: from Normal Aging to Age-Related Macular Degeneration', *International Journal of Molecular Sciences*. doi:10.3390/ijms20143578.

Tate, D.J., Miceli, M. V. and Newsome, D.A. (1995) 'Phagocytosis and H₂O₂ induce catalase and metallothionein gene expression in human retinal pigment epithelial cells', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*.

Terluk, M.R., Kapphahn, R.J., Soukup, L.M., Gong, H., Gallardo, C., Montezuma, S.R. and Ferrington, D.A. (2015) 'Investigating mitochondria as a target for treating age-related macular degeneration', *Journal of Neuroscience*, 35(18). doi:10.1523/JNEUROSCI.0190-15.2015.

The Lancet (2018) 'Age-related macular degeneration: treatment at what cost?', *The Lancet*, 392(10153), p. 1090. doi:10.1016/S0140-6736(18)32291-8.

Tomany, S.C., Cruickshanks, K.J., Klein, R., Klein, B.E.K. and Knudtson, M.D. (2004) 'Sunlight and the 10-Year Incidence of Age-Related Maculopathy: The Beaver Dam Eye Study', *Archives of Ophthalmology*. doi:10.1001/archopht.122.5.750.

Tomany, S.C., Wang, J.J., Van Leeuwen, R., Klein, R., Mitchell, P., Vingerling, J.R., Klein, B.E.K., Smith, W. and De Jong, P.T.V.M. (2004) 'Risk factors for incident age-related macular degeneration: Pooled findings from 3 continents', *Ophthalmology*. doi:10.1016/j.ophtha.2003.11.010.

- Tong, Y. and Wang, S. (2020) 'Not All Stressors Are Equal: Mechanism of Stressors on RPE Cell Degeneration', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. doi:10.3389/fcell.2020.591067.
- Tong, Y., Zhang, Z. and Wang, S. (2022) 'Role of Mitochondria in Retinal Pigment Epithelial Aging and Degeneration', *Frontiers in aging*, 3, 926627. <https://doi.org/10.3389/fragi.2022.926627>
- Tyl Hewitt, A., Nakazawa, K. and Newsome, D.A. (1989) 'Analysis of newly synthesized Bruch's membrane proteoglycans', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*.
- Vinding, T., Appleyard, M., Nyboe, J. and Jensen, G. (1992) 'Risk factor analysis for atrophic and exudative age-related macular degeneration: An epidemiological study of 1000 aged individuals', *Acta Ophthalmologica*. doi:10.1111/j.1755-3768.1992.tb02093.x.
- Vranka, J.A., Johnson, E., Zhu, X., Shepardson, A., Alexander, J.P., Bradley, J.M.B., Wirtz, M.K., Weleber, R.G., Klein, M.L. and Acott, T.S. (1997) 'Discrete expression and distribution pattern of TIMP-3 in the human retina and choroid', *Current Eye Research*. doi:10.1076/ceyr.16.2.102.5086.
- Walport, M.J. (2001) 'Complement. First of two parts.', *New England Journal of Medicine*, 344(14), pp. 1058–1066. doi:10.1056/NEJM200104053441406.
- Wang, C. hu, Cao, G.F., Jiang, Q. and Yao, J. (2012) 'TNF- α promotes human retinal pigment epithelial (RPE) cell migration by inducing matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) expression through activation of Akt/mTORC1 signaling', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. doi:10.1016/j.bbrc.2012.07.044.
- Wang, L., Clark, M.E., Crossman, D.K., Kojima, K., Messinger, J.D., Mobley, J.A. and Curcio, C.A. (2010) 'Abundant lipid and protein components of drusen', *PLoS ONE*. doi:10.1371/journal.pone.0010329.
- Weber, B.H.F., Vogt, G., Pruett, R.C., Stöhr, H. and Felbor, U. (1994) 'Mutations in the tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3) in patients with Sorsby's fundus dystrophy', *Nature Genetics*. doi:10.1038/ng1294-352.
- Wightman, A.J. and Guymer, R.H. (2019) 'Reticular pseudodrusen: current understanding', *Clinical and Experimental Optometry*. doi:10.1111/cxo.12842.
- Wihlmark, U., Wrjgstad, A., Roberg, K., Brunk, U.T. and Nilsson, S.E.G. (1996) 'Formation of lipofuscin in cultured retinal pigment epithelial cells exposed to pre-oxidized photoreceptor outer segments', *APMIS*. doi:10.1111/j.1699-0463.1996.tb00717.x.
- Winkler, B.S., Boulton, M.E., Gottsch, J.D. and Sternberg, P. (1999) 'Oxidative damage and age-related macular degeneration.', *Molecular vision*.
- Wong, W.L., Su, X., Li, X., Cheung, C.M.G., Klein, R., Cheng, C.Y. and Wong, T.Y. (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.
- Wu, J. and Sun, X. (2019) 'Complement system and age-related macular degeneration: Drugs and challenges', *Drug Design, Development and Therapy*. doi:10.2147/DDDT.S206355.
- Wu, Z., Ayton, L.N., Luu, C.D., Baird, P.N. and Guymer, R.H. (2016) 'Reticular pseudodrusen in intermediate age-related macular degeneration: Prevalence, detection, clinical, environmental, and genetic associations', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. doi:10.1167/iovs.15-18682.
- Xu, H. and Chen, M. (2016) 'Targeting the complement system for the management of retinal inflammatory and degenerative diseases', *European Journal of Pharmacology*. doi:10.1016/j.ejphar.2016.03.001.
- Yadav, U.C.S. and Ramana, K. V. (2013) 'Regulation of NF- κ B-induced inflammatory signaling by lipid peroxidation-derived aldehydes', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.

doi:10.1155/2013/690545.

Yang, P., Skiba, N.P., Tewkesbury, G.M., Treboschi, V.M., Baciú, P. and Jaffe, G.J. (2017) 'Complement-mediated regulation of apolipoprotein e in cultured human RPE Cells', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 58(7). doi:10.1167/iovs.16-20083.

Ye, Z., He, S.Z. and Li, Z.H. (2018) 'Effect of A β protein on inhibiting proliferation and promoting apoptosis of retinal pigment epithelial cells', *International Journal of Ophthalmology*, 11(6). doi:10.18240/ijo.2018.06.06.

Yehoshua, Z., Alexandre De Amorim Garcia Filho, C., Nunes, R.P., Gregori, G., Penha, F.M., Moshfeghi, A.A., Zhang, K., Sadda, S., Feuer, W. and Rosenfeld, P.J. (2014) 'Systemic complement inhibition with eculizumab for geographic atrophy in age-related macular degeneration: The COMPLETE study', *Ophthalmology*. doi:10.1016/j.ophtha.2013.09.044.

Yi, X., Ogata, N., Komada, M., Yamamoto, C., Takahashi, K., Omori, K. and Uyama, M. (1997) 'Vascular endothelial growth factor expression in choroidal neovascularization in rats', *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. doi:10.1007/BF01739641.

Yu, D.Y. and Cringle, S.J. (2005) 'Retinal degeneration and local oxygen metabolism', *Experimental Eye Research*. doi:10.1016/j.exer.2005.01.018.

Zarbin, M.A. (2004) 'Current Concepts in the Pathogenesis of Age-Related Macular Degeneration', *Archives of Ophthalmology*, 122(4), pp. 598–614. doi:10.1001/archophth.122.4.598.

Zhang, D.D. (2006) 'Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway', in *Drug Metabolism Reviews*. doi:10.1080/03602530600971974.

Zhao, X., Hu, L., Liu, G., Yin, X., Gong, Q., Li, Y., Li, Q., Zhou, Y., Sun, Y., Guo, C., & Du, Z. (2024). 'Fibronectin binds integrin $\alpha 5\beta 1$ to regulate macular neovascularization through the Wnt/ β -catenin signaling pathway', *Experimental eye research*, 242, 109880. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2024.109880>

12 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bedanken für die freundliche Unterstützung sowie für die vielen Anregungen und Vorschläge, die mir während der Anfertigung dieser Arbeit zukamen.

Herzlichen Dank an Herrn Professor Dr. Weber für die Möglichkeit, spannende und aktuelle Forschungsarbeit kennenzulernen und für die Begutachtung dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Plössl und Frau Dr. Ulrike Friedrich für die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten, die mir jederzeit mit Rat und Tat zu Seite standen. Ohne die umfassende Betreuung und Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Bedanken möchte ich mich auch beim gesamten, sehr hilfsbereiten Team des Instituts sowie für die Unterstützung aus meinem persönlichen Umfeld.

13 Lebenslauf

Zur Person:

Name, Vorname: Glanz, Dario

Geburtsdatum/-ort: 19.12.1999 in Marl, Deutschland

Universitäre Ausbildung:

seit 2020	Bachelorstudium Mathematik, Universität Regensburg
2023 bis 2024	Praktisches Jahr an den Universitätskliniken der Universität Regensburg, TU München und PMU Salzburg
2019 bis 2022	Studium der Humanmedizin, Universität Regensburg, klinischer Abschnitt
2017 bis 2019	Studium der Humanmedizin, Universität Regensburg, vorklinischer Abschnitt

Schulische Ausbildung:

2009 bis 2017	Besuch des Gymnasiums Kolleg der Schulbrüder, Illertissen mit Erreichen der allgemeinen Hochschulreife 2017
2005 bis 2009	Besuch der Grundschule, Dietenheim

14 Selbstständigkeitserklärung

Ich, Dario Glanz, geboren am 19.12.1999 in Marl, 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 von Quellen 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.

Regensburg den 17.09.2024

Dario Glanz

15 Appendix

Im Folgenden werden für die Färbungen von EZM- und Drusenbestandteilen aus Kapitel 4.2.1 und 4.2.2 ausführliche Zusammenstellungen repräsentativer Fluoreszenzphotographien gezeigt. Die entsprechenden Bilder für die HR-Zelllinien 1/2 mit POS und die LR-Zelllinien 2/4 mit POS fehlen dabei aufgrund von Problemen bei der Kultivierung.

Für die Färbungen wurden 4 Hochrisiko (HR)-Zelllinien und 4 Niedrigrisiko (LR)-Zelllinien für 90 Tage auf Transwell Filtereinsätzen kultiviert, ab Tag 42 wurde ein Teil der Zellen regelmäßig mit Photorezeptor-Außensegmenten (POS) gefüttert. Nach 90 Tagen wurde die Filtereinsätze mit Zelllysepuffer bzw. Trypsin dezellularisiert und mit Antikörpern gegen das entsprechende Protein bzw. Lipide mit Nilrot gefärbt. Die Bilder wurden mithilfe konfokaler Laserscanningmikroskopie bei 10x Vergrößerung aufgenommen (Scale bars: 100 µm).

15.1 ICC-Analyse von Strukturproteinen der EZM

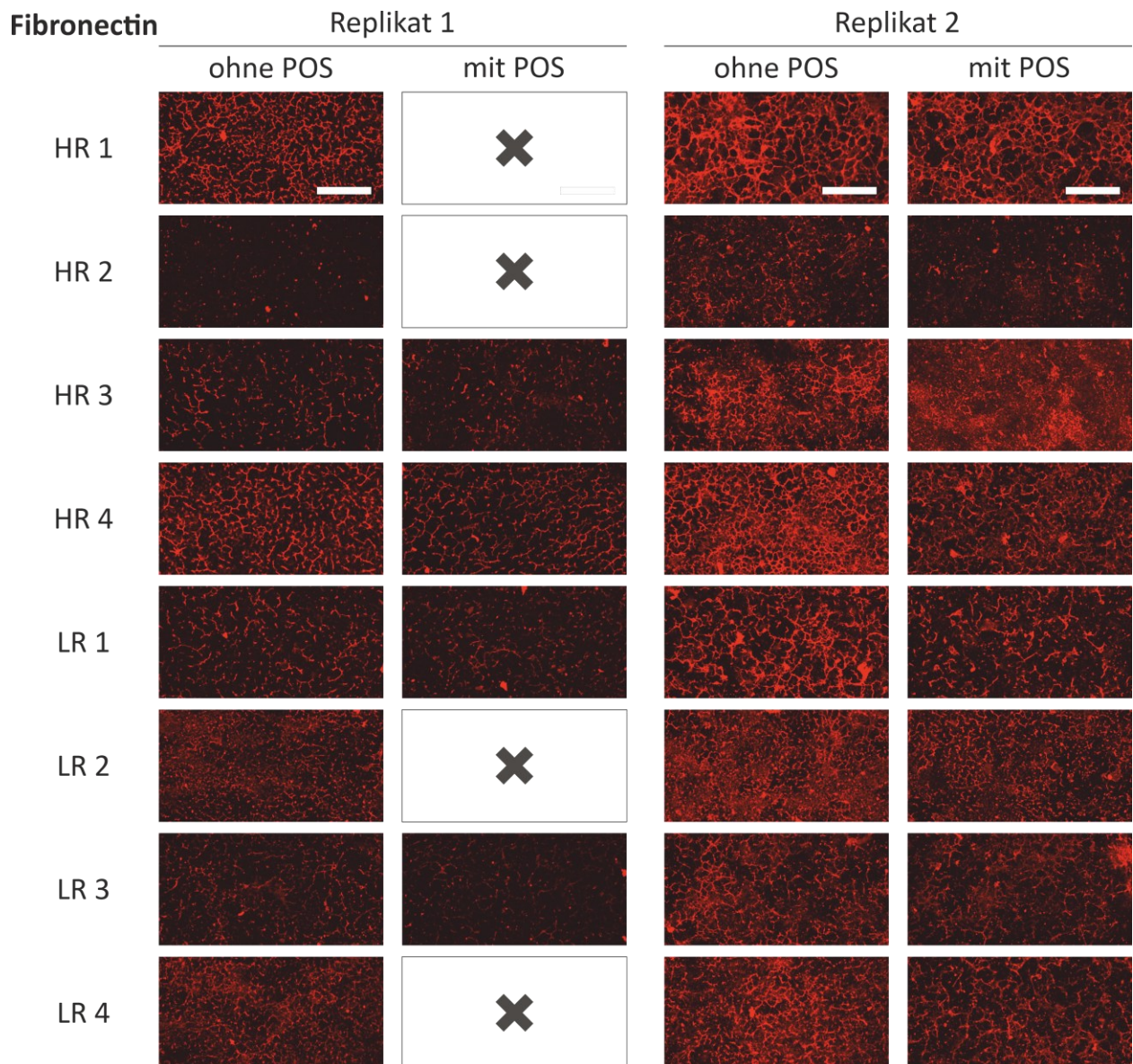


Abbildung 22: Ausführliche Zusammenstellung der Fluoreszenzphotographien der Färbung gegen FN.

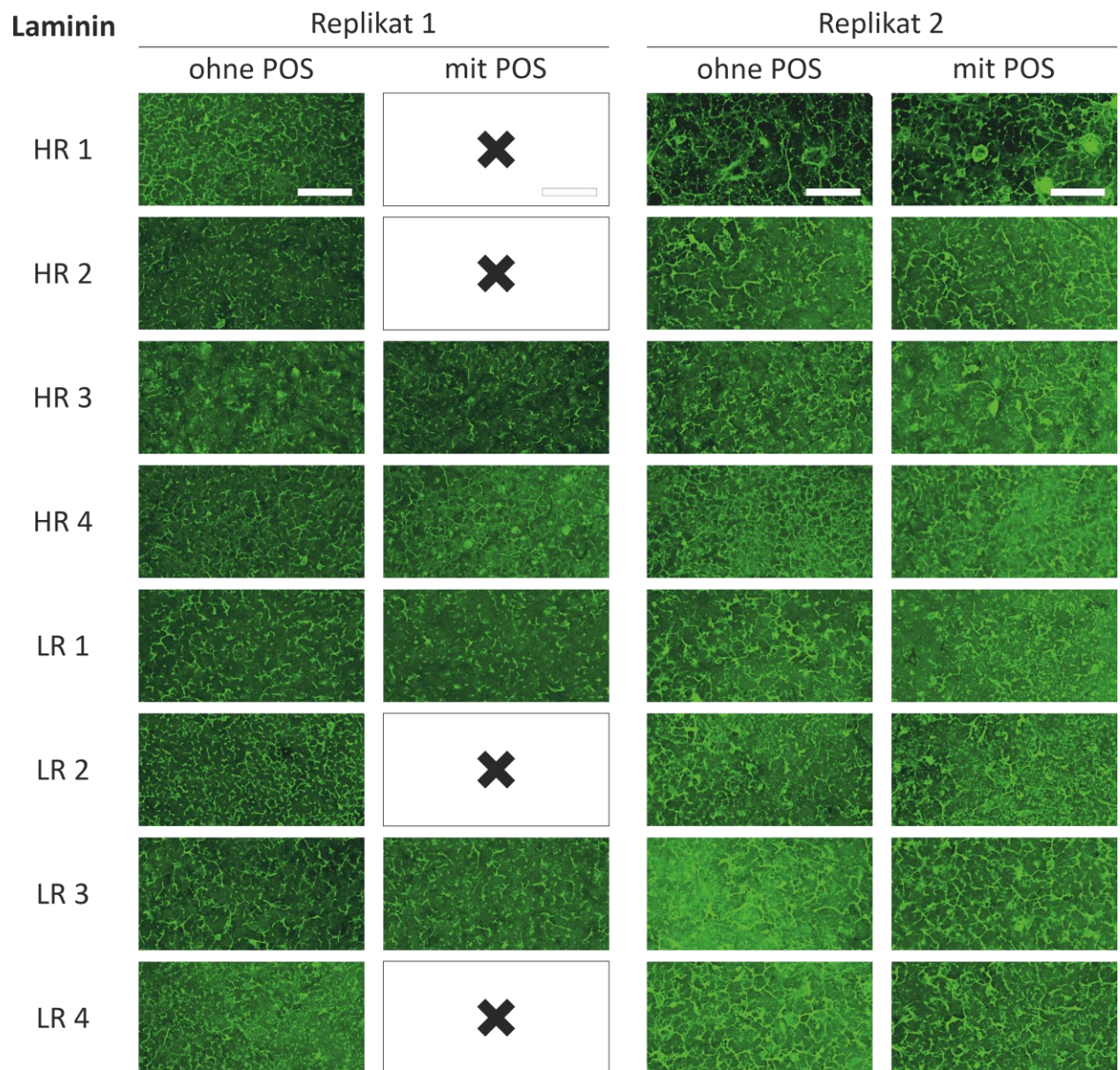


Abbildung 23: Ausführliche Zusammenstellung der Fluoreszenzphotographien der Färbung gegen Laminin.

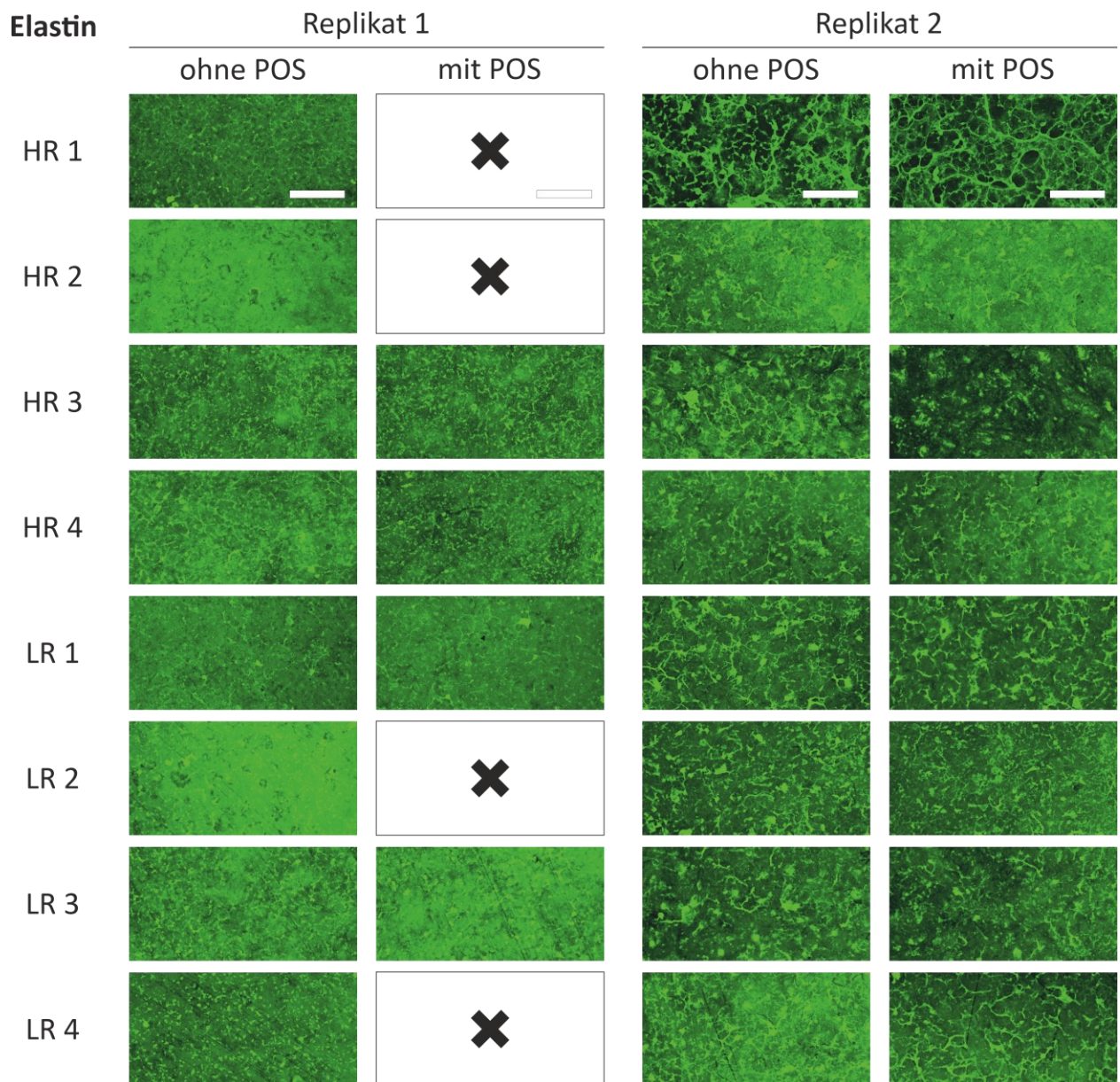


Abbildung 24: Ausführliche Zusammenstellung der Fluoreszenzphotographien der Färbung gegen Elastin.

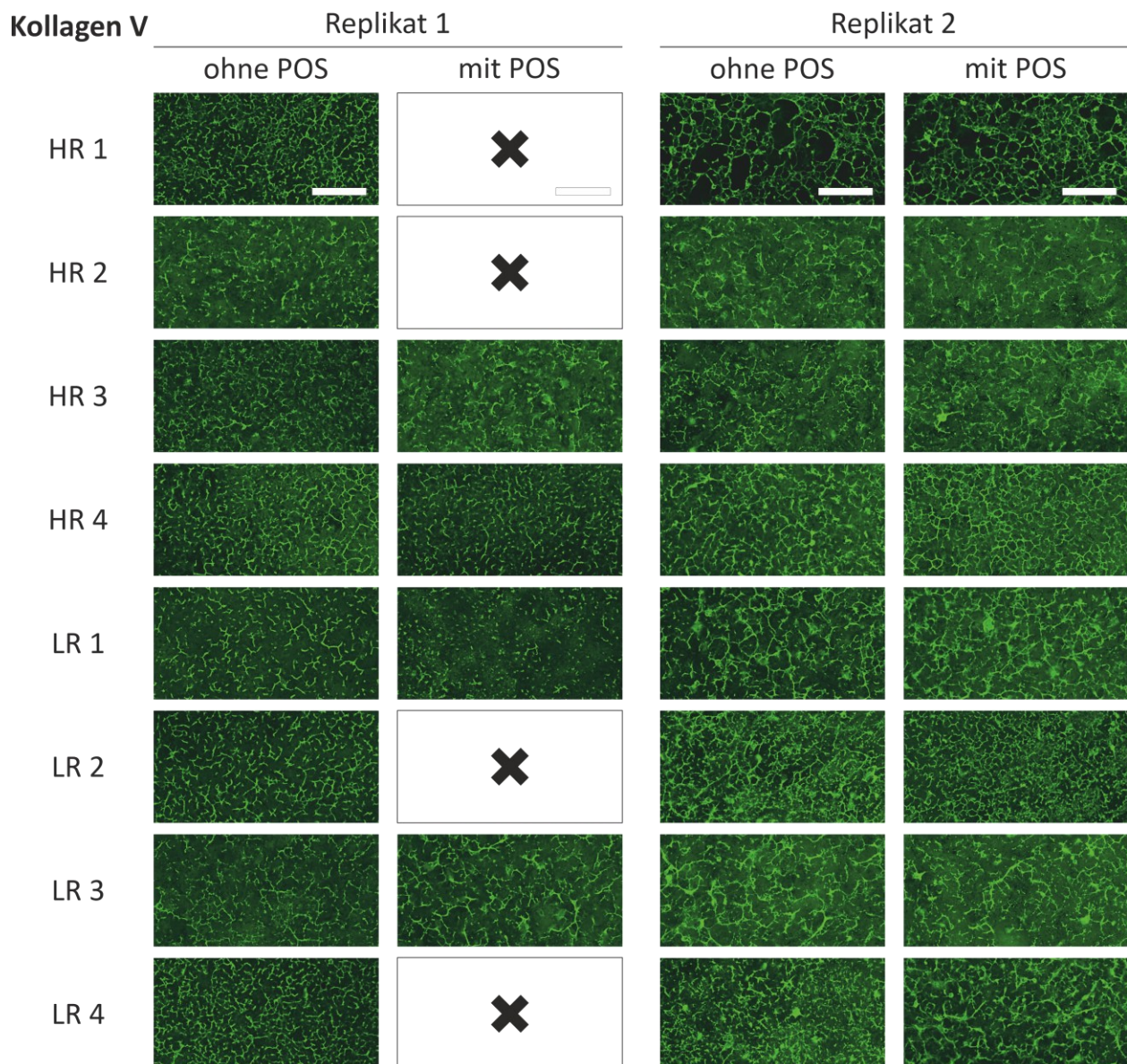


Abbildung 25: Ausführliche Zusammenstellung der Fluoreszenzphotographien der Färbung gegen Kollagen V.

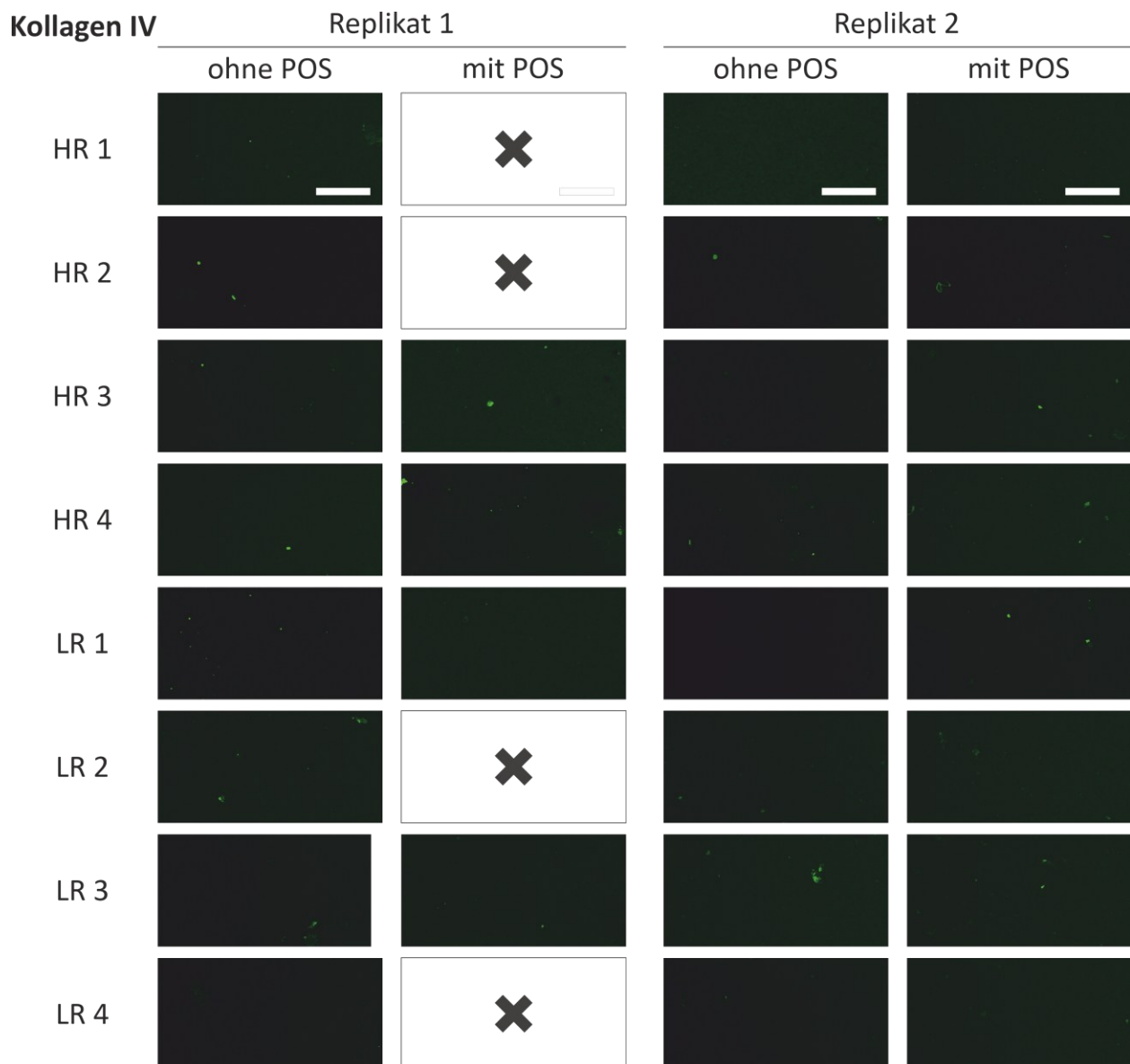


Abbildung 26: Ausführliche Zusammenstellung der Fluoreszenzphotographien der Färbung gegen Kollagen IV.

15.2 ICC-Analyse von AMD-typischen Proteinen und Lipiden als Bestandteil von Drusen

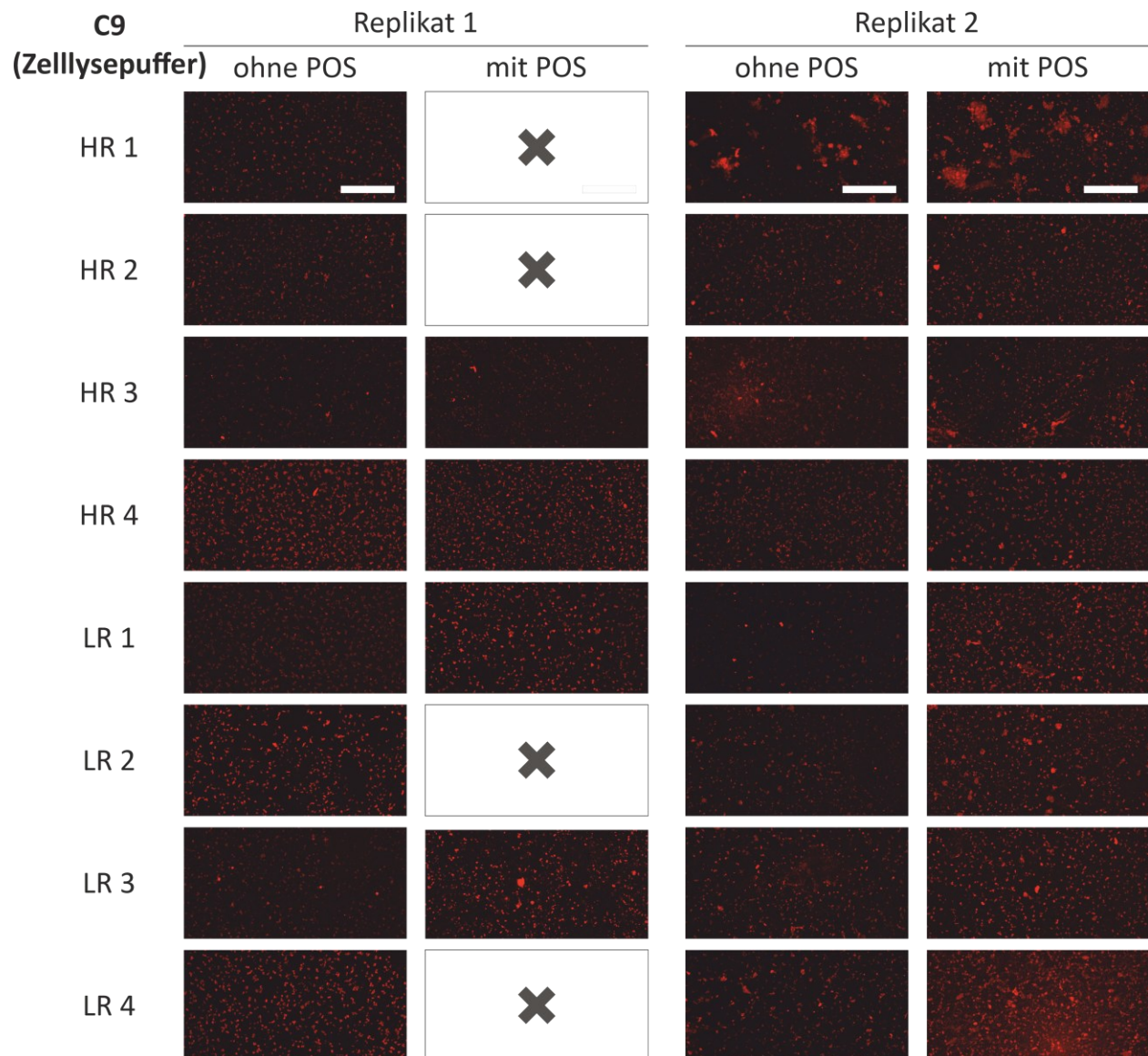


Abbildung 27: Ausführliche Zusammenstellung der Fluoreszenzphotographien der Färbung gegen C9 bei Ablösen der Zellen mit Zelllysepuffer.

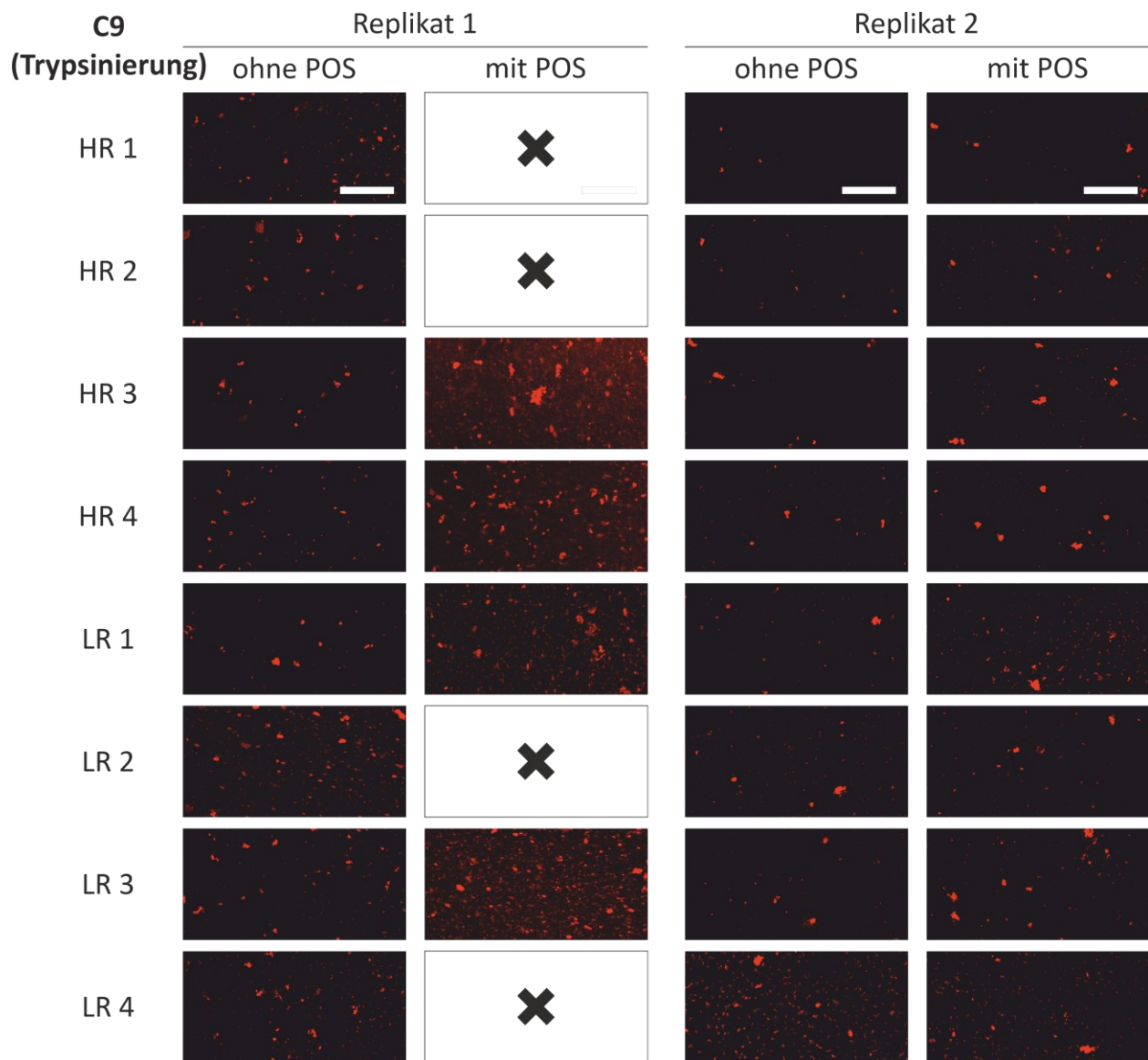


Abbildung 28: Ausführliche Zusammenstellung der Fluoreszenzphotographien der Färbung gegen C9 bei Ablösen der Zellen mit Trypsin.

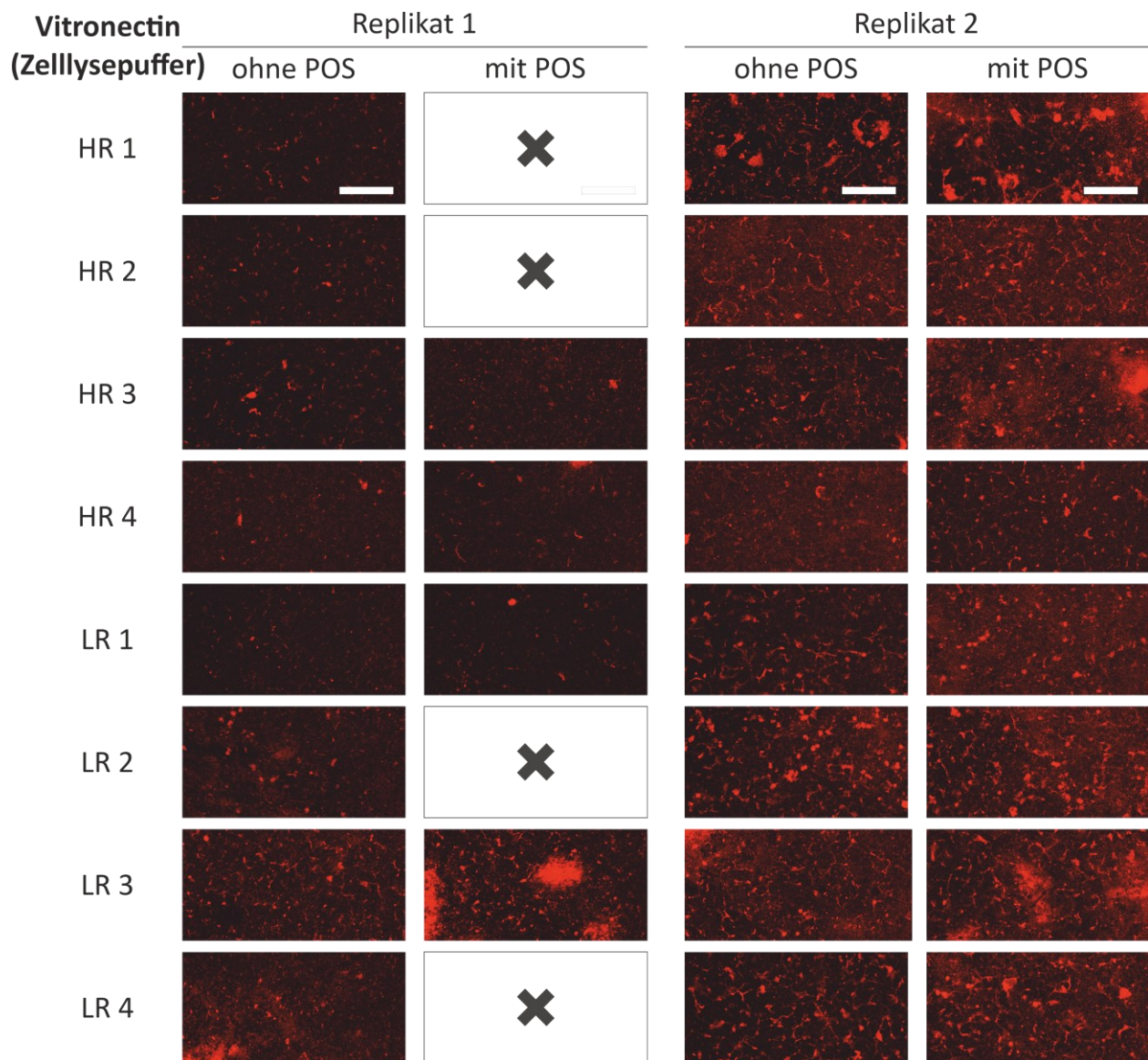


Abbildung 29: Ausführliche Zusammenstellung der Fluoreszenzphotographien der Färbung gegen VTN bei Ablösen der Zellen mit Zelllysepuffer.

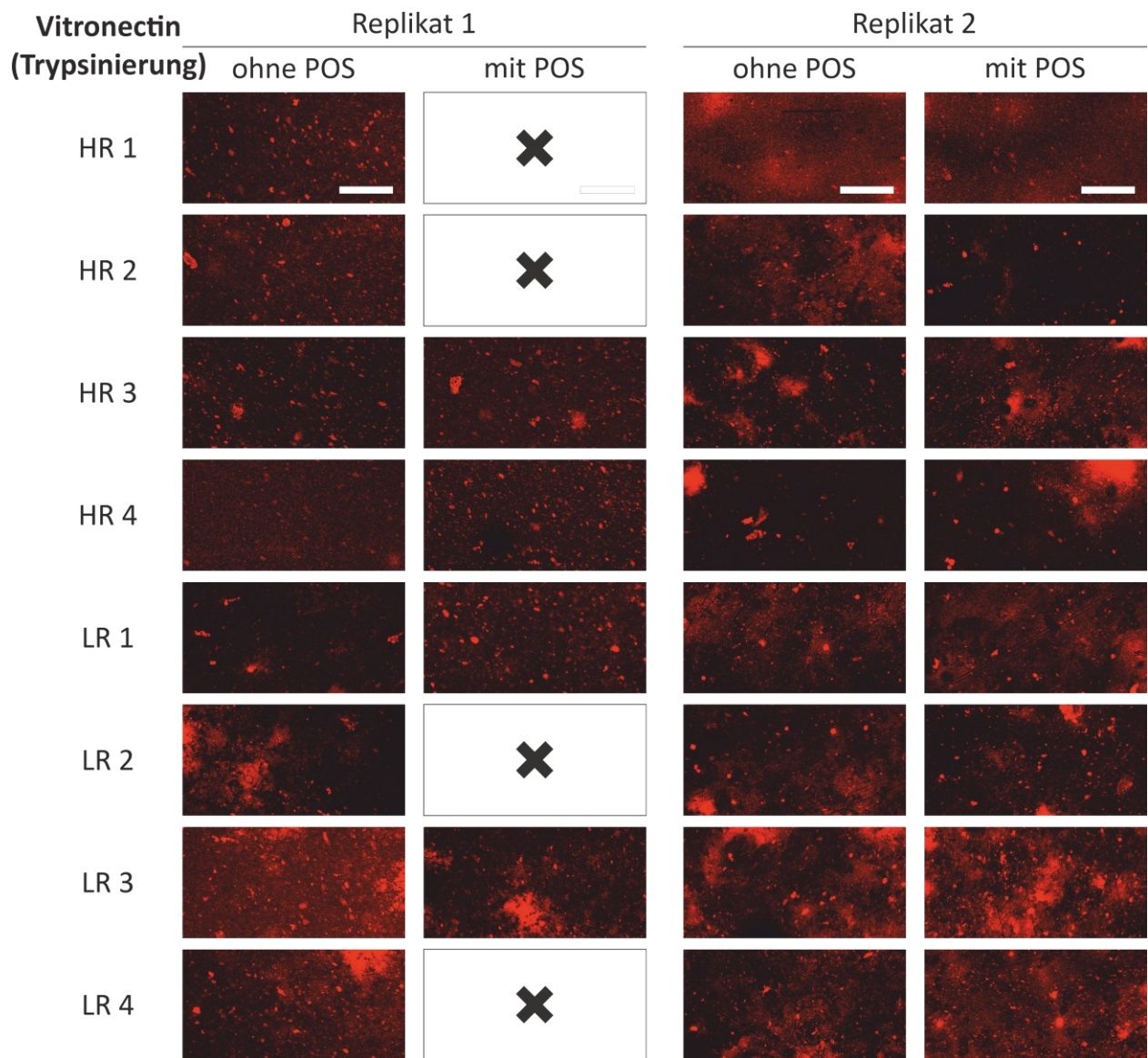


Abbildung 30: Ausführliche Zusammenstellung der Fluoreszenzphotographien der Färbung gegen VTN bei Ablösen der Zellen mit Trypsin.

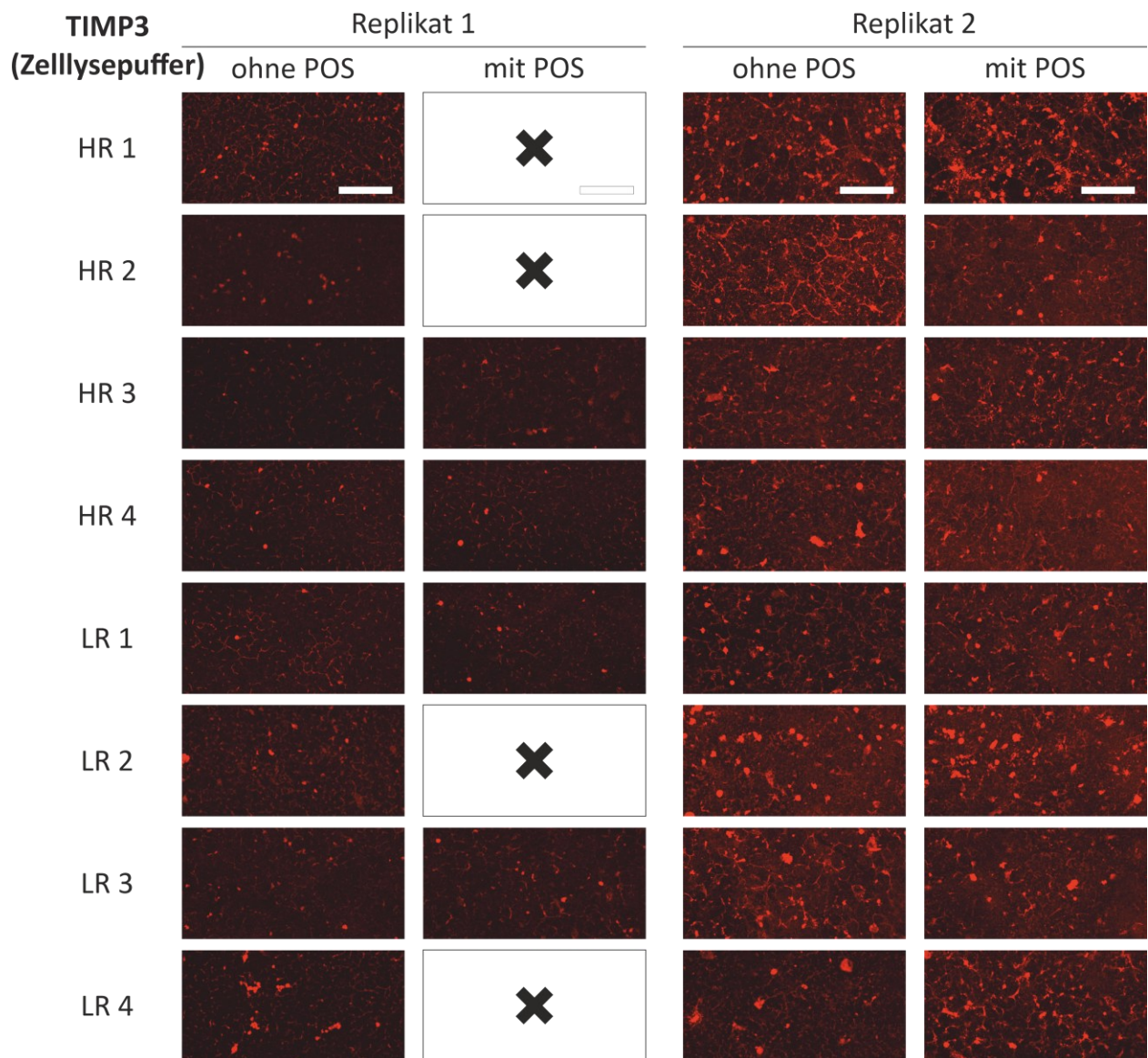


Abbildung 31: Ausführliche Zusammenstellung der Fluoreszenzphotographien der Färbung gegen TIMP3 bei Ablösen der Zellen mit Zellysepuffer.

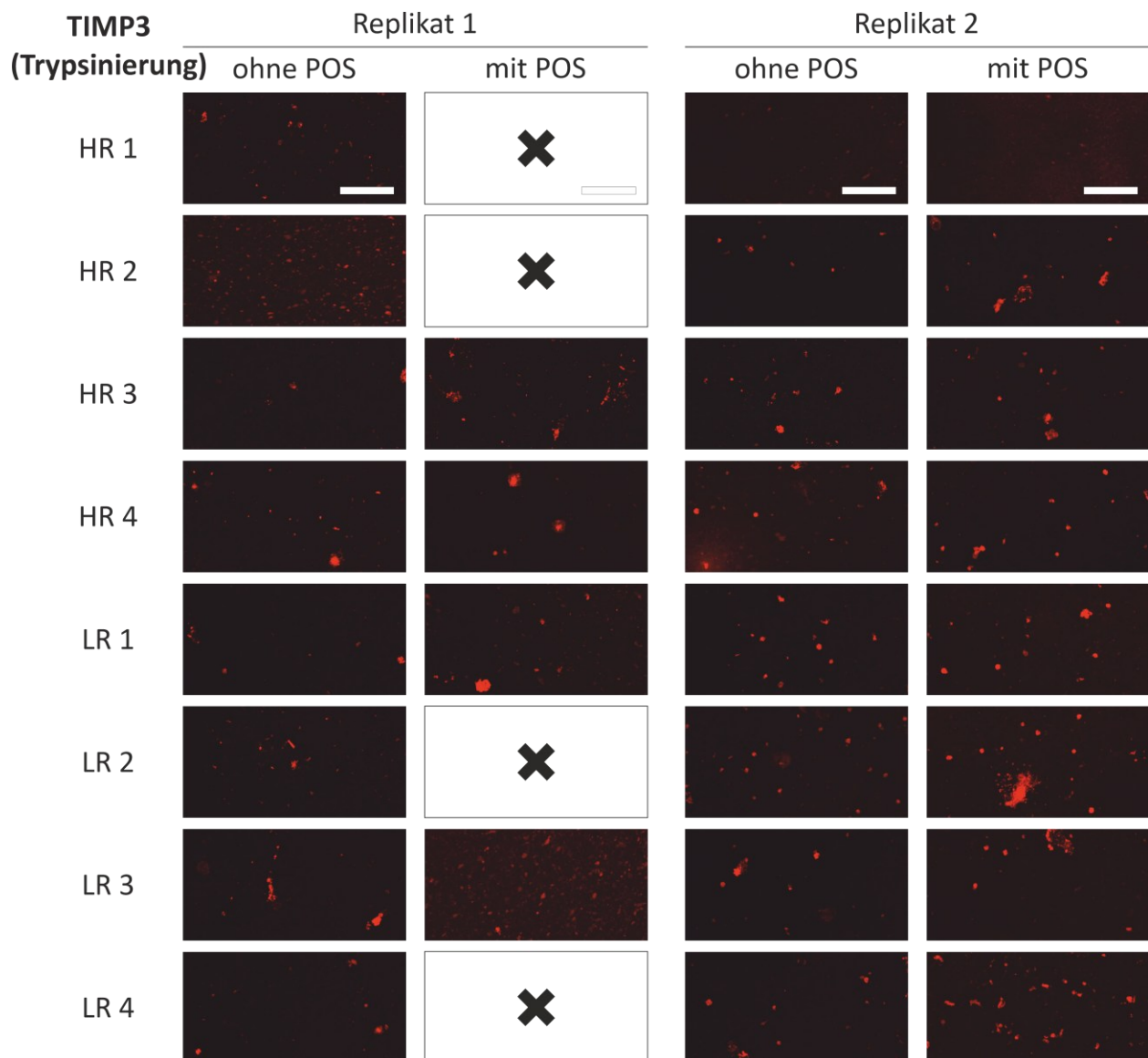


Abbildung 32: Ausführliche Zusammenstellung der Fluoreszenzphotographien der Färbung gegen TIMP3 bei Ablösen der Zellen mit Trypsin.

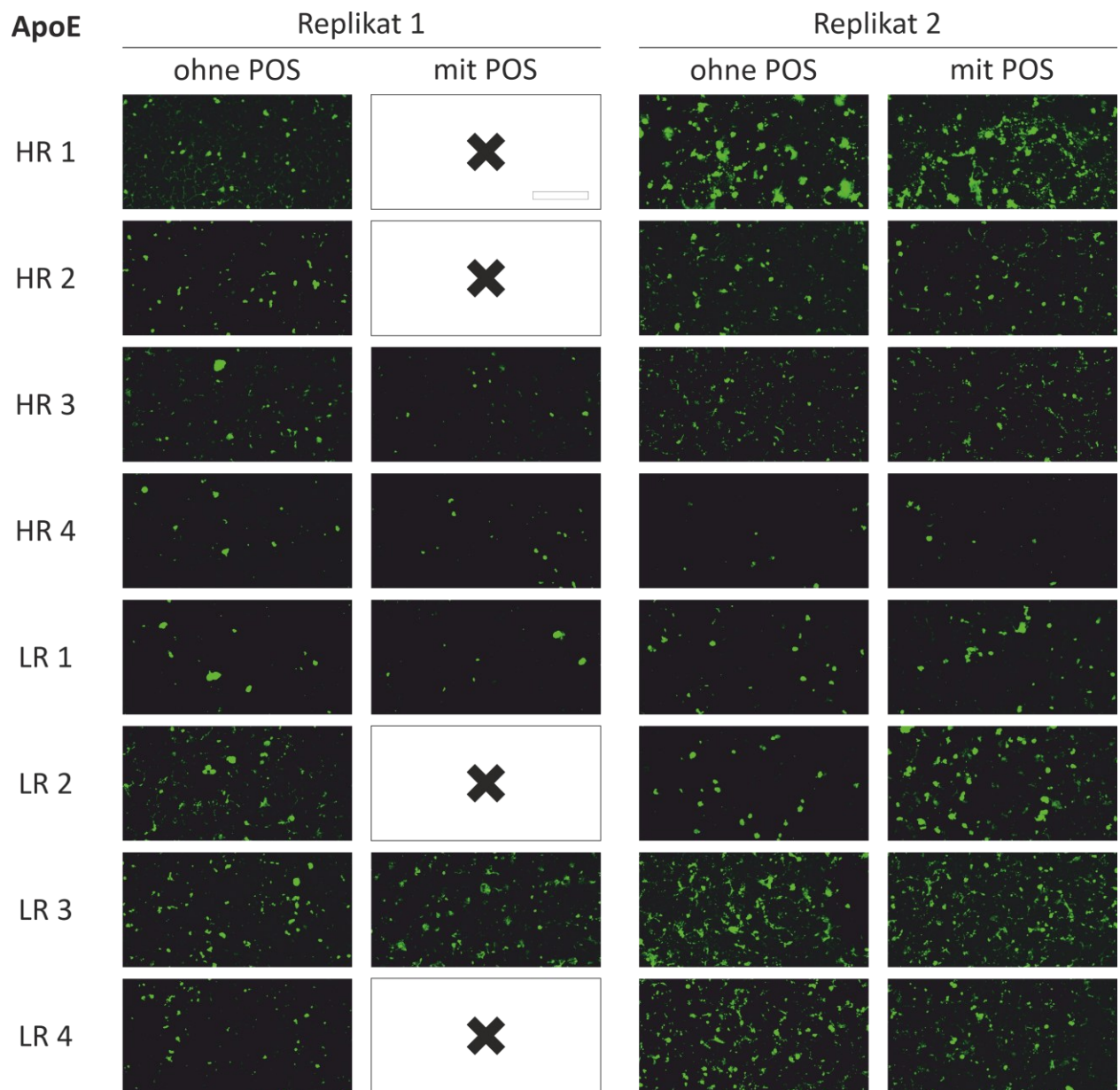


Abbildung 33: Ausführliche Zusammenstellung der Fluoreszenzphotographien der Färbung gegen ApoE.

β -Amyloid

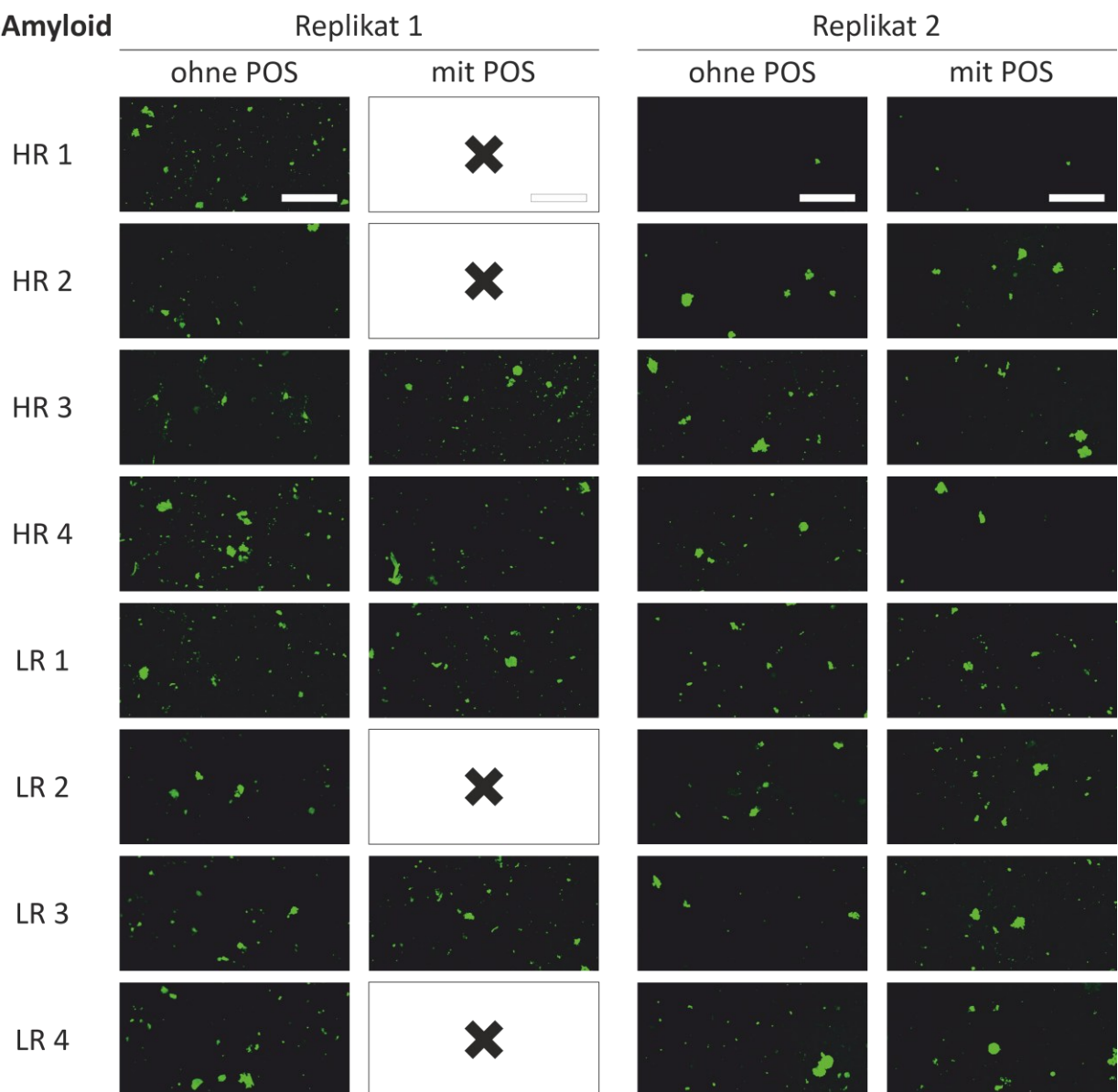


Abbildung 34: Ausführliche Zusammenstellung der Fluoreszenzphotographien der Färbung gegen β -Amyloid.

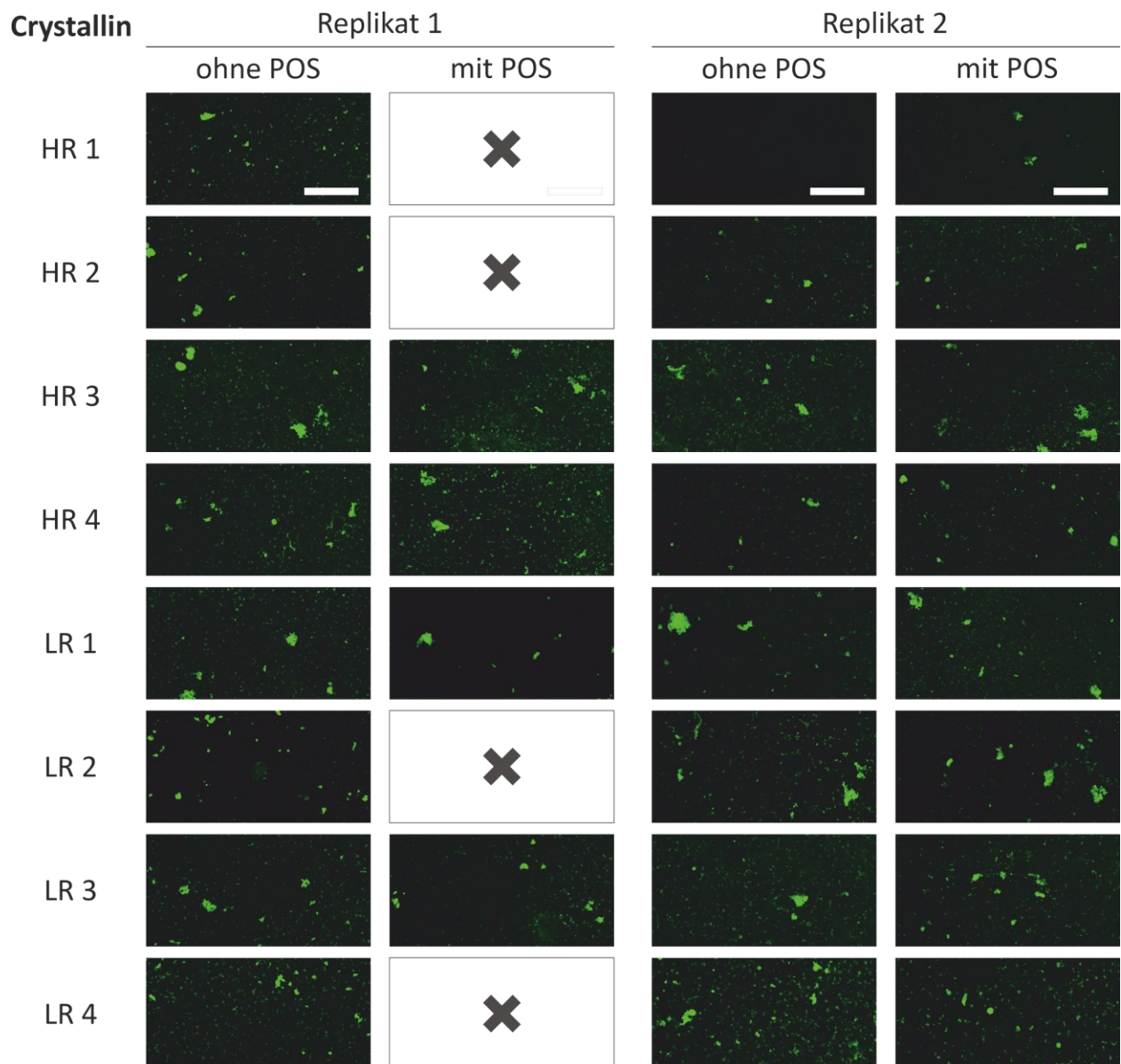


Abbildung 35: Ausführliche Zusammenstellung der Fluoreszenzphotographien der Färbung gegen Crystallin.

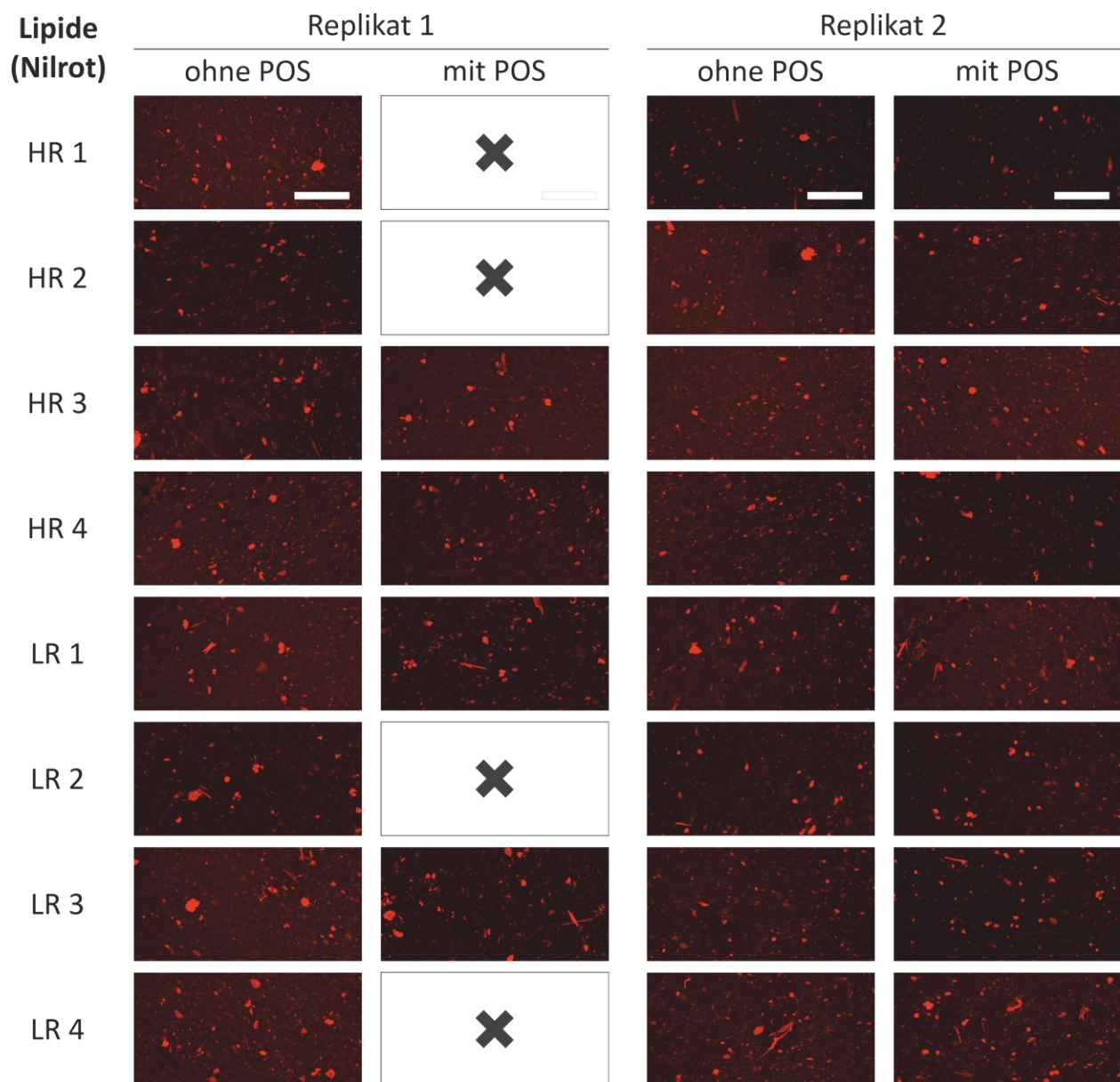


Abbildung 36: Ausführliche Zusammenstellung der Fluoreszenzphotographien der Färbung von Lipiden mit dem Farbstoff Nilrot.