

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

**Der Einfluss von verlängerter Kulturdauer
und oxidativem Stress auf das iPSC-RPE-Modell
für die komplexe altersabhängige Makuladegeneration**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Nico Kleinhölting

2025

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

**Der Einfluss von verlängerter Kulturdauer
und oxidativem Stress auf das iPSC-RPE-Modell
für die komplexe altersabhängige Makuladegeneration**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Nico Kleinhölting

2025

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Bernhard Weber

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Caroline Brandl

Tag der mündlichen Prüfung: 28.11.2025

Inhaltsverzeichnis

Abstract.....	6
1 Einleitung	8
1.1 Krankheitsbild der Altersabhängigen Makuladegeneration	8
1.2 Epidemiologie der AMD.....	10
1.3 Risikofaktoren für die AMD.....	11
1.4 Therapie der AMD.....	13
1.5 Funktionen des RPE	14
1.6 AMD-assoziierte dysregulierte Prozesse	16
1.7 Modellsystem für die AMD	18
1.7.1 NA unterdrückt AMD-Phänotyp.....	19
1.7.2 SI-Zugabe als oxidativer Stressor	19
1.8 Ziele dieser Arbeit	20
2 Materialien	21
2.1 hiPSC induzierte RPE-Zelllinien	21
2.2 Zellkulturmedien.....	21
2.3 Immunzytochemie	22
2.3.1 Puffer und Lösungen	22
2.3.2 Primärantikörper	23
2.3.3 Sekundärantikörper	23
2.4 Kitsysteme	23
2.5 Chemikalien	24
2.6 Verbrauchsmaterialien	25
2.7 Geräte und Instrumente	26
2.8 Software.....	28
3 Methoden	29
3.1 Kultivierung der iPSC-RPE.....	29
3.2 Nährmedien für iPSC-RPE.....	29
3.3 Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER).....	30
3.4 Untersuchung der RPE-Morphologie mit immunzytochemischen Verfahren	30
3.5 Entnahme von konditionierten Medien	31
3.6 Isolation und Aufreinigung von POS aus Schweine-Retina	31

3.7	Bestimmung der POS-Konzentration durch den Bradford Assay	31
3.8	Induktion von physiologischem Stress durch POS-Zugabe	32
3.9	Induktion von oxidativem Stress durch SI-Zugabe	33
3.10	RPE-Zelllyse und RNA-Isolierung	33
3.11	cDNA-Synthese	34
3.12	Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion	35
3.13	Zytokin-Arrays	37
3.14	ELISA	38
3.15	Statistik	38
4	Ergebnisse	39
4.1	Auswirkungen des NA-Entzugs und des SI-Stresses auf sechs Wochen alte iPSC-RPE-Zellen	39
4.1.1	mRNA-Expressionsanalyse von Genmarkern der Autophagie	40
4.1.2	mRNA-Expressionsanalyse mitochondrialer Genmarker	42
4.1.3	mRNA-Expressionsanalyse von Genmarkern des Immun- und Komplementsystems	47
4.1.4	Analyse der Zytokin-Sekretion ins konditionierte Medium nach NA-Entzug	50
4.1.5	Analyse der Zytokin-Sekretion ins konditionierte Medium nach SI-Stress	52
4.1.6	mRNA-Expressionsanalyse von <i>VEGF</i> , <i>FGF9</i> , <i>TGFβ2</i> und <i>ANG</i>	60
4.1.7	VEGF-Proteinsekretion im konditionierten Medium	62
4.2	Auswirkungen von oxidativem Stress durch SI auf iPSC-RPE-Zellen	66
4.2.1	Induktion von oxidativem Stress durch SI für eine Woche	68
4.2.1.1	Verifizierung der RPE-Zellmorphologie und der Integrität des RPE-Monolayers nach achtwöchiger Kultivierungszeit	68
4.2.1.2	mRNA-Expressionsanalyse der antioxidativen Genmarker <i>HMOX1</i> und <i>NQO1</i>	70
4.2.1.3	Verifizierung der RPE-Zellmorphologie und der Integrität des RPE-Monolayers nach zehnwöchiger Kultivierungszeit	71
4.2.1.4	mRNA-Expressionsanalyse antioxidativer Genmarker	73
4.2.2	Induktion von oxidativem Stress durch SI für drei Wochen	75
4.2.2.1	Verifizierung der RPE-Zellmorphologie und der Integrität des RPE-Monolayers nach achtwöchiger Kultivierungszeit	75
4.2.2.2	mRNA-Expressionsanalyse der antioxidativen Genmarker <i>HMOX1</i> und <i>NQO1</i>	76

4.3	Induktion eines physiologischen Stressors durch POS-Zugabe	79
4.3.1	Verifizierung der RPE-Zellmorphologie und Integrität des RPE-Monolayers nach POS-induziertem Stress	80
4.3.2	mRNA-Expressionsanalyse der antioxidativen Genmarker <i>HMOX1</i> und <i>NQO1</i>	81
5	Diskussion.....	84
5.1	Erweiterte Analyse AMD-assoziierter Dysregulationen nach NA-Entzug und SI-Zugabe in iPSC-RPE-Zellen.....	84
5.2	Direktionale Proteinsekretion und mRNA-Expressionsanalyse nach SI-vermittelten oxidativen Stress	87
5.3	Auswirkungen des artifiziellen, oxidativen und physiologischen Stresses auf die Aktivierung des NRF2-Signalweges	91
6	Schlussfolgerung und Ausblick.....	95
7	Anhang	96
8	Literaturverzeichnis	98
9	Abkürzungsverzeichnis	114
10	Abbildungsverzeichnis.....	118
11	Tabellenverzeichnis	121
12	Danksagung	122
13	Lebenslauf	123
14	Selbstständigkeitserklärung	124

Abstract

Die altersabhängige Makuladegeneration (AMD) ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung der Netzhaut und ist die häufigste Ursache für einen zentralen Sehverlust in Industrieländern. Der Krankheit liegen genetische Prädispositionen und Umweltfaktoren, wie z.B. das zunehmende Alter oder Zigarettenkonsum, zu Grunde. Diese Kombination an Risikofaktoren resultiert in einem individuellen Erkrankungsrisiko einzelner Personen. Charakteristisch für die Pathogenese der AMD ist eine Degeneration des retinalen Pigmentepithels (RPE). Als Ursache für diese Degeneration spielt oxidativer Stress als wichtigster exogener Faktor eine zentrale Rolle (Kaarniranta et al. 2013).

In dieser Arbeit wurden Analysen von molekularen Prozessen, denen eine Beteiligung in der AMD-Entstehung zugeschrieben wird, durchgeführt. In RPE-Zellen aus induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC) wurde nach oxidativem Stress (Zugabe von Natriumiodat; SI) und unter modifizierten Zellkulturbedingungen (Entfernung von Nikotinamid) veränderte Expressionen von Genen, die im Zusammenhang mit AMD-assoziierten dysregulierten Prozessen (Mitochondrien, Autophagie, Komplement- und Entzündungskaskade) stehen, ermittelt.

Mittels kommerzieller Zytokin-Arrays identifizierten wir vier Proteine mit potentiell dysregulierter direktonaler Sekretion der RPE-Zellen, die in der AMD-Pathogenese eine Rolle spielen könnten. Zudem zeigten wir, dass eine dreiwöchige SI-Exposition im Vergleich zu einer einwöchigen Stressinduktion in einer erhöhten NAD(P)H-Dehydrogenase-(Quinon)-1 (*NQO1*)-Expression als antioxidative Zellantwort resultiert. Im Gegensatz hierzu zeigten Zellen, die zu Beginn einer einwöchigen Stressinduktion zehn Wochen alt waren, eine geringere *NQO1*-Expression als Zellen, die acht Wochen alt waren. Die Anwendung von mildem physiologischen Stress durch Fütterung mit Außensegmenten von Schweine-Photorezeptoren (POS) führte zu keiner messbaren Antwort über den *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (NRF2)-Signalweg.

Dadurch, dass das genetische AMD-Risikoprofil der iPSC-RPE-Zellen im Vorfeld bekannt war, sich die Antworten der Zelllinien in all unseren Versuchen individuell nicht unterschieden, schlussfolgerten wir, dass die genetische Prädisposition für die AMD keinen Einfluss auf die Expression und Sekretion von Konstituenten der von uns betrachteten Signalwege nahm.

Unsere Ergebnisse erweitern die Einsicht in die AMD-Pathogenese und legen einen möglichen präventiven Charakter einer NA-Supplementierung auf die AMD-Entstehung dar.

1 Einleitung

1.1 Krankheitsbild der Altersabhängigen Makuladegeneration

Bei der altersabhängigen Makuladegeneration (AMD) handelt es sich um eine chronisch-progrediente Erkrankung der Netzhaut sowie des darunterliegenden retinalen Pigmentepithels (RPE) (Lim et al. 2012). Sie gilt als der häufigste Grund für einen zentralen Sehverlust bei älteren Erwachsenen in westlichen Industriestaaten (Wong et al. 2014).

Unterschieden werden bei der AMD ein frühes und spätes Krankheitsstadium. In der frühen Phase sind die Patienten weitestgehend asymptomatisch oder spüren nur ein geringfügig verzerrtes zentrales Gesichtsfeld (Grassmann et al. 2015). Mikroskopisch auffällig und kennzeichnend für das Frühstadium ist die Anhäufung von Drusen. Dies bezeichnet die Ablagerung von gelblichen extrazellulären Proteinen-/Lipidgemischen, die sich zwischen dem RPE und der Bruch'schen Membran (BM) ablagern. Im späten Krankheitsstadium können diese Ablagerungen zu Schäden am RPE und sekundär zum Verlust von Photorezeptoren führen (Fritsche et al. 2014; Khan et al. 2016; Al-Zamil und Yassin 2017). Weitere morphologische Unterschiede zwischen Patienten im AMD-Frühstadium und gesunden Kontrollen sind einerseits eine verdünnte Photorezeptorschicht, andererseits eine verdickte RPE/BM-Schicht. Bereits im Frühstadium wurde das Auftreten morphologischer Alterationen beschrieben, die den Photorezeptor-Verlust begünstigen (Brandl et al. 2019). Zur Definition des Frühstadiums gehören zusätzlich die Hypo-/Hyperpigmentierung des RPE (Bird et al. 1995).

Zum Spätstadium werden die geographische Atrophie (GA) und die neovaskuläre Form (NV) der AMD gezählt (Lim et al. 2012; Pennington und DeAngelis 2016). Hierbei findet der symptomatisch werdende zentrale Gesichtsfeldausfall meist erst in diesen fortgeschrittenen Phasen statt (Lim et al. 2012).

Die GA ist gekennzeichnet durch scharf abgrenzbare atrophische Läsionen der Retina, welche durch den Verlust von Photorezeptoren, dem RPE und den sich darunter befindlichen Choriokapillarisgefäßen entstehen (Curcio et al. 1996; Fleckenstein et al. 2018). Diese Atrophie tritt zunächst meist perifoveal auf, dehnt sich anschließend aber bis auf die Fovea aus, woraus irreversible Skotome resultieren können (Fleckenstein et al. 2018).

Die neovaskuläre Form ist durch das Einwachsen feiner Blutgefäße aus der Choroidea oder alternativ aus retinalen Gefäßen der äußeren Retina in das subretinale Gewebe gekennzeichnet. Dort kann es zu subretinalen oder intraretinalen Flüssigkeitsansammlungen sowie zu Blutungen kommen. Dies führt sekundär zu einer Entzündungsreaktion, deren Folge eine bindegewebige oder atrophische Narbe im Bereich der Makula ist. Dies wiederum führt zum Verlust von Photorezeptoren und RPE-Zellen (Gheorghe et al. 2015). Zusätzlich löst sich das RPE bei Flüssigkeitsansammlungen zwischen dem RPE und der BM ab, was schlussendlich einen Sehverlust begründet (Karampelas et al. 2020).

Insgesamt sind nur 10-15 % aller AMD-Erkrankten im Spätstadium von der NV betroffen, gleichzeitig ist diese aber für 90 % aller schweren Sehverluste verantwortlich (Waisbourd et al. 2007; Stewart 2012). Der Sehverlust bei der NV kann im Gegensatz zur eher langsameren, progredienten GA auch rasch auftreten (Grassmann et al. 2014). Eine schematische Darstellung des Auges, in der die GA und die NV dargestellt sind, findet sich in Abbildung 1.

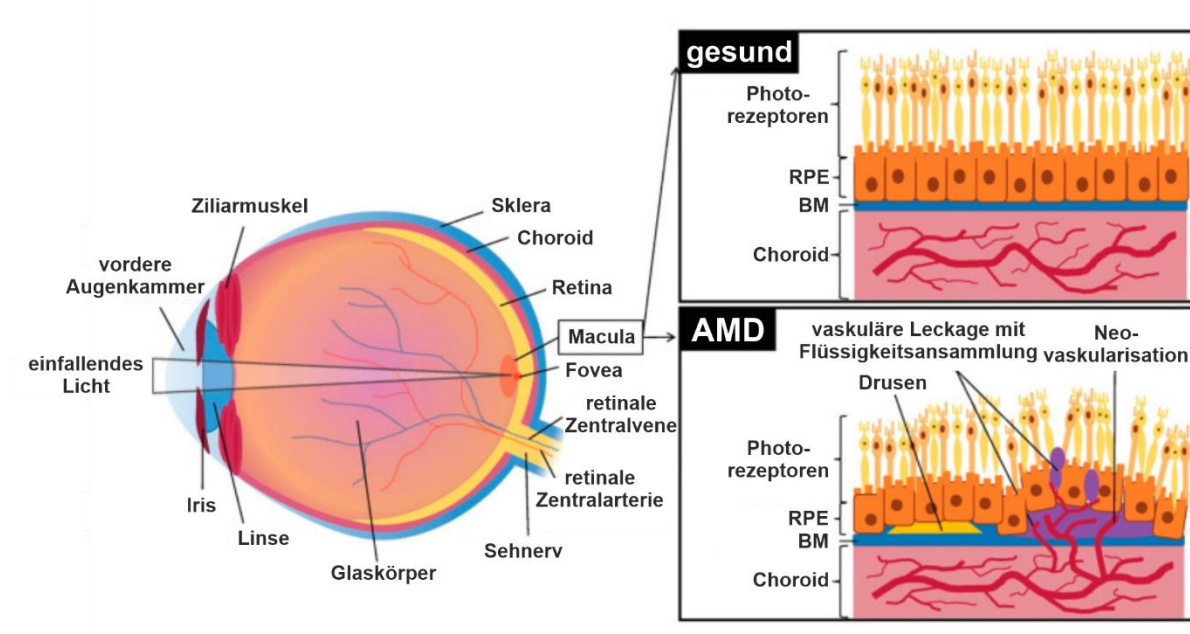


Abbildung 1: Schematische Darstellung des menschlichen Auges mit gesunder Retina und von AMD-betroffener Retina. Links dargestellt ist eine Übersicht des menschlichen Auges. Oben rechts ist die gesunde Retina vergrößert dargestellt. Unten rechts sind die Effekte der AMD auf die Retina dargestellt, im linken Bildteil die Ansammlung von Drusen, im rechten Bildteil die NV. RPE: Retinales Pigmentepithel, BM: Bruch'sche Membran. Übernommen und modifiziert aus Rastoin et al. 2020.

Die AMD beeinflusst die Lebensqualität von Patienten stark, wenn diese den Aufgaben des täglichen Lebens (Arbeit, Freizeit, Haushalt) durch den Sehverlust nicht weiter nachgehen können. Sie gilt als großer Risikofaktor für die Entwicklung einer Depression und geht oft mit Pflegebedürftigkeit einher (Lotery et al. 2007; Casten und Rovner 2013).

Der Einfluss der AMD auf die Kosten in den nationalen Gesundheitssystemen der westlichen Staaten ist nicht unerheblich. Eine Studie innerhalb der Bevölkerung des vereinigten Königreichs konnte zeigen, dass die Kosten der AMD-Patienten im Vergleich zu Nicht-AMD-Patienten aus finanzieller Sicht eine siebenfach höhere Belastung darstellen (Lotery et al. 2007).

1.2 Epidemiologie der AMD

Weltweit stellt die AMD die Ursache für 6 – 9 % aller starken Sehbeeinträchtigungen dar. Gleichzeitig ist auf Grund des demographischen Wandels und einer immer älter werdenden Gesellschaft mit steigenden Zahlen in den kommenden Jahrzehnten zu rechnen (Wong et al. 2014; Jonas et al. 2017). Während 2020 noch von 196 Millionen Erkrankten ausgegangen war, soll diese Zahl Berechnungen zu Folge bis auf 288 Millionen im Jahr 2040 ansteigen (Wong et al. 2014). In Deutschland waren im Jahr 2002 5,7 Millionen Menschen erkrankt, während es 2017 bereits 7 Millionen Menschen waren (Stahl 2020).

In einer Metaanalyse wurden rund 42.000 Menschen, die mindestens 40 Jahre alt waren und aus zehn verschiedenen europäischen Ländern kamen, nach der Progredienz der AMD und des Alters eingeteilt. Von der frühen Form waren 3,5 % aller 55-59-Jährigen und 17,6 % aller über 80-Jährigen betroffen. Bei der späten Form waren es nur 0,1 % bzw. 9,8 %. Ein Zusammenhang der Prävalenz mit dem Alter wird hier auffällig (Colijn et al. 2017).

Zusätzlich zeigten Studien, dass die Prävalenz der AMD nicht gleichmäßig in unterschiedlichen Ethnien verteilt ist. Dabei wurden höhere Prävalenzen unter Europäern im Vergleich zu Asiaten/Afrikanern gefunden (Wong et al. 2014). Eine andere Studie stellte fest, dass die Hautfarbe einen Einfluss auf Prävalenz zu haben scheint. 60-80-Jährige mit schwarzer Hautfarbe erkrankten signifikant häufiger an AMD als Menschen mit weißer Hautfarbe (Vanderbeek et al. 2011). Die Ursache hierfür ist noch unbekannt.

1.3 Risikofaktoren für die AMD

Die AMD ist eine komplexe Erkrankung, was bedeutet, dass sowohl endogene als auch exogene Risikofaktoren die Erkrankung beeinflussen. Das Zusammenspiel beider Komponenten resultiert in einem individuellen Gesundheitsrisiko an der AMD zu erkranken, welches mittels mathematischer Modelle näherungsweise bestimmt werden kann.

Die Genetik ist ein endogener Faktor, der mit bis zu 71 % zum individuellen AMD-Risiko einer Person beiträgt (Seddon et al. 2005). Die jüngste und umfangreichste genomweite Assoziationsstudie (GWAS) von Fritsche und Kollegen identifizierte 52 genetische Varianten an 34 Loci, die protektive bzw. risiko-erhöhende Eigenschaften haben (Fritsche et al. 2016). Auffallend viele der gefundenen Varianten liegen in der Nähe von Genen der Komplementfaktoren, wie beispielsweise den Faktoren C3, C9, CFB, CFH und CFI (Edwards et al. 2005; Gold et al. 2006; Maller et al. 2007; Yates et al. 2007; Fagerness et al. 2009; Seddon et al. 2013; Fritsche et al. 2016). Die Mehrheit dieser Gene befindet sich auf den Chromosomen 1, 6 und 10 (Al-Zamil und Yassin 2017). In einer Studie zu AMD-Genvarianten auf Chromosom 1 wurde Y402H als Variante des CFH-Gens entdeckt, welche bis dato die stärkste AMD-Assoziation zeigt (Haines et al. 2005). Der genaue molekulare Pathomechanismus der Y402H-Variante ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt, jedoch resultiert die Mutation vermutlich in einer kontinuierlichen, transienten Inflammation des RPE und dem mutmaßlich folgenden Photorezeptorverlust (Laine et al. 2007). Ein weiterer Locus mit Polymorphismen, der mit der AMD im Zusammenhang steht, ist der *age-related maculopathy susceptibility 2/high temperature requirement A serin peptidase 1* (ARMS2/HTRA1)-Locus auf Chromosom 10 (Edwards et al. 2005; Hageman et al. 2005; Jakobsdottir et al. 2005; Rivera et al. 2005; Sobrin et al. 2012; Grassmann et al. 2015). Mit der Genvariante am Matrixmetalloprotease-9-(MMP9)-Locus konnte zum ersten Mal eine Variante mit einer spezifischen AMD-Form (hier NV) assoziiert werden (Fritsche et al. 2016). Weitere Genvarianten im Fett- und Cholesterinmetabolismus zeigten ebenso Zusammenhänge mit der AMD (Chen et al. 2010; Neale et al. 2010). Entgegen all der genannten Risiko-erhöhenden Genvarianten konnten aber auch protektive Alterationen gefunden werden, wie z.B. die Deletion von CFH-verwandeten Genen (CFHR1 und CFHR3) (Hughes et al. 2006).

Trotz aller genetischen Einflüsse bleibt das Alter der größte Risikofaktor für die Entwicklung der AMD. Epidemiologische Studien, wie die von Colijn und Kollegen,

zeigten, dass die Prävalenz erkrankter Personen mit zunehmendem Alter steigt (Colijn et al. 2017). Der Risikofaktor Alter ist mit einer höheren Wahrscheinlichkeit an GA (als an NV) zu erkranken assoziiert (Jonasson et al. 2014).

Ob das Geschlecht ebenfalls ein Risikofaktor ist, wird widersprüchlich diskutiert. Einige Studien zeigten, dass das Auftreten der AMD nicht mit dem Geschlecht korreliert (Wong et al. 2014; Jonas et al. 2017), während andere Studien von entgegengesetzten Ergebnissen berichteten (Joachim et al. 2014; McGuinness et al. 2016).

Exogene Faktoren, die eine AMD-Erkrankung begünstigen, sind zum Teil individuell und damit beeinflussbar. Der größte vermeidbare Risikofaktor für die AMD ist das Rauchen, welches das Erkrankungsrisiko unabhängig von der AMD-Form um den Faktor 2-4 erhöht (Tikellis et al. 2007). Die Anzahl an *pack years* (Anzahl täglicher Zigarettenschachteln multipliziert mit Raucherjahren) steht hierbei in einem dosisabhängigen Zusammenhang mit der Wahrscheinlichkeit zu erkranken (Clemons et al. 2005; Lechanteur et al. 2012). Das Rauchen aufzugeben ist durchaus sinnvoll, da es das Risiko einer Erkrankung mindert und nach 20 Jahren der Rauchabstinenz das basale Niveau der Erkrankungswahrscheinlichkeit eines Nichtraucherers entspricht (Vingerling et al. 1996). Als Grund, weshalb Tabakkonsum krankheitsfördernd wirkt, werden toxische Metabolite in Zigaretten, die die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (engl.: *reactive oxygen species*, ROS) fördern, diskutiert. Zusätzlich induzieren ROS pathologische Veränderungen in Blutgefäßen, wie beispielsweise die Entstehung atherosklerotischen Plaques. In *in vitro* Versuchen konnte der negative Einfluss von durch Zigarettenbestandteilen induzierten ROS auf die Zellgröße, mitochondriale Funktionen und die Überlebensfähigkeit von ARPE19 und primärem humanen RPE bereits gezeigt werden (Bertram et al. 2009).

Neben dem Zigarettenrauch gibt es eine Vielzahl weiterer Umweltfaktoren, deren Auswirkungen auf die AMD-Entstehung untersucht wurde. Viele hiervon lassen sich allerdings nur ungenügend bzw. in ihrer jeweiligen Effektrichtung replizieren. Dies gilt bspw. für den Einfluss des Body-Maß-Index (BMI) (Tomany et al. 2004; Shim et al. 2016) und für das Bildungsniveau (Clemons et al. 2005; Lechanteur et al. 2012). Eindeutig protektiv hingegen scheint der Verzehr von vielen Antioxidantien sowie Obst und Gemüse zu wirken, wie man es häufig in der mediterranen Küche findet (Merle et al. 2015). Aber auch hier wurde dieser Schutzfaktor nicht immer in anderen Studien bestätigt (McGuinness et al. 2016). Außerdem wurde lange Zeit angenommen, dass die Sonnenlichtexposition als Risikofaktor fungiert, was allerdings von Zhou und

Kollegen in einer retrospektiven Studie an über 40.000 Probanden nicht bestätigt wurde (Zhou et al. 2018).

1.4 Therapie der AMD

Bei der Therapie der AMD werden medikamentöse Angriffspunkte für die beiden Spätformen der AMD (NV und GA) unterschieden.

Die Antikörpertherapie der NV (Wirkstoffe: Ranibizumab, Aflibercept, Bevacizumab) beruht auf der Inaktivierung des Proteins *vascular endothelial growth factor A* (VEGF-A; VEGF). Dieses induziert die Biogenese neuer Blutgefäße aus der Choroidea ins subretinale Gewebe, welche dort wiederum Flüssigkeitsansammlungen und Entzündungsreaktionen zur Folge haben können. So kann eine intravitreal verabreichte anti-VEGF-Therapie den Sehverlust verbessern bzw. das Fortschreiten einer bereits bestehenden Beeinträchtigung aufhalten (Chang et al. 2017). Dieser Effekt kann bei Patienten nach zwei bis drei Jahren Therapiedauer und multiplen Injektionen abnehmen. Diese für Patienten teilweise als unangenehm wahrgenommenen intravitrealen Injektionen sowie die Häufigkeit regelmäßiger Therapien erfordern weitere Forschung an neuen Therapiemöglichkeiten (Krüger Falk et al. 2013; Guimaraes et al. 2021). Hierzu gehört auch die retinale Gentherapie der NV, bei der mit Hilfe meist viraler Vektoren intakte Gene in das Auge injiziert werden. Diese Vektoren beinhalten verschiedene Gene, die eine Rolle im Kontext der AMD-Pathogenese spielen und zielen auf eine langfristige und anhaltende Therapie ab (Khanani et al. 2022; Farjood et al. 2020). Klinische Studien in frühen Phasen sind vielversprechend, jedoch ist bis dato keine Gentherapie der AMD am Menschen zugelassen (Guimaraes et al. 2021).

Seit 2023 sind in der Therapie der GA die Wirkstoffe Pegcetacoplan und Avacincaptad Pegol in den USA zugelassen. Diese Medikamente greifen in die Komplementkaskade ein und inhibieren jeweils spezifisch den Komplementfaktor C3 bzw. C5 (Heier et al. 2023; Nadeem et al. 2023; Rush et al. 2025).

1.5 Funktionen des RPE

Das RPE nimmt eine zentrale Rolle im Aufbau und der strukturellen Stabilität der Retina ein und ist Garant einer uneingeschränkten Funktion für die Aufrechterhaltung der retinalen Homöostase.

Das RPE ist morphologisch durch eine postmitotische Einzellschicht (monolayer) polygonaler, meist hexagonaler, Zellen gekennzeichnet. Diese befinden sich zwischen den Photorezeptoren auf der apikalen Zellseite und der BM auf der basolateralen Zellseite. Kennzeichnend für die basolaterale Seite sind kleine Einstülpungen der Zellmembran, die der Oberflächenvergrößerung dienen. Auf der apikalen Zellseite befinden sich Mikrovilli, die in enger räumlicher Nähe zu den Photorezeptoren stehen und u.a. eine Rolle bei deren Phagozytose spielen (Zhou und Zhou 2020; Yang et al. 2021b; Yang et al. 2021a). Die dunkelbraune Pigmentierung der Zelle ist auf Melaningranula zurückzuführen, die sie vor zu starker UV-Licht-Exposition schützt (Tian et al. 2021). Die Granula dienen dazu, überschüssige Lichtstrahlung zu absorbieren und die Zelle so vor der Bildung von ROS zu schützen. Diese hochreaktiven Sauerstoffradikale oxidieren die Zellmembran und destabilisieren sie auf diese Weise. Deshalb verfügt das RPE auch über antioxidative Schutzfunktionen, wie sie beispielweise durch Glutathion oder die Superoxid-Dismutase vermittelt werden (Yang et al. 2021a).

Eine weitere wichtige Rolle des RPEs ist die Aufrechterhaltung des Sehzyklus. Während des Sehprozesses fällt all-trans-Retinal an. Dieses Retinoid wird im RPE zunächst zum all-trans-Retinol reduziert, anschließend zum 11-cis-Retinol reisomerisiert und erneut oxidiert. Anschließend steht es für neue Sehzyklen wieder zur Verfügung (Gu et al. 1997; Strauss 2005; Kiser et al. 2014; Yang et al. 2021a).

Das RPE ist des Weiteren für die Phagozytose der äußeren Segmente der Photorezeptoren (engl.: *photoreceptor outer segments*, POS) verantwortlich. Diese werden von den Photorezeptoren regelmäßig abgestoßen, um ihre Vitalität und Funktionalität aufrecht zu erhalten, indem sie geschädigte Proteine aufgrund der hohen Lichtenergie abstoßen (Bosch et al. 1993; Kevany und Palczewski 2010). Dabei steht eine RPE-Zelle in direktem Kontakt mit etwa 30 POS und phagozytiert diese (Kwon und Freeman 2020). Die POS gehen anschließend in einen Erneuerungsprozess über, indem diese von der Basis ausgehend reassembliert werden, um anschließend den Photorezeptoren wieder zur Verfügung zu stehen (Nguyen-Legros und Hicks 2000). Wenn die zelluläre Homöostase des RPEs durch

Ausfall einer oder mehrerer dieser beschriebenen Funktionen gestört ist, können RPE-assoziierte Retinopathien, wie die AMD, die Folge sein (Kay et al. 2013).

Das RPE ist fester Bestandteil der Blut-Retina-Schranke. Dies wird durch die Ausbildung von „Schlussleisten“, sog. *tight junctions*, ermöglicht (bestehend aus Occludin, Claudin und Zonula occludens-1 [ZO-1]). Durch diese dichte Zellstruktur benachbarter Zellen ist das RPE für einen geregelten zellulären Import von Ionen und Nährstoffen zuständig, ebenso wie für den Abtransport von Abfallprodukten in Richtung Choroid (Rizzolo 2007). Die Aufrechterhaltung der Blut-Retina-Schranke gelingt nur, indem die Zellen in ihrem Zellverbund über eine spezifische direktionale Proteinsekretion verfügen. So wird sichergestellt, dass das RPE auf der apikalen Seite hochspezifisch mit den Photorezeptoren und auf seiner basolateralen Seite mit der BM und den choroidalen Blutgefäßen über Signalmoleküle kommunizieren kann. Diese Art der interzellulären Kommunikation spielt eine unbestritten wichtige Rolle in einer intakten Funktionalität der Photorezeptoren (Kay et al. 2013).

Verschiedene Proteine werden vom RPE bevorzugt apikal oder basolateral sezerniert, wenngleich die Sekretion keinem speziellen Muster folgt. Zu den primär apikal sezernierten Proteinen gehören beispielsweise die Wachstumsfaktoren TGF β 2 und PEDF (Dawson et al. 1999; Tan et al. 2010), sowie der Matrix-Metalloproteinase-Inhibitor TIMP-1 (Padgett et al. 1997). Der angiogene Wachstumsfaktor VEGF wird im Gegensatz dazu vermehrt über die basolaterale Zellseite sezerniert und fördert dort die Entstehung choroidaler Blutgefäße (Maminishkis et al. 2006).

Es wird angenommen, dass Abweichungen in der Direktionalität des Sekretionsprofils der RPE-Zellen mögliche Pathomechanismen für die Entstehung von Retinopathien darstellen (Kay et al. 2013). Für die Matrix-Metalloprotease-2 (MMP-2) konnten bspw. dreifach höhere Konzentrationen in primären AMD-RPE-Zellen im Vergleich zu gesunden Kontrollen ermittelt werden. Man vermutet, dass MMP-2 eine Rolle im *remodelling* der extrazellulären Matrix (EZM) spielt und so Einfluss auf die Entstehung der AMD nimmt (Lambert et al. 2003; An et al. 2006). Eine weitere Studie berichtete über Abweichungen im Sekretionsprofil von PEDF, SPARC und Clusterin, die allesamt mit der AMD assoziiert werden (An et al. 2006). Insgesamt bedarf es weiterhin an intensiver Forschung zur sekretorischen Funktion des RPEs, um weitere Proteine zu identifizieren und um zu ermitteln, ob Abweichungen im Sekretionsprofil die Ursache oder die Folge der pathogenetischen Vorgänge bei der AMD darstellen.

1.6 AMD-assoziierte dysregulierte Prozesse

Die AMD ist eine komplexe Erkrankung, was sich auch in der Vielfalt der intrazellulären Prozesse widerspiegelt, welche im Zusammenhang mit der AMD-Pathogenese stehen. Im Folgenden wird auf die für diese Arbeit relevanten Prozesse eingegangen. Die Entwicklung der AMD wird mit dem mitochondrialen Status und der mitochondrialen Vitalität assoziiert. An humanen primären RPE-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der Mitochondrien und die Dichte der mitochondrialen Matrix mit steigendem Alter abfällt. AMD-Erkrankte zeigten im Vergleich zu gleichaltrigen Zellen signifikant weniger Mitochondrien. Morphologisch konnten fragmentierte und beschädigte Mitochondrien in AMD-RPE-Zellen elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden (Feher et al. 2006). Auch die ATP-Bereitstellung ist in AMD-RPE-Zellen herabgesetzt (Nordgaard et al. 2008). *In vitro*-Stressversuche zeigten, dass die mtDNA gegenüber der nukleären DNA anfälliger für oxidativen Stress ist (Liang und Godley 2003). Dieser oxidative Schaden findet sich auch an Proteinen und Lipiden, die Bestandteile der Zellmembran sind (Jarrett et al. 2008).

Die eigenen Abwehrmechanismen der Mitochondrien bestehen aus antioxidativen Enzymen. Dazu gehören bspw. die Mangan-Superoxid-Dismutase (MnSOD), die Katalase, oder die Glutathion-Peroxidase. Diese neutralisieren die zellschädlichen mitochondrialen ROS durch verschiedene Reaktionswege. An Augen von verstorbenen AMD-Patienten konnte gezeigt werden, dass die MnSOD und Katalase hochreguliert waren, was als Kompensationsmechanismus durch den erhöhten oxidativen Stress in der AMD zu deuten war (Decanini et al. 2007; Kaarniranta et al. 2020). Lin und Kollegen zeigten, dass die durch mtDNA kodierten Schutzenzyme im Bereich der Macula im Vergleich zur retinalen Peripherie schwächer exprimiert waren. Zusätzlich zeigte sich eine positive Korrelation des AMD-Status mit dem mtDNA-Schaden, aber gleichzeitig eine negative Korrelation in der Kapazität der Reparaturenzyme (Lin et al. 2011). Diese Ergebnisse unterstreichen die Notwendigkeit einer intakten mtDNA und die Funktionalität antioxidativer Enzyme in der zellulären Abwehr gegenüber oxidativem Stress (Brown et al. 2019; Ebeling et al. 2021; Bhattacharya et al. 2022; Ebeling et al. 2022; Fisher et al. 2022). Weitere Proteine mit antioxidativer Wirkung werden von der nukleären DNA kodiert. Dazu gehören Proteine des *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (NRF2)-Signalweges. Eine Dysregulation dieses Signalweges wird in der AMD-Pathogenese vermutet (Sachdeva et al. 2014; Zhang et al. 2015). Begründet wird dies unter anderem dadurch, dass

NRF2-defiziente Mäuse allein durch den physiologischen Alterungsprozess AMD-ähnliche Phänotypen zeigten. Dazu gehörte unter anderem die Akkumulation von sub-RPE-Drusen und die spontane choroidale Neovaskularisation (Zhao et al. 2011).

An Mäusen unterschiedlichen Alters konnte zusätzlich gezeigt werden, dass das RPE älterer im Vergleich zu jüngeren Mäusen höhere mRNA-Expressionen der antioxidativen Genmarker *HMOX1* und *NQO1* aufweist. Dies unterstreicht die Vermutung eines altersabhängigen, basalen oxidativen Stresses. Die Induktion von oxidativem Stress durch SI führte bei älteren Mäusen zu einem höheren Spiegel oxidativer Stressoren, gleichzeitig aber zu einer geringeren Induktion der antioxidativen Schutzmechanismen (Sachdeva et al. 2014).

Wenn zelluläre Kompensationsmechanismen überschritten werden, können Zellen durch Apoptose in einen programmierten Zelltod übergehen. Damit schützen sie benachbartes Gewebe, indem die lokale Entzündung begrenzt wird (Elmore 2007). Eingeleitet wird der Zelluntergang der Photorezeptoren in der AMD über Proteine der Bcl-2-Familie, die pro/anti-apoptotisch wirken und die mitochondrialen Membranen (de)stabilisieren und somit die Freisetzung des Cytochrom c ins Zytosol fördern/verhindern (Dunaief et al. 2002; Hanus et al. 2015a; Gao et al. 2018). Dies setzt eine Aktivierung von Caspasen in Gang, die den Selbstverdau der Zelle initiieren (Dunaief et al. 2002; Wang und Youle 2009). Der Selbstverdau findet in Autophagosomen statt, die vorübergehend mit Lysosomen zu Autophagolysosomen verschmelzen. Eine Dysregulation der Prozesse, die an dieser Autophagie beteiligt sind, wurde ebenfalls mit der Entstehung der AMD in Zusammenhang gebracht (Golestaneh et al. 2017). Durch Defekte in der Autophagie akkumulieren Proteinaggregate, welche oxidativen Stress auf das RPE auslösen (Keeling et al. 2018). Zusätzlich führte eine zu starke Expression der Autophagie ebenfalls zum retinalen Zelluntergang, besonders in den frühen Phasen der Krankheit (Jiao et al. 2014; Zhu et al. 2017).

Da die Autophagie als Antwort auf oxidativen Stress verstärkt wird und deren Signalwege auch Einfluss auf die Degradation von Proteinen des NRF2-Signalweg nehmen, wird ein direkter Zusammenhang zwischen Autophagie, oxidativem Stress und antioxidativer Schutzfunktionen erkenntlich (Lee et al. 2012; Kaarniranta et al. 2017).

1.7 Modellsystem für die AMD

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten RPE-Zellen sind aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC) differenziert worden. Vorteile dieser Vorgehensweise sind ethische Unbedenklichkeiten, da hierfür anstatt embryonaler Zellen lediglich adulte somatische Zellen benötigt werden. Durch eine Blutentnahme können periphere mononukleäre Blutzellen bzw. durch eine Stanzbiopsie Haut-Fibroblasten gewonnen und genutzt werden. Des Weiteren spricht die hohe Verfügbarkeit der Zellen und damit auch die hohe Reproduzierbarkeit von Experimenten für eine experimentelle Nutzung. Ein Nachteil dieses Modellsystems ist die Abbildung des Faktors Zeit *in vitro*, da primäre RPE-Zellen aus Spendern meist mehr als 60 Jahre alt sind, während die Zellen im Labor lediglich für wenige Monate kultiviert wurden. Außerdem ist ungeklärt, ob die Differenzierung von iPSC-Zellen zu iPSC-RPE-Zellen Einfluss auf die epigenetische, altersbedingte Veränderungen der RPE-Zellen nimmt (Fisher et al. 2022).

Um adulte somatische Zellen zu iPSC zu differenzieren, werden die Gene der vier Yamanaka-Transkriptionsfaktoren (c-MYC, kruppel like factor 4 [KLF4], octamer binding transcription factor 4 [OCT4], SRY box 2 [SOX2]) durch ein Virus in die Wirtszelle eingeschleust (Takahashi und Yamanaka 2006). Humane Fibroblasten oder periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) können hierbei als Wirtszelle fungieren (Takahashi et al. 2007). Nach dieser Differenzierung können die iPSC-Zellen anhand verschiedener Protokolle zu verschiedenen Zellarten reprogrammiert werden. Anschließend ähneln die hiPSC-RPE-Zellen den nativen RPE-Zellen auf morphologischer und auf funktioneller Ebene, was den Nutzen als Modellorganismus für die AMD unterstreicht (Kokkinaki et al. 2011; Fields et al. 2016).

Die für diese Arbeit verwendeten iPSC-RPE-Zellen stammen aus der Rekrutierung von insgesamt 161 Patienten aus der Augenklinik der Universität Regensburg. Den Patienten wurde nach einer Genotypisierung ein individuelles hohes bzw. geringes genetisches Risiko für die Entstehung der AMD zugeschrieben. Die Risikoberechnung erfolgte nach der Arbeit von Grassmann und Kollegen, die ein Risikomodell auf Grundlage von 8 Genorten und den dort assoziierten genetischen Varianten aufstellen konnten (*APOE*, *AMRS2/HTRA1*, *CFB*, *CFH*, *C3*, *LIPC*, *TIMP3*, *PLA2G12A*). Die Patienten wurden mit diesem Modell entsprechend des Genotyps in fünf Risikogruppen unterteilt (Grassmann et al. 2012). Durch die verschiedenen Risikograde kann der genetische Einfluss auf die AMD-Pathogenese weiter untersucht

werden. Der genetische Einfluss fungiert als endogener Faktor und wird zusammen mit der Induktion von oxidativem Stress als exogenen Faktor kombiniert, um die Komplexität der AMD-Entstehung *in vitro* bestmöglich abzubilden.

1.7.1 NA unterdrückt AMD-Phänotyp

Nikotinamid (NA) ist ein Vitamin-B3-Derivat, das vor oxidativem und inflammatorischem Stress schützt (Maiese et al. 2009). Dieses wird häufig als Zusatz zum Kulturmedium genutzt und wird ebenfalls bei der Differenzierung der iPSC-RPE-Zellen verwendet (Idelson et al. 2009). Eine Studie von Saini et al. (2017) kam zu dem Schluss, dass NA den AMD-Phänotyp in hiPSC-RPE-Zellen unterdrückte. In dessen Gegenwart wurden geringere Konzentrationen von AMD- und Drusen-assoziierten Proteinen gemessen, sowie herabgesetzte mRNA-Expressionen von Komplement- und Entzündungsgenen ermittelt. Außerdem nahm der Zusatz von NA ins Zellmedium Einfluss auf morphologische und funktionelle Eigenschaften der kultivierten RPE-Zellen. Einerseits wurde das Zytoskelett stabilisiert, andererseits phagocytierten RPE-Zellen doppelt so viele POS in Anwesenheit von NA (Parmar und Malek 2022). Deshalb kann der NA-Entzug *in vitro* als neuer Ansatz gesehen werden, um potenzielle Signalwege oder Proteine aufzudecken, die mit der AMD assoziiert sein könnten.

1.7.2 SI-Zugabe als oxidativer Stressor

Um oxidativen Stress an iPSC-RPE *in vitro* auszulösen, wurde in vielen Studien Natriumiodat (engl.: *sodium iodate*, SI, NaIO_3) verwendet (Kannan und Hinton 2014). Die SI-Zugabe resultierte dabei in der Freisetzung von ROS, welche Zellmembranen schädigte und sie damit destabilisierte (Zhou et al. 2014).

In vivo induzierte die SI-Gabe die Degeneration des RPEs, gefolgt von einem Untergang der Photorezeptoren. Dabei spielte Nekrose bei Verlust des RPEs eine Rolle, während Apoptose als programmierter Zelltod hauptsächlich für den Zelltod der Photorezeptoren verantwortlich war (Hanus et al. 2016; Reisenhofer et al. 2017). Im Mausmodell führte die systemische SI-Gabe zu inflammatorischen und degenerativen Prozessen in der Retina. Mikroskopisch ließen sich dabei ein lückenhaftes RPE und eine verdünnte Photorezeptorschicht feststellen. Zusätzlich wurden erhöhte Expressionsniveaus von Komplementgenen wie *C1S*, *C3* und *CFH* und proinflammatorischen Genmarkern wie *Interleukin-1 β* festgestellt (Enzbrenner et al. 2021).

Eine neuere Studie an ARPE19-Zellen stellte die Hypothese auf, dass die SI-Zugabe zur Freisetzung von labilem Eisen führte, sodass hohe Eisenspiegel in den Zellen einen ferroptotischen Zelltod auslösen könnten. Beide Arten des Zelltodes haben jedoch gemeinsam, dass es durch SI zuvor zur ROS-Bildung und Membranschädigung kommt (Liu et al. 2021).

Auf molekularer Ebene konnte mit dem antioxidativen NRF2-Signalweg und den Zielgenen *NQO1* und *HMOX1* eine Stressantwort identifiziert werden, die vor SI-induziertem Zellstress schützt (Sachdeva et al. 2014). Die Auswirkungen von oxidativem Stress auf RPE-Zellen und die Funktionsweise dieses Signalweges wurden in 1.6 beschrieben.

1.8 Ziele dieser Arbeit

In dieser Arbeit wurden im iPSC-RPE Zellmodell mit bekanntem genetischem AMD-Risikoprofil erweiterte Analysen zu Prozessen durchgeführt, denen eine Beteiligung in der AMD-Pathogenese zugesprochen wurde. Dazu wurden Auswirkungen veränderter Kulturbedingungen (NA-Entzug) und oxidativen Stresses (SI-Zugabe) auf mitochondriale, proinflammatorische und Komplement- sowie Autophagie-bezogene Stressmarker ermittelt. Da in der AMD-Pathogenese häufig das RPE und dessen intrazellulären Prozesse isoliert betrachtet werden, sollte hier die direktionale Sekretion bislang unbeachteter Proteine, die im Zusammenhang mit der AMD-Pathogenese stehen könnten, untersucht werden. Dadurch soll der direktionale Einfluss des RPEs auf andere, benachbarte, Zellen ermittelt werden.

Um die meist mehrjährige AMD-Pathogenese *in vitro* besser abzubilden, wurden chronische, oxidative Stressversuche durchgeführt. Dabei wurden Auswirkungen eines länger applizierten oxidativen Stresses sowie die Folgen einer später einsetzenden, aber gleichlangen Stressperiode auf die Aktivierung des NRF2-Signalweges ermittelt. Weiterhin wurden die RPE-Zellen mit POS behandelt, um physiologische Stressbedingungen bestmöglich zu rekapitulieren.

Durch die Nutzung von iPSC-RPE-Zellen mit niedrigem bzw. hohem AMD-Risikograd wurden Unterschiede der Zellantworten ermittelt, um den Einfluss des genetischen Hintergrundes in der AMD-Pathogenese zu untersuchen.

2 Materialien

2.1 hiPSC induzierte RPE-Zelllinien

Tabelle 1: Verwendete RPE-Zelllinien und deren Ursprung.

Spezies	Risikoprofil	Zelllinie	Ursprung
<i>Homo sapiens</i>	<i>High risk (HR)</i>	HR1	Fibroblasten
		HR2	PBMCs
		HR3	PBMCs
		HR4	Fibroblasten
	<i>Low risk (LR)</i>	LR1	PBMCs
		LR2	Fibroblasten
		LR3	PBMCs
		LR4	PBMCs

PBMCs: Periphere mononukleäre Blutzellen

Die RPE-Zellen wurden auf Transwellfilter kultiviert, die zuvor mit Fibronectin beschichtet wurden. Pro Zelllinie wurden 72 Transwellfilter auf 12-Kavitätenplatten kultiviert, die zur Isolierung von RNA, für immunzytochemische Färbungen sowie für die Entnahme von konditioniertem Medium genutzt wurden.

2.2 Zellkulturmedien

Tabelle 2: RPE-Zellkulturmedien und Zellkulturzusätze

Komponente	Hersteller
β-Mercaptoethanol, C ₂ H ₆ OS	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Fibronectin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Gentamycin (50 mg/ml)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Gibco™ Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS)	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-Glutamin 200 mM (100x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Gibco™ MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Gibco™ TrypLE™ Express Enzyme	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Nikotinamid, C ₆ H ₆ N ₂ O	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

2.3 Immunzytochemie

2.3.1 Puffer und Lösungen

Tabelle 3: Zusammensetzung der Block- und Antikörperlösungen für die Immunzytochemie (ICC)

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	Menge
Blocklösung (ICC)	Goat serum	10 % (v/v)
	Triton-X-100	0,3 % (v/v)
	1x PBS	89,7 % (v/v)
Paraformaldehyd-Lösung	Paraformaldehyd 4 % (v/v)	50 % (v/v)
	1x PBS	50 % (v/v)
Primärantikörperlösung (ICC)	Goat serum	2,5 % (v/v)
	20 % Triton-X-100	0,05 % (v/v)
	2% Natriumazid	0,1 % (v/v)
	1x PBS	97,35 % (v/v)
Sekundärantikörperlösung (ICC)	Goat serum	2,5 % (v/v)
	20 % Triton-X-100	0,05 % (v/v)
	1x PBS	97,45 % (v/v)

2.3.2 Primärantikörper

Tabelle 4: Primärantikörper für die Immunzytochemie

Bezeichnung	Typ	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Anti-ZO-1	Polyklonaler Antikörper	Kaninchen	1:500	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

2.3.3 Sekundärantikörper

Tabelle 5: Sekundärantikörper für die Immunzytochemie

Bezeichnung	Verdünnung	Hersteller
Anti-rabbit IgG, Alexa Fluor™ 594	1:800	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

2.4 Kitsysteme

Tabelle 6: Verwendete Kitsysteme

Kit	Hersteller
PureLink® RNA Mini Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Human Cytokine Array C5	RayBiotech Life, Inc. Peachtree Corners, GA, USA
Human VEGF Quantikine Kit	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA

2.5 Chemikalien

Tabelle 7: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
2x TaqMan Gene Expression Master Mix	Eurogentec, Seraing, Belgien
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), $C_{16}H_{15}N_5$	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
β -Mercaptoethanol, $HSCH_2CH_2OH$	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	Panreac AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Dako Fluorescence Mounting Medium	Agilent, Santa Clara, CA, USA
dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	Genaxxon bioscience GmbH, Ulm, Deutschland
Ethanol $\geq 99,8\%$ p.a, C_2H_6O	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Gibco™ DPBS	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Gibco™ Opti-MEM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Isopropanol, C_3H_8O	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Natriumazid 2%, NaN_3	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Natriumhydroxid, NaOH	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Natriumiodat, 99% min, $NaIO_3$	Alfa Aesar, Haverhill, MA, USA
Paraformaldehyd (PFA), $(CH_2O)_n$	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Salzsäure (HCl), 1 M	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland

Sucrose	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Taurin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Triton® X-100	AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany

2.6 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 8: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
12-Kavitäten Zellkulturplatte	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
6-Kavitäten Zellkulturplatte	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
Deckgläschen (24 x 50 mm)	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland
Eppendorf-Röhrchen (0,5 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Eppendorf-Röhrchen (1,5 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Eppendorf-Röhrchen (2 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Falcon-Röhrchen (15 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Falcon-Röhrchen (50 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Matrix-Pipetten-Spitzen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
MicroAmp™ Optical 384-Kavitäten-Platte	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
MicroAmp™ Optical Adhesive Film	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Multiply® µStrip 0,2 ml chain	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Nitril Handschuhe	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland
PCR-Cups (0,5 ml)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland
Pipettenspitzen, steril, mit Filter (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Nerbe Plus GmbH, Winsen, Deutschland
Plastikpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

QIAshredder	QIAGEN N.V., Hilden, Deutschland
Reagenzienreservoir (25 ml)	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland
SuperFrost® Plus Mikroskop Objektträger	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland
ThinCert™ Zellkultur Filter (12 Kavitäten)	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Wägeschiffchen	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland
Zellschaber	Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgien

2.7 Geräte und Instrumente

Tabelle 9: Verwendete Geräte und Instrumente

Gerät/Instrument	Hersteller
Accu-jet Pipettierhilfe	Brand, Wertheim, Deutschland
Autoklav V-150	Systec GmbH, Wettenberg, Deutschland
CO ₂ -Inkubator (Heracell™)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Durchlichtmikroskop Axioskop 2	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
E1-ClipTip™ Equalizer Mehrkanalpipette	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Eclipse Ts2 Inversmikroskop	Nikon, Tokio, Japan
Eismaschine AF 100	Scotsman, Vernon Hills, IL, USA
Eppendorf Research® Plus 8 Kanalpipette	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
EVOM Epithelialer Volt-Ohm-Meter	WPI World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA
Feinwaage Explorer	OHAUS, Nänikon, Schweiz
Fluoreszenz-Mikroskop BZ-X810	Keyence Corporation, Osaka, Japan

Invertiertes Routine-Mikroskop ECLIPSE Ts2	Nikon Corporation, Tokyo, Japan
Milli-Q-Synthesis Reinstwasseranlage	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
NanoDrop® ND1000 Spektrophotometer	NanoDrop, Wilmington, DE, USA
Odyssey® XF Imager	LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA
Picus® NxT elektronische Pipette, 12-Kanal, 10-300 µl	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
QuantStudio® 5 Real-Time PCR System	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
ScanLaf biologische Sicherheitswerkbank Klasse 2 - Mars	LaboGene A/S, Allerød, Dänemark
Sicherheitswerkbank BDK-SK1800	Weiss Umwelttechnik GmbH, Reiskirchen, Deutschland
TECAN SPARK® Multimode Microplate Reader	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz
Titramax 101	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Transferpipette® (10 µl)	Brand, Wertheim, Deutschland
Transferpipette® (100 µl)	Brand, Wertheim, Deutschland
Transferpipette® (1000 µl)	Brand, Wertheim, Deutschland
Vakuumpumpe MZ 2 C	Vacuubrand GmbH, Wertheim, Deutschland
Vortex Genie2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Waage	SCALTEC Instruments GmbH, Heiligenstadt, Deutschland
Wasserbad W12	Labortechnik Medingen, Arnsdorf, Deutschland
Wasserdestilliergerät	GFL GmbH, Burgwedel, Deutschland
Werkbank Heraguard	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Biofuge fresco (Tischzentrifuge für Eppendorf Röhrchen)	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland

Zentrifuge (Kühlzentrifuge Falcon)	Megafuge	1.0R	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Zentrifuge (Falconzentrifuge)	Megafuge	3L	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland

2.8 Software

Tabelle 10: Verwendete Software

Software	Hersteller
AxioVision Rel. 4.8	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
CorelDRAW® 2019	Corel Corporation, Ottawa, ON, Kanada
BZ X800 Viewer	Keyence Corporation, Osaka, Japan
ImageJ	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA
Microsoft Office	Microsoft Cooperation, Redmond, WA, USA
R 3.4.4	R Foundation, Vienna, Österreich
Spark®Control MethodEditor	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz
Image Studio 4.0	LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA
QuantStudio Design Analysis	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

3 Methoden

3.1 Kultivierung der iPSC-RPE

Die RPE-Zellen wurden bei 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5 % in einem Heracell™-150i-CO₂-Inkubator kultiviert. Der Medienwechsel erfolgte in einer Sterilbank. Das Kulturmedium wurde steril vorbereitet, bei 4 °C in einem Kühlschrank gelagert und war zur Zeit der Verwendung maximal eine Woche alt. Das Kulturmedium wurde eine Stunde vor Verwendung bei Raumtemperatur gelagert. Der Medienwechsel erfolgte stets drei Mal pro Woche in gleichmäßigen Abständen. Außerdem erfolgten wöchentliche Kontrollen unter dem Nikon Eclipse Ts2 Inversmikroskop, um die charakteristische RPE-Zellmorphologie als Qualitätsmerkmal der Zellen zu identifizieren und um Kontaminationen auszuschließen.

3.2 Nährmedien für iPSC-RPE

Als Standardmedium wurde Gibco™ KnockOut™ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit weiteren Zusätzen genutzt (Tabelle 11).

Tabelle 11: Zusätze zum DMEM

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

Dieses Medium wurde für die erste Woche nach dem Aussäen der in flüssigem Stickstoff konservierten Zellen genutzt. Anschließend wurde das Nikotinamid entfernt, wobei die restliche Zusammensetzung und Frequenz der Medienwechsel unverändert blieben.

Bei der Entnahme von konditioniertem Medium wurde der letzte Medienwechsel mit KOSR-freiem Medium durchgeführt.

3.3 Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER)

Vorbereitend für die TEER-Messung wurden die Elektroden des Volt-Ohm-Meters für 15 min in 70 % Ethanol desinfiziert und daraufhin für 15 min in 150 mM Natriumchlorid äquilibriert. Vor der Messung wurde das Medium ausgetauscht. Anschließend wurde die kleine Elektrode in das Medium über dem Transwellfilter und die lange Elektrode in das Medium unter dem Transwellfilter positioniert. Es wurden Dreifachmessungen durchgeführt, der Mittelwert berechnet und um einen Leerwert korrigiert. Als Leerwert diente die Messung in frischem Kulturmedium, welcher von den Messwerten subtrahiert wurde. Dieser Netto-Messwert wurde mit der Oberfläche der Transwellfilter multipliziert, sodass der TEER in $[\Omega \cdot \text{cm}^2]$ angegeben werden konnte

3.4 Untersuchung der RPE-Morphologie mit immunzytochemischen Verfahren

Die charakteristische Morphologie der RPE-Zellen besteht aus hexagonalen Strukturen und der Bildung einer einzelnen Zellschicht. Zur Darstellung der Charakteristika wurde das RPE durch die Färbung mittels spezifischer Antigene immunzytochemisch untersucht. Dabei diente Zonula occludens-1 (ZO-1) als Marker für die Zellbänder (tight junctions) und Diamidin-2-phenylindol (DAPI) als Zellkernmarker.

Aus den Transwellfiltern wurde mit einem Skalpell ein kleines Filterstück herausgeschnitten und in einer 12-well-plate mit 300 μl PBS bis zur Weiterverarbeitung bedeckt. Für die Fixierung wurde das PBS durch 300 μl 2 % Paraformaldehyd (PFA) für 10 Minuten ersetzt. Anschließend wurde das PFA entfernt und die Filterstücke insgesamt dreimal mit 300 μl PBS für 5 Minuten gewaschen. Es folgte eine Inkubation für 30 Minuten mit 300 μl Blocklösung, bevor diese abgenommen wurde und die Filter über Nacht bei 4 °C mit der Primärantikörperlösung versetzt wurden. Diese wurde am darauffolgenden Tag abgenommen, die Filter erneut drei Mal für 5 Minuten mit je 300 μl PBS gewaschen und mit der dazugehörigen Sekundärantikörperlösung für mindestens vier Stunden bei RT im Dunkeln inkubiert. Diese Antikörperlösung wurde erneut abgenommen, und die Filter drei Mal für 5 Minuten mit 300 μl PBS gewaschen. Die Filter wurden mit einer Pinzette aus den Kavitäten entnommen und unter einem Tropfen Dako Fluorescence Mounting Medium durch ein Deckgläschen auf einem Objektträger fixiert.

Aufnahmen der Filterstücke wurden anschließend unter dem Keyence BZ-X810-Fluoreszenzmikroskop bei 20-facher Vergrößerung und einer Wellenlänge von 594 nm für die ZO-1-Färbung bzw. 461 nm für die DAPI-Färbung angefertigt.

3.5 Entnahme von konditionierten Medien

Konditionierte Medien wurden entnommen, indem bei den Proben das Medium sowohl oberhalb (= apikales Kompartiment) als auch unterhalb des Transwellfilters (= basales Kompartiment) in getrennte Falcon-Röhrchen überführt wurde. Medien gleicher Zelllinien und gleicher Behandlungen wurden zusammengeführt. Die Proben wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert.

3.6 Isolation und Aufreinigung von POS aus Schweine-Retina

Um POS aus 24 frischen Schweineaugen zu isolieren, wurden die Augen mit Hilfe eines Skalpells präpariert, sodass die Retina vom Tapetum lucidum abgelöst werden konnte. Zunächst wurden die Retinae in 30 ml Taurinpuffer (Tabelle 12) resuspendiert, durch Mullbinden filtriert und anschließend mit 5 ml- und 1000 µl-Pipetten homogenisiert. Verschiedene Sucrose-Gradienten von 20 - 60 % (Tabelle 13) wurden angefertigt. In 38,5-ml-Ultrazentrifugenröhrchen wurden je 5 ml der Sucrose-Gradienten-Lösung in aufsteigender Konzentration untergeschichtet. Anschließend wurden 6,5 ml homogenisierte Retinae zugegeben. Die Ansätze wurden bei 26.000 rpm in SW 40 Ti Swinging Bucket Rotoren für zwei Stunden ultrazentrifugiert. Die pinke, ringförmige, POS-haltige Fraktion wurde abgenommen und für 20 min bei 7500 rpm in einem 50-ml-Falconröhrchen zentrifugiert. Es folgten zwei Waschschrte mit Opti-MEM I und die anschließende Resuspension der aufgereinigten POS in Opti-MEM I mit 1% v/v Penicillin/Streptomycin. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

3.7 Bestimmung der POS-Konzentration durch den Bradford Assay

Die Konzentrationsbestimmung der aufgereinigten POS erfolgte mit Hilfe des Bradford Assays. Bovines Serumalbumin (BSA) wurde als Referenzprotein benutzt. Eine BSA-Lösung mit einer Konzentration von 2000 µg/ml wurde hergestellt, indem 100 mg/ml BSA (gelöst in Millipore-H₂O) mit Opti-MEM I auf die entsprechende Verdünnung eingestellt wurde. Hieraus wurde eine Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 2000 µg/ml, 1000 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 62,5 µg/ml, 31,12 µg/ml und

0 µg/ml hergestellt. Roti-Quant wurde 1:5 in Millipore-H₂O verdünnt. Anschließend wurden 5 µl der Standardkonzentrationen bzw. der Proben mit 995 µl Roti-Quant versetzt und gevortext. Nach einer Inkubationszeit von 20 min bei RT wurde die Absorption photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Die BSA-Lösung von 0 µg/ml diente als Leermessung. Die POS-Konzentration wurde aus der ermittelten Standardkurve bestimmt.

Tabelle 12: Zusammensetzung des Taurin-Puffers für POS-Isolation

Komponente	Volumen
5 M NaCl	5,2 ml
1 M MgCl ₂	400 µl
1 M Tris-Puffer	4 ml
100 mM Taurin	10 ml
H ₂ O dest.	180,4 ml

Tabelle 13: Übersicht der Lösungen mit verschiedenen Sucrose-Gradienten für die POS-Isolation

%	Volumen Taurin-Puffer	Volumen 60 %-iger Sucrose-Lösung
20	16 ml	8 ml
27	13,2 ml	10,8 ml
33	10,8 ml	13,2 ml
41	7,6 ml	16,4 ml
50	4 ml	20 ml
60	-	24 ml

3.8 Induktion von physiologischem Stress durch POS-Zugabe

In iPSC-RPE-Zellen wurden durch die POS-Zugabe physiologischer Stress induziert. Dabei wurde eine POS-Konzentration von 4 µg/cm² verwendet, was rund 20 POS/RPE-Zelle entspricht. Stressversuche mit dieser POS-Konzentration wurden in früheren Arbeiten etabliert (Singh et al. 2013; Brandl et al. 2014). Hierzu wurden die POS zunächst auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden die POS für 5 min bei einer

Amplitude von 10 % sonifiziert. Die POS wurden durch ein Zellsieb (Porengröße: 5 µm) gefiltert und anschließend mit KOSR-freiem Kulturmedium auf das benötigte Endvolumen aufgefüllt. Auf die apikale Zellseite wurde 1 ml der POS-Lösung gegeben. Unter den Transwellfilter wurde kein Medium hinzugegeben. Nach 6 Stunden wurde das Medium entfernt und durch frisches Kulturmedium ersetzt. Die Fütterung in POS-Stressversuchen erfolgte in gleichmäßigen Abständen dreimal wöchentlich. Die Lagerung und sonstige Behandlung im Vergleich zu ungestressten Zellen blieb unverändert.

3.9 Induktion von oxidativem Stress durch SI-Zugabe

Durch die Zugabe von SI wurde der Einfluss von Langzeitstress auf die RPE-Zellen *in vitro* untersucht. Hierfür wurde das SI auf eine Konzentration von 0,125 mM in Kulturmedium ohne NA-Zugabe gelöst. Es wurde sowohl auf als auch unter dem Transwellfilter ein Volumen von 1 ml Medium vorgelegt. Das Medium wurde hierbei vor jedem Medienwechsel frisch angesetzt und im 48-Stunden-Rhythmus gewechselt.

3.10 RPE-Zelllyse und RNA-Isolierung

Pro Behandlung und pro Zelllinie wurden technische Triplikate angefertigt, deren RNA isoliert wurde. Um die RNA aufzubereiten, wurde zunächst das Medium aus den 12-well-plates entnommen und die Transwellfilter mit 350 µl Lysepuffer (+ 1 % (v/v) β-Mercaptoethanol) aus dem PureLinkR-RNA-Mini-Kit von Life Technologies gefüllt. Anschließend wurden die Zellen durch einen Zellschaber vom Filter gelöst, die Suspension für den Zellaufschluss in QIAshredder-Säulen überführt und 3 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Es wurden 350 µl Ethanol (70 %) zugegeben und der Inhalt auf die Aufreinigungssäule des Kits überführt. Es folgte eine Zentrifugation für 30 Sekunden bei 13.000 rpm. Der Durchlauf wurde verworfen und die Membran der Aufreinigungssäule mit 350 µl Wasch-Puffer I des Kits gewaschen. Erneut wurde zentrifugiert (30 Sekunden, 13.000 rpm) und der Durchlauf verworfen. Die Aufreinigungssäulen wurden mit 10 µl DNase (1:8 gelöst in RDD-Puffer) für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurde erneut mit 350 µl Wasch-Puffer I und zwei Mal mit je 500 µl Wasch-Puffer II gewaschen und der Durchlauf stets verworfen. Zwischen den Waschschritten wurden die Säulen zentrifugiert (30 Sekunden, 13.000 rpm). Die Säulen wurden für 2 Minuten bei 13.000 rpm trocken zentrifugiert und die Membranen

anschließend mit 30 µl RNase-freiem Wasser für 1 Minute inkubiert. Die RNA wurde in der Zentrifuge für 2 Minuten bei 13.000 rpm eluiert und bei -80 °C gelagert. Die RNA-Konzentration wurde mittels NanoDropR ND1000 Spectrophometer bestimmt.

3.11 cDNA-Synthese

Um die komplementäre DNA aus der isolierten RNA zu synthetisieren, wurde das RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit von Thermo Scientific™ genutzt. Abhängig von der jeweiligen RNA-Konzentration wurde das Volumen des Wassers berechnet, indem eine definierte Menge RNA gelöst war. Das entsprechende Volumen wurde in ein Eppendorfröhrchen überführt und mit RNase-freiem Wasser auf ein Endvolumen von 11,5 µl aufgefüllt. Jedem Ansatz wurde 1 µl Random Hexamere Primer zugegeben und anschließend für 5 Minuten bei 65 °C im Thermocycler inkubiert. Anschließend wurde jedem Ansatz 7,5 µl Mastermix hinzugefügt (Tabelle 14). Die Ansätze wurden daraufhin vollständig im Thermocycler amplifiziert (Tabelle 15). Die Lagerung erfolgte bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C.

Tabelle 14: Zusammensetzung des Mastermixes für die cDNA-Synthese

Reagenz	Volumen
5x Puffer RevertAid™	4 µl
dNTPs (jeweils 10 mM)	2 µl
RevertAid™ Reverse Transkriptase	0,5 µl
RNase freies Wasser	1 µl

Tabelle 15: Reaktionsschritte des Thermocyclers für die cDNA-Synthese

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

3.12 Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion

Mittels quantitativer Real-Time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) konnte das Expressionsniveau spezifischer Gene auf der mRNA ermittelt werden. Die Zusammensetzung des Mastermixes ist in Tabelle 16 und die einzelnen Reaktionsschritte der qRT-PCR in Tabelle 17 gelistet. Die Genmarker und deren zelluläre Funktion sind in Tabelle 18 dargestellt. Für jedes Gen wurde je ein *forward* und *reverse primer* als auch die entsprechende Sonde genutzt. Die Proben wurden auf das Referenzgen *Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT)* normalisiert.

Zunächst wurde die cDNA mit einem definierten Volumen H₂O Millipore verdünnt. Für jeden Reaktionsansatz wurden 7,5 µl des Mastermixes (Tabelle 16) und 2,5 µl der verdünnten cDNA in die Kavitäten einer 384-Kavitätenplatte gegeben. Die Vervielfältigung im Thermocycler erfolgte pro Reaktionsansatz als technisches Triplikat (Tabelle 17). Mit Hilfe der Software QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System wurden die Einstellungen für die Messungen getroffen. Anschließend wurden die Daten mit der Delta-Delta-($\Delta\Delta$)-C_t-Methode analysiert und graphisch dargestellt.

Tabelle 16: Zusammensetzung des Mastermixes für die qRT-PCR

Reagenz	Volumen
2x Taqman Gene Expression Master Mix	5 µl
Primer forward	1 µl
Primer reverse	1 µl
Sonde	0,125 µl
Millipore-H ₂ O	0,375 µl

Tabelle 17: Reaktionsschritte der qRT-PCR

Reaktionsschritt (40x)	Temperatur	Dauer
Denaturierung	95 °C	40 sek
Primeranlagerung	60 °C	60 sek
Amplifikation	72 °C	120 sek

Tabelle 18: Taqman-qRT-Genmarker. F: *forward primer*, R: *reverse primer*.

Genmarker	Funktion der translatierten Proteine	Sequenz (5' – 3')
<i>ANG</i> (<i>Angiogenin</i>)	Induktion der Angiogenese	F: AGGTTACACAACTGGAACC R: ACCATCTCTTCCAACACAGG
<i>ATG5</i> (Autophagosom 5)	Induktion der Autophagie	F: GAAGGTTATGAGACAAGAAG R: TCTGGAAAACCTTTAAAATGTA
<i>ATG7</i> (Autophagosom 7)	Induktion der Autophagie	F: TTTGAAGATTGCCTAGGGGG R: AACTGGAGAAGTTCACTGG
<i>BCL2</i> (engl. B-cell lymphoma 2)	Antiapoptotische Wirkung	F: TTCTTTGAGTTCGGTGGGG R: GTACTCAGTCATCCACAGGG
<i>CCL2</i> (CC-Chemokin-Ligand-2)	Antiinflammatorische Wirkung	F: ATAGCAGCCACCTTCATTCC R: CCTCTGCACTGAGATCTTCC
<i>CFI</i> (Komplementfaktor I)	Inaktivator des Komplementfaktors C3b	F: AAATCGGGTGTTTGCATTCC R: CTTTCTGCATCCATGTCAGC
<i>COX4</i> (Cytochrom-c-Oxidase, Untereinheit 4, Isoform 1)	Teil der Atmungskette; Transferiert Elektronen von Cytochrom c auf molekularen O ₂	F: GCTTTGCTGAGATGAACAGG R: CACCCACTCTTTGTCAAAGC
<i>FGF9</i> (engl.: <i>fibroblast growth factor 9</i>)	Wachstumsfaktor, Reparatur von defektem Gewebe, fördert zelluläres Überleben	F: CCCAATGGTACTATCCAGGG R: CTCCCCCTTCTCATTATCC
<i>HMOX1</i> (Hämoxygenase 1)	Teil des NRF2-Signalweges zum Schutz vor ROS	F: ATAGAAGAGGCCAAGACTGC R: ATCTTGCACTTTGTTGCTGG

<i>HPRT</i> (Hypoxanthin- Guanin- Phosphoribosyl- Transferase)	Purinstoffwechsel; fungiert als Haushaltsgen	F: CTTTGCTTTCCTTGGTCAGG R: TCAAATCCAACAAAGTCTGGC
<i>NQO1</i> (NADPH- Quinon- Dehydrogenase 1)	Teil des NRF2- Singalweges zum Schutz vor ROS	F: AAGGTTGCCTGAAAAATGGG R: TTGTGGATACTGTCTGAGAGC
<i>PPARGC1A</i> (engl. <i>Peroxisome proliferator- activated receptor gamma coactivator 1-alpha</i>)	Hauptinduktor mitochondrialer Biogenese	F: CCTTCAAACATATTTGAGAAGATAG R: GTCACGTCTCCATCTGTC
<i>SOD2</i> (Superoxid- Dismutase-2)	Mitochondriale Beseitigung von ROS	F: ACTTCTGGTAGATGTCACCC R: GTTTGCCTTTACTGTGCAGG
<i>TGFβ2</i> (engl.: <i>transforming growth factor β2</i>)	Embryonal- entwicklung von Lunge, Herz, Knochen	F: ATGGAGTTCAGACACTCAGC R: TCAATCTTGGGTGTTTTGCC
<i>VEGF</i> (engl.: <i>vascular endothelial growth factor</i>)	Vaskulogenese, Angiogenese	F: GCAGCTTGAGTTAAACGAACG R: GGTTCCTCGAAACCCTGAG

3.13 Zytokin-Arrays

Die Durchführung der Zytokin-Arrays erfolgte mit dem Kit Human Cytokine Antibody Array C5 von RayBiotech nach dem Protokoll des Herstellers. Als Probe wurde jeweils 1 ml unverdünntes, konditioniertes Medium genutzt. Die Auswertung erfolgte bei einer chemilumineszenten Belichtungszeit von 2:55 min im Odyssey® XF Imager von LI-COR Biosciences. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit der Software Image Studios 4.0 von LI-COR Biosciences. Dazu wurden die Signale jeder einzelnen

Membran nach den Angaben des Protokolls auf den Mittelwert der Positivproben normalisiert und gegen die Kontrollen kalibriert.

3.14 ELISA

Das Protein VEGF wurde mittels *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) in konditioniertem Medium nachgewiesen. Hierzu wurde das Human VEGF Quantikine ELISA Kit von R&D Systems genutzt und nach dem Protokoll gearbeitet. Die konditionierten Medien wurden zuvor 1:10 in PBS verdünnt. Die Konzentrationsbestimmung in den Proben erfolgte anhand der Standardkurve im Kit.

3.15 Statistik

Bei Datensätzen, die zwei Konditionen enthielten, wurde der Shapiro-Wilk-Test zur Ermittlung der Normalverteilung sowie der Levene-Test zur Überprüfung der Varianzhomogenität genutzt. Nicht normalverteilte Datensätze wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test auf statistische Signifikanz ($p < 0,05$) überprüft. Aus statistischen Gründen wurden HR- und LR-Zelllinien im Mittel bzw. alle Zelllinien im Mittel, jedoch keine einzelnen Zelllinien gegen die entsprechenden Kontrollen untersucht. Als Software diente das Programm R (Version 3.4.4).

4 Ergebnisse

4.1 Auswirkungen des NA-Entzugs und des SI-Stresses auf sechs Wochen alte iPSC-RPE-Zellen

Die in diesem Versuchsteil verwendeten RNA-Proben und konditionierte Medien stammen aus einer früheren Arbeit am Institut für Humangenetik in Regensburg und wurden freundlicherweise von Cornelia Nees zur Verfügung gestellt (2022, unpublizierte Arbeit).

Da für die molekulare Pathogenese der AMD Störungen in verschiedenen Prozessen diskutiert wird, wurden diese nach einer Literaturrecherche zusammengestellt. In der hier angefertigten Arbeit beschränkten wir uns auf mitochondriale und Autophagie-bezogene Prozesse sowie das Komplement- und Immunsystem.

Je vier high risk (HR) und low risk (LR) iPSC-RPE-Zelllinien wurden genutzt, um die Folgen des Entzuges von Nikotinamid (NA) aus dem Kulturmedium auf verschiedene mRNA-Expressionsmarker zu untersuchen. Nach dem Auftauen der iPSC-RPE-Zellen, wurden zunächst alle Zellen für eine Woche mit NA-zugesetztem Medium kultiviert. Die Hälfte jeder Zelllinie wurde anschließend sieben Wochen mit NA-freiem Medium kultiviert, die andere Hälfte diente als Kontrolle und erhielt weiterhin NA im Kulturmedium. Zusätzlich wurde ein Teil der Zelllinie in den letzten zwei Wochen vor Versuchsende mit 0,125 mM SI (+SI) oxidativ gestresst, die Kontrolle wurde nicht gestresst (0mM SI; -SI). Eine Übersicht der daraus resultierenden vier verschiedenen Behandlungen zeigt Abbildung 2.

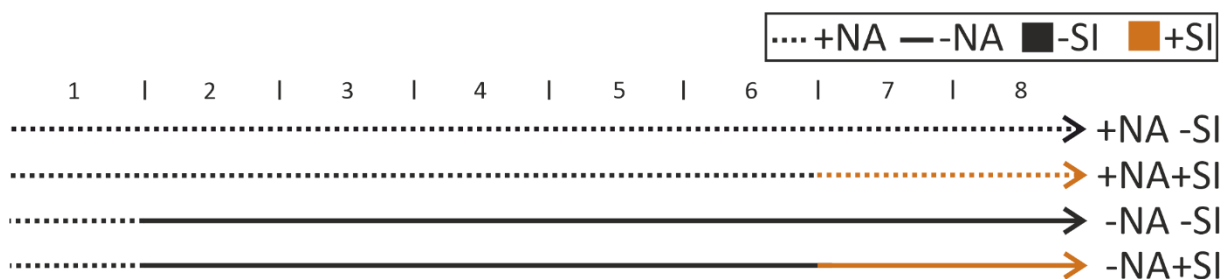


Abbildung 2: Übersicht über die verschiedenen Kultivierungsbedingungen acht Wochen alter iPSC-RPE-Zellen. Gestrichelte Linien zeigen eine Kultivierung mit NA-Zusatz, durchgängige Linien eine Kultivierung unter NA-Entzug. Eine SI-freie Kultivierung wird in schwarz und oxidativer Stress in orange dargestellt. Die Zahlen entsprechen der jeweiligen Kultivierungswoche.

4.1.1 mRNA-Expressionsanalyse von Genmarkern der Autophagie

Um den Einfluss des NA-Entzuges und des SI vermittelten oxidativen Stresses auf die iPSC-RPE-Zellen quantitativ zu erfassen, wurde eine qRT-PCR der Genmarker *ATG5* und *ATG7* durchgeführt.

Hierbei wird erkenntlich, dass der NA-Entzug in allen Zelllinien zu einem Anstieg der *ATG5*-Expression führte. Innerhalb der HR-Zelllinien zeigte sich der stärkste Anstieg für HR2 mit einer 1,75-fachen ($\pm 0,006$) Expression, während der stärkste Anstieg innerhalb der LR-Zelllinien bei 1,53 ($\pm 0,273$) bei LR2 lag. Daraus resultierte für die HR- und LR-Zelllinien jeweils ein signifikanter *ATG5*-Expressionsanstieg (-NA-SI bei HR: 1,69 [$\pm 0,094$]; -NA+SI bei HR: 1,31 [$\pm 0,200$]; -NA+SI bei LR: 1,22 [$\pm 0,096$]; jeweils $p < 0,05$), welcher für die HR-Zelllinien im direkten Vergleich zu LR-Zelllinien jedoch signifikant höher war ($p < 0,05$; Abbildung 3A).

Ähnliche Ergebnisse zeigten sich für das *ATG7*-Expressionsniveau nach NA-Entzug. Innerhalb der HR-Zelllinien stieg die *ATG7*-Expression in jeder Zelllinie an, am stärksten in Zelllinie HR4 mit einem 1,48-fachen ($\pm 0,432$) Zuwachs. Bei den LR-Zelllinien zeigten LR2, LR3 und LR4 einen schwachen Anstieg, während bei LR1 im Vergleich zur Kontrolle eine relativ schwächere *ATG7*-Expression vorlagen. HR-Zelllinien zeigten einen signifikanten 1,31-fachen ($\pm 0,147$) Anstieg der Genexpression ($p < 0,05$), LR-Zelllinien einen 1,17-fachen ($\pm 0,137$) Anstieg ($p < 0,05$; Abbildung 3C). Nach SI-vermitteltem oxidativen Stress zeigte die relative *ATG5*-Genexpression behandelter Zellen im Vergleich zur Kontrolle einen schwachen Abfall (maximal auf 0,62 [$\pm 0,238$] bei HR1) innerhalb der HR-Zelllinien. Dieser Trend war auch innerhalb der LR-Zelllinien erkennbar, gleichzeitig war dieser weniger schwach ausgeprägt (0,77 [$\pm 0,206$] bei LR1). HR- und LR-Zelllinien zeigten beide eine schwache *ATG5*-Expressionsabnahme, wobei Signifikanz lediglich für die -NA+SI-Behandlung der HR-Gruppe ermittelt wurde (0,74 [$\pm 0,095$], $p < 0,05$). Unterschiede zwischen HR- und LR-Gruppen wurden nicht detektiert ($p > 0,05$; Abbildung 3B).

Das relative *ATG7*-Expressionsniveau zeigte (abgesehen von Zelllinie LR4) für alle Zelllinien eine schwache Abnahme der Genexpression nach oxidativem Stress (maximal 0,75 [$\pm 0,131$] für HR4). HR-Zelllinien zeigten im Vergleich zu LR-Zelllinien eine etwas stärkere, aber trotzdem sehr schwache Abnahme der *ATG7*-Expression, welche nur für -NA+SI-Behandlung der HR-Zelllinie signifikant niedrigere Werte zeigte (0,83 [$\pm 0,050$], $p < 0,05$; Abbildung 3D).

Insgesamt stieg die Expression der Autophagie-bezogenen Genmarker nach NA-Entzug an, während sie nach oxidativem Stress gleichzeitig nur geringfügig abnahm.

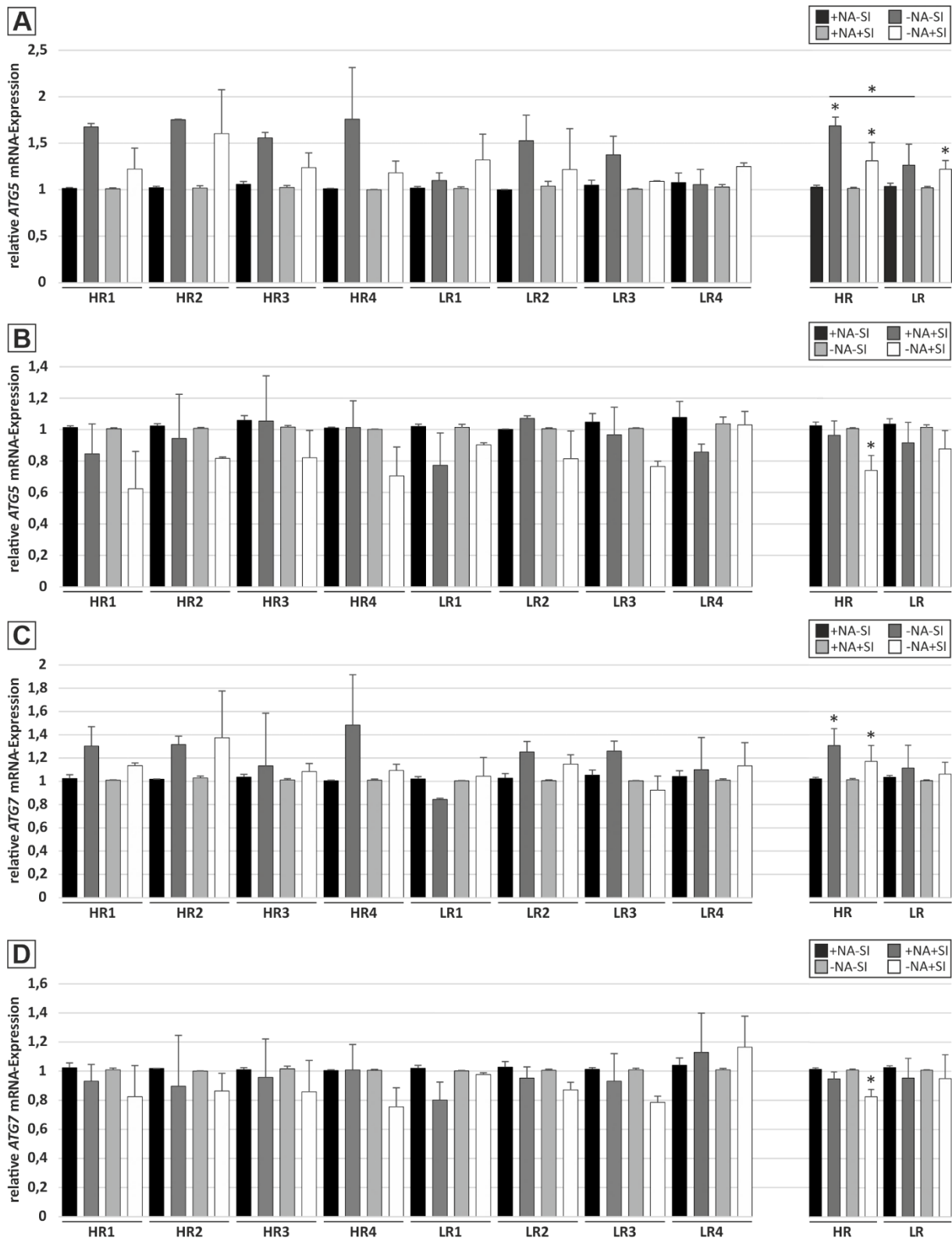


Abbildung 3: Relative mRNA-Expression der Autophagie-bezogenen Genmarker ATG5 und ATG7 bei acht Wochen alten iPSC-RPE-Zellen nach NA-Entzug und oxidativem SI-

Stress. Je vier HR- und LR-Zelllinien wurden nach einer Woche das NA aus dem Kulturmedium entzogen (-NA), der Kontrolle nicht (+NA). Zusätzlich wurden die Zelllinien in den letzten zwei Wochen mit 0,125 mM SI gestresst (+SI), die Kontrollen nicht (0 mM SI; -SI). Das Expressionsniveau wurde auf das Referenzgen *HPRT* normalisiert, anschließend wurde das Expressionsniveau von *ATG5* bzw. *ATG7* der Zelllinien unter NA-freier Behandlung gegen die Kontrolle kalibriert (A bzw. C). Das Expressionsniveau von *ATG5* bzw. *ATG7* SI-gestresster Zelllinien wurde ebenso gegen die Kontrolle kalibriert (B bzw. D). Jeweils links sind die Messwerte der einzelnen Zelllinien angegeben, rechts die Werte der HR- bzw. LR-Zelllinien im Mittel (n=4). Angegeben sind die Mittelwerte der Messungen mit Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Versuchen. Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt (*: $p < 0,05$; direkter Vergleich zwischen der Behandlung mit der jeweiligen Kontrolle; * mit Balken markieren signifikante Unterschiede zwischen den HR- und LR-Zelllinien bei derselben Kultivierung).

4.1.2 mRNA-Expressionsanalyse mitochondrialer Genmarker

Als mitochondriale Genmarker für die qRT-PCR dienten *BCL2*, *COX4I1*, *SOD2* und *PPARGC1A*. Dabei wurde untersucht, ob der NA-Entzug und der SI-vermittelte oxidative Stress zu Änderungen in der mRNA-Expression der iPSC-RPE-Zellen dieser vier Genmarker führte.

Die relative *COX4I1*-Expression stieg innerhalb aller Zelllinien nach dem NA-Entzug an und zeigte in Zelllinie LR4 mit einem 1,6-fachen ($\pm 0,278$) Anstieg den stärksten im Datensatz. Die daraus resultierenden HR- und LR-Zelllinien wiesen nach SI-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle ebenso wie die einzelnen Zelllinien statistisch signifikant stärkere *COX4I1*-Expressionen auf (-NA+SI bei HR: 1,18 [$\pm 0,083$]; -NA-SI bei LR: 1,46 [$\pm 0,113$]; -NA+SI bei LR: 1,29 [$\pm 0,188$]; jeweils $p < 0,05$; Abbildung 4A). Der NA-Entzug resultierte verglichen mit der Kontrolle in einem Anstieg der *SOD2*-Expression aller einzelnen Zelllinien und damit auch für den Mittelwert der HR- und LR-Zelllinien. Die stärkste Zunahme fand sich in Zelllinie HR1 (2,85-fach [$\pm 0,731$]). Obwohl auch für die LR-Zelllinien ein klarer Trend erkennbar war, konnte hier nur für die -NA-SI-Behandlung (1,95 [$\pm 0,632$]; $p < 0,05$) und die -NA+SI-Behandlung (1,53 [$\pm 0,213$]; $p < 0,05$) der HR-Zelllinien statistische Signifikanz gezeigt werden (Abbildung 4C).

Der Einfluss des durch SI-vermittelten oxidativen Stresses resultierte bei *COX4I1* und *SOD2* nur in schwachen, jedoch teilweise signifikanten Änderungen in der mRNA-Expression innerhalb der Zelllinien. Die -NA+SI-Behandlung der HR-Zelllinie führte zu

einer signifikanten Abnahme der *COX4I1*-Expression auf $0,87 [\pm 0,102]$ ($p < 0,05$). Die *COX4I1*-Expression der -NA+SI-Behandlung der LR-Zelllinie sank signifikant auf $0,91 (\pm 0,056)$ ($p < 0,05$). SI-vermittelter oxidativer Stress führte zu einer Abnahme der *SOD2*-Expression der -NA+SI-Behandlung auf $0,85 (\pm 0,137)$ ($p < 0,05$; Abbildung 4B,D).

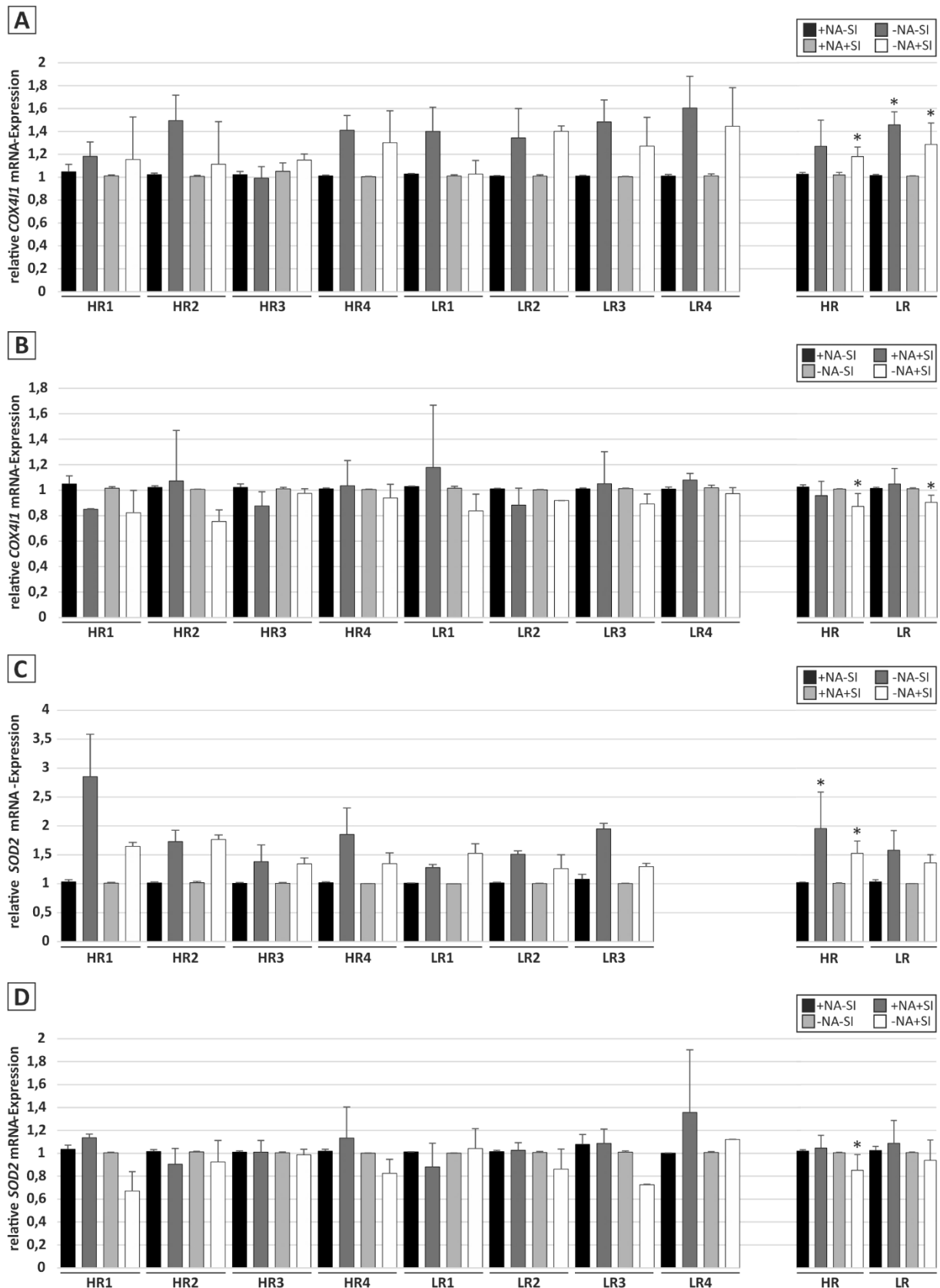


Abbildung 4: Relative mRNA-Expression der mitochondrialen Genmarker COX4I1 und SOD2 bei acht Wochen alten iPSC-RPE-Zellen nach NA-Entzug und oxidativem SI-Stress. Je vier HR- und LR-Zelllinien wurde nach einer Woche das NA aus dem Kulturmedium entzogen (-NA), der Kontrolle nicht (+NA). Zusätzlich wurden die Zelllinien in den letzten zwei

Wochen mit 0,125 mM SI gestresst (+SI), die Kontrollen nicht (0 mM SI; -SI). Das Expressionsniveau wurde auf das Referenzgen *HPRT* normalisiert, anschließend wurde das Expressionsniveau von *COX4I1* bzw. *SOD2* der Zelllinien unter NA-freier Behandlung gegen die Kontrolle kalibriert (A bzw. C). Das Expressionsniveau von *COX4I1* bzw. *SOD2* SI-gestresster Zelllinien wurde ebenso gegen die Kontrolle kalibriert (B bzw. D). Jeweils links sind die Messwerte der einzelnen Zelllinien angegeben, rechts die Werte für den Mittelwert der HR- bzw. LR-Zelllinien (n=4). Zelllinie LR4 fehlt in (C), da die Messungen ungültig waren. Angegeben sind die Mittelwerte der Messungen mit Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Versuchen. Statistische Signifikanz (*: $p < 0,05$; direkter Vergleich zwischen der Behandlung mit der jeweiligen Kontrolle) wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt.

Das relative mRNA-Expressionsniveau von *BCL2* stieg bei allen Zelllinien und damit auch für die HR- und LR-Zelllinien signifikant nach NA-Entzug an (-NA-SI bei HR: 1,64 [$\pm 0,373$]; -NA+SI bei HR: 1,53 [$\pm 0,178$]; -NA+SI bei LR: 1,34 [$\pm 0,175$]; jeweils $p < 0,05$). Entgegengesetzte Ergebnisse fanden sich in der *BCL2*-Expression nach SI-Stress verglichen mit den Kontrollen. Hier sank die *BCL2*-Expression innerhalb aller Zelllinien und führte damit für den Mittelwert der HR/LR-Zelllinien zu einer signifikanten Abnahme (+NA+SI bei HR: 0,75 [$\pm 0,051$]; -NA+SI bei HR: 0,74 [$\pm 0,155$]; +NA+SI bei LR: 0,70 [$\pm 0,189$]; jeweils $p < 0,05$; Abbildung 5A,B).

Als Folge des NA-Entzuges stieg die *PPARGC1A*-Expression der einzelnen Zelllinien mit einer ca. 1,5-fachen Zunahme schwach an. Lediglich die *PPARGC1A*-Expression der -NA-SI-Behandlung von Zelllinie HR1 stieg auf das ca. 2,82-fache ($\pm 1,950$) an. Der NA-Entzug resultierte für die HR-Zelllinien in einer signifikanten Zunahme der *PPARGC1A*-Expression (-NA-SI bei HR: 1,87 [$\pm 0,646$]; -NA+SI bei HR: 1,43 [$\pm 0,174$]; jeweils $p < 0,05$; Abbildung 5C).

Oxidativer SI-Stress in iPSC-RPE-Zellen resultierte ebenso in einer schwachen Zunahme der relativen mRNA-Expression von *PPARGC1A* innerhalb aller Zelllinien. Diese Zunahme erreichte den stärksten Wert im Datensatz bei der Zelllinie LR4 (ca. 2,32 [$\pm 1,698$]) und war für die HR- und LR-Zelllinie signifikant (+NA+SI bei HR: 1,41 [$\pm 0,246$]; -NA+SI bei HR: 1,13 [$\pm 0,051$]; -NA+SI bei LR: 1,48 [$\pm 0,584$]; jeweils $p < 0,05$), aber zeigte keine Unterschiede zwischen den HR- und LR-Risikoprofilen ($p > 0,05$; Abbildung 5D).

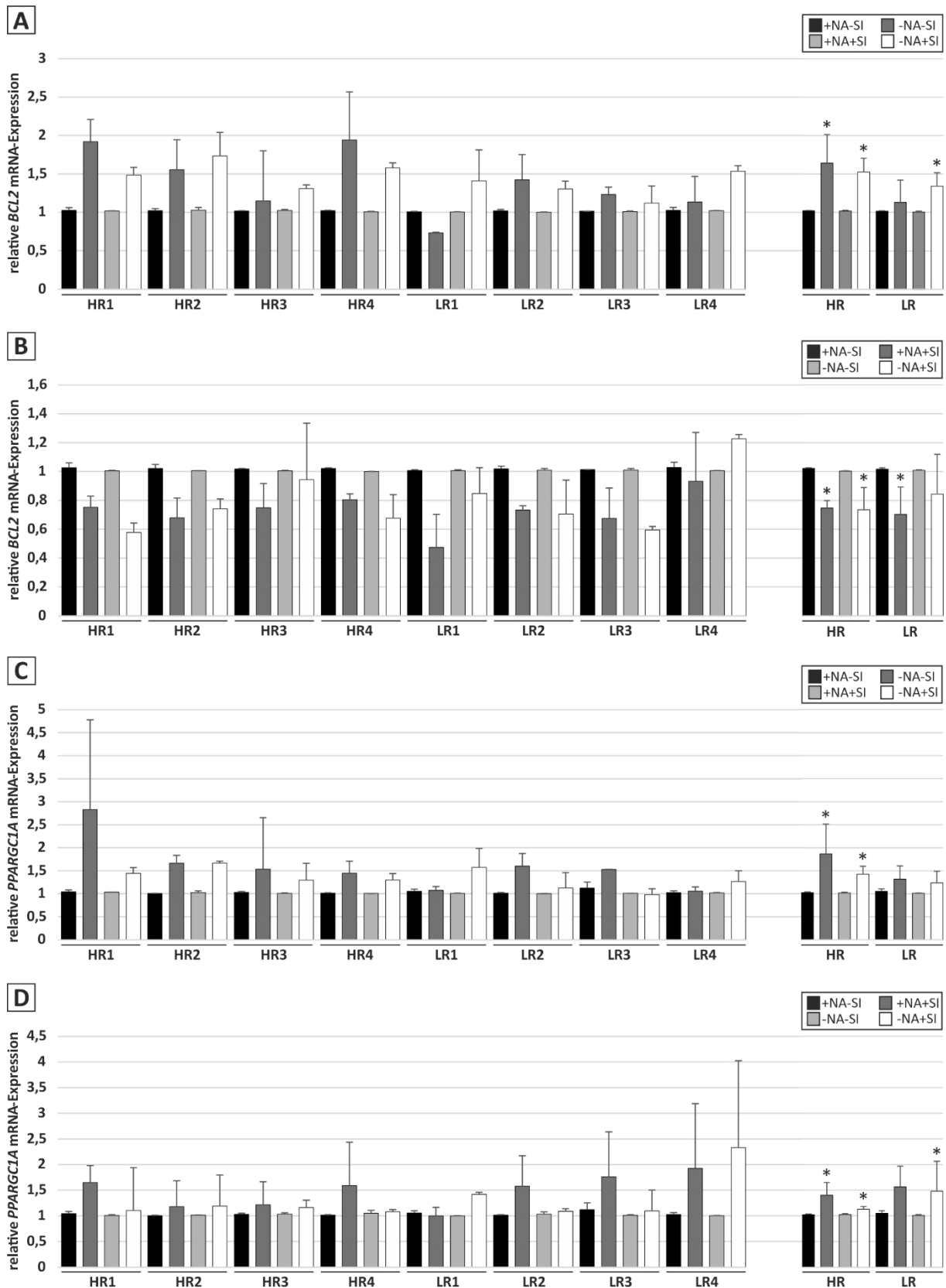


Abbildung 5: Relative mRNA-Expression der mitochondrialen Genmarker *BCL2* und *PPARGC1A* bei acht Wochen alten iPSC-RPE-Zellen nach NA-Entzug und oxidativem Stress. Je vier HR- und LR-Zelllinien wurde nach einer Woche das NA aus dem Kulturmedium entzogen (-NA), der Kontrolle nicht (+NA). Zusätzlich wurden die Zelllinien in den letzten zwei

Wochen mit 0,125 mM SI gestresst (+SI), die Kontrollen nicht (0 mM SI; -SI). Das Expressionsniveau wurde auf das Referenzgen HPRT normalisiert, anschließend wurde das Expressionsniveau von *BCL2* bzw. *PPARGC1A* der Zelllinien unter NA-freier Behandlung gegen die Kontrolle kalibriert (A bzw. C). Das Expressionsniveau von *BCL2* bzw. *PPARGC1A* SI-gestresster Zelllinien wurde ebenso gegen die Kontrolle kalibriert (B bzw. D). Jeweils links sind die Messwerte der einzelnen Zelllinien angegeben, rechts die Werte für den Mittelwert der HR- bzw. LR-Zelllinien (n=4). Angegeben sind die Mittelwerte der Messungen mit Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Versuchen. Statistische Signifikanz (*: $p < 0,05$; direkter Vergleich zwischen der Behandlung mit der jeweiligen Kontrolle) wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt.

4.1.3 mRNA-Expressionsanalyse von Genmarkern des Immun- und Komplementsystems

Um den Einfluss des NA-Entzuges und des SI-vermittelten oxidativen Stresses auf das Immun- und Komplementsystem der iPSC-RPE-Zellen zu testen, wurde eine qRT-PCR der Genmarker *CFI* und *CCL2* durchgeführt.

Der NA-Entzug führte innerhalb aller HR- und LR-Zelllinien zu statistisch signifikant höheren relativen *CFI*-Expressionen im Vergleich zur Kontrolle. Hierbei zeigte Zelllinie HR3 mit einer 43-fachen ($\pm 8,794$) Expressionserhöhung die maximalen Werte im Datensatz. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Risikogruppen wurden nicht ermittelt ($p > 0,05$; Abbildung 6A).

Der NA-Entzug resultierte ebenfalls in einem Anstieg der relativen *CCL2*-Expression aller behandelten Zelllinien im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. HR- und LR-Zelllinien zeigten daraus resultierend ebenso eine starke Zunahme der *CCL2*-Expression nach NA-Entzug. Diese Unterschiede zeigten allesamt statistische Signifikanz (-NA-SI bei HR: 29,95 [$\pm 12,873$]; -NA+SI bei HR: 17,59 [$\pm 7,872$]; -NA-SI bei LR: 27,31 [$\pm 7,135$]; -NA+SI bei LR: 21,17 [$\pm 4,935$]; jeweils $p < 0,05$). Der Unterschied zwischen der HR- und LR-Zelllinien war nicht signifikant ($p > 0,05$; Abbildung 6C).

Die relative *CFI*-Expression zeigte (mit Ausnahme von Zelllinie HR4) innerhalb aller Zelllinien einen Anstieg nach SI-induziertem Stress im Vergleich zur Kontrolle jeweils für die +NA+SI-Behandlung. Hierbei war die 1,83-fache ($\pm 0,471$) *CFI*-Expressionszunahme in Zelllinie HR3 die stärkste im Datensatz. Daraus resultierte für die HR- und LR-Zelllinie eine *CFI*-Zunahme der +NA+SI-Behandlung nach oxidativem

Stress, welche nur in den LR-Zelllinien Signifikanz zeigte ($1,33 \pm 0,243$; $p < 0,05$). Die *CFI*-Expressionen der übrigen Konditionen blieben unverändert (Abbildung 6B). SI-vermittelter oxidativer Stress resultierte in keinem eindeutig erkennbaren Trend der Änderungen der relativen *CCL2*-Expression innerhalb der Zelllinien. Oxidativer Stress resultierte für die HR-Zelllinie in weitestgehend unveränderten *CCL2*-Expressionen, aber in schwachen Abnahmen der *CCL2*-Expression in den LR-Zelllinien mit Signifikanz für die +NA+SI-Behandlung ($0,82 \pm 0,217$; $p < 0,05$; Abbildung 6D).

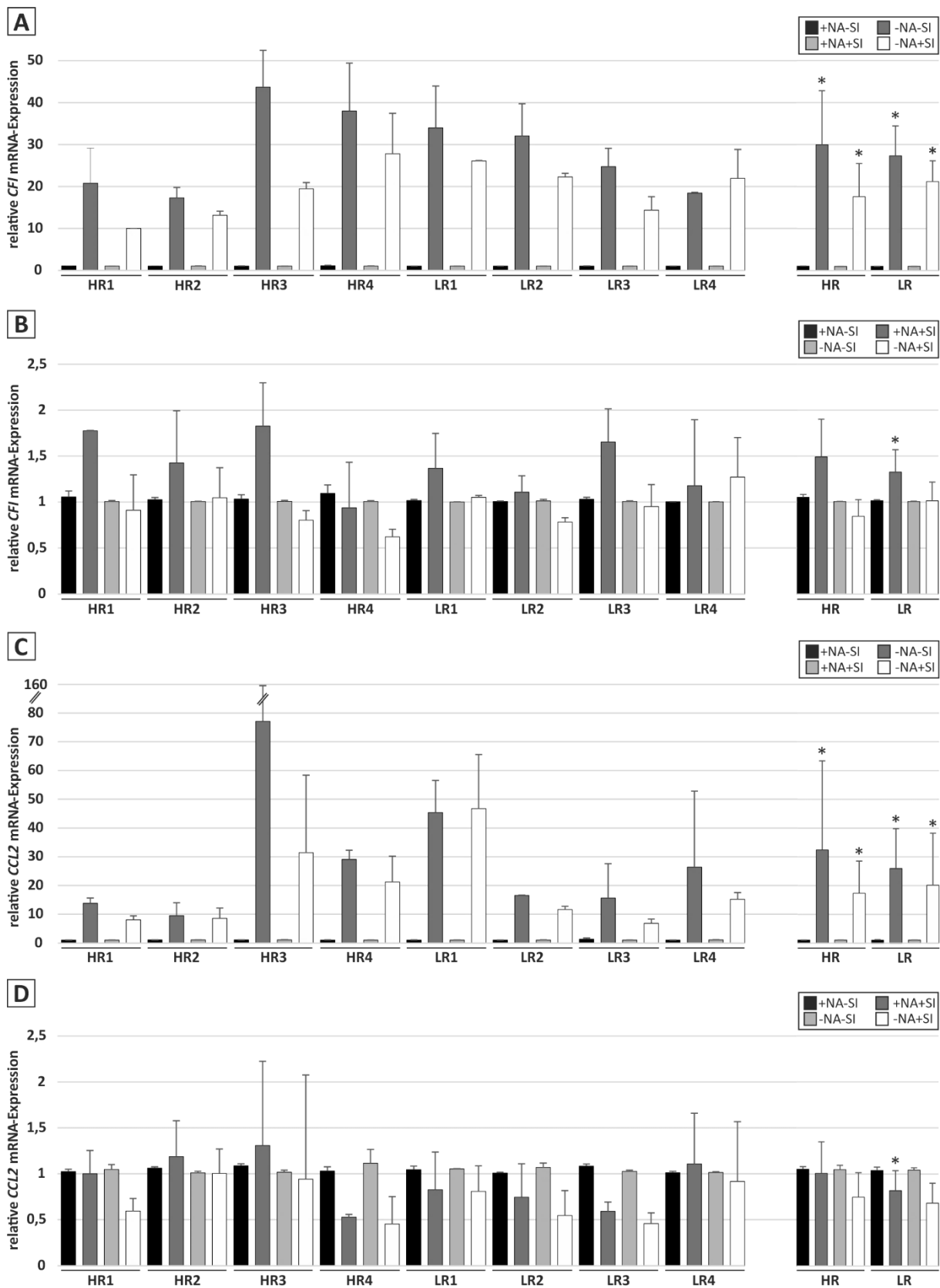


Abbildung 6: Relative mRNA-Expression von Genmarkern des Immunsystems (*CCL2*) und des Komplementsystems (*CFI*) in acht Wochen alten iPSC-RPE-Zellen nach NA-Entzug und oxidativem SI-Stress. Je vier HR- und LR-Zelllinien wurde nach einer Woche

das NA aus dem Kulturmedium entzogen (-NA), der Kontrolle nicht (+NA). Zusätzlich wurden die Zelllinien in den letzten zwei Wochen mit 0,125 mM SI gestresst (+SI), die Kontrollen nicht (0 mM SI; -SI). Das Expressionsniveau wurde auf das Referenzgen *HPRT* normalisiert, anschließend wurde das Expressionsniveau von *CFI* bzw. *CCL2* der Zelllinien unter NA-freier Behandlung gegen die Kontrolle kalibriert (A bzw. C). Das Expressionsniveau von *CCL2* bzw. *CFI* SI-gestresster Zelllinien wurde ebenso gegen die Kontrolle kalibriert (B bzw. D). Jeweils links sind die Messwerte der einzelnen Zelllinien angegeben, rechts die Werte für den Mittelwert der HR- bzw. LR-Zelllinien (n=4). Angegeben sind die Mittelwerte der Messungen mit Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Versuchen. Statistische Signifikanz (*: $p < 0,05$; direkter Vergleich zwischen der Behandlung mit der jeweiligen Kontrolle) wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt.

4.1.4 Analyse der Zytokin-Sekretion ins konditionierte Medium nach NA-Entzug

Da die AMD-Pathogenese mit Störungen in der Zellpolarität und Änderungen der directionalen Proteinsekretion in ursächlichem Zusammenhang stehen könnte, wurde mit dem Kit Human Cytokine Antibody Array C5 von RayBiotech der Effekt des NA-Entzuges auf die Proteinsekretion ermittelt. Zunächst wurden in einer vorherigen Arbeit verschiedene Komplementfaktoren durch eine Multiplex-ELISA im apikalen und basalen Kompartiment gemessen. Hier zeigte sich eine generell stärkere Proteinsekretion der Komplementfaktoren als auch ein größerer stressvermittelter Unterschied in der Sekretion im apikalen Kompartiment (Daten nicht dargestellt). Deshalb wurde die experimentelle Ermittlung der Sekretion durch Zytokin-Arrays auf das apikale Kompartiment beschränkt. Dieser weniger selektive Ansatz der Proteindetektion zielte auf eine Identifizierung bislang unbekannter Proteine ab, die eine Rolle in der AMD-Pathogenese spielen könnten. Die Zytokin-Arrays zur Ermittlung des Effekts des NA-Entzuges wurden in zwei biologischen Pseudoreplikaten (doppelter Probengewinn desselben biologischen Spenders) durchgeführt. Da die Antikörper-markierten Zytokin-Array-Membranen unter den Replikaten identisch aussahen, werden in Abbildung 7 aus Gründen der besseren Übersicht lediglich die Membranen des ersten Replikats dargestellt.

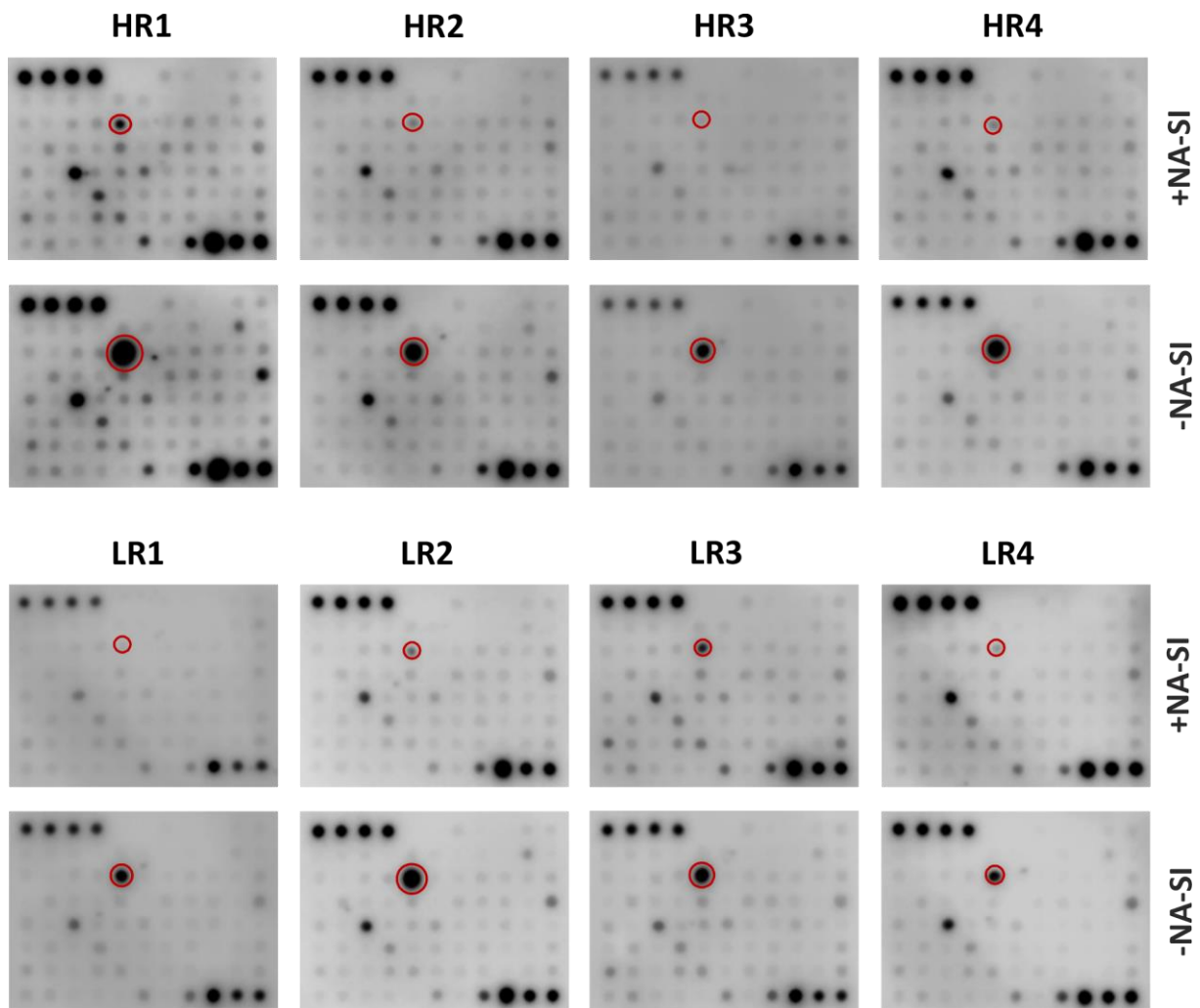


Abbildung 7: Zytokin-Array von acht Wochen alten iPSC-RPE-Zellen nach NA-Entzug. Je vier HR- und LR-Zelllinien wurde nach einwöchiger Kultivierung das NA aus dem Kulturmedium entzogen (-NA-SI), der Kontrolle hingegen nicht (+NA-SI). Medien aus dem apikalen Kompartiment wurden gewonnen und mittels Zytokin-Arrays untersucht. Die roten Kreise (CCL2) zeigen Signalunterschiede zwischen den Behandlungen an.

Das apikale Medium zeigte nach densitometrischer Auswertung für alle Zelllinien eine starke Zunahme der CCL2-Sekretion nach NA-Entzug, verglichen mit der jeweiligen Kontrolle. Der Anstieg der CCL2-Sekretion war für die HR- und LR-Zelllinie signifikant (HR: 24,80 [$\pm$ 4,209]; LR: 15,10 [$\pm$ 9,319]; jeweils $p < 0,05$), aber unterschied sich zwischen den beiden Risikoprofilen HR und LR nicht ($p > 0,05$). Der Mittelwert aller acht Zelllinien zeigte im Vergleich zur +NA-Kontrolle eine signifikante Zunahme der CCL2-Sekretion durch den NA-Entzug (19,55 [$\pm$ 8,469]; $p < 0,05$; Abbildung 8).

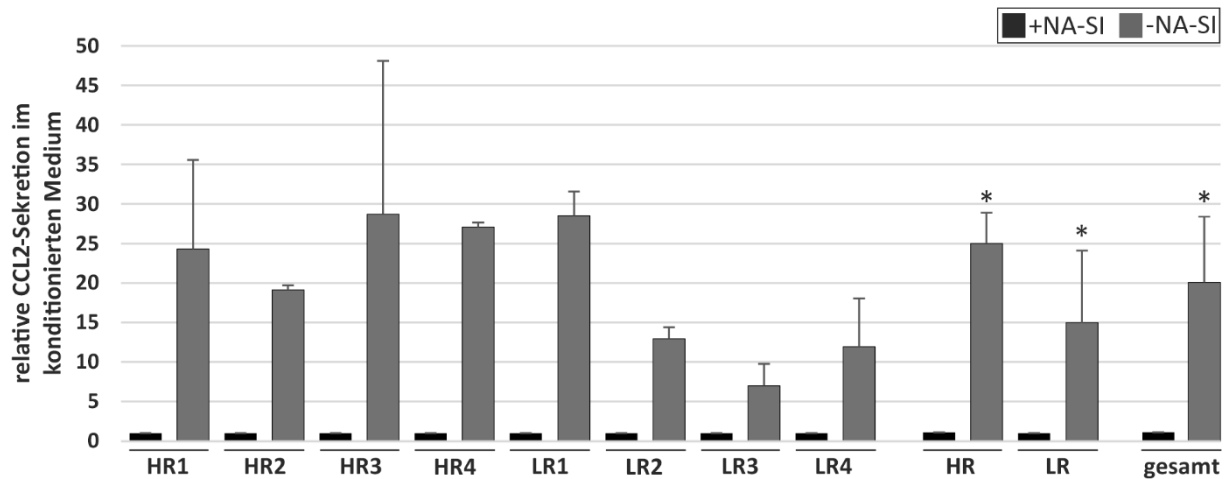


Abbildung 8: Relative CCL2-Proteinsekretion im apikalen Kompartiment von acht Wochen alten iPSC-RPE-Zellen nach NA-Entzug. Je vier HR- und LR-Zelllinien wurde das NA nach einer Woche Kultivierung aus dem Kulturmedium entnommen (-NA), der Kontrolle hingegen nicht (+NA). Dargestellt ist die densitometrische Auswertung der relativen Proteinsekretion von CCL2, welche jeweils auf die Kontrolle normalisiert wurde. Angegeben sind links die Messwerte aller acht Zelllinien, mittig den Mittelwert der HR- und LR-Zelllinie (n=4), sowie rechts der Mittelwert der gesamten acht Zelllinien unabhängig vom Risikograd für die AMD (n=8). Angegeben sind die Mittelwerte der Messungen mit Standardabweichung aus zwei unabhängigen Versuchen. Statistische Signifikanz (*: $p < 0,05$; direkter Vergleich zwischen der Behandlung mit der jeweiligen Kontrolle) wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt.

4.1.5 Analyse der Zytokin-Sekretion ins konditionierte Medium nach SI-Stress

Zytokin-Arrays zur Messung der Proteinsekretion ins apikale Medium wurden zusätzlich nach SI-vermitteltem oxidativen Stress (0,125 mM SI; +SI) durchgeführt, jeweils in Kulturbedingungen mit und ohne NA. Die Kontrollen wurden nicht SI-gestresst (0 mM SI; -SI). Die Zytokin-Arrays wurden an Proben zweier biologischer Pseudoreplikate durchgeführt. Die dabei gewonnenen Ergebnisse werden wegen Abweichungen im direkten Vergleich zwischen den Pseudoreplikaten einzeln dargestellt. Abbildung 9 zeigt die Membranen des Zytokin-Arrays des ersten biologischen Pseudoreplikats.

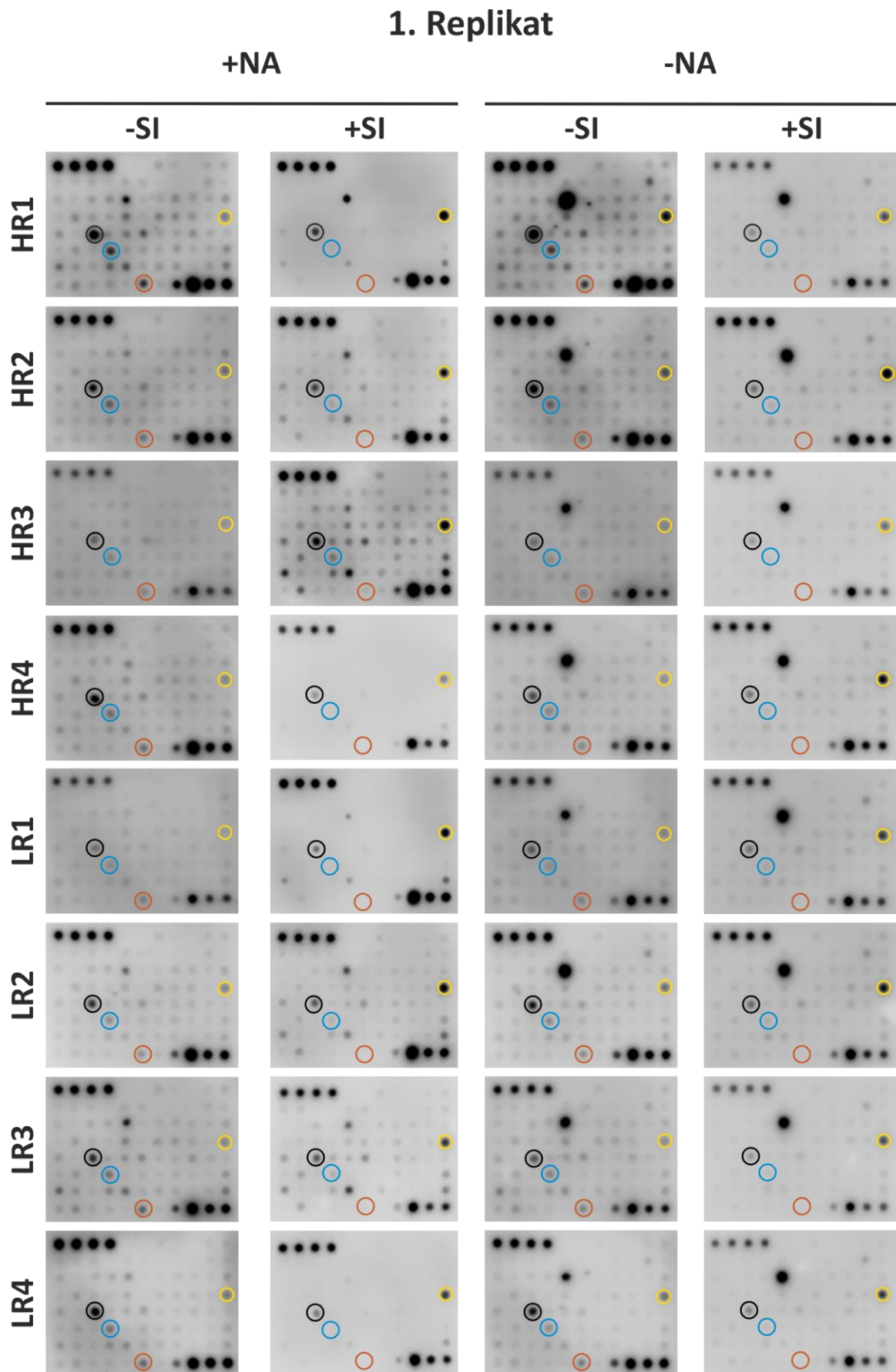


Abbildung 9: Zytokin-Arrays von acht Wochen alten iPSC-RPE-Zellen nach SI-vermitteltem Stress, jeweils in Kulturmedium mit und ohne NA (1. Replikat). Je vier HR-

und LR-Zelllinien wurden in den letzten beiden Wochen der Kultur mit 0,125 mM SI gestresst (+SI), jeweils in Medium mit und ohne NA. Die Kontrollen wurden nicht SI-gestresst (0 mM SI; -SI). Medium aus den apikalen Kompartiments wurden gewonnen und mittels Zytokin-Arrays untersucht. Die Kreise zeigen Signalunterschiede zwischen den Behandlungen. Schwarz: VEGF. Blau: FGF9. Orange: TGF β 2. Gelb: ANG.

Die densitometrische Auswertung der Proteinsignale in der Durchführung des ersten Replikats zeigte für alle Zelllinien nach oxidativem Stress eine relative Abnahme der Proteinsekretion des vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor 9 (FGF9) und transforming growth factor β 2 (TGF β 2) im apikalen Kompartiment verglichen mit der jeweiligen Kontrolle. Die Sekretion von Angiogenin (ANG) nahm im Gegensatz dazu in allen Zelllinien stark zu. Die HR- und LR-Zelllinien im Mittel zeigten vergleichbare Ergebnisse. Die Änderung der Proteinsekretion war für iPSC-RPE-Zellen, die in NA⁺ und NA⁻ Medium kultiviert wurden, identisch (Abbildung 10).

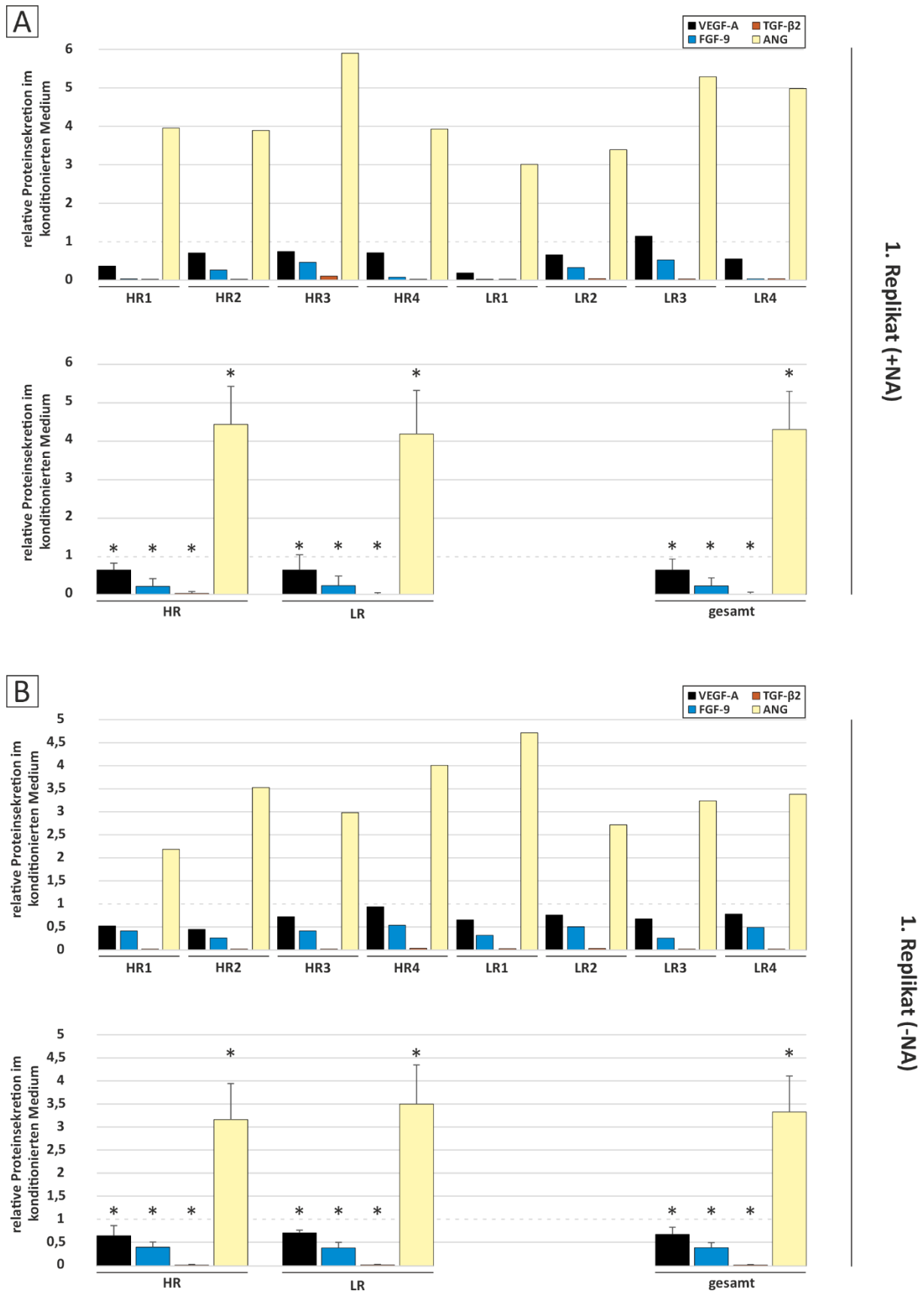


Abbildung 10: Relative Proteinsekretion ins apikale Mediumskompartiment acht Wochen alter iPSC-RPE-Zellen nach SI-vermittelten oxidativen Stress, jeweils in Kulturmedium mit und ohne NA (1. Replikat). Je vier HR- und LR-Zelllinien wurden in den

letzten beiden Wochen mit 0,125 mM SI (+SI) gestresst, jeweils in Kulturmedium (A) mit und (B) ohne NA. Als Kontrolle diente die SI-freie Behandlung (0 mM SI; -SI). Dargestellt ist die densitometrische Auswertung der relativen Proteinsekretion von VEGF, FGF9, TGF β 2 und ANG, welche jeweils auf die Kontrolle normalisiert wurden. Angegeben sind die Messwerte der Einzelmessungen der acht Zelllinien, sowie die Mittelwerte mit Standardabweichung der daraus ermittelten HR/LR-Zelllinien (n=4) bzw. der gesamten Zelllinien unabhängig vom Risikograd (n=8). Statistische Signifikanz (*: $p < 0,05$) wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt.

Um die Ergebnisse des ersten Durchlaufs zu verifizieren, wurde die RPE-Zellen des zweiten biologischen Pseudoreplikats ebenfalls oxidativ mit SI gestresst und die Zytokin-Sekretion ins apikale Medium untersucht, sowohl in Kulturmedium mit und ohne NA-Zusatz. Die Membranen des Zytokin-Arrays werden in Abbildung 11 abgebildet.

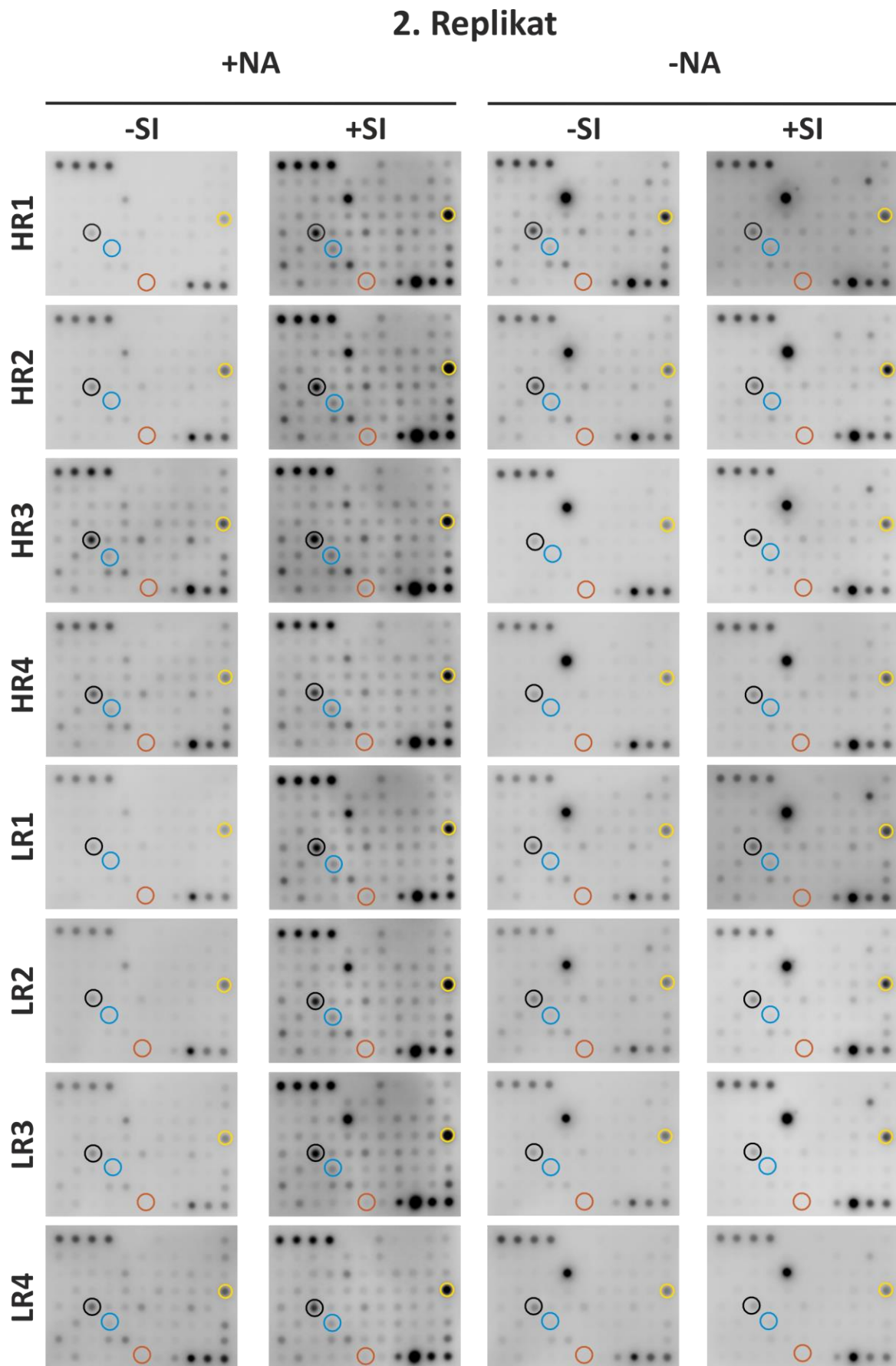


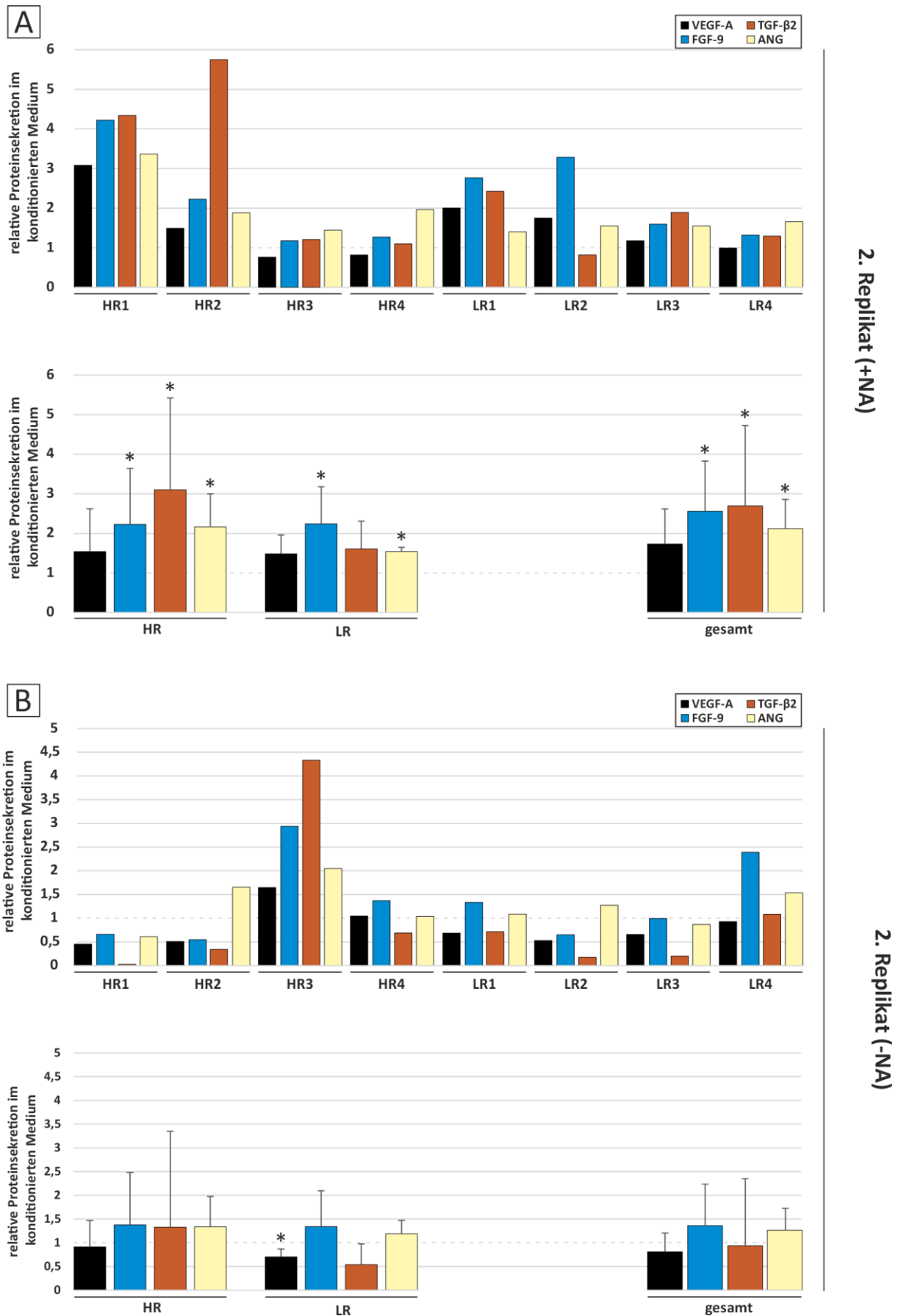
Abbildung 11: Zytokin-Arrays von acht Wochen alten iPSC-RPE-Zellen nach SI-vermitteltem Stress, jeweils in Kulturmedium mit und ohne NA (2. Replikat). Je vier HR-

und LR-Zelllinien wurden in den letzten zwei Wochen mit 0,125 mM SI gestresst (+SI), jeweils in Kulturmedium mit und ohne NA. Die Kontrollen wurden nicht SI-gestresst (0 mM SI; -SI). Medienproben aus dem apikalen Kompartiment wurden gewonnen und mittels Zytokin-Arrays untersucht. Die gefärbten Kreise zeigen Signalunterschiede zwischen den Behandlungen an, welche in diesem Durchlauf zur Verifizierung des ersten Durchlaufes bestätigt werden sollten. Schwarz: VEGF. Blau: FGF9. Orange: TGF β 2. Gelb: ANG.

Im Vergleich zur Auswertung des ersten biologischen Replikates, ergab die densitometrische Auswertung der Zytokin-Arrays von Proben aus dem apikalen Kompartiment des zweiten biologischen Pseudoreplikats nach SI-Stress ein weniger einheitliches Bild. Im Ansatz mit NA im Medium zeigten sich Schwankungen der relativen Proteinsekretion von VEGF zwischen den einzelnen Zelllinien, insgesamt jedoch signifikante Zunahme der Sekretion von FGF9, TGF β 2 und ANG (FGF9: 2,32 [$\pm$ 1,111]; TGF β 2: 2,35 [$\pm$ 1,775]; ANG: 2,03 [$\pm$ 0,643]; jeweils $p < 0,05$; Abbildung 12). Die Sekretion von ANG zeigt eine weitestgehend gleiche Zunahme in den einzelnen Zelllinien. Auffällig ist in diesem Ansatz die Zelllinie HR1, in dem die Sekretion aller Proteine sehr stark gestiegen ist.

Im Versuchsansatz bei NA-Entzug des zweiten Replikats führte die SI-Zugabe für VEGF, FGF9, TGF β 2 und ANG zwischen den Zelllinien jeweils zu Zunahmen und Abnahmen der Proteinsekretion. Hierbei fallen teilweise enorme Unterschiede in der Sekretion auf, wie beispielsweise die TGF β 2-Sekretion im Vergleich zwischen den Zelllinien HR1 und HR3 (Abbildung 12). Die Proteinsekretion unter NA-freier Behandlung im zweiten Replikat zeigte (mit Ausnahme der VEGF-Sekretion in den LR-Zelllinien) keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$; Abbildung 12).

Im Vergleich der einzelnen Proteinsekretionen zwischen dem ersten und zweiten Replikat ergaben sich teilweise starke Unterschiede, ebenso wie für den Effekt des NA-Entzuges innerhalb eines Replikats auf die Sekretion. So wurde die Proteinsekretion im ersten Replikat nicht vom NA im Kulturmedium beeinflusst (Abbildung 10). Im Gegensatz dazu unterschieden sich die Proteinsekretionen innerhalb des zweiten Replikats bereits allein durch den Einfluss eines NA-Zusatzes. Im Ansatz mit NA im Medium nahm die Sekretion von FGF9, TGF β 2 und ANG nach SI-Stress signifikant zu (s. o.), während die Sekretion im Ansatz unter NA-Entzug dieser Proteine nur geringfügig anstieg bzw. unverändert blieb (Abbildung 12). Insgesamt konnten die Ergebnisse der Zytokin-Arrays nicht repliziert werden.



Kulturmedium mit und ohne NA (2. Replikat). Je vier HR- und LR-Zelllinien wurden in den letzten beiden Wochen mit 0,125 mM SI (+SI) gestresst, jeweils in Kulturmedium (A) mit und (B) ohne NA. Als Kontrolle diente die SI-freie Behandlung (0 mM SI; -SI). Dargestellt ist die densitometrische Auswertung der relativen Proteinsekretion von VEGF, FGF9, TGF β 2 und ANG, welche jeweils auf die Kontrolle normalisiert wurden. Angegeben sind die Messwerte der Einzelmessungen der acht Zelllinien, sowie die Mittelwerte mit Standardabweichung der daraus ermittelten HR/LR-Zelllinien (n=4) bzw. der gesamten Zelllinien unabhängig vom Risikograd (n=8). Statistische Signifikanz (*: $p < 0,05$) wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt.

4.1.6 mRNA-Expressionsanalyse von VEGF, FGF9, TGF β 2 und ANG

Bei der Durchführung der Zytokin-Arrays wurden vier Proteine identifiziert, die bei der Untersuchung des ersten Replikats markante Unterschiede in der Sekretion nach SI-vermitteltem Stress zeigten.

Nachfolgend wurde die mRNA-Expression von VEGF, FGF9, TGF β 2 und ANG nach SI-Stress bestimmt. Erneut, je einmal im Kulturmedium mit und ohne NA-Zusatz. Aus Gründen der besseren Übersicht ist lediglich das mRNA-Expressionsniveau der HR/LR-Vergleiche und der gesamten Zelllinien dargestellt, der Vergleich der einzelnen acht Zelllinien befindet sich im Anhang (Abbildung 28).

Eine ANG-Expression konnte weder im ersten noch im zweiten Replikat detektiert werden. Dies könnte auf eine fehlende Spezifität des kommerziell erworbenen Primer-Kits mit einem speziell für diese Arbeit designten ANG-Primer zurückzuführen sein.

Die relative mRNA-Expression von VEGF stieg nach SI-vermitteltem Stress in HR-Zelllinien an, zeigte jedoch in LR-Zelllinien sowohl Zunahmen als auch Abnahmen. Für die -NA+SI-Kultivierung wurde in HR-Zelllinien eine statistisch stärkere VEGF-Expression im Vergleich zu LR-Zelllinien ermittelt ($p < 0,05$). Insgesamt führte oxidativer Stress im Mittel aller Zelllinien nur im Versuchsansatz mit NA-Zusatz zu einer höheren VEGF-Expression. Oxidativer Stress führte zu keiner Änderung der VEGF-Expression bei gleichzeitigem NA-Entzug. Die FGF9- und die TGF β 2-Expression nahm nach oxidativem Stress durch die SI-Zugabe sowohl in NA-zugesetztem als auch NA-freiem Kulturmedium ab, obwohl dabei nur für TGF β 2 Signifikanz gezeigt werden konnte (+NA+SI bei HR: 0,89 [$\pm$ 0,139]; -NA+SI bei HR: 0,83 [$\pm$ 0,094]; -NA+SI bei LR: 0,72 [$\pm$ 0,059]; jeweils $p < 0,05$). Gleichzeitig konnten keine Unterschiede zwischen den HR- und den LR-Zelllinien ermittelt werden ($p > 0,05$; Abbildung 13).

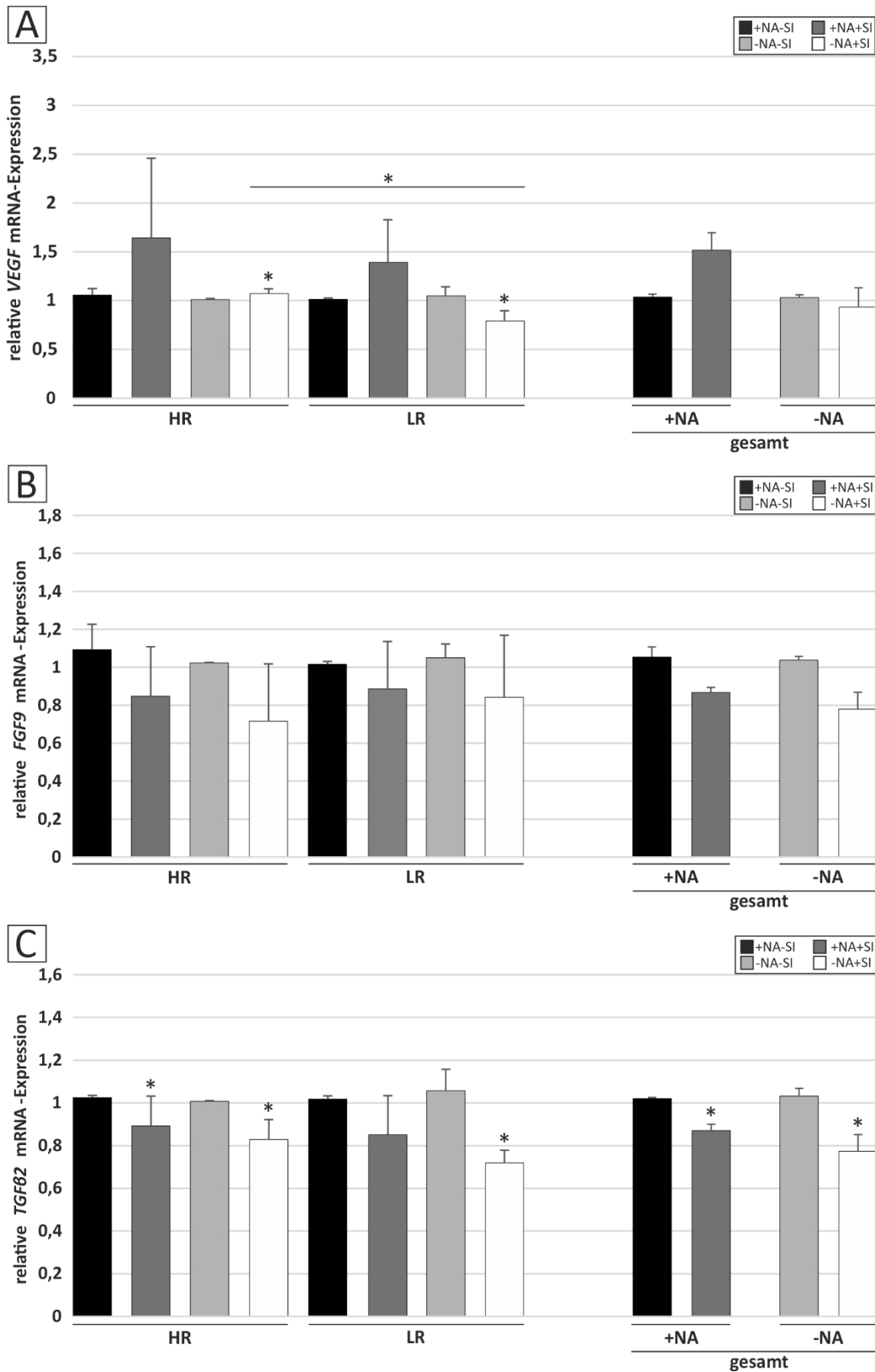


Abbildung 13: Relative mRNA-Expression von VEGF (A), FGF9 (B) und TGFβ2 (C) in acht Wochen alten iPSC-RPE-Zellen nach SI-vermitteltem Stress in NA-zugesetztem und

NA-freiem Kulturmedium. Je vier HR- und LR-Zelllinien wurden in den letzten zwei Wochen mit 0,125 mM SI gestresst (+SI), jeweils in Kulturmedium mit und ohne NA. Die Kontrollen wurde nicht gestresst (0 mM SI; -SI). Das Expressionsniveau wurde auf das Referenzgen *HPRT* normalisiert, anschließend wurde das Expressionsniveau von *VEGF/FGF9/TGFβ2* gegen die Kontrolle kalibriert. Jeweils links ist der Mittelwert der HR/LR-Zelllinien angegeben (n=4), rechts der Mittelwert der gesamten Zelllinien unabhängig vom Risikograd (n=4), unterteilt in einen NA-zugesetzten und NA-freien Ansatz. Angegeben sind die Mittelwerte der Messungen mit Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Versuchen. Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt (*: $p < 0,05$; direkter Vergleich zwischen der Behandlung mit der jeweiligen Kontrolle; * mit Balken markieren signifikante Unterschiede zwischen den HR- und LR-Zelllinien bei derselben Kultivierung).

4.1.7 VEGF-Proteinsekretion im konditionierten Medium

Da das Protein VEGF eine wichtige Rolle in der Neovaskularisation und damit in der NV der AMD spielt, sollte untersucht werden, ob sich die VEGF-Sekretion ins basale Medium der vier HR- und LR-RPE-Zelllinien nach NA-Entzug, SI-vermitteltem oxidativen Stress und der Kombination beider Behandlungen unterschied. Obwohl VEGF sowohl auf der apikalen als auch basalen Zellseite nachgewiesen werden kann, ist bekannt, dass es in primären porcinen RPE-Zellen signifikant stärker basal sezerniert wird, weshalb sich auf dieses Kompartiment beschränkt wurde (Klettner et al. 2015). Dieser Ansatz diente der Ermittlung von Auswirkungen des oxidativen Stresses und veränderter Kulturbedingungen auf die VEGF-Sekretion in iPSC-RPE-Zellen mit einem hohen bzw. geringen AMD-Risikograd.

Die VEGF-Sekretion ins basale Medium nahm innerhalb aller Zelllinien (bis auf LR4) für die NA-freie Behandlung zu. Für die HR-Zelllinie stieg die VEGF-Expression von 2,18 ($\pm 0,99$) ng/ml auf 3,71 ($\pm 0,94$) ng/ml, für die LR-Zelllinie von 2,52 ($\pm 0,91$) ng/ml auf 3,10 ($\pm 0,25$) ng/ml, sodass der Mittelwert aller Zelllinien von 2,35 ($\pm 0,90$) ng/ml auf 3,40 ($\pm 0,71$) ng/ml signifikant stieg ($p < 0,05$; Abbildung 14A).

Die Induktion des oxidativen Stresses durch SI im Kulturmedium mit NA-Zusatz führte ebenfalls zu einem Anstieg der VEGF-Sekretion innerhalb aller Zelllinien verglichen mit den jeweiligen Kontrollen. Für die HR-Zelllinien ergab sich eine Zunahme der VEGF-Sekretion ins basale Kompartiment von 2,18 ($\pm 0,98$) ng/ml auf 3,46 ($\pm 0,38$) ng/ml und für die LR-Zelllinien von 2,52 ($\pm 0,91$) ng/ml auf 3,71 ($\pm 0,53$) ng/ml. Der Mittelwert aller Zelllinien stieg signifikant von 2,35 ($\pm 0,89$) ng/ml auf 3,58 ($\pm 0,73$) ng/ml ($p < 0,05$; Abbildung 14B).

Die VEGF-Sekretion nach SI-Zugabe im NA-freien Medium nahm innerhalb aller Zelllinien schwach zu. Daraus resultierte für die HR-Zelllinie ein Anstieg von 3,71 ($\pm$ 0,93) ng/ml auf 4,49 ($\pm$ 0,87) ng/ml, für die LR-Zelllinie von 3,10 ($\pm$ 0,25) ng/ml auf 3,53 ($\pm$ 0,47) ng/ml, sowie für den Durchschnitt aller Zelllinien von 3,40 ($\pm$ 0,71) ng/ml auf 4,01 ($\pm$ 0,83) ng/ml (Abbildung 14C).

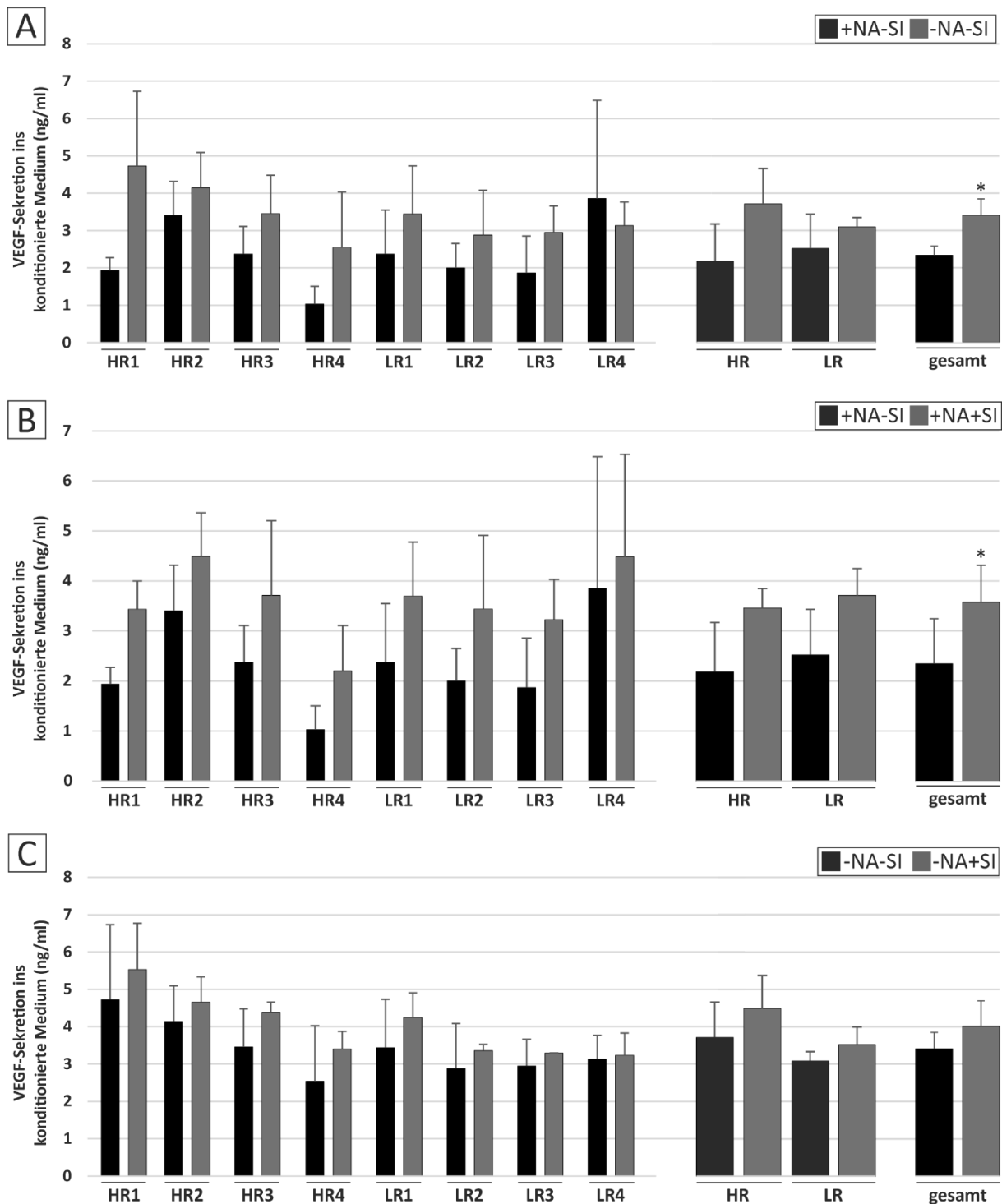


Abbildung 14: VEGF-Sekretion ins basale Mediums von acht Wochen alten iPSC-RPE-Zellen nach NA-Entzug und oxidativem SI-Stress. Je vier HR- und LR-Zelllinien wurde nach einer Woche das NA aus dem Medium entfernt (-NA), der Kontrolle nicht (+NA). Zusätzlich wurden die Zelllinien in den letzten zwei Wochen mit 0,125 mM SI gestresst (+SI), die Kontrollen nicht (0 mM SI; -SI). Links dargestellt ist die VEGF-Sekretion ins basale Kompartiment (ng/ml) der einzelnen Zelllinien, mittig der Mittelwert der HR- und LR-Zelllinien (n=4) und rechts der Mittelwert aller Zelllinien unabhängig vom AMD-Risikograd (n=8). (A)

zeigt die Auswirkung des NA-Entzuges (grau), als Kontrolle dient die NA-Behandlung (schwarz). (B) zeigt die Auswirkung der SI-Zugabe bei NA-Zusatz ins Kulturmedium (grau), die Kontrolle wurde nicht mit SI gestresst (schwarz). (C) zeigt die Applikation von SI-Stress in NA-freiem Kulturmedium (grau), als Kontrolle dient die SI-freie Behandlung (schwarz). Die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Versuchen sind angegeben. Statistische Signifikanz (*: $p < 0,05$; direkter Vergleich zwischen der Behandlung mit der jeweiligen Kontrolle) wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt.

Die Ergebnisse der mRNA-Expressionsanalyse, der ELISA von Medienproben des basalen Kompartimentes, und der Zytokin-Arrays von Medienproben des apikalen Kompartimentes wurden in Abbildung 15 zusammengefasst. Die farbkodierte Zuordnung erlaubt einen Überblick über Zu- bzw. Abnahmen der jeweiligen Expression/Sekretion für den Mittelwert aller Zelllinien.

Auffällig ist, dass die Ergebnisse zu den Versuchen des ersten Replikats in sich kongruent waren und vergleichbare Ergebnisse für die Ansätze mit und ohne NA-Zusatz zeigten. Eine Ausnahme war die *VEGF*-Expression in der qRT-PCR, die bei NA-Entzug Änderungen zeigte. Innerhalb des zweiten Replikats konnte die Änderung der *VEGF*-Expression nach NA-Entzug nicht repliziert werden, sowie jegliche Ergebnisse der Proteinsekretion in der Durchführung von Zytokin-Arrays. Innerhalb derselben Kultivierungsbedingung (+NA bzw. -NA) ermittelten wir dieselben Ergebnisse in der Proteindetektion mittels ELISA, teilweise übereinstimmende Ergebnisse in den qRT-PCR, jedoch abweichende Ergebnisse der Zytokin-Arrays im Vergleich beider biologischer Pseudoreplikate.

	1. Replikat			2. Replikat			
	Zytokin-Array	ELISA	qRT-PCR	Zytokin-Array	ELISA	qRT-PCR	
VEGF							+NA
TGFβ2		X			X		
FGF9		X			X		
ANG		X	XX		X	XX	
VEGF							-NA
TGFβ2		X			X		
FGF9		X			X		
ANG		X	XX		X	XX	

Abbildung 15: Übersicht der Ergebnisse zu Zytokin-Arrays (apikales Kompartiment), der ELISA (basales Kompartiment) und der qRT-PCR von acht Wochen alten iPSC-RPE-

Zellen nach SI-Stress. Dargestellt sind die Ergebnisse der Zelllinien unabhängig vom AMD-Risiko in den verschiedenen experimentellen Ansätzen, jeweils getrennt für das 1./2. Replikat und für den Ansatz mit NA (+NA) und ohne NA (-NA) im Kulturmedium. Grün: Zunahme. Rot: Abnahme. Grau: keine Änderung. X: nicht durchgeführt. XX: nicht detektierbar.

4.2 Auswirkungen von oxidativem Stress durch SI auf iPSC-RPE-Zellen

Die in den folgenden Abschnitten verwendeten RPE-Zellen, RNA und Medien wurden mit iPSC-RPE-Zellen durchgeführt, die bis zur Zelllyse kultiviert wurden. Bevor die iPSC-RPE-Zellen oxidativ gestresst wurden, erfolgte nach einer sechswöchigen Kultivierung eine immunzytochemische Färbung der Zellkerne mittels DAPI und der Zellbänder (tight junctions) mittels ZO-1 Antikörper. Zusätzlich wurde der TEER gemessen, um die Kompaktheit des Monolayers anhand des elektrischen Widerstandes zu bewerten. Unberührt hiervon wurde in den sechs Wochen vorab die Vitalität und der Ausschluss von Kontaminationen durch wöchentliche mikroskopische Untersuchungen sichergestellt.

Die immunzytochemische Färbung der iPSC-RPE-Zellen zeigte die typische, hexagonale Struktur der RPE-Zellen (Abbildung 16). Dabei war der Monolayer durchgängig und die Größe benachbarter Zellen vergleichbar. Die ZO-1-Färbung ergab, dass die Zellen über intakte und durchgängige Membranen verfügen. Morphologische Unterschiede zwischen den HR und LR-Zelllinien sind nicht zu erkennen.

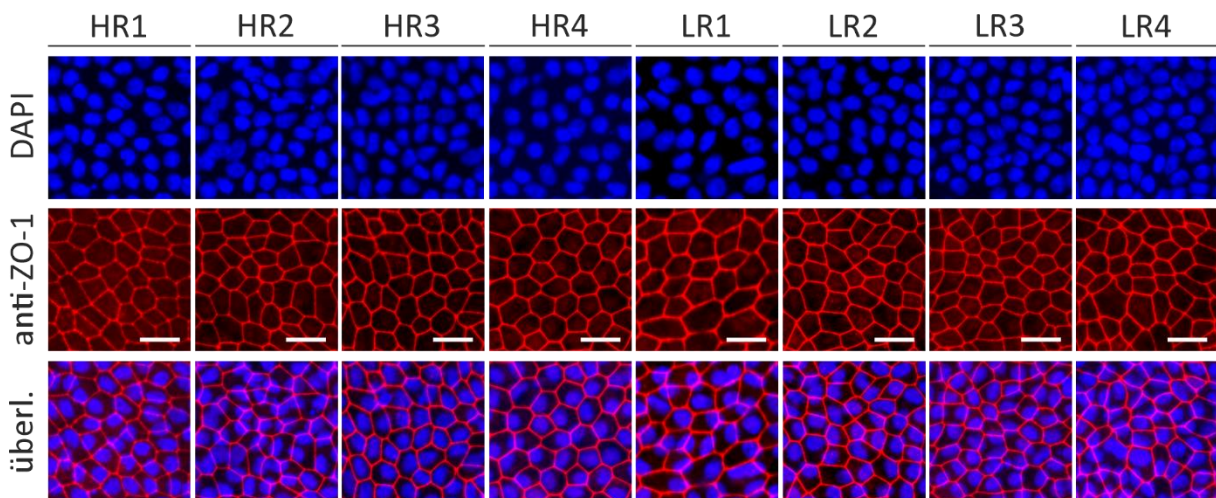


Abbildung 16: Verifizierung der RPE-Zellmorphologie und der Integrität des Monolayers. Bei je vier HR- und LR-iPSC-RPE-Zelllinien wurden nach 6 Wochen Kultivierungszeit die Zellkerne immunzytochemisch mit DAPI (blau) und die tight junctions mit ZO-1 Antikörpern (rot) gefärbt. Anschließend erfolgte die Untersuchung bei einer 20x-

Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop. überl.: Überlagerung der DAPI und ZO-1-Färbung. Scale bar: 20 μm .

Die TEER-Messungen erfolgten ebenfalls nach der sechs Wochen langen ungestressten Zellkultivierung, um die Kompaktheit des Monolayers und damit dessen Barrierefunktion zu bewerten. Hierbei zeigten sich weitestgehend konstante Widerstandsmessungen zwischen ca. 490 und 650 $\text{Ohm}\cdot\text{cm}^2$, welche von der Größenordnung den Messwerten anderer Publikationen entsprechen (Singh et al. 2013; Galloway et al. 2017). Der Vergleich gesamter HR- zu LR-Zelllinien zeigte keine signifikanten Unterschiede im TEER ($p > 0,05$; Abbildung 17).

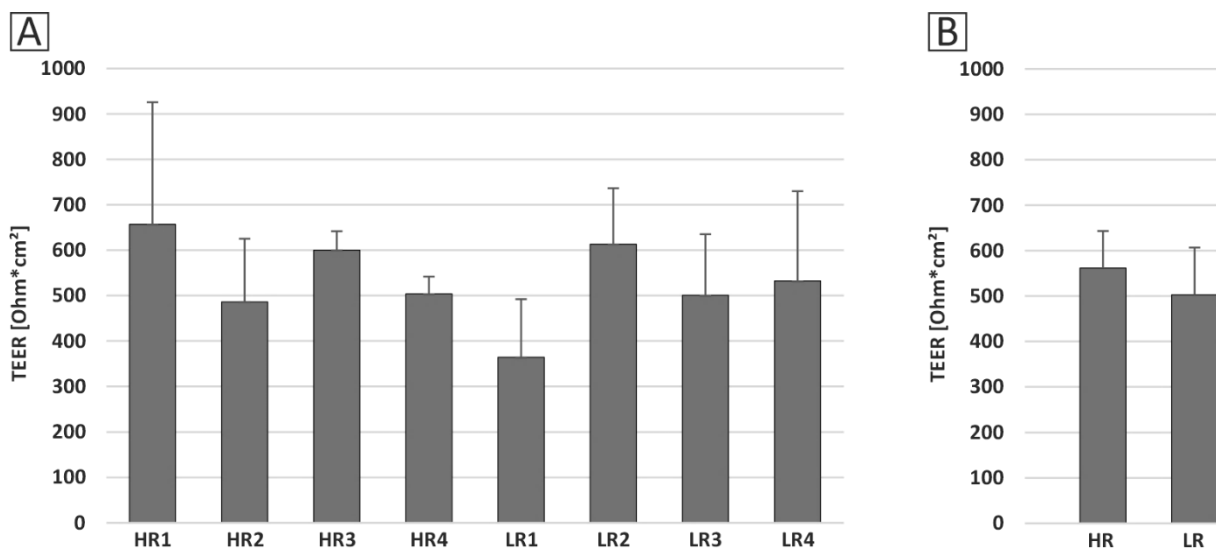


Abbildung 17: TEER-Messung an sechs Wochen alten ungestressten iPSC-RPE-Zellen.

(A) Bei je vier HR- und LR-Zelllinien wurde nach sechs Wochen Kultivierungszeit der TEER in 12-Kavitätenplatten gemessen, um einen Mediumsleerwert korrigiert und mit der Zellfiltergröße multipliziert, sodass der TEER in der Einheit $\text{Ohm}\cdot\text{cm}^2$ dargestellt ist. (B) Der TEER der einzelnen Zelllinien wurde für die HR- bzw. LR-Zelllinien zusammengeführt ($n=4$). Der Mittelwert mit Standardabweichung aus zwei unabhängigen Versuchen ist angegeben. Statistische Signifikanz (*: $p < 0,05$) wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt.

Da weder ICC-Analysen noch TEER-Messungen Unterschiede zwischen den Zelllinien durch die ungestresste Kultivierung der iPSC-RPE-Zellen aufwiesen, wurde auf eine gleiche Qualität der Zellen geschlossen, sodass vergleichbare Ausgangsbedingungen für oxidative Stressversuche vorliegen sollten.

Nach acht Wochen Kultivierungszeit wurden die iPSC-RPE-Zellen für eine bzw. drei weitere Wochen mit SI oxidativ gestresst. Zusätzlich wurden zehn Wochen alte iPSC-RPE-Zellen für eine Woche oxidativ gestresst. Die Kombinationen der drei Ansätze erlaubten sowohl die Beurteilung der Folgen eines länger wirkenden Stresses (Abbildung 18, 2b vs. 3b) als auch des Einflusses eines höheren Zellalters bis zum Einsetzen des oxidativen Stresses (Abbildung 18, 1b vs. 2b). Hierzu wurde das SI-Medium (0,125 mM) alle 48 Stunden frisch angesetzt und genau wie bei ungestressten Zellen ausgetauscht. Anschließend erfolgte die Zelllyse, ICC-Färbungen mittels DAPI und ZO-1 Antikörpern, und die mRNA-Expressionsanalyse von *HMOX1* und *NQO1*.

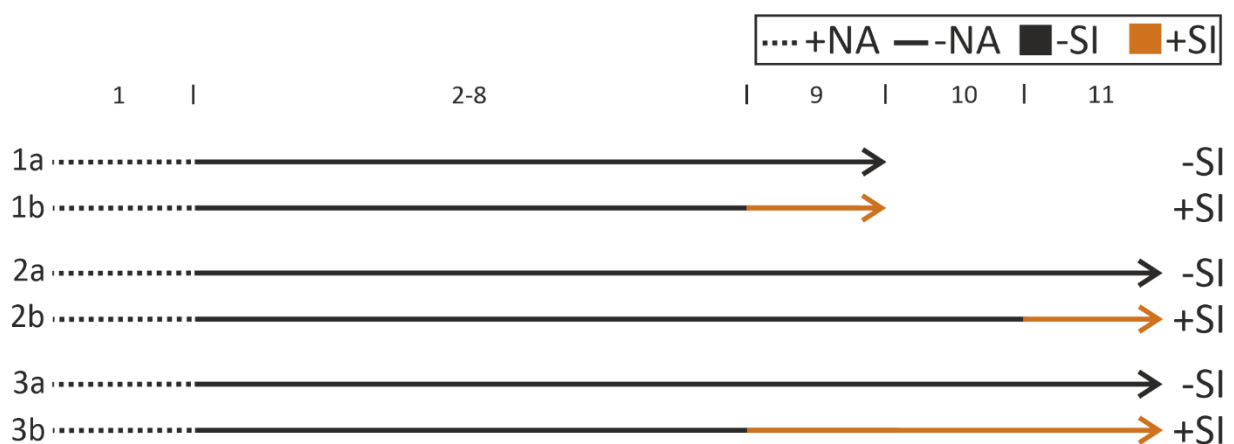


Abbildung 18: Übersicht der verschiedenen Kultivierungsbedingungen von neun/elf Wochen alten iPSC-RPE-Zellen nach SI-vermitteltem oxidativen Stress. Gestrichelte Linien zeigen eine Kultivierung mit NA-Zusatz an, durchgängige Linien eine NA-freie Kultivierung. Schwarz markiert SI-freie Kultivierung, orange oxidativer SI-Stress. Die Zahlen entsprechen der jeweiligen Kultivierungswoche. 1b – 3b entsprechen den behandelten Ansätzen (0,125 mM SI; +SI), 1a – 3a dienen als ungestresste Kontrolle (0 mM SI; -SI).

4.2.1 Induktion von oxidativem Stress durch SI für eine Woche

4.2.1.1 Verifizierung der RPE-Zellmorphologie und der Integrität des RPE-Monolayers nach achtwöchiger Kultivierungszeit

Nach einer achtwöchigen Kultivierung wurden die iPSC-RPE für eine Woche mit 0,125 mM SI (+SI) oxidativ gestresst. Als Kontrolle diente die Behandlung mit Kulturmedium (0 mM SI; -SI). Anschließend wurde eine immunzytochemische Färbung der Zellkerne mittels DAPI und der Zellbänder (tight junctions) mittels ZO-1 Antikörpern durchgeführt, um die Zellmembranen anzufärben und die Intaktheit der Zelle zu bewerten.

Die immunzytochemische Färbung der iPSC-RPE-Zellen zeigte die typische, hexagonale Struktur der RPE-Zellen. Benachbarte Zellen zeigten eine vergleichbare Größe, ebenso war der Monolayer durchgängig und ununterbrochen. Eine subjektiv empfundene Ausnahme, welche nicht weiter vermessen wurde, stellte die HR1-Zelllinie dar. Hier zeigten die behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen eine nicht reproduzierbare Größenzunahme. Die ZO-1-Färbung ergab, dass alle Zellen über intakte und durchgängige Membranen verfügten. Morphologische Unterschiede zwischen den gestressten und ungestressten Zellen waren ebenso wenig erkennbar wie Unterschiede zwischen den HR- und LR-Zelllinien (Abbildung 19).

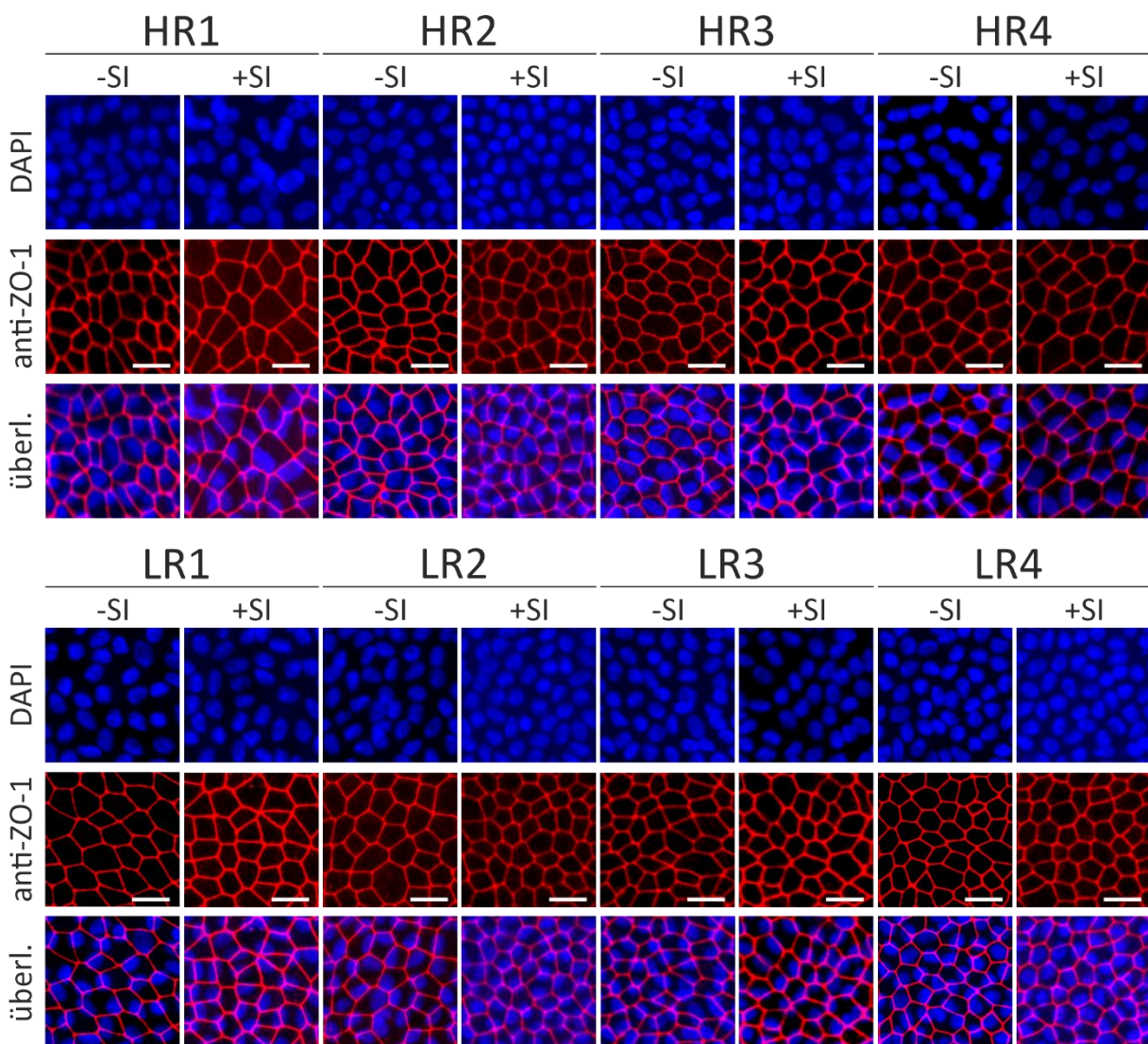


Abbildung 19: Verifizierung der RPE-Zellmorphologie und der Integrität des Monolayers nach einwöchigem oxidativem SI-Stress. Je vier HR- und LR-iPSC-RPE-Zelllinien wurden nach 8 Wochen Kultivierungszeit für eine Woche mit 0,125 mM SI gestresst (+SI). Als Kontrolle dienten ungestresste Zellen (0 mM SI; -SI). Zellkerne wurden immunzytochemisch mit DAPI

(blau) und die tight junctions mit ZO-1 Antikörpern (rot) gefärbt. Anschließend erfolgte die Untersuchung bei einer 20x-Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop. Überl.: Überlagerung der DAPI und ZO-1-Färbung. Scale bar: 20 μ m.

4.2.1.2 mRNA-Expressionsanalyse der antioxidativen Genmarker *HMOX1* und *NQO1*

Nachdem immunzytochemisch bestätigt wurde, dass der applizierte oxidative Stress keinen qualitativen Einfluss auf die RPE-Zellmorphologie nahm, wurde eine qRT-PCR der antioxidativen Stressmarker *HMOX1* und *NQO1* zur Bestimmung der Auswirkungen des einwöchigen SI-Stresses durchgeführt.

Oxidativer Stress führte zu keinen erkennbaren Änderungen der *HMOX1*-Genexpression innerhalb der einzelnen Zelllinien. Die Mittelwerte SI-gestresster HR-Zelllinien blieben bei 0,94 ($\pm$ 0,25) und die der LR-Zelllinien bei 1,02 ($\pm$ 0,24) nahezu unverändert.

Der SI-vermittelte Stress führte zu einem starken Anstieg der mRNA-Expression von *NQO1* in allen Zelllinien. In Zelllinie HR1 stieg die relative Genexpression auf 5,61 ($\pm$ 1,09), in HR2 auf 5,01 ($\pm$ 1,28), in HR3 auf 3,26 ($\pm$ 1,11), in HR4 auf 4,33 ($\pm$ 0,81), in LR1 auf 3,60 ($\pm$ 0,47), in LR2 auf 3,56 ($\pm$ 0,81), in LR3 auf 2,63 ($\pm$ 1,11) und in LR4 auf 4,08 ($\pm$ 1,09). Oxidativer Stress führte für HR-Zelllinien und LR-Zelllinien im Vergleich zur Kontrolle zu einem vergleichbaren, signifikanten Anstieg der *NQO1*-Expression (HR: 4,55 [$\pm$ 1,010]; LR: 3,47 [$\pm$ 0,610]; jeweils $p < 0,05$). Es wurde kein Unterschied in der Gen-Expression zwischen den Risikoprofilen ermittelt ($p > 0,05$; Abbildung 20).

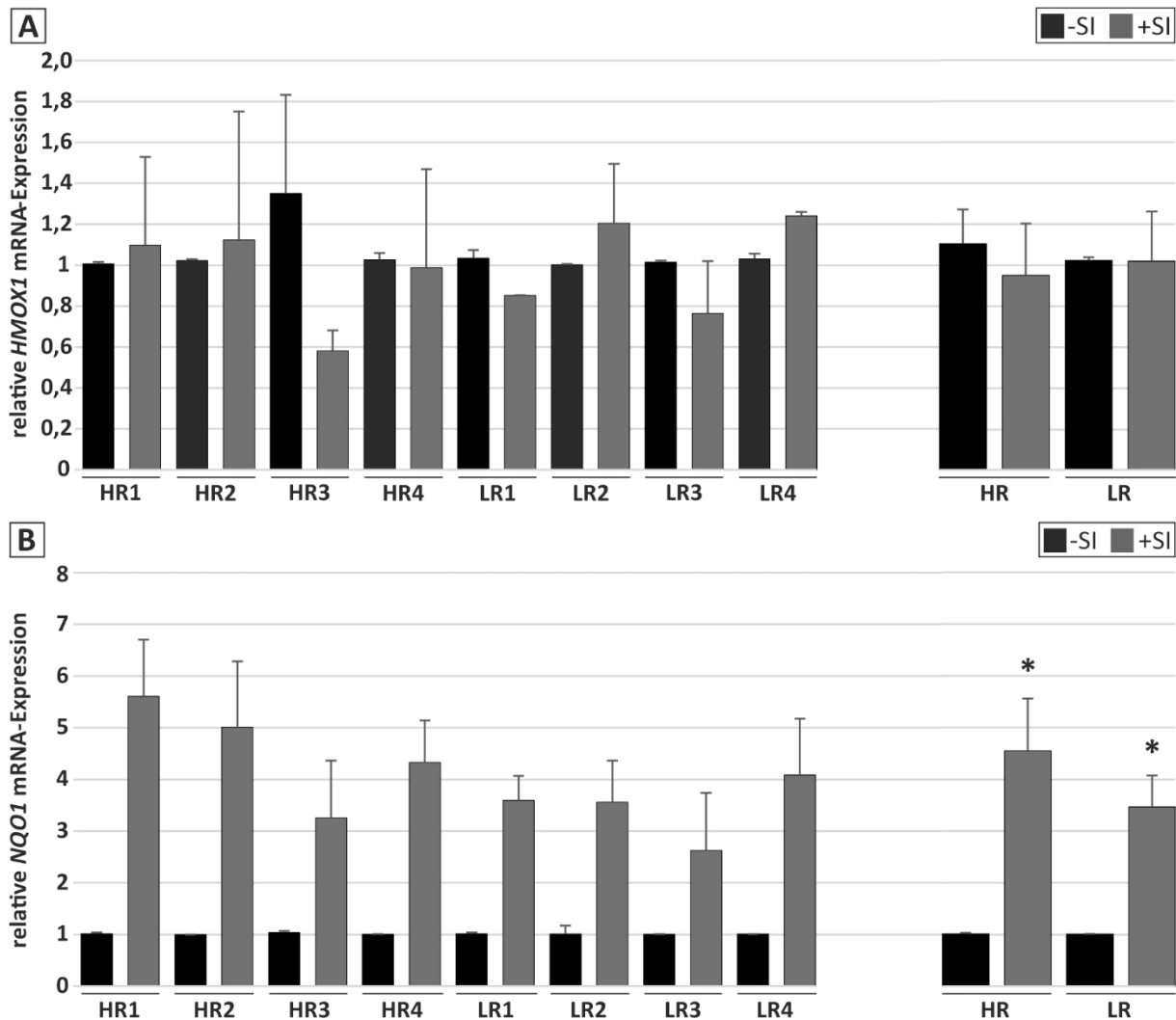


Abbildung 20: Relative mRNA-Expressionsanalyse von *HMOX1* und *NQO1* bei acht Wochen alten iPSC-RPE-Zellen nach zusätzlichem einwöchigem SI-Stress. Links dargestellt ist die mRNA-Expression von (A) *HMOX1* / (B) *NQO1* bei je vier HR- und LR-Zelllinien nach einwöchigem SI-Stress (0,125 mM). Das Expressionsniveau wurde auf das Referenzgen *HPRT* normalisiert, anschließend wurde jeweils die gestresste Behandlung (+SI; grau) gegen die ungestresste (-SI; schwarz) kalibriert. Rechts dargestellt ist der Mittelwert der HR- bzw LR-Zelllinien (n=4) aus (A) bzw. (B). Der Mittelwert und die Standardabweichung aus zwei unabhängigen Versuchen sind angegeben. Statistische Signifikanz (*: $p < 0,05$; direkter Vergleich zwischen der Behandlung mit der jeweiligen Kontrolle) wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt.

4.2.1.3 Verifizierung der RPE-Zellmorphologie und der Integrität des RPE-Monolayers nach zehnwöchiger Kultivierungszeit

Um den Einfluss eines länger applizierten oxidativen Stresses auf die Zellmorphologie und die Expression antioxidativer Genmarker zu untersuchen, wurden die RPE-Zellen

in diesem Versuch nur für eine Woche mit 0,125 mM SI oxidativ (+SI) gestresst. Kontrollen wurden nicht behandelt (0 mM SI; -SI). Die Färbung der RPE-Zellkerne durch DAPI und der Zellbänder (tight junctions) durch ZO-1 Antikörper diente der Verifizierung morphologischer Abweichungen SI-gestresster Zellen von ungestressten Zellen.

Oxidativ gestresste RPE-Zellen zeigten genau wie die Kontrollen die typische hexagonale Struktur, intakte Zellmembranen und keine Unterschiede in der Zellgröße (Abbildung 21).

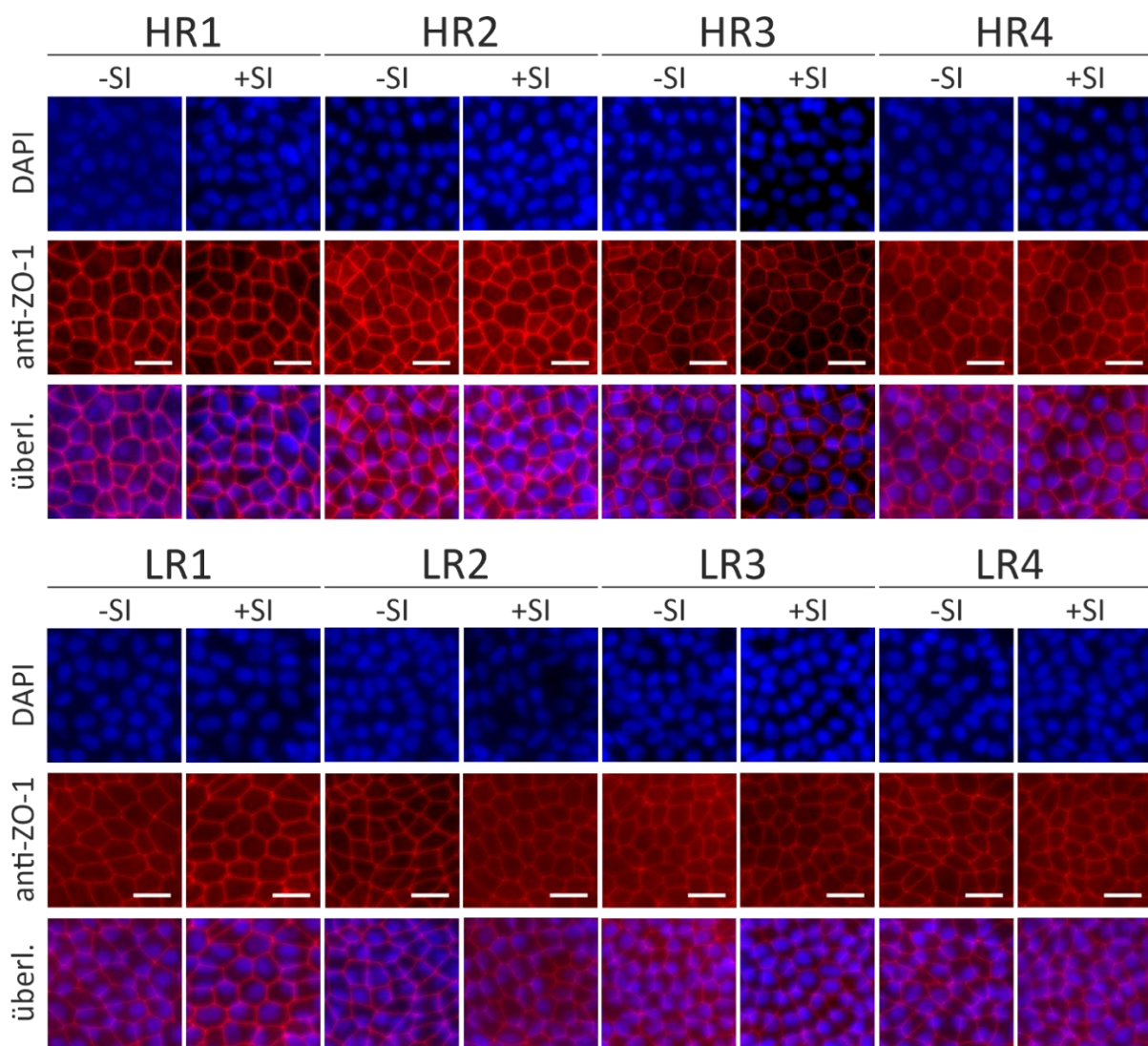


Abbildung 21: Verifizierung der RPE-Zellmorphologie und der Integrität des Monolayers nach zehnwöchiger Kultivierungszeit und zusätzlichem einwöchigen SI-Stress. Je vier HR- und LR-iPSC-RPE-Zelllinien wurden nach zehn Wochen Kultivierungszeit für eine Woche mit 0,125 mM SI oxidativ gestresst (+SI). Kontrollen hingegen nicht (0 mM SI; -SI). Blau dargestellt ist die Färbung der Zellkerne mittels DAPI, rot die der tight junctions

mittels ZO-1 Antikörper. Aufnahmen wurden unter 20x-Vergrößerung mit dem Fluoreszenzmikroskop angefertigt. Überl.: Überlagerung der DAPI und ZO-1-Färbung. Scale bar: 20 μm .

4.2.1.4 mRNA-Expressionsanalyse antioxidativer Genmarker

Die Expression der antioxidativen Genmarker *HMOX1* und *NQO1* wurde nach Ausschluss morphologischer Alterationen für Kontrollen und oxidativ gestresste Zellen ermittelt und ist in Abbildung 22 dargestellt.

Die relative Genexpression von *HMOX1* stieg nach einwöchigem oxidativem Stress durch SI in den Zelllinien HR2, LR3 und LR4 an. In den restlichen Zelllinien sank die *HMOX1*-Expression nach SI-Zugabe. Insgesamt waren innerhalb der Zelllinien keine gleichgerichteten Änderungen der Genexpression erkenntlich. Die *HMOX1*-Expression blieb für HR-Zelllinien im Mittel bei 0,90 ($\pm 0,29$), ebenso wie die für die LR-Zelllinien im Mittel bei 1,03 ($\pm 0,29$), nahezu unverändert.

Im Gegensatz dazu zeigen alle Zelllinien nach SI-Stress eine höhere relative *NQO1*-Expression. Diese stieg in Zelllinie HR1 auf 2,28 ($\pm 1,91$), in HR2 auf 1,33 ($\pm 1,77$), in HR3 auf 2,08 ($\pm 2,01$), in HR4 auf 2,75 ($\pm 2,99$), in LR1 auf 1,92 ($\pm 1,56$), in LR2 auf 2,02 ($\pm 1,76$), in LR3 auf 2,25 ($\pm 1,65$) und in LR4 auf 2,52 ($\pm 1,81$). Im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle resultierte oxidativer Stress sowohl für den Mittelwert der HR-Zelllinien (von 1,01 [$\pm 0,01$] auf 2,11 [$\pm 0,59$]; $p < 0,05$) als auch für den Mittelwert aller LR-Zelllinien (von 1,01 [$\pm 0,01$] auf 2,18 [$\pm 0,27$]; $p < 0,05$) in einem signifikanten Anstieg der *NQO1*-Expression (Abbildung 22).

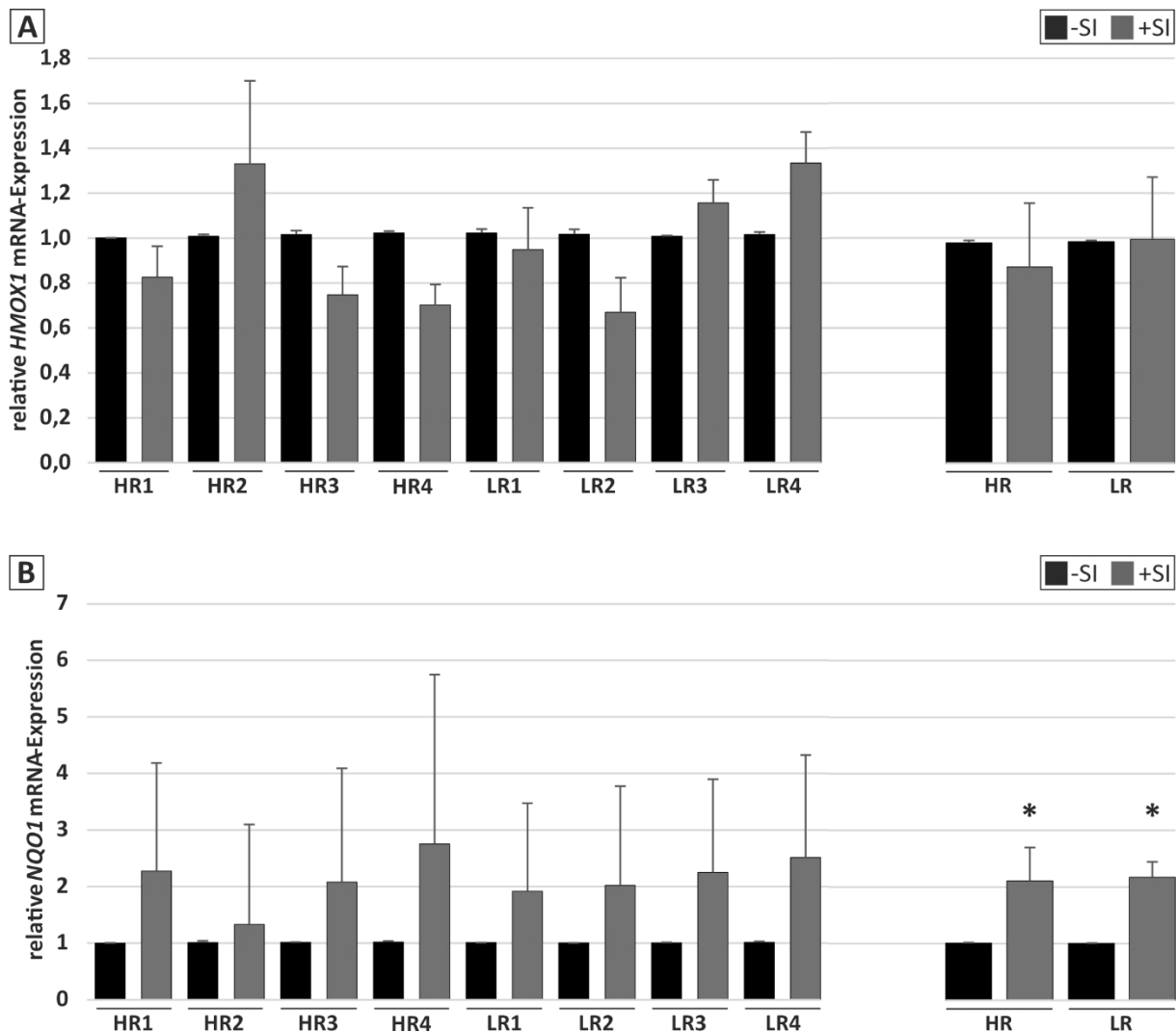


Abbildung 22: Relative mRNA-Expressionsanalyse von *HMOX1* und *NQO1* nach zehnwöchiger Kultivierungszeit und zusätzlichem einwöchigem SI-Stress. Links dargestellt ist die mRNA-Expression von (A) *HMOX1* / (B) *NQO1* bei je vier HR- und LR-Zelllinien nach dreiwöchigem SI-Stress (0,125 mM). Das Expressionsniveau wurde auf das Referenzgen HPRT normalisiert, anschließend wurde jeweils die gestresste Behandlung (+SI; grau) gegen die ungestresste (-SI; schwarz) kalibriert. Jeweils rechts dargestellt ist der Mittelwert aller HR- bzw LR-Zelllinien (n=4) aus (A) bzw. (B). Der Mittelwert und die Standardabweichung aus zwei unabhängigen Versuchen sind angegeben. Statistische Signifikanz (*: $p < 0,05$; direkter Vergleich zwischen der Behandlung mit der jeweiligen Kontrolle) wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt.

4.2.2 Induktion von oxidativem Stress durch SI für drei Wochen

4.2.2.1 Verifizierung der RPE-Zellmorphologie und der Integrität des RPE-Monolayers nach achtwöchiger Kultivierungszeit

Der in 4.2.1 beschriebene Stressversuch wurde für zwei weitere Wochen fortgesetzt, sodass die RPE-Zellen nach acht Wochen Kultivierungszeit für insgesamt drei Wochen zusätzlich mit 0,125 mM SI-Medium (+SI) oxidativ gestresst wurden. Als Kontrolle dienten ungestresste Zellen (0 mM SI; -SI).

Mittels einer immunzytochemischen Färbung von DAPI wurden die Zellkerne gefärbt. ZO-1 Antikörper färbten die Zellbänder (tight junctions), sodass die Durchgängigkeit der Zellmembranen ersichtlich wurde.

Die iPSC-RPE-Zellen zeigen eine charakteristische, hexagonale Struktur und anhand der ZO-1-Färbung wurde erkenntlich, dass die Zellen über durchgängige Membranen verfügten. Morphologische Unterschiede zwischen den gestressten und ungestressten Zellen waren ebenso wenig erkennbar wie Unterschiede zwischen den HR- und LR-Zelllinien (Abbildung 23).

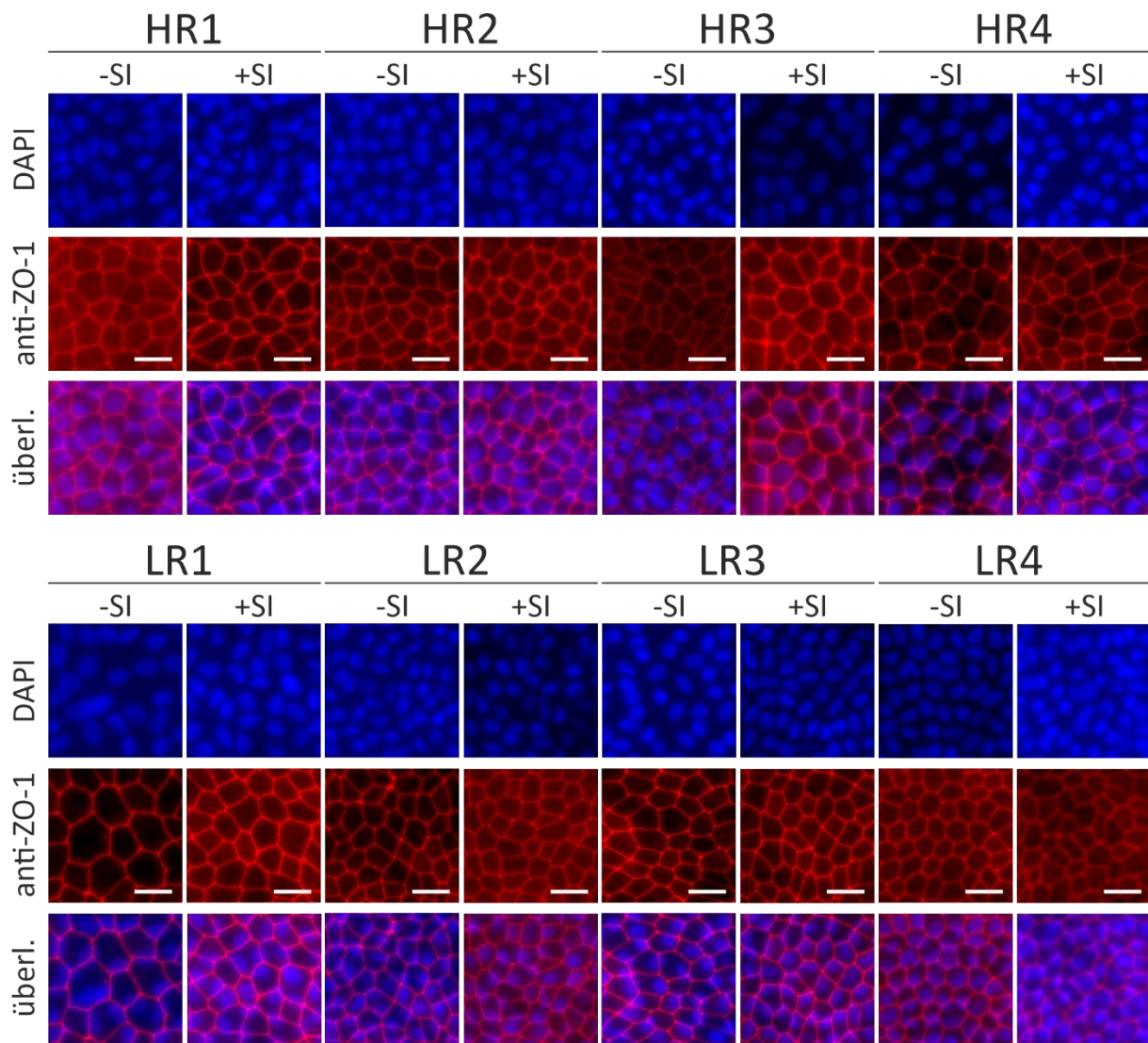


Abbildung 23: Verifizierung der RPE-Zellmorphologie und der Integrität des Monolayers nach dreiwöchigem oxidativem SI-Stress. Je vier HR- und LR-iPSC-RPE-Zelllinien wurden nach acht Wochen Kultivierungszeit für drei Wochen mit 0,125 mM SI gestresst (+SI). Als Kontrolle dienten ungestresste Zellen (0 mM SI; -SI). Zellkerne wurden immunzytochemisch mit DAPI (blau) und die tight junctions mit ZO-1 Antikörper (rot) gefärbt. Anschließend erfolgte die Untersuchung bei einer 20x-Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop. overl.: Überlagerung der DAPI und ZO-1-Färbung. Scale bar: 20 μ m.

4.2.2.2 mRNA-Expressionsanalyse der antioxidativen Genmarker *HMOX1* und *NQO1*

Nachdem die RPE-Morphologie und die Integrität des RPE-Monolayers verifiziert wurden, folgte eine Messung der antioxidativen Stressmarker *HMOX1* und *NQO1* durch eine qRT-PCR (Abbildung 24).

Die relative *HMOX1*-Expression stieg in Zelllinie HR4 nach SI-Stress im Vergleich zur Kontrolle an. Die anderen Zelllinien zeigten lediglich moderate Schwankungen der *HMOX1*-Expression, teilweise als Zunahme oder Abnahme nach SI-Stress. Insgesamt führte oxidativer Stress bei HR-Zelllinien und LR-Zelllinien zu unveränderten *HMOX1*-Expressionen ($1,23 [\pm 0,53]$ bzw. $1,14 [\pm 0,19]$).

Die relative *NQO1*-Expression stieg nach SI-Stress in allen Zelllinien an. Innerhalb der HR-Zelllinien nahm die Expression für Zelllinie HR1 auf $4,61 (\pm 1,05)$, für HR2 auf $3,86 (\pm 1,96)$, für HR3 auf $3,92 (\pm 0,65)$ und für HR4 auf $4,13 (\pm 1,32)$ zu. Innerhalb der LR-Zelllinien stiegen die Werte für LR1 auf $4,84 (\pm 0,21)$, für LR2 auf $4,24 (\pm 0,57)$, für LR3 auf $3,98 (\pm 0,22)$ und für LR4 auf $4,06 (\pm 0,76)$ nach oxidativem Stress an. Oxidativer Stress führte im Mittel der HR- und LR-Zelllinien jeweils zu signifikanten *NQO1*-Zunahmen (HR: $4,13 [\pm 0,344]$; LR: $4,28 [\pm 0,387]$; jeweils $p < 0,05$), aber zu keinen signifikanten Unterschieden für die unterschiedlichen Risikoprofilen ($p > 0,05$; Abbildung 24).

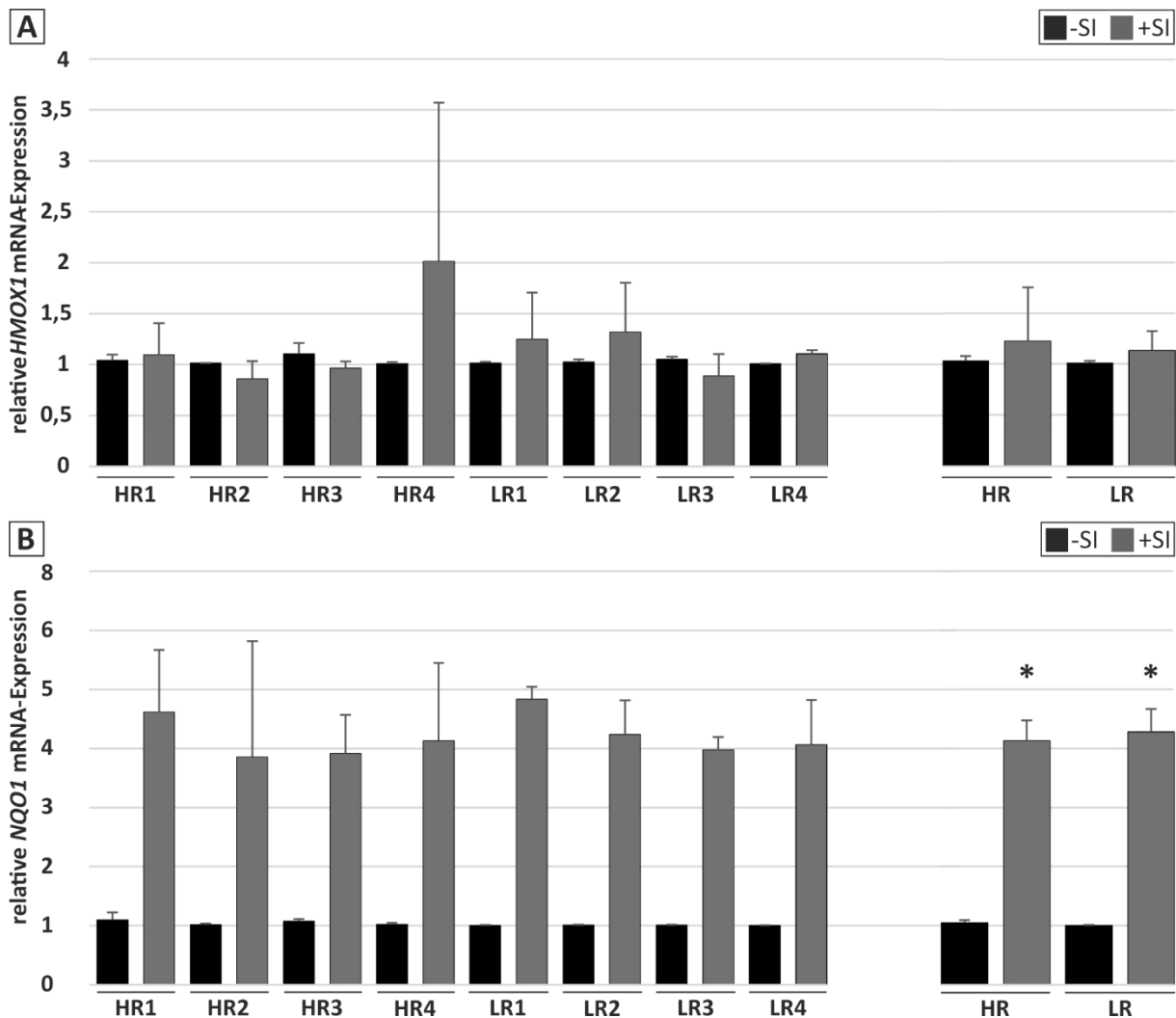


Abbildung 24: Relative mRNA-Expressionsanalyse von *HMOX1* und *NQO1* bei acht Wochen alten iPSC-RPE-Zellen nach zusätzlichem dreiwöchigem SI-Stress. Links dargestellt ist die mRNA-Expression von (A) *HMOX1* / (B) *NQO1* bei je vier HR- und LR-Zelllinien nach dreiwöchigem SI-Stress (0,125 mM). Die Expression wurde auf das Referenzgen *HPRT* normalisiert, anschließend wurde jeweils die gestresste Behandlung (+SI; grau) gegen die ungestresste (-SI; schwarz) kalibriert. Jeweils rechts dargestellt ist der Mittelwert der HR- bzw. LR-Zelllinien (n=4) aus (A) bzw. (B). Der Mittelwert und die Standardabweichung aus zwei unabhängigen Versuchen sind angegeben. Statistische Signifikanz (*: $p < 0,05$; direkter Vergleich zwischen der Behandlung mit der jeweiligen Kontrolle) wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt.

Um die Aktivierung des NRF2-Signalweges nach einem längeren chronischen SI-Stress sowie einem späteren Beginn bei gleichlangem SI-Stress vergleichen zu können, wurde die quantitative Expression der Stressmarker gegenübergestellt (Abbildung 25). Bezogen auf den Mittelwert aller HR- und LR-Zelllinien führte dreiwöchiger oxidativer Stress zu einer relativen *NQO1*-Expression von 4,20,

gleichzeitig lag diese Expression im Falle des einwöchigen Stresses nur bei 2,14 (Abbildung 22, Abbildung 24). Die relative *NQO1*-Expression acht Wochen alter iPSC-RPE-Zellen stieg nach einwöchigem Stress auf 4,00, während die der zehn Wochen alten Zellen nach einwöchigem Stress nur auf 2,14 zunahm (Abbildung 20, Abbildung 22). Die relativen *HMOX1*-Expressionen der drei verschiedenen Kultivierungsbedingungen blieben bei 0,96, 0,975 und 1,19 weitestgehend unverändert.

	<i>HMOX1</i> -Expression	<i>NQO1</i> -Expression
längerer chronischer Stress *		
späterer Beginn eines chronischen Stresses **		

Abbildung 25: Direktionaler Vergleich der Aktivierung des NRF2-Signalweges bei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen. *: Vergleich eines dreiwöchigen mit einem einwöchigen SI-Stress bei einem gleichen Gesamalter der iPSC-RPE-Zellen. **: Vergleich acht Wochen mit zehn Wochen alter iPSC-RPE-Zellen mit jeweils zusätzlichem einwöchigen SI-Stress. Grau: gleichbleibend. Grün: Zunahme. Rot: Abnahme.

4.3 Induktion eines physiologischen Stressors durch POS-Zugabe

In diesem Versuchsansatz wurden die vier HR- und die vier LR-RPE-Zelllinien nach neunwöchiger Kultivierungszeit für zusätzliche zwei Wochen durch die Zugabe von POS gestresst.

Entgegen des deutlich einfacher verfügbaren chemischen oxidativen Stressors SI, simulierte die POS-Zugabe einen physiologischen Stressor für die iPSC-RPE-Zellen. Hierbei wurde dem Kulturmedium POS zugesetzt, sodass eine RPE-Zelle näherungsweise 20 POS phagozytierte. Kontrollen wurden in POS-freiem Kulturmedium kultiviert. Die POS-Zugabe wurde dreimal wöchentlich in gleichen Abständen für jeweils 6 Stunden durchgeführt. Anschließend wurde das Medium durch POS-freies Kulturmedium ausgetauscht.

4.3.1 Verifizierung der RPE-Zellmorphologie und Integrität des RPE-Monolayers nach POS-induziertem Stress

Zunächst sollten morphologische Unterschiede der iPSC-RPE-Zellen nach POS-Zugabe im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle ausgeschlossen werden. Dazu wurde eine immunozytochemische Färbung der Zellkerne mittels DAPI und der Zellbänder (tight junctions) mittels ZO-1 Antikörperfärbung durchgeführt. Dies diente der Erfassung morphologischer Alterationen nach POS-Zugabe innerhalb der Zelllinien, jeweils verglichen mit unbehandelten Kontrollen. Sowohl gestresste als auch ungestresste Zellen zeigten hierbei durchgängige Färbungen der Zellbänder (tight junctions), uniforme Zellgrößen und eine intakte Einzelzellschicht. Lediglich die POS-gestresste LR4-Zelllinie zeigte am unteren Bildrand in der ZO-1-Färbung leicht abgeplattete Zellen. Da die restliche Aufnahme aber die hexagonale Struktur der RPE-Zellen darstellt, ist von einem Fehler beim Fixieren der Filter auf die Objektträger auszugehen (zu hoher Druck auf das Deckglas). Damit wurden POS-induzierte morphologische Änderungen ausgeschlossen (Abbildung 26).

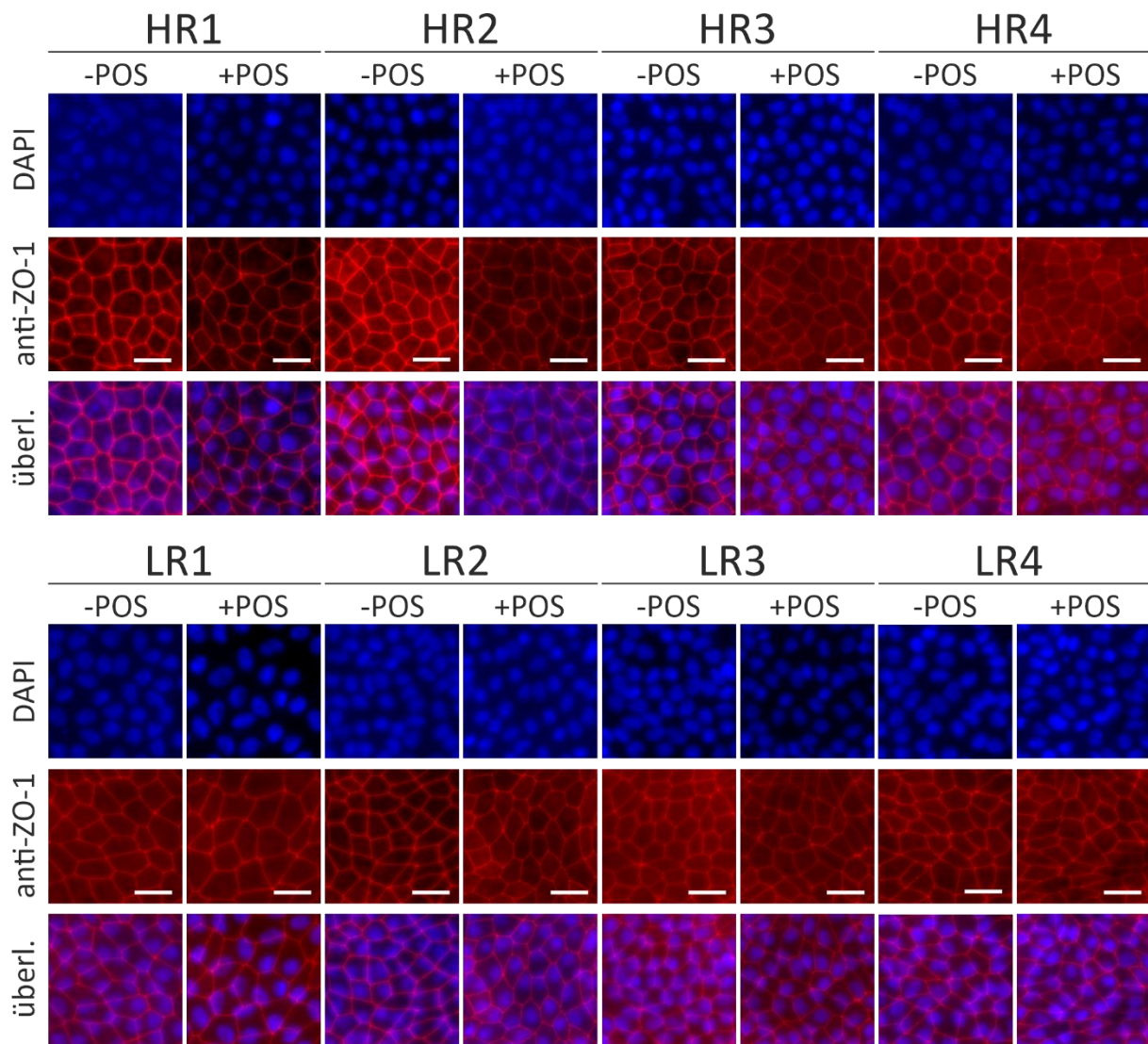


Abbildung 26: Verifizierung der RPE-Zellmorphologie und Integrität des Monolayers nach Induktion eines physiologischen Stresses durch POS. Je vier HR- und LR-iPSC-RPE-Zelllinien wurden nach neun Wochen Kultivierungszeit für zwei Wochen mit 20 POS pro RPE-Zelle physiologisch gestresst (+POS). Als Kontrolle dienten ungestresste Zellen (-POS). Zellkerne wurden immunzytochemisch mit DAPI (blau) und die tight junctions mit ZO-1 Antikörper (rot) gefärbt. Anschließend erfolgte die Untersuchung bei einer 20x-Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop. überl.: Überlagerung der DAPI und ZO-1-Färbung. Scale bar: 20 µm.

4.3.2 mRNA-Expressionsanalyse der antioxidativen Genmarker *HMOX1* und *NQO1*

Nachdem die RPE-Zellmorphologie der iPSC-RPE-Zellen nach POS-Zugabe durch immunzytochemische Färbungen verifiziert wurde, folgte die Durchführung einer qRT-

PCR. Es wurden erneut die mRNA-Expression der antioxidativen Genmarker *HMOX1* und *NQO1* gemessen.

Die relative *HMOX1*-Expression zeigte nach POS-induziertem Stress Schwankungen, jeweils verglichen mit der Kontrolle. So zeigten sich verteilt über alle Zelllinien sowohl Zunahmen als auch Abnahmen der *HMOX1*-Expression nach POS-Zugabe. HR-Zelllinien zeigten im Mittel keine Änderungen in der *HMOX1*-Expression ($p > 0,05$). Gleichzeitig fiel die mRNA-Expression von *HMOX1* für die LR-Zelllinien von $1,02 (\pm 0,006)$ auf $0,75 (\pm 0,174)$ signifikant ab ($p < 0,05$; Abbildung 27A).

Zunahmen der relativen *NQO1*-Expression nach POS-Stress zeigten sich lediglich in Zelllinie HR2 (auf $1,40 \pm 0,117$). In allen anderen Zelllinien resultierte die Induktion des POS-Stresses in einem weitestgehend unverändertem *NQO1*-Expressionsniveau. Infolgedessen zeigte auch die *NQO1*-Expression der HR-Zelllinie ($1,02 [\pm 0,010]$; $p > 0,05$) keine Änderungen, während die der LR-Zelllinie ($0,87 [\pm 0,058]$; $p < 0,05$) erneut signifikant abnahm.

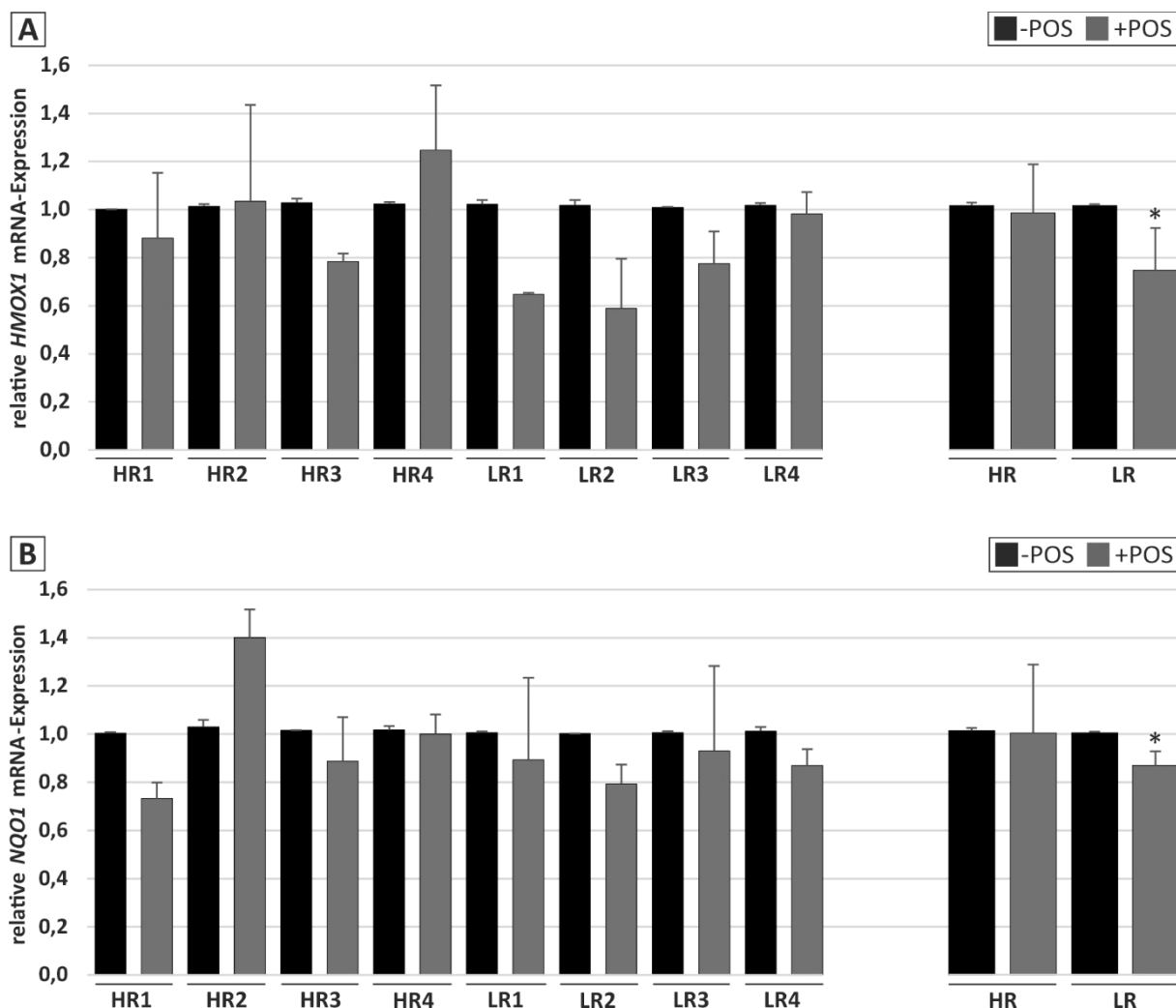


Abbildung 27: Relative mRNA-Expressionsanalyse der antioxidativen Genmarker *HMOX1* und *NQO1* nach neunwöchiger Kultivierungszeit und zusätzlichem zweiwöchigen POS-induziertem Stress. Links dargestellt ist die mRNA-Expression von (A) *HMOX1* / (B) *NQO1* bei je vier HR- und LR-Zelllinien nach zweiwöchigem POS-induzierten Stress (20 POS pro 1 RPE-Zelle). Das Expressionsniveau wurde auf das Referenzgen *HPRT* normalisiert, anschließend wurde jeweils die gestresste Behandlung (+POS; grau) gegen die ungestresste (-POS; schwarz) kalibriert. Links angegeben sind die relativen Werte der einzelnen Zelllinien. Jeweils rechts dargestellt ist der Mittelwert der HR- bzw. LR-Zelllinien (n=4) aus (A) bzw. (B). Der Mittelwert und die Standardabweichung aus zwei unabhängigen Versuchen sind angegeben. Statistische Signifikanz (*: $p < 0,05$; direkter Vergleich zwischen der Behandlung mit der jeweiligen Kontrolle) wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt.

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von oxidativem Stress (SI-Zugabe) und veränderter Kulturbedingungen (NA-Entzug) auf je vier iPSC-RPE-Zelllinien mit hohem/geringem AMD-Risikoprofil untersucht. Dabei wurden Änderungen der Genexpression und Proteinsekretion, denen eine Beteiligung an der molekularen Pathogenese der AMD zugeschrieben wird (Autophagie, mitochondriale Funktionen, Komplement-/Immunsystem), untersucht.

In einem weiteren Versuchsteil sollte ermittelt werden, ob sich durch die Dauer und den Zeitpunkt des Beginns eines chronischen oxidativen Stresses unterschiedliche Auswirkungen im NRF2-Signalweg zeigten, und ob physiologischer Stress (POS-Zugabe) Einfluss auf das Stressniveau der iPSC-RPE-Zellen nahm.

Da der AMD-Risikograd der Zelllinien bekannt war, konnten die Zellantworten vor dem Hintergrund des genetischen Status und damit der Anfälligkeit für die AMD ermittelt werden.

5.1 Erweiterte Analyse AMD-assoziiierter Dysregulationen nach NA-Entzug und SI-Zugabe in iPSC-RPE-Zellen

Saini und Kollegen zeigten, dass NA-supplementierte Kulturmedien die Genexpression von Komplementgenen und damit einen AMD-Phänotypen in iPSC-RPE-Zellen unterdrücken können (Saini et al. 2017). Gleichzeitig wurde vermutet, dass eine dysregulierte Autophagie zur AMD-Pathogenese beiträgt, sodass in dieser Arbeit der Einfluss veränderter Kulturbedingungen durch NA-Entzug auf die Autophagie-bezogenen Genmarker ermittelt wurde. Der NA-Entzug aus dem Kulturmedium resultierte hierbei in einer signifikanten Zunahme der Expression von *ATG5* und *ATG7* in iPSC-RPE-Zellen. Dies impliziert, dass ein NA-supplementiertes Kulturmedium die Induktion der Autophagie inhibiert. Im Gegensatz dazu würde eine physiologisch induzierte Autophagie zellulären Müll im RPE beseitigen und so protektiv auf degenerative Prozesse wirken (Zhang et al. 2020). Unsere Ergebnisse erweitern die Aussagen von Zhang und Kollegen, die die Auswirkungen der Autophagie-Defizienz in *Atg5/Atg7*-knockout-Mäusen untersuchten und feststellten, dass die Deletion von *Atg5* und *Atg7* zu einer Zunahme von oxidierten Zelltrümmern, sowie einer Verschlechterung des Abbaus von zellulärem Müll führte (Zhang et al. 2017). Dies unterstreicht die Notwendigkeit einer intakten Autophagie als zellulären Schutzmechanismus gegen oxidativen Stress und ordnet NA eine der Autophagie

übergeordnete antioxidative Funktion zu. Die Substitution von exogenem NA könnte ein Anhaltspunkt für die Entwicklung einer neuen Therapie für die AMD darstellen, da geringere Konzentrationen von NA und dessen metabolische Vorläufer in altersabhängigen Erkrankungen mit chronischer Entzündung gezeigt wurden (Braidy et al. 2018). Daraus resultierten pathologische Auswirkungen auf die zelluläre DNA-Reparatur und Energiebereitstellung (Braidy et al. 2008; Braidy et al. 2018; Braidy und Liu 2020).

In unserer Arbeit an iPSC-RPE-Zellen zeigte der SI-vermittelter oxidativer Stress keinen reproduzierbaren Einfluss auf die Autophagie-bezogenen Marker *ATG5* und *ATG7*. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass ROS und die Autophagie in einer paradoxen, reziproken Beziehung stehen (Chang et al. 2022). Einerseits können ROS die Induktion der Autophagie fördern, um die Zelle so vor aufkommenden Schäden zu schützen (Mitter et al. 2014). Andererseits können ROS das Kernprotein *ATG7* oxidieren und damit die Autophagie inhibieren (Filomeni et al. 2010; Chang et al. 2022). Der genaue Mechanismus der ROS-vermittelten Induktion bzw. Inhibierung der Autophagie ist noch ungeklärt. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass die Regulation von der Konzentration des oxidativen Stressors abhängig ist (Chang et al. 2022). Dies wurde von Su und Kollegen bestätigt, die in ihrer Studie zur neuronalen Apoptose feststellten, dass niedrige Wasserstoffperoxid-(H₂O₂)-Konzentrationen als oxidativer Stressor die Autophagie unterdrücken, während hohe Konzentrationen sie induzieren (Su et al. 2018). Interessant wäre also eine Studie mit SI als oxidativen Stressor in verschiedenen Konzentrationen an iPSC-RPE-Zellen, um zu ermitteln, ob es in diesem Modell auch einen Wendepunkt in der Regulation gibt.

Weiterhin wurden die Auswirkungen des NA-Entzuges auf die Expression mitochondrialer Genmarker untersucht. Dabei resultierte der NA-Entzug in allen acht iPSC-RPE-Zelllinien in einer signifikanten Zunahme der mRNA-Expressionsmarker von *COX4I1*, *SOD2* und *BCL2*. Aufgrund der Zunahme dieser Genmarker lässt sich eine Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase vermuten, die durch den Wegfall der antioxidativen Komponente NA gestört wurde. Interessant ist, dass das Nikotinamidadenindinukleotid-(NAD⁺)-Niveau in seneszenten ARPE19-Zellen sinkt, sodass wir auch für iPSC-RPE-Zellen eine Induktion der von uns ermittelten mitochondrialen Genmarker im Alter erwarten (Ren et al. 2022). Obwohl andere Arbeiten Nikotinamidmononukleotid (NMN) und NAD⁺ anstelle von NA nutzten,

werden die Stoffe äquivalent betrachtet, da diese im Organismus enzymatisch umwandelbar sind (Poddar et al. 2019). Da in der AMD-Pathogenese auch eine Dysregulation der mitochondrialen Funktionen wahrscheinlich ist, könnte ein anhaltender NA-Verlust im Alter langfristig zur Überforderung der zellulären Kompensationsmechanismen und damit zur AMD-Entstehung führen (Ebeling et al. 2021). Gleichzeitig zeigten Ren und Kollegen, dass eine Vorbehandlung von ARPE19-Zellen mit NMN den Alterungsprozess verlangsamte und zu signifikant geringeren intrazellulären ROS-Ansammlungen führte, was den Einsatz von NA als potentiell Agens in der Behandlung oder Prävention der AMD unterstrich (Ren et al. 2022). Eine adäquate NA-Zufuhr konnte mehrere AMD-assoziierte Signalwege unterdrücken und damit protektiv auf die RPE-Zellen wirken (Saini et al. 2017; Ren et al. 2022).

SI-vermittelter oxidativer Stress resultierte in einer signifikanten Abnahme der *BCL2*-Expression, was sich mit den Ergebnissen von Wang und Kollegen deckt, die durch die Applikation von H_2O_2 -vermitteltem oxidativem Stress in C57BL/6J-Mäusen ebenfalls die Induktion der Apoptose auslösen konnten (Wang et al. 2014). Es wäre denkbar, dass oxidativer Stress den programmierten Zelltod in iPSC-RPE-Zellen induziert, um eine Beschädigung von benachbartem Gewebe zu verhindern. Zusätzlich resultierte der oxidative Stress in einer signifikanten Zunahme der *PPARGC1A*-Expression. Die Induktion der Expression antioxidativer Gene könnte durch *PPARGC1A* gesteuert werden, um die zelluläre Resistenz gegenüber oxidativem Stress zu steigern (Iacovelli et al. 2016). Neuere Studien im Mausmodell bestätigen ebenfalls einen Einfluss des *PPARGC1A*-Genproduktes auf die zelluläre Abwehr gegenüber oxidativem Stress und diskutieren eine Steuerung der antioxidativen Schutzmechanismen sowie der Autophagie (Gurubaran et al. 2024). Auch in ARPE19-Zellen konnte eine Defizienz des *PPARGC1A*-Genproduktes mit einer gestörten mitochondrialen Funktion, erhöhter Anfälligkeit gegenüber oxidativem Stress und einem Einfluss auf den Lipidmetabolismus in Verbindung gebracht werden (Zhou et al. 2024).

Des Weiteren wurde untersucht, ob der NA-Zusatz im Kulturmedium der iPSC-RPE-Zellen den AMD-Phänotyp in Bezug auf zelluläre Antworten des Komplement-/Immunsystems unterdrückt. Wir zeigten, dass die Expression von *CFI* und *CCL2* hierbei als Folge des NA-Entzuges signifikant anstieg. Diese Ergebnisse bestätigen die von Saini und Kollegen, die ebenfalls eine signifikante Reduktion von *CFI* bzw.

CCL2 durch die NA-Zugabe verzeichneten (Saini et al. 2017). Dieselben Ergebnisse konnten wir mittels Zytokin-Array für die CCL2-Sekretion zeigen. Der genetische Status der Zelllinien hatte weder auf mRNA- noch auf Proteinexpression einen Einfluss. Der Einsatz des antioxidativen NA zeigte erneut einen protektiven Charakter auf die RPE-Zellen, da einerseits hohe intraokuläre CCL2-Pegel mit der NV assoziiert werden und dort weitere proinflammatorische Prozesse in Gang setzen (Jonas et al. 2010; Gudauskiene et al. 2022). Andererseits konnte die *CFI*-Expressionszunahme bei NA-Entzug als Kompensationsmechanismus zur negativen Regulation einer überschießenden Komplementaktivierung gedeutet werden (Jonas et al. 2010). Der durch oxidativen Stress verursachte *CFI*-Anstieg war im Sinne einer generalisierten Komplementaktivierung zu verstehen, welche mit der AMD-Pathogenese assoziiert wird und zu einer transienten Inflammation des RPEs führen kann. Entgegen unserer Erwartung führte die SI-Behandlung zu keiner Zunahme der *CCL2*-Expression, obwohl dies für akute Entzündungen und unter oxidativen Stressbedingungen im RPE bereits gezeigt werden konnte (Higgins et al. 2003; Nakazawa et al. 2007).

5.2 Direktionale Proteinsekretion und mRNA-Expressionsanalyse nach SI-vermittelten oxidativen Stress

Da Störungen in der direktionalen Sekretion von Proteinen aus dem RPE als ein weiterer Prozess diskutiert wird, welcher in der AMD-Pathogenese eine Rolle spielt, sollten die Auswirkungen des NA-Entzuges und des oxidativen SI-Stresses auf die Sekretion verschiedener Zytokine, Wachstums- und Komplementfaktoren untersucht werden. Die Ergebnisse beider Zytokin-Arrays nach oxidativem Stress unterschieden sich zwischen den biologischen Pseudoreplikaten jedoch stark, sodass die initialen Ergebnisse der Proteinsekretion von VEGF, FGF9, TGF β 2 und ANG nicht repliziert werden konnten. Anschließende mRNA-Expressionsanalysen der entsprechenden vier Gene zeigten zwischen den Replikaten ebenfalls divergierende Ergebnisse. Auch innerhalb der Replikate fanden sich inkongruente Ergebnisse zwischen Proteinsekretion und mRNA-Expression. Deshalb sind insgesamt die Vergleichbarkeit und Aussagekraft schwierig.

Bei der densitometrischen Auswertung der Zytokin-Arrays nahmen wir subjektiv zur Kenntnis, dass die allgemeine Signalstärke der Antigen-Antikörper-Reaktion (unabhängig vom nachgewiesenen Protein) auf den Zytokin-Membranen des zweiten

Replikats weniger intensiv wirkte. Damit erschienen diese Zytokin-Membranen blasser als es im ersten Ansatz der Fall war. Da unsere Arbeit die Methodik der Zytokin-Arrays laborintern einführte und die Erfahrungen dementsprechend fehlten, wurde von einem exogenen Einflussfaktor auf die Durchführung/Auswertung der Zytokin-Arrays ausgegangen. Eine technische Wiederholung des Versuches am zweiten Replikat wurde zunächst angefertigt, später jedoch abgebrochen, da keine Änderungen zum ersten technischen Replikat erkenntlich waren und damit ein methodischer Fehler ausgeschlossen wurde. Die in der Literatur häufigsten beschriebenen Limitationen im Umgang mit Zytokin-Arrays wurden durch Verwendung identischer Kit-Systeme sowie einer computerbasierten densitometrischen Versuchsauswertung zuvor vermieden (Tsang und Weatherbee 1996).

Mögliche Gründe für die starke Diskrepanz dieser Ergebnisse könnten im Umgang mit den Medienproben liegen. Durch wiederholte Einfrier- und Auftauprozesse könnten die temperatursensiblen Proteine in den Proben beschädigt worden sein. Ebenso nicht auszuschließen sind minimale Unterschiede exogener Faktoren (Temperatur, UV-Strahlung, Luftfeuchtigkeit) bei der praktischen Durchführung der Zytokin-Arrays, welche trotz größtmöglicher Sorgfalt nicht in Gänze steuerbar waren. Ob dies jedoch derartige Diskrepanzen zwischen Pseudoreplikaten verursacht, bleibt fraglich.

In der AMD-Pathogenese wird eine Dysregulation der Aufrechterhaltung einer zellulären Polarität und daraus resultierend eine veränderte direktionale Proteinsekretion angenommen (Kay et al. 2013). Dies könnte auch zu einer Änderung der physiologisch vorwiegend apikalen TGFβ2-Sekretion führen (Hirsch et al. 2014). TGFβ2 fördert die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) der RPE-Zellen, woraus der Verlust der RPE-Polarität und die Ablösung des RPEs von der BM folgen (Xu et al. 2009; Begum et al. 2017). Die durch die EMT verursachte subretinale Fibrose fand sich ebenfalls in der AMD-Ausprägung wieder (Tenbrock et al. 2022). Bereits im ARPE19-Zellkulturmodell konnte H₂O₂-vermittelter oxidativer Stress die TGFβ2-induzierte EMT verstärken (Yang et al. 2020). Deshalb hätten wir durch die SI-Zugabe in unserem iPSC-RPE-Modell ebenfalls eine Zunahme der TGFβ2-Sekretion vermutet. Zusätzlich unterdrückte TGFβ2 die Expression von *PPARGC1A* in ARPE19- und primären RPE-Zellen, woraus eine mitochondriale Fragmentierung und eine Reduktion der oxidativen Phosphorylierung mit folgendem ATP-Mangel resultierte (Shu et al. 2021). Dies steht im Einklang mit beschriebenen mitochondrialen Dysfunktionen im Rahmen der AMD-Pathogenese.

Des Weiteren wurde TGF β 2 eine Rolle in der Homöostase der retinalen Blutversorgung zugeschrieben. Studien berichteten, dass TGF β 2 eine Abnahme der VEGF-R2-Expression und der VEGF-vermittelten Angiogenese in Endothelzellen induzierte. Dabei wurde TGF β 2 hauptsächlich von RPE-Zellen sezerniert (Jeong et al. 2019). In C57BL/6J-Mäusen wurde nach SI-vermitteltem oxidativen Stress ebenfalls signifikant höhere *Tgf β* -Expressionen und signifikant niedrigere *Vegf*-Expressionen gemessen (Enzbrenner et al. 2021). Andere Publikationen zeigten in primären humanen RPE-Zellen, dass die VEGF-Expression und VEGF-Sekretion TGF β 2-vermittelt zunahm und dadurch proangiogene Effekte eingetreten sind (Naginei et al. 2003; Bian et al. 2007). Der genaue Interaktionsmechanismus zwischen TGF β 2 und VEGF wurde noch nicht abschließend geklärt, aber es konnten bereits Proteine in gemeinsamen Signalwegen identifiziert werden (Bian et al. 2007). In unseren Versuchen erwarteten wir eine TGF β 2-induzierte Zunahme der VEGF-Expression und der proangiogenen Faktoren VEGF (und ANG), da VEGF im Endstadium der NV-AMD stark überreguliert wird und die Induktion neuer Blutgefäße initiiert (Ishibashi et al. 1997). Zusätzlich wird ANG, ein weiterer proangiogener Faktor, mit der AMD-Entstehung assoziiert. Im Plasma von AMD-Patienten mit GA oder NV konnte eine Zunahme der ANG-Expression festgestellt werden, nachdem Plasmaproben kultiviert und anschließend *in vitro* Hypoxie ausgelöst wurde. Interessanterweise war die VEGF-Expression gleichzeitig nur bei Patienten mit NV erhöht (Ghosh et al. 2017). Dies könnte auf eine früh einsetzende Rolle von ANG in der AMD-Pathogenese hindeuten. An C57Bl/6-Mäusen und porcinen RPE-Zellen konnten weitere Studien ebenfalls gesteigerte ANG- und VEGF-Sekretionen nach mechanischem bzw. oxidativem Stress feststellen. ANG wurde dabei als Induktor des NRF2-Signalweges identifiziert (Hoang et al. 2019; Farjood et al. 2020). Diese Ergebnisse lassen einen Zusammenhang zwischen Angiogenese und antioxidativen Schutzfunktion im Rahmen der AMD-Erkrankung vermuten.

Die Rolle von FGF9 wurde in der Literatur in verschiedensten Forschungsrichtungen untersucht, findet aber bis dato nahezu keine Erwähnung in der Forschung zur AMD. Es konnte gezeigt werden, dass FGF2 als Reaktion auf eine Reihe von Stressfaktoren in humanen RPE-Zellen *in vitro* exprimiert wird (Hackett et al. 1997; Alizadeh et al. 2003). Des Weiteren zeigten Forschungen zur Sorsby Fundus Dystrophie (SFD), einer der AMD-Symptomatik vergleichbaren monogenen Krankheit verursacht durch Mutationen im *TIMP3*-Gen, bei der es ebenfalls zur NV kommt, dass FGF2 in *TIMP3*-

knock-in Mäusen und in konditionierten Medienproben von *TIMP3*-knock-in ARPE19-Zellen erhöht war (Qi et al. 2019). In porcinen Endothelzellen konnte anschließend die Induktion der Angiogenese durch FGF-Signalwege festgestellt werden (Qi et al. 2019). Ob die durch Stressbedingungen induzierte Angiogenese in iPSC-RPE-Zellen auch durch FGF-Homologe induziert werden kann und ob dieser Mechanismus auch in der AMD zu tragen kommt, bedarf weiterer Forschung.

Fortgesetzte Arbeiten zu der hier besprochenen Thematik können die Methodik verbessern, indem zukünftig Medienproben zunächst zentrifugiert und das Pellet, welches aus zellulärem Debris besteht, abgenommen wird. So kann ein vom Zellschrott ausgehender Einfluss auf die Proteine im Medium ausgeschlossen werden. Außerdem sollte die Anzahl der Replikate erhöht und ein direkter quantitativer Nachweis der vier Proteine mittels ELISA erbracht werden, um die statistische Reliabilität und die methodische Variabilität zu erhöhen.

Ein VEGF-ELISA der konditionierten Medienproben aus dem basalen Kompartiment wurde in dieser Arbeit angefertigt, weil VEGF dort vermehrt sezerniert wurde und bekannt war, dass es in der NV-AMD überexprimiert wird. Es sollte untersucht werden, ob die VEGF-Sekretion ins basale Kompartiment durch oxidativen Stress (SI-Zugabe) und veränderte Kulturbedingungen (NA-Entzug) beeinflusst wurde. Dabei resultierte der isolierte NA-Entzug als auch SI-vermittelter oxidativer Stress (unabhängig vom NA im Kulturmedium) in einer Zunahme der VEGF-Sekretion. Es wurden keine Unterschiede in der VEGF-Sekretion zwischen einem hohen und niedrigen AMD-Risikoprofil entdeckt.

Chen und Kollegen entdeckten in iPSC-RPE-Zellen nach oxidativem Stress eine Stimulation der VEGF-Sekretion, der proangiogene Effekte folgen würden (Kannan et al. 2006; Chen et al. 2022). Dies deckt sich mit unseren Ergebnissen, da der SI-induzierte Stress, unabhängig vom NA-Gehalt des Kulturmediums, zu einer Zunahme der VEGF-Sekretion führte. Entgegen einer weitläufigen Annahme stellt die alleinige erhöhte VEGF-Sekretion noch keine Induktion der NV dar. Hierfür sind weitere pathologische Alterationen, wie Schäden an der BM, vorauszusetzen (Schwesinger et al. 2001; Oshima et al. 2004).

Während VEGF meist überlebensfördernde Effekte zugeordnet wurde, gibt es ebenso Studien, die VEGF-vermittelte pro-apoptotische Auswirkungen auf das RPE neben der NV auch in der GA vermuten (Byeon et al. 2010; Kurihara et al. 2012). VEGF konnte zur Störung der Barrierefunktion des RPEs beitragen und so die Einwanderung von

Makrophagen mit anschließender Entzündungsreaktion erleichtern (Ablonczy et al. 2014). Außerdem können in C57BL/6J-Mäusen, die Vegf überexprimieren, eine Atrophie des RPEs und Defekte im Sehzyklus, wie die Abnahme des Rhodopsingehaltes, beobachtet werden (Ablonczy et al. 2014). In Mäusen, die Vegf überexprimierten, resultierte die Aktivierung von Inflammasomen in einer Degradation der Photoreptoren (Marneros 2016).

Unsere Ergebnisse bestätigen die durch oxidativen Stress vermittelte Zunahme der VEGF-Sekretion im iPSC-RPE-Modell und die Notwendigkeit weiterer Forschung, um die molekularen VEGF-Signalwege in der AMD-Pathogenese aufzuklären.

Gleichzeitig zeigten wir, dass die übermäßige VEGF-Sekretion unabhängig vom genetischen Status und damit dem AMD-Risikograd ist, zumindest für die in dieser Arbeit vorliegenden Zelllinien.

5.3 Auswirkungen des artifiziellen, oxidativen und physiologischen Stresses auf die Aktivierung des NRF2-Signalweges

Um die AMD bestmöglich *in vitro* darzustellen, wurde chronischer oxidativer Stress durch SI in iPSC-RPE-Zellen vermittelt, da dies unter Berücksichtigung des Faktors „Zeit“ die meist mehrjährige, progrediente AMD-Entstehung *in vivo* am stärksten nachahmt. Dabei wurde sowohl nach einwöchiger als auch nach dreiwöchiger Stressperiode eine Hochregulierung der *NQO1*-Expression in allen Zelllinien gemessen, unabhängig davon, ob die Zellen vorab für acht oder zehn Wochen ungestresst kultiviert wurden.

Auffällig war, dass die dreiwöchige Stressperiode zu einer doppelt so starken Zunahme der *NQO1*-Expression führte als es nach einwöchigem Stress der Fall war. Der genetische Status hatte hierbei keinen Einfluss auf die Stressantwort. Diese Ergebnisse unterstreichen die Hypothese, dass die RPE-Zellen über den NRF2-Signalweg antioxidative Schutzfunktionen nach SI-Stress induzieren. Der daraus resultierende Anstieg der *NQO1*-Expression zeigte eine Abhängigkeit vom Zeitintervall des oxidativen Stresses. Dieser gleichgerichtete *NQO1*-Anstieg in allen Zelllinien steht im Einklang mit vielen Publikationen, sowohl an iPSC-RPE-Zellen, als auch an ARPE19-Zellen (Hanus et al. 2015b; Garcia et al. 2015; Plössl et al. 2022). An iPSC-RPE-Zellen konnte außerdem gezeigt werden, dass ein dreiwöchiger im Vergleich zu einwöchigem Paraquat-induzierte Stress zu einer signifikant höheren *NQO1*-

Expression führte (Garcia et al. 2015). Wir konnten ebenso ein signifikantes Ergebnis für den SI-Stressor erzielen.

Interessanterweise zeigten unsere Ergebnisse, dass die einwöchige SI-Induktion nach acht im Vergleich zu zehn Wochen ungestresster Kultivierungszeit die *NQO1*-Expression doppelt so stark hochregulierte. Dies impliziert, dass die antioxidativen Schutzfunktionen im Alter beeinträchtigt sein könnten. Diese Ergebnisse decken sich mit einer Studie, die postulierte, dass ältere C57Bl6/J-Mäuse im Vergleich zu jüngeren nach gleich langem SI-induzierten Stress nur über defiziente Schutzmechanismen verfügen (Sachdeva et al. 2014). Die Integration dieser Ergebnisse in den Kontext der AMD-Pathogenese ergibt ebenfalls Sinn, da das Alter als größter Risikofaktor für die AMD-Entstehung gesehen wird und die erhöhte Anfälligkeit gegenüber oxidativem Stress erklärt. Es muss jedoch immer berücksichtigt werden, dass unsere iPSC-RPE-Zellen den Faktor Zeit *in vitro* nur bedingt darstellen können und die tatsächlich ungestressten und gestressten Zeiträumen *in vivo* hiervon stark abweichen.

Im Gegensatz zur *NQO1*-Hochregulierung in allen einzelnen Zelllinien, konnte weder nach ein- noch nach dreiwöchigem SI-Stress eine vergleichbare Änderung der *HMOX1*-Expression ermittelt werden. Das Protein *HMOX1* hat antioxidative Funktionen und spielt eine Rolle in der Regulation von Apoptose und der Modulation von Entzündungen. Ein Zusammenhang von altersabhängigen Krankheiten, wie Krebserkrankungen, Alzheimer und der AMD, mit Störungen in adäquaten *HMOX1*-Expressionen konnte gezeigt werden (Loboda et al. 2016). Außerdem könnte diese Unregelmäßigkeit der *HMOX1*-Genexpression damit erklärt werden, dass die Länge der (GT)_n-reichen Promotorregion des *HMOX1*-Genes die Induktion der *HMOX1*-Expression signifikant beeinflusst, jedoch die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien nicht auf die Anzahl dieser Wiederholungen untersucht wurden (Taha et al. 2010; Loboda et al. 2016). Ob diese Erklärung zutreffend ist, bleibt fraglich, da vorherige Arbeiten *HMOX1*-Anstiege an denselben iPSC-RPE-Zelllinien feststellten, welche auch in dieser Arbeit genutzt wurden. Neben dem NRF2-Signalweg wird die Transkription von *HMOX1* auch über andere Transkriptionsfaktoren (Hitzeschock-Faktoren, NF-κB, AP1-Familie) reguliert, welche alle über einen spezifischen Stressor die *HMOX1*-Transkription beeinflussen (Alam und Cook 2007). Durch diese feinjustierte Regulation könnte es zu einer ausgebliebenen *HMOX1*-, jedoch gestiegenen *NQO1*-Expression gekommen sein. Harada und Kollegen fanden heraus, dass der initiale *HMOX1*-Expressionsanstieg unter Stressbedingungen durch

Arsenite-Zugabe in murinen embryonale Fibroblasten durch Transkriptionsfaktoren des NRF2-Signalweg verursacht wurde. Nach 24 h waren die NRF2-Expressionen jedoch auf das basale Niveau gesunken, sodass der permanente *HMOX1*-Anstieg durch andere TK-Faktoren bedingt wurde (Harada et al. 2008). Studien könnten an diesen Ergebnissen ansetzen, um die Translokation des NRF2 in den Zellkern zu belegen und damit NRF2 als Induktor der Langzeit-Stressantwort zu bestätigen. Unsere Ergebnisse widersprechen jedoch denen anderer Arbeiten, die nach appliziertem oxidativem Stress in älteren C57Bl6/J-Mäusen zwar eine schwächere, jedoch trotzdem induzierbare *Hmox1*-Expression feststellten (Sachdeva et al. 2014). Gründe für diese diskrepanten Ergebnisse könnte auf den Einsatz verschiedener Stressoren in den RPE-Modellen, sowie deren unterschiedlich eingesetzten Konzentrationen, aber auch auf verschieden lange Kultivierungsbedingungen bzw. das Alter im Mausmodell sein. Vereinheitlichte Stress- und Kultivierungsbedingungen zukünftiger Arbeiten würden die Vergleichbarkeit verbessern.

Abschließend wurden die iPSC-RPE-Zellen durch eine zweiwöchige POS-Phagozytose nicht mit artifiziellem, chemischem SI, sondern physiologisch über POS gestresst, um den *in vivo*-Stress bestmöglich zu simulieren. Daraufhin wurde die Expression antioxidativer Genmarker mittels qRT-PCR gemessen. Das Expressionsniveau von *HMOX1* und *NQO1* zeigte innerhalb aller Zelllinien keine gleichgerichteten Änderungen, sodass auch der HR/LR-Vergleich kein verwertbares Ergebnis liefern konnte. Lediglich eine Kultivierungsbedingung in den LR-Zelllinien zeigte entgegen unseren Erwartungen signifikante Abnahmen der *HMOX1*- und *NQO1*-Expression. Dabei decken sich unsere Ergebnisse mit denen einer früheren Studie am Institut für Humangenetik Regensburg an iPSC-RPE-Zellen, die den POS-Stress nur für eine Woche induzierten, aber ebenfalls keinen Anstieg der *HMOX1*- und *NQO1*-Expression ermittelten (Cornelia Nees, 2022, unpublizierte Daten). Auch 4-Hydroxynonenal-(HNE)-modifizierte POS, welche im Vergleich zu unmodifizierten POS resistenter gegen lysosomale Degradation waren, zeigten nach einwöchigem POS-Stress ebenfalls unveränderte *HMOX1*- und *NQO1*-Expressionen (Kaemmerer et al. 2007). Darüber hinaus war bekannt, dass die Phagozytose HNE-modifizierter POS zur Akkumulation und Speicherung nicht abgebauter modifizierter Proteine und zu einer Dysfunktion des lysosomalen Abbaus führte, was die Lipofuszinogenese in RPE-Zellen induzierte (Kaemmerer et al. 2007; Krohne et al. 2010). Akkumuliertes

Lipofuszin und die AMD-Pathogenese werden assoziiert, jedoch sind Ursache und Wirkung noch nicht vollständig geklärt (Katz 2002).

Die Gründe für das unerwartete Fehlen der Induktion einer antioxidativen Zellantwort nach Induktion eines physiologischen Stressors sind vielfältig. Einerseits könnte der zweiwöchige POS-Stress zu kurz gewesen sein, andererseits könnte die festgelegte POS-Konzentration zu gering gewesen sein, obwohl sich diese in anderen Studien zu immunzytochemischen Untersuchungen und in POS-Phagozytose Assays bewährte (Singh et al. 2013; Brandl et al. 2014). Da die POS-Degradation *in vivo* den wichtigsten Stressor für das RPE und die Hauptquelle für zellulären Debris darstellt, sollte das Modell der POS-Phagozytose in iPSC-RPE-Zellen modifiziert werden, um die Ermittlung POS-induzierter zellulärer Stressantworten mit Beteiligung des NRF2-Signalweges weiter aufzuklären.

6 Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Arbeit wurden Auswirkungen von oxidativem Stress und von veränderten Kulturbedingungen in iPSC-RPE-Zellen mit bekanntem genetischen Risikoprofil für die AMD auf das Komplement-/Immunsystem, die Autophagie und mitochondriale Prozesse untersucht. Der NA-Entzug resultierte in einer Zunahme der Expressionen der untersuchten Gene, während die Induktion von oxidativem Stress zu Zunahmen der Expression von *PPARGC1A* und *CFI*, jedoch zu Abnahmen von *ATG5*, *ATG7* und *BCL2* führte. Mittels Zytokin-Arrays wurden weiterhin vier Proteine mit möglicher dysregulierter direktonaler Sekretion identifiziert, wobei diese Resultate in einem zweiten unabhängigen Versuch aus bisher ungeklärten Gründen nicht repliziert werden konnten.

Während POS-vermittelter physiologischer Stress in keiner messbar induzierten Zellantwort resultierte, folgte die Behandlung der Zellen mit SI zu eindeutig messbarem chemisch oxidativem Stress. Hierbei zeigte sich eine verstärkte antioxidative Zellantwort nach längerem chronisch oxidativem Stress, sowie eine altersbedingte Beeinträchtigung der Induktion einer antioxidativen Antwort über den NRF2-Signalweg.

Da wir keine stetigen Unterschiede der Zellantworten vor dem genetischen Hintergrund der iPSC-RPE-Zellen aufzeigen konnten, schlussfolgern wir, dass die genetische Prädisposition unsere adressierten Konstituenten nicht beeinflusste.

Unsere Arbeit legt einen präventiven Charakter der NA-Supplementierung auf die Induktion AMD-assoziiierter Prozesse nahe und fordert die Loslösung der isolierten Betrachtung des RPEs, und die Berücksichtigung dessen parakriner Effekte auf angrenzende Zellverbände.

7 Anhang

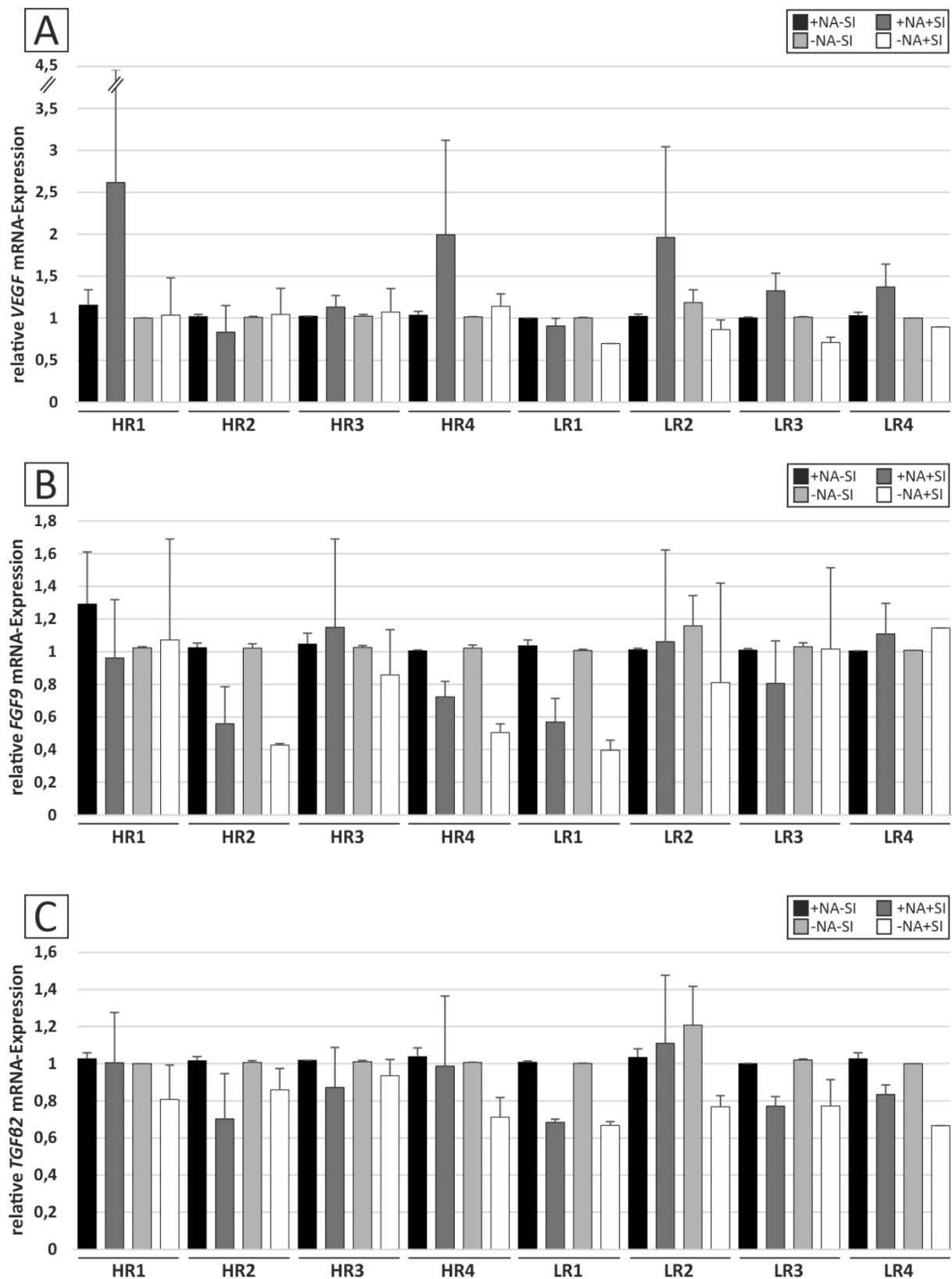


Abbildung 28: Relative mRNA-Expression von *VEGF* (A), *FGF9* (B) und *TGFβ2* (C) von acht Wochen alten iPSC-RPE-Zellen nach SI-vermitteltem Stress in NA-zugesetztem und

NA-freiem Kulturmedium. Je vier HR- und LR-Zelllinien wurden in den letzten zwei Wochen mit 0,125 mM SI (+SI) gestresst, jeweils in Kulturmedium mit und ohne NA-Zusatz. Die Kontrollen wurde nicht gestresst (0 mM SI; -SI). Das Expressionsniveau wurde auf das Referenzgen *HPRT* normalisiert, anschließend wurde das Expressionsniveau von *VEGF/FGF9/TGF β 2* gegen die Kontrolle kalibriert. Angegeben sind die Mittelwerte der Messungen mit Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Versuchen.

8 Literaturverzeichnis

Ablonczy, Zsolt; Dahrouj, Mohammad; Marneros, Alexander G. (2014): Progressive dysfunction of the retinal pigment epithelium and retina due to increased VEGF-A levels. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 28 (5), S. 2369–2379. DOI: 10.1096/fj.13-248021.

Alam, Jawed; Cook, Julia L. (2007): How many transcription factors does it take to turn on the heme oxygenase-1 gene? In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 36 (2), S. 166–174. DOI: 10.1165/rcmb.2006-0340TR.

Alizadeh, Mitra; Miyamura, Noritake; Handa, James T.; Hjelmeland, Leonard M. (2003): Human RPE cells express the FGFR2IIIc and FGFR3IIIc splice variants and FGF9 as a potential high affinity ligand. In: *Experimental eye research* 76 (2), S. 249–256. DOI: 10.1016/S0014-4835(02)00252-X.

Al-Zamil, Waseem M.; Yassin, Sanaa A. (2017): Recent developments in age-related macular degeneration: a review. In: *Clinical Interventions in Aging* 12, S. 1313–1330. DOI: 10.2147/CIA.S143508.

An, Eunkyung; Lu, Xiaoning; Flippin, Jessica; Devaney, Joseph M.; Halligan, Brian; Hoffman, Eric P. et al. (2006): Secreted proteome profiling in human RPE cell cultures derived from donors with age related macular degeneration and age matched healthy donors. In: *Journal of proteome research* 5 (10), S. 2599–2610. DOI: 10.1021/pr060121j.

Begum, Ghazala; O'Neill, Jenna; Blachford, Karen; Rauz, Saaeha; Scott, Robert A. H.; Logan, Ann; Blanch, Richard J. (2017): Transforming growth factor beta 2 as a biomarker for detection of disease progression of proliferative vitreoretinopathy. In: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 58 (8), S. 5979, zuletzt geprüft am 20.09.2022.

Bertram, Kurt M.; Baglolle, Carolyn J.; Phipps, Richard P.; Libby, Richard T. (2009): Molecular regulation of cigarette smoke induced-oxidative stress in human retinal pigment epithelial cells: implications for age-related macular degeneration. In: *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 297 (5), C1200-10. DOI: 10.1152/ajpcell.00126.2009.

Bhattacharya, Sujoy; Yin, Jinggang; Huo, Weihong; Chaum, Edward (2022): Modeling of mitochondrial bioenergetics and autophagy impairment in MELAS-mutant iPSC-derived retinal pigment epithelial cells. In: *Stem cell research & therapy* 13 (1), S. 260. DOI: 10.1186/s13287-022-02937-6.

Bian, Zong-Mei; Elner, Susan G.; Elner, Victor M. (2007): Regulation of VEGF mRNA Expression and Protein Secretion by TGF- β 2 in Human Retinal Pigment Epithelial Cells. In: *Experimental eye research* 84 (5), S. 812–822. DOI: 10.1016/j.exer.2006.12.016.

Bird, A. C.; Bressler, N. M.; Bressler, S. B.; Chisholm, I. H.; Coscas, G.; Davis, M. D. et al. (1995): An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. In: *Survey of ophthalmology* 39 (5), S. 367–374. DOI: 10.1016/s0039-6257(05)80092-x.

Bosch, E.; Horwitz, J.; Bok, D. (1993): Phagocytosis of outer segments by retinal pigment epithelium: phagosome-lysosome interaction. In: *The journal of*

histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society 41 (2), S. 253–263. DOI: 10.1177/41.2.8419462.

Braidy, Nady; Berg, Jade; Clement, James; Khorshidi, Fatemeh; Poljak, Anne; Jayasena, Tharusha et al. (2018): Role of Nicotinamide Adenine Dinucleotide and Related Precursors as Therapeutic Targets for Age-Related Degenerative Diseases: Rationale, Biochemistry, Pharmacokinetics, and Outcomes. In: *Antioxidants & Redox Signaling* 30 (2), S. 251–294. DOI: 10.1089/ars.2017.7269.

Braidy, Nady; Guillemin, Gilles; Grant, Ross (2008): Promotion of cellular NAD(+) anabolism: therapeutic potential for oxidative stress in ageing and Alzheimer's disease. In: *Neurotoxicity research* 13 (3-4), S. 173–184. DOI: 10.1007/BF03033501.

Braidy, Nady; Liu, Yue (2020): NAD⁺ therapy in age-related degenerative disorders: A benefit/risk analysis. In: *Experimental gerontology* 132, S. 110831. DOI: 10.1016/j.exger.2020.110831.

Brandl, Caroline; Brücklmayer, Christiane; Günther, Felix; Zimmermann, Martina E.; Küchenhoff, Helmut; Helbig, Horst et al. (2019): Retinal Layer Thicknesses in Early Age-Related Macular Degeneration: Results From the German AugUR Study. In: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 60 (5), S. 1581–1594. DOI: 10.1167/iovs.18-25332.

Brandl, Caroline; Zimmermann, Stephanie J.; Milenkovic, Vladimir M.; Rosendahl, Sibylle M. G.; Grassmann, Felix; Milenkovic, Andrea et al. (2014): In-depth characterisation of Retinal Pigment Epithelium (RPE) cells derived from human induced pluripotent stem cells (hiPSC). In: *Neuromolecular medicine* 16 (3), S. 551–564. DOI: 10.1007/s12017-014-8308-8.

Brown, Emily E.; DeWeerd, Alexander J.; Ildefonso, Cristhian J.; Lewin, Alfred S.; Ash, John D. (2019): Mitochondrial oxidative stress in the retinal pigment epithelium (RPE) led to metabolic dysfunction in both the RPE and retinal photoreceptors. In: *Redox biology* 24, S. 101201. DOI: 10.1016/j.redox.2019.101201.

Byeon, Suk Ho; Lee, Sung Chul; Choi, Soo Hyun; Lee, Hyung-Keun; Lee, Joon H.; Chu, Young Kwang; Kwon, Oh Woong (2010): Vascular endothelial growth factor as an autocrine survival factor for retinal pigment epithelial cells under oxidative stress via the VEGF-R2/PI3K/Akt. In: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51 (2), S. 1190–1197. DOI: 10.1167/iovs.09-4144.

Casten, Robin J.; Rovner, Barry W. (2013): Update on depression and age-related macular degeneration. In: *Current opinion in ophthalmology* 24 (3), S. 239–243. DOI: 10.1097/ICU.0b013e32835f8e55.

Chang, Andrew; Schlottmann, Patricio G.; Chan, R. V. Paul (2017): Latest Developments in the Management of AMD. In: *Asia-Pacific journal of ophthalmology (Philadelphia, Pa.)* 6 (6), S. 477–478. DOI: 10.22608/APO.2017480.

Chang, Kun-Che; Liu, Pei-Feng; Chang, Chia-Hsuan; Lin, Ying-Cheng; Chen, Yen-Ju; Shu, Chih-Wen (2022): The interplay of autophagy and oxidative stress in the pathogenesis and therapy of retinal degenerative diseases. In: *Cell & bioscience* 12 (1), S. 1. DOI: 10.1186/s13578-021-00736-9.

Chen, Lisheng; Perera, N. Dayanthi; Karoukis, Athanasios J.; Feathers, Kecia L.; Ali, Robin R.; Thompson, Debra A.; Fahim, Abigail T. (2022): Oxidative stress differentially impacts apical and basolateral secretion of angiogenic factors from human iPSC-derived retinal pigment epithelium cells. In: *Scientific reports* 12 (1), S. 12694. DOI: 10.1038/s41598-022-16701-6.

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

Clemons, Traci E.; Milton, Roy C.; Klein, Ronald; Seddon, Johanna M.; Ferris, Frederick L. (2005): Risk factors for the incidence of Advanced Age-Related Macular Degeneration in the Age-Related Eye Disease Study (AREDS) AREDS report no. 19. In: *Ophthalmology* 112 (4), S. 533–539. DOI: 10.1016/j.ophtha.2004.10.047.

Colijn, Johanna M.; Buitendijk, Gabriëlle H. S.; Prokofyeva, Elena; Alves, Dalila; Cachulo, Maria L.; Khawaja, Anthony P. et al. (2017): Prevalence of Age-Related Macular Degeneration in Europe: The Past and the Future. In: *Ophthalmology* 124 (12), S. 1753–1763. DOI: 10.1016/j.ophtha.2017.05.035.

Curcio, C. A.; Medeiros, N. E.; Millican, C. L. (1996): Photoreceptor loss in age-related macular degeneration. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 37 (7), S. 1236–1249.

Dawson, D. W.; Volpert, O. V.; Gillis, P.; Crawford, S. E.; Xu, H.; Benedict, W.; Bouck, N. P. (1999): Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. In: *Science (New York, N.Y.)* 285 (5425), S. 245–248. DOI: 10.1126/science.285.5425.245.

Decanini, Alejandra; Nordgaard, Curtis L.; Feng, Xiao; Ferrington, Deborah A.; Olsen, Timothy W. (2007): Changes in select redox proteins of the retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration. In: *American journal of ophthalmology* 143 (4), S. 607–615. DOI: 10.1016/j.ajo.2006.12.006.

Dunaief, Joshua L.; Dentchev, Tzvete; Ying, Gui-Shuang; Milam, Ann H. (2002): The role of apoptosis in age-related macular degeneration. In: *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)* 120 (11), S. 1435–1442. DOI: 10.1001/archophth.120.11.1435.

Ebeling, Mara C.; Geng, Zhaohui; Kapphahn, Rebecca J.; Roehrich, Heidi; Montezuma, Sandra R.; Dutton, James R.; Ferrington, Deborah A. (2021): Impaired Mitochondrial Function in iPSC-Retinal Pigment Epithelium with the Complement Factor H Polymorphism for Age-Related Macular Degeneration. In: *Cells* 10 (4). DOI: 10.3390/cells10040789.

Ebeling, Mara C.; Geng, Zhaohui; Stahl, Madilyn R.; Kapphahn, Rebecca J.; Roehrich, Heidi; Montezuma, Sandra R. et al. (2022): Testing Mitochondrial-Targeted Drugs in iPSC-RPE from Patients with Age-Related Macular Degeneration. In: *Pharmaceuticals* 15 (1). DOI: 10.3390/ph15010062.

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

Elmore, Susan (2007): Apoptosis: a review of programmed cell death. In: *Toxicologic pathology* 35 (4), S. 495–516. DOI: 10.1080/01926230701320337.

Enzbrenner, Anne; Zulliger, Rahel; Biber, Josef; Pousa, Ana Maria Quintela; Schäfer, Nicole; Stucki, Corinne et al. (2021): Sodium Iodate-Induced Degeneration Results in Local Complement Changes and Inflammatory Processes in Murine Retina. In: *International journal of molecular sciences* 22 (17). DOI: 10.3390/ijms22179218.

- Fagerness, Jesen A.; Maller, Julian B.; Neale, Benjamin M.; Reynolds, Robyn C.; Daly, Mark J.; Seddon, Johanna M. (2009): Variation near complement factor I is associated with risk of advanced AMD. In: *European journal of human genetics : EJHG* 17 (1), S. 100–104. DOI: 10.1038/ejhg.2008.140.
- Farjood, Farhad; Ahmadpour, Amir; Ostvar, Sassan; Vargis, Elizabeth (2020): Acute mechanical stress in primary porcine RPE cells induces angiogenic factor expression and in vitro angiogenesis. In: *Journal of biological engineering* 14, S. 13. DOI: 10.1186/s13036-020-00235-4.
- Feher, Janos; Kovacs, Illes; Artico, Marco; Cavallotti, Carlo; Papale, Antonio; Balacco Gabrieli, Corrado (2006): Mitochondrial alterations of retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration. In: *Neurobiology of aging* 27 (7), S. 983–993. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2005.05.012.
- Fields, Mark; Cai, Hui; Gong, Jie; Del Priore, Lucian (2016): Potential of Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs) for Treating Age-Related Macular Degeneration (AMD). In: *Cells* 5 (4). DOI: 10.3390/cells5040044.
- Filomeni, Giuseppe; Desideri, Enrico; Cardaci, Simone; Rotilio, Giuseppe; Ciriolo, Maria Rosa (2010): Under the ROS...thiol network is the principal suspect for autophagy commitment. In: *Autophagy* 6 (7), S. 999–1005. DOI: 10.4161/auto.6.7.12754.
- Fisher, Cody R.; Ebeling, Mara C.; Geng, Zhaohui; Kapphahn, Rebecca J.; Roehrich, Heidi; Montezuma, Sandra R. et al. (2022): Human iPSC- and Primary-Retinal Pigment Epithelial Cells for Modeling Age-Related Macular Degeneration. In: *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 11 (4). DOI: 10.3390/antiox11040605.
- Fleckenstein, Monika; Mitchell, Paul; Freund, K. Bailey; Sadda, SriniVas; Holz, Frank G.; Brittain, Christopher et al. (2018): The Progression of Geographic Atrophy Secondary to Age-Related Macular Degeneration. In: *Ophthalmology* 125 (3), S. 369–390. DOI: 10.1016/j.ophtha.2017.08.038.
- Fritsche, Lars G.; Fariss, Robert N.; Stambolian, Dwight; Abecasis, Gonçalo R.; Curcio, Christine A.; Swaroop, Anand (2014): Age-related macular degeneration: genetics and biology coming together. In: *Annual review of genomics and human genetics* 15, S. 151–171. DOI: 10.1146/annurev-genom-090413-025610.
- Fritsche, Lars G.; Igl, Wilmar; Bailey, Jessica N. Cooke; Grassmann, Felix; Sengupta, Sebanti; Bragg-Gresham, Jennifer L. et al. (2016): A large genome-wide association study of age-related macular degeneration highlights contributions of rare and common variants. In: *Nature genetics* 48 (2), S. 134–143. DOI: 10.1038/ng.3448.
- Galloway, Chad A.; Dalvi, Sonal; Hung, Sandy S. C.; MacDonald, Leslie A.; Latchney, Lisa R.; Wong, Raymond C. B. et al. (2017): Drusen in patient-derived hiPSC-RPE models of macular dystrophies. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (39), E8214-23. DOI: 10.1073/pnas.1710430114.
- Gao, Jiangyuan; Cui, Jing Z.; To, Eleanor; Cao, Sijia; Matsubara, Joanne A. (2018): Evidence for the activation of pyroptotic and apoptotic pathways in RPE cells associated with NLRP3 inflammasome in the rodent eye. In: *Journal of neuroinflammation* 15 (1), S. 15. DOI: 10.1186/s12974-018-1062-3.
- Garcia, Thelma Y.; Gutierrez, Mark; Reynolds, Joseph; Lamba, Deepak A. (2015): Modeling the Dynamic AMD-Associated Chronic Oxidative Stress Changes in Human

ESC and iPSC-Derived RPE Cells. In: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 56 (12), S. 7480–7488. DOI: 10.1167/iovs.15-17251.

Gheorghe, Andreea; Mahdi, Labib; Musat, Ovidiu (2015): AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION. In: *Romanian Journal of Ophthalmology* 59 (2), S. 74–77. DOI: Review.

Ghosh, Arkasubhra; Chevour, Priyanka; Gopi Krishna, Santosh; Sinha, Shivani; Sinha, Debasish; Sethu, Swaminathan (2017): Elevated Angiogenin levels associated with both forms of age-related macular degeneration is regulated by hypoxia and telomerase. In: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 58 (8), S. 811.

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

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

Grassmann, Felix; Fauser, Sascha; Weber, Bernhard H. F. (2015): The genetics of age-related macular degeneration (AMD)--Novel targets for designing treatment options? In: *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceuticals : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* 95 (Pt B), S. 194–202. DOI: 10.1016/j.ejpb.2015.04.039.

Grassmann, Felix; Fritsche, Lars G.; Keilhauer, Claudia N.; Heid, Iris M.; Weber, Bernhard H. F. (2012): Modelling the genetic risk in age-related macular degeneration. In: *PloS one* 7 (5), e37979. DOI: 10.1371/journal.pone.0037979.

Grassmann, Felix; Schoenberger, Peter G. A.; Brandl, Caroline; Schick, Tina; Hasler, Daniele; Meister, Gunter et al. (2014): A circulating microRNA profile is associated with late-stage neovascular age-related macular degeneration. In: *PloS one* 9 (9), e107461. DOI: 10.1371/journal.pone.0107461.

Gu, S. M.; Thompson, D. A.; Srikumari, C. R.; Lorenz, B.; Finckh, U.; Nicoletti, A. et al. (1997): Mutations in RPE65 cause autosomal recessive childhood-onset severe retinal dystrophy. In: *Nature genetics* 17 (2), S. 194–197. DOI: 10.1038/ng1097-194.

Gudauskiene, Gaile; Vilkeviciute, Alvida; Gedvilaite, Greta; Liutkeviciene, Rasa; Zaliuniene, Dalia (2022): CCL2, CCR2 Gene Variants and CCL2, CCR2 Serum Levels Association with Age-Related Macular Degeneration. In: *Life (Basel, Switzerland)* 12 (7). DOI: 10.3390/life12071038.

Guimaraes, Thales Antonio Cabral de; Georgiou, Michalis; Bainbridge, James W. B.; Michaelides, Michel (2021): Gene therapy for neovascular age-related macular degeneration: rationale, clinical trials and future directions. In: *The British journal of ophthalmology* 105 (2), S. 151–157. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2020-316195.

Gurubaran, Iswariyaraja Sridevi; Watala, Cezary; Kostanek, Joanna; Szczepanska, Joanna; Pawlowska, Elzbieta; Kaarniranta, Kai; Blasiak, Janusz (2024): PGC-1 α regulates the interplay between oxidative stress, senescence and autophagy in the ageing retina important in age-related macular degeneration. In: *Journal of cellular and molecular medicine* 28 (8), e18051. DOI: 10.1111/jcmm.18051.

- Hackett, S. F.; Schoenfeld, C. L.; Freund, J.; Gottsch, J. D.; Bhargava, S.; Campochiaro, P. A. (1997): Neurotrophic factors, cytokines and stress increase expression of basic fibroblast growth factor in retinal pigmented epithelial cells. In: *Experimental eye research* 64 (6), S. 865–873. DOI: 10.1006/exer.1996.0256.
- Hageman, Gregory S.; Anderson, Don H.; Johnson, Lincoln V.; Hancox, Lisa S.; Taiber, Andrew J.; Hardisty, Lisa I. et al. (2005): A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (20), S. 7227–7232. DOI: 10.1073/pnas.0501536102.
- Haines, Jonathan L.; Hauser, Michael A.; Schmidt, Silke; Scott, William K.; Olson, Lana M.; Gallins, Paul et al. (2005): Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. In: *Science (New York, N.Y.)* 308 (5720), S. 419–421. DOI: 10.1126/science.1110359.
- Hanus, J.; Anderson, C.; Sarraf, D.; Ma, J.; Wang, S. (2016): Retinal pigment epithelial cell necroptosis in response to sodium iodate. In: *Cell death discovery* 2, S. 16054. DOI: 10.1038/cddiscovery.2016.54.
- Hanus, Jakub; Anderson, Chastain; Wang, Shusheng (2015a): RPE necroptosis in response to oxidative stress and in AMD. In: *Ageing research reviews* 24 (Pt B), S. 286–298. DOI: 10.1016/j.arr.2015.09.002.
- Hanus, Jakub; Kolkin, Alexander; Chimienti, Julia; Botsay, Sara; Wang, Shusheng (2015b): 4-Acetoxyphenol Prevents RPE Oxidative Stress-Induced Necrosis by Functioning as an NRF2 Stabilizer. In: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 56 (9), S. 5048–5059. DOI: 10.1167/iovs.15-16401.
- Harada, Harumi; Sugimoto, Rika; Watanabe, Ayaka; Taketani, Shigeru; Okada, Kosuke; Warabi, Eiji et al. (2008): Differential roles for Nrf2 and AP-1 in upregulation of HO-1 expression by arsenite in murine embryonic fibroblasts. In: *Free radical research* 42 (4), S. 297–304. DOI: 10.1080/10715760801975735.
- Heier, Jeffrey S.; Lad, Eleonora M.; Holz, Frank G.; Rosenfeld, Philip J.; Guymer, Robyn H.; Boyer, David et al. (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. In: *Lancet (London, England)* 402 (10411), S. 1434–1448. DOI: 10.1016/S0140-6736(23)01520-9.
- Higgins, Gareth T.; Wang, Jiang Huai; Dockery, Peter; Cleary, Philip E.; Redmond, H. Paul (2003): Induction of angiogenic cytokine expression in cultured RPE by ingestion of oxidized photoreceptor outer segments. In: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44 (4), S. 1775–1782. DOI: 10.1167/iovs.02-0742.
- Hirsch, Louis; Nazari, Hossein; Sreekumar, Parameswaran G.; Kannan, Ram; Dustin, Laurie; Zhu, Danhong et al. (2014): TGF- β 2 secretion from RPE decreases with polarization and becomes apically oriented. In: *Cytokine* 71 (2), S. 394–396. DOI: 10.1016/j.cyto.2014.11.014.
- Hoang, Trish T.; Johnson, Delinda A.; Raines, Ronald T.; Johnson, Jeffrey A. (2019): Angiogenin activates the astrocytic Nrf2/antioxidant-response element pathway and thereby protects murine neurons from oxidative stress. In: *The Journal of biological chemistry* 294 (41), S. 15095–15103. DOI: 10.1074/jbc.RA119.008491.

Hughes, Anne E.; Orr, Nick; Esfandiary, Hossein; Diaz-Torres, Martha; Goodship, Timothy; Chakravarthy, Usha (2006): A common CFH haplotype, with deletion of CFHR1 and CFHR3, is associated with lower risk of age-related macular degeneration. In: *Nature genetics* 38 (10), S. 1173–1177. DOI: 10.1038/ng1890.

Iacovelli, Jared; Rowe, Glenn C.; Khadka, Arogya; Diaz-Aguilar, Daniel; Spencer, Carrie; Arany, Zoltan; Saint-Geniez, Magali (2016): PGC-1 α Induces Human RPE Oxidative Metabolism and Antioxidant Capacity. In: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 57 (3), S. 1038–1051. DOI: 10.1167/iov.15-17758.

Idelson, Maria; Alper, Ruslana; Obolensky, Alexey; Ben-Shushan, Etti; Hemo, Itzhak; Yachimovich-Cohen, Nurit et al. (2009): Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional retinal pigment epithelium cells. In: *Cell stem cell* 5 (4), S. 396–408. DOI: 10.1016/j.stem.2009.07.002.

Ishibashi, T.; Hata, Y.; Yoshikawa, H.; Nakagawa, K.; Sueishi, K.; Inomata, H. (1997): Expression of vascular endothelial growth factor in experimental choroidal neovascularization. In: *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 235 (3), S. 159–167. DOI: 10.1007/BF00941723.

Jakobsdottir, Johanna; Conley, Yvette P.; Weeks, Daniel E.; Mah, Tammy S.; Ferrell, Robert E.; Gorin, Michael B. (2005): Susceptibility Genes for Age-Related Maculopathy on Chromosome 10q26. In: *American Journal of Human Genetics* 77 (3), S. 389–407.

Jarrett, Stuart G.; Lin, Haijiang; Godley, Bernard F.; Boulton, Michael E. (2008): Mitochondrial DNA damage and its potential role in retinal degeneration. In: *Progress in retinal and eye research* 27 (6), S. 596–607. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2008.09.001.

Jeong, Han-Seok; Yun, Jang-Hyuk; Lee, Da-Hye; Lee, Eun Hui; Cho, Chung-Hyun (2019): Retinal pigment epithelium-derived transforming growth factor- β 2 inhibits the angiogenic response of endothelial cells by decreasing vascular endothelial growth factor receptor-2 expression. In: *Journal of cellular physiology* 234 (4), S. 3837–3849. DOI: 10.1002/jcp.27156.

Jiao, Xiaoling; Peng, Yuan; Yang, Liu (2014): Minocycline protects retinal ganglion cells after optic nerve crush injury in mice by delaying autophagy and upregulating nuclear factor- κ B2. In: *Chinese medical journal* 127 (9), S. 1749–1754.

Joachim, Nichole; Mitchell, Paul; Rochtchina, Elena; Tan, Ava Grace; Wang, Jie Jin (2014): Incidence and progression of reticular drusen in age-related macular degeneration: findings from an older Australian cohort. In: *Ophthalmology* 121 (4), S. 917–925. DOI: 10.1016/j.ophtha.2013.10.043.

Jonas, Jost B.; Cheung, Chui Ming Gemmy; Panda-Jonas, Songhomitra (2017): Updates on the Epidemiology of Age-Related Macular Degeneration. In: *Asia-Pacific journal of ophthalmology (Philadelphia, Pa.)* 6 (6), S. 493–497. DOI: 10.22608/APO.2017251.

Jonas, Jost B.; Tao, Yong; Neumaier, Michael; Findeisen, Peter (2010): Monocyte chemoattractant protein 1, intercellular adhesion molecule 1, and vascular cell adhesion molecule 1 in exudative age-related macular degeneration. In: *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)* 128 (10), S. 1281–1286. DOI: 10.1001/archophthalmol.2010.227.

- Jonasson, Fridbert; Fisher, Diana E.; Eiriksdottir, Gudny; Sigurdsson, Sigurdur; Klein, Ronald; Launer, Lenore J. et al. (2014): Five-year incidence, progression, and risk factors for age-related macular degeneration: the age, gene/environment susceptibility study. In: *Ophthalmology* 121 (9), S. 1766–1772. DOI: 10.1016/j.ophtha.2014.03.013.
- Kaarniranta, Kai; Sinha, Debasish; Blasiak, Janusz; Kauppinen, Anu; Veréb, Zoltán; Salminen, Antero et al. (2013): Autophagy and heterophagy dysregulation leads to retinal pigment epithelium dysfunction and development of age-related macular degeneration. In: *Autophagy* 9 (7), S. 973–984. DOI: 10.4161/auto.24546.
- Kaarniranta, Kai; Tokarz, Paulina; Koskela, Ali; Paterno, Jussi; Blasiak, Janusz (2017): Autophagy regulates death of retinal pigment epithelium cells in age-related macular degeneration. In: *Cell biology and toxicology* 33 (2), S. 113–128. DOI: 10.1007/s10565-016-9371-8.
- Kaarniranta, Kai; Uusitalo, Hannu; Blasiak, Janusz; Felszeghy, Szabolcs; Kannan, Ram; Kauppinen, Anu et al. (2020): Mechanisms of mitochondrial dysfunction and their impact on age-related macular degeneration. In: *Progress in retinal and eye research* 79, S. 100858. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2020.100858.
- Kaemmerer, Elke; Schutt, Florian; Krohne, Tim U.; Holz, Frank G.; Kopitz, Jurgen (2007): Effects of lipid peroxidation-related protein modifications on RPE lysosomal functions and POS phagocytosis. In: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48 (3), S. 1342–1347. DOI: 10.1167/iovs.06-0549.
- Kannan, Ram; Hinton, David R. (2014): Sodium iodate induced retinal degeneration: new insights from an old model. In: *Neural Regeneration Research* 9 (23), S. 2044–2045. DOI: 10.4103/1673-5374.147927.
- Kannan, Ram; Zhang, Ning; Sreekumar, Parameswaran G.; Spee, Christine K.; Rodriguez, Anthony; Barron, Ernesto; Hinton, David R. (2006): Stimulation of apical and basolateral VEGF-A and VEGF-C secretion by oxidative stress in polarized retinal pigment epithelial cells. In: *Molecular vision* 12, S. 1649–1659.
- Karampelas, Michael; Malamos, Panagiotis; Petrou, Petros; Georgalas, Ilias; Papaconstantinou, Dimitrios; Brouzas, Dimitrios (2020): Retinal Pigment Epithelial Detachment in Age-Related Macular Degeneration. In: *Ophthalmology and Therapy* 9 (4), S. 739–756. DOI: 10.1007/s40123-020-00291-5.
- Katz, Martin L. (2002): Potential role of retinal pigment epithelial lipofuscin accumulation in age-related macular degeneration. In: *Archives of gerontology and geriatrics* 34 (3), S. 359–370. DOI: 10.1016/s0167-4943(02)00012-2.
- Kay, Paul; Yang, Yit C.; Paraoan, Luminita (2013): Directional protein secretion by the retinal pigment epithelium: roles in retinal health and the development of age-related macular degeneration. In: *Journal of cellular and molecular medicine* 17 (7), S. 833–843. DOI: 10.1111/jcmm.12070.
- Keeling, Eloise; Lotery, Andrew J.; Tumbarello, David A.; Ratnayaka, J. Arjuna (2018): Impaired Cargo Clearance in the Retinal Pigment Epithelium (RPE) Underlies Irreversible Blinding Diseases. In: *Cells* 7 (2). DOI: 10.3390/cells7020016.
- Kevany, Brian M.; Palczewski, Krzysztof (2010): Phagocytosis of retinal rod and cone photoreceptors. In: *Physiology (Bethesda, Md.)* 25 (1), S. 8–15. DOI: 10.1152/physiol.00038.2009.

Khan, Kamron N.; Mahroo, Omar A.; Khan, Rehna S.; Mohamed, Moin D.; McKibbin, Martin; Bird, Alan et al. (2016): Differentiating drusen: Drusen and drusen-like appearances associated with ageing, age-related macular degeneration, inherited eye disease and other pathological processes. In: *Progress in retinal and eye research* 53, S. 70–106. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2016.04.008.

Khanani, Arshad M.; Thomas, Mathew J.; Aziz, Aamir A.; Weng, Christina Y.; Danzig, Carl J.; Yiu, Glenn et al. (2022): Review of gene therapies for age-related macular degeneration. In: *Eye (London, England)* 36 (2), S. 303–311. DOI: 10.1038/s41433-021-01842-1.

Kiser, Philip D.; Golczak, Marcin; Palczewski, Krzysztof (2014): Chemistry of the retinoid (visual) cycle. In: *Chemical reviews* 114 (1), S. 194–232. DOI: 10.1021/cr400107q.

Klettner, Alexa; Kaya, Leyla; Flach, Janina; Lassen, Jens; Treumer, Felix; Roider, Johann (2015): Basal and apical regulation of VEGF-A and placenta growth factor in the RPE/choroid and primary RPE. In: *Molecular vision* 21, S. 736–748.

Kokkinaki, Maria; Sahibzada, Niaz; Golestaneh, Nady (2011): Human induced pluripotent stem-derived retinal pigment epithelium (RPE) cells exhibit ion transport, membrane potential, polarized vascular endothelial growth factor secretion, and gene expression pattern similar to native RPE. In: *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 29 (5), S. 825–835. DOI: 10.1002/stem.635.

Krohne, Tim U.; Stratmann, Nina K.; Kopitz, Jürgen; Holz, Frank G. (2010): Effects of lipid peroxidation products on lipofuscinogenesis and autophagy in human retinal pigment epithelial cells. In: *Experimental eye research* 90 (3), S. 465–471. DOI: 10.1016/j.exer.2009.12.011.

Krüger Falk, Mads; Kemp, Henrik; Sørensen, Torben Lykke (2013): Four-year treatment results of neovascular age-related macular degeneration with ranibizumab and causes for discontinuation of treatment. In: *American journal of ophthalmology* 155 (1), 89-95.e3. DOI: 10.1016/j.ajo.2012.06.031.

Kurihara, Toshihide; Westenskow, Peter D.; Bravo, Stephen; Aguilar, Edith; Friedlander, Martin (2012): Targeted deletion of Vegfa in adult mice induces vision loss. In: *The Journal of clinical investigation* 122 (11), S. 4213–4217. DOI: 10.1172/JCI65157.

Kwon, Whijin; Freeman, Spencer A. (2020): Phagocytosis by the Retinal Pigment Epithelium: Recognition, Resolution, Recycling. In: *Frontiers in immunology* 11, S. 604205. DOI: 10.3389/fimmu.2020.604205.

Laine, Matti; Jarva, Hanna; Seitsonen, Sanna; Haapasalo, Karita; Lehtinen, Markus J.; Lindeman, Nina et al. (2007): Y402H polymorphism of complement factor H affects binding affinity to C-reactive protein. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 178 (6), S. 3831–3836. DOI: 10.4049/jimmunol.178.6.3831.

Lambert, Vincent; Wielockx, Ben; Munaut, Carine; Galopin, Catherine; Jost, Maud; Itoh, Takeshi et al. (2003): MMP-2 and MMP-9 synergize in promoting choroidal neovascularization. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17 (15), S. 2290–2292. DOI: 10.1096/fj.03-0113fje.

Lechanteur, Yara T. E.; van de Ven, Johannes P. H.; Smailhodzic, Dzenita; Boon, Camiel J. F.; Klevering, B. Jeroen; Fauser, Sascha et al. (2012): Genetic, behavioral,

and sociodemographic risk factors for second eye progression in age-related macular degeneration. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 53 (9), S. 5846–5852. DOI: 10.1167/iovs.11-7731.

Lee, Jisun; Giordano, Samantha; Zhang, Jianhua (2012): Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. In: *The Biochemical journal* 441 (2), S. 523–540. DOI: 10.1042/BJ20111451.

Liang, Fong-Qi; Godley, Bernard F. (2003): Oxidative stress-induced mitochondrial DNA damage in human retinal pigment epithelial cells: a possible mechanism for RPE aging and age-related macular degeneration. In: *Experimental eye research* 76 (4), S. 397–403. DOI: 10.1016/s0014-4835(03)00023-x.

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

Lin, Haijiang; Xu, Haifeng; Liang, Fong-Qi; Liang, Hao; Gupta, Praveena; Havey, Anna N. et al. (2011): Mitochondrial DNA damage and repair in RPE associated with aging and age-related macular degeneration. In: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52 (6), S. 3521–3529. DOI: 10.1167/iovs.10-6163.

Liu, Binghua; Wang, Weiyan; Shah, Arman; Yu, Meng; Liu, Yang; He, Libo et al. (2021): Sodium iodate induces ferroptosis in human retinal pigment epithelium ARPE-19 cells. In: *Cell death & disease* 12 (3), S. 230. DOI: 10.1038/s41419-021-03520-2.

Loboda, Agnieszka; Damulewicz, Milena; Pyza, Elzbieta; Jozkowicz, Alicja; Dulak, Jozef (2016): Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. In: *Cellular and Molecular Life Sciences* 73, S. 3221–3247. DOI: 10.1007/s00018-016-2223-0.

Lotery, Andrew; Xu, Xiao; Zlatava, Gergana; Loftus, Jane (2007): Burden of illness, visual impairment and health resource utilisation of patients with neovascular age-related macular degeneration: results from the UK cohort of a five-country cross-sectional study. In: *The British journal of ophthalmology* 91 (10), S. 1303–1307. DOI: 10.1136/bjo.2007.116939.

Maiese, Kenneth; Chong, Zhao Zhong; Hou, Jinling; Shang, Yan Chen (2009): The vitamin nicotinamide: translating nutrition into clinical care. In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 14 (9), S. 3446–3485. DOI: 10.3390/molecules14093446.

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

Maminishkis, Arvydas; Chen, Shan; Jalickee, Stephen; Banzon, Tina; Shi, Guangpu; Wang, Fei E. et al. (2006): Confluent monolayers of cultured human fetal retinal pigment epithelium exhibit morphology and physiology of native tissue. In: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47 (8), S. 3612–3624. DOI: 10.1167/iovs.05-1622.

Marneros, Alexander G. (2016): Increased VEGF-A promotes multiple distinct aging diseases of the eye through shared pathomechanisms. In: *EMBO molecular medicine* 8 (3), S. 208–231. DOI: 10.15252/emmm.201505613.

McGuinness, Myra B.; Karahalios, Amalia; Simpson, Julie A.; Guymer, Robyn H.; Robman, Luba D.; Hodge, Allison M. et al. (2016): Past physical activity and age-related macular degeneration: the Melbourne Collaborative Cohort Study. In: *The British journal of ophthalmology* 100 (10), S. 1353–1358. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2015-307663.

Merle, Bénédicte M. J.; Silver, Rachel E.; Rosner, Bernard; Seddon, Johanna M. (2015): Adherence to a Mediterranean diet, genetic susceptibility, and progression to advanced macular degeneration: a prospective cohort study. In: *The American journal of clinical nutrition* 102 (5), S. 1196–1206. DOI: 10.3945/ajcn.115.111047.

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

Nadeem, Abdullah; Malik, Inshal A.; Shariq, Fariha; Afridi, Eesha K.; Taha, Muhammad; Raufi, Nahid et al. (2023): Advancements in the treatment of geographic atrophy: focus on pegcetacoplan in age-related macular degeneration. In: *Annals of medicine and surgery (2012)* 85 (12), S. 6067–6077. DOI: 10.1097/MS9.0000000000001466.

Nagineni, Chandrasekharam N.; Samuel, William; Nagineni, Sahrudaya; Pardhasaradhi, Komanduri; Wiggert, Barbara; Detrick, Barbara; Hooks, John J. (2003): Transforming growth factor-beta induces expression of vascular endothelial growth factor in human retinal pigment epithelial cells: involvement of mitogen-activated protein kinases. In: *Journal of cellular physiology* 197 (3), S. 453–462. DOI: 10.1002/jcp.10378.

Nakazawa, Toru; Hisatomi, Toshio; Nakazawa, Chifuyu; Noda, Kosuke; Maruyama, Kazuichi; She, Haicheng et al. (2007): Monocyte chemoattractant protein 1 mediates retinal detachment-induced photoreceptor apoptosis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (7), S. 2425–2430. DOI: 10.1073/pnas.0608167104.

Neale, Benjamin M.; Fagerness, Jesen; Reynolds, Robyn; Sobrin, Lucia; Parker, Margaret; Raychaudhuri, Soumya et al. (2010): Genome-wide association study of advanced age-related macular degeneration identifies a role of the hepatic lipase gene (LIPC). In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (16), S. 7395–7400. DOI: 10.1073/pnas.0912019107.

Nguyen-Legros, J.; Hicks, D. (2000): Renewal of photoreceptor outer segments and their phagocytosis by the retinal pigment epithelium. In: *International review of cytology* 196, S. 245–313. DOI: 10.1016/s0074-7696(00)96006-6.

Nordgaard, Curtis L.; Karunadharma, Pabalu P.; Feng, Xiao; Olsen, Timothy W.; Ferrington, Deborah A. (2008): Mitochondrial proteomics of the retinal pigment epithelium at progressive stages of age-related macular degeneration. In: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49 (7), S. 2848–2855. DOI: 10.1167/iovs.07-1352.

Oshima, Yuji; Oshima, Sachiko; Nambu, Hiroyuki; Kachi, Shu; Hackett, Sean F.; Melia, Michele et al. (2004): Increased expression of VEGF in retinal pigmented epithelial cells is not sufficient to cause choroidal neovascularization. In: *Journal of cellular physiology* 201 (3), S. 393–400. DOI: 10.1002/jcp.20110.

- Padgett, L. C.; Lui, G. M.; Werb, Z.; 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. In: *Experimental eye research* 64 (6), S. 927–938. DOI: 10.1006/exer.1997.0287.
- Parmar, Tanu; Malek, Goldis (2022): Morphological and functional effects of nicotinamide on primary RPE cells derived from old donors. In: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 63 (7), 4627 – F0419-4627 – F0419.
- Pennington, Katie L.; DeAngelis, Margaret M. (2016): Epidemiology of age-related macular degeneration (AMD): associations with cardiovascular disease phenotypes and lipid factors. In: *Eye and vision (London, England)* 3, S. 34. DOI: 10.1186/s40662-016-0063-5.
- Plössl, Karolina; Webster, Emily; Kiel, Christina; Grassmann, Felix; Brandl, Caroline; Weber, Bernhard H. F. (2022): In vitro modeling of the complex retinal condition age-related macular degeneration. In: *jtgg*. DOI: 10.20517/jtgg.2021.39.
- Poddar, Saikat Kumar; Sifat, Ali Ehsan; Haque, Sanjana; Nahid, Noor Ahmed; Chowdhury, Sabiha; Mehedi, Imtias (2019): Nicotinamide Mononucleotide: Exploration of Diverse Therapeutic Applications of a Potential Molecule. In: *Biomolecules* 9 (1). DOI: 10.3390/biom9010034.
- Qi, Jian Hua; Bell, Brent; Singh, Rupesh; Batoki, Julia; Wolk, Alyson; Cutler, Alecia et al. (2019): Sorsby Fundus Dystrophy Mutation in Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 3 (TIMP3) promotes Choroidal Neovascularization via a Fibroblast Growth Factor-dependent Mechanism. In: *Scientific reports* 9 (1), S. 17429. DOI: 10.1038/s41598-019-53433-6.
- Rastoin, Olivia; Pagès, Gilles; Dufies, Maeva (2020): Experimental Models in Neovascular Age Related Macular Degeneration. In: *International journal of molecular sciences* 21 (13). DOI: 10.3390/ijms21134627.
- Reisenhofer, M. H.; Balmer, J. M.; Enzmann, V. (2017): What Can Pharmacological Models of Retinal Degeneration Tell Us? In: *Current molecular medicine* 17 (2), S. 100–107. DOI: 10.2174/1566524017666170331162048.
- Ren, Chengda; Hu, Chengyu; Wu, Yan; Li, Tingting; Zou, Aiqi; Yu, Donghui et al. (2022): Nicotinamide Mononucleotide Ameliorates Cellular Senescence and Inflammation Caused by Sodium Iodate in RPE. In: *Oxidative medicine and cellular longevity* 2022. DOI: 10.1155/2022/5961123.
- Rivera, Andrea; Fisher, Sheila A.; Fritsche, Lars G.; Keilhauer, Claudia N.; Lichtner, Peter; Meitinger, Thomas; Weber, Bernhard H. F. (2005): Hypothetical LOC387715 is a second major susceptibility gene for age-related macular degeneration, contributing independently of complement factor H to disease risk. In: *Human molecular genetics* 14 (21), S. 3227–3236. DOI: 10.1093/hmg/ddi353.
- Rizzolo, Lawrence J. (2007): Development and role of tight junctions in the retinal pigment epithelium. In: *International review of cytology* 258, S. 195–234. DOI: 10.1016/S0074-7696(07)58004-6.
- Rush, Ryan B.; Klein, Westin; Reinauer, Robert M. (2025): Real-World Outcomes with Complement Inhibitors for Geographic Atrophy: A Comparative Study of Pegacetacoplan versus Avacincaptad Pegol. In: *Clinical ophthalmology (Auckland, N.Z.)* 19, S. 1167–1174. DOI: 10.2147/OPTH.S518398.

- Sachdeva, Mira M.; Cano, Marisol; Handa, James T. (2014): Nrf2 signaling is impaired in the aging RPE given an oxidative insult. In: *Experimental eye research* 119, S. 111–114. DOI: 10.1016/j.exer.2013.10.024.
- Saini, Janmeet S.; Corneo, Barbara; Miller, Justine D.; Kiehl, Thomas R.; Wang, Qingjie; Boles, Nathan C. et al. (2017): Nicotinamide Ameliorates Disease Phenotypes in a Human iPSC Model of Age-Related Macular Degeneration. In: *Cell stem cell* 20 (5), 635–647.e7. DOI: 10.1016/j.stem.2016.12.015.
- Schwesinger, C.; Yee, C.; Rohan, R. M.; Joussen, A. M.; Fernandez, A.; Meyer, T. N. et al. (2001): Intrachoroidal neovascularization in transgenic mice overexpressing vascular endothelial growth factor in the retinal pigment epithelium. In: *The American journal of pathology* 158 (3), S. 1161–1172. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64063-1.
- Seddon, Johanna M.; Cote, Jennifer; Page, William F.; Aggen, Steven H.; Neale, Michael C. (2005): The US twin study of age-related macular degeneration: relative roles of genetic and environmental influences. In: *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)* 123 (3), S. 321–327. DOI: 10.1001/archophth.123.3.321.
- Seddon, Johanna M.; Yu, Yi; Miller, Elizabeth C.; Reynolds, Robyn; Tan, Perciliz L.; Gowrisankar, Sivakumar et al. (2013): Rare variants in CFI, C3 and C9 are associated with high risk of advanced age-related macular degeneration. In: *Nature genetics* 45 (11), S. 1366–1370. DOI: 10.1038/ng.2741.
- Shim, Seong Hee; Kim, Soo-Geun; Bae, Jeong Hun; Yu, Hyeong Gon; Song, Su Jeong (2016): Risk Factors for Progression of Early Age-Related Macular Degeneration in Koreans. In: *Ophthalmic epidemiology* 23 (2), S. 80–87. DOI: 10.3109/09286586.2015.1129425.
- Shu, Daisy Y.; Butcher, Erik R.; Saint-Geniez, Magali (2021): Suppression of PGC-1 α Drives Metabolic Dysfunction in TGF β 2-Induced EMT of Retinal Pigment Epithelial Cells. In: *International journal of molecular sciences* 22 (9). DOI: 10.3390/ijms22094701.
- Singh, Ruchira; Phillips, M. Joseph; Kuai, David; Meyer, Jackelyn; Martin, Jessica M.; Smith, Molly A. et al. (2013): Functional analysis of serially expanded human iPSC cell-derived RPE cultures. In: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 54 (10), S. 6767–6778. DOI: 10.1167/iovs.13-11943.
- Sobrin, Lucia; Ripke, Stephan; Yu, Yi; Fagerness, Jesen; Bhangale, Tushar R.; Tan, Perciliz L. et al. (2012): Heritability and genome-wide association study to assess genetic differences between advanced age-related macular degeneration subtypes. In: *Ophthalmology* 119 (9), S. 1874–1885. DOI: 10.1016/j.ophtha.2012.03.014.
- Stahl, Andreas (2020): The Diagnosis and Treatment of Age-Related Macular Degeneration. In: *Deutsches Ärzteblatt International* 117 (29-30), S. 513–520. DOI: 10.3238/arztebl.2020.0513.
- Stewart, Michael W. (2012): The expanding role of vascular endothelial growth factor inhibitors in ophthalmology. In: *Mayo Clinic proceedings* 87 (1), S. 77–88. DOI: 10.1016/j.mayocp.2011.10.001.
- Strauss, Olaf (2005): The retinal pigment epithelium in visual function. In: *Physiological reviews* 85 (3), S. 845–881. DOI: 10.1152/physrev.00021.2004.
- Su, Qian; Zheng, Bin; Wang, Chen-Yao; Yang, Yun-Zhi; Luo, Wen-Wen; Ma, Shu-Min et al. (2018): Oxidative Stress Induces Neuronal Apoptosis Through Suppressing

Transcription Factor EB Phosphorylation at Ser467. In: *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 46 (4), S. 1536–1554. DOI: 10.1159/000489198.

Taha, Hevidar; Skrzypek, Klaudia; Guevara, Ibeth; Nigisch, Anneliese; Mustafa, Stefan; Grochot-Przeczek, Anna et al. (2010): Role of heme oxygenase-1 in human endothelial cells: lesson from the promoter allelic variants. In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 30 (8), S. 1634–1641. DOI: 10.1161/ATVBAHA.110.207316.

Takahashi, Kazutoshi; Okita, Keisuke; Nakagawa, Masato; Yamanaka, Shinya (2007): Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. In: *Nature protocols* 2 (12), S. 3081–3089. DOI: 10.1038/nprot.2007.418.

Takahashi, Kazutoshi; Yamanaka, Shinya (2006): Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. In: *Cell* 126 (4), S. 663–676. DOI: 10.1016/j.cell.2006.07.024.

Tan, Jia; Deng, Zhi-hong; Liu, Shuang-zhen; Wang, Jian-tao; Huang, Chen (2010): TGF-beta2 in human retinal pigment epithelial cells: expression and secretion regulated by cholinergic signals in vitro. In: *Current eye research* 35 (1), S. 37–44. DOI: 10.3109/02713680903374190.

Tenbrock, Louis; Wolf, Julian; Boneva, Stefaniya; Schlecht, Anja; Agostini, Hansjürgen; Wieghofer, Peter et al. (2022): Subretinal fibrosis in neovascular age-related macular degeneration: current concepts, therapeutic avenues, and future perspectives. In: *Cell and tissue research* 387 (3), S. 361–375. DOI: 10.1007/s00441-021-03514-8.

Tian, Xiaoyu; Cui, Ziyong; Liu, Song; Zhou, Jun; Cui, Rutao (2021): Melanosome transport and regulation in development and disease. In: *Pharmacology & therapeutics* 219, S. 107707. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2020.107707.

Tikellis, G.; Robman, L. D.; Dimitrov, P.; Nicolas, C.; McCarty, C. A.; Guymer, R. H. (2007): Characteristics of progression of early age-related macular degeneration: the cardiovascular health and age-related maculopathy study. In: *Eye (London, England)* 21 (2), S. 169–176. DOI: 10.1038/sj.eye.6702151.

Tomany, Sandra C.; Wang, Jie Jin; van Leeuwen, Redmer; Klein, Ronald; Mitchell, Paul; Vingerling, Johannes R. et al. (2004): Risk factors for incident age-related macular degeneration: pooled findings from 3 continents. In: *Ophthalmology* 111 (7), S. 1280–1287. DOI: 10.1016/j.opht.2003.11.010.

Tsang, M. L.; Weatherbee, J. A. (1996): Cytokine assays and their limitations. In: *Alimentary pharmacology & therapeutics* 10 Suppl 2, 55-61; discussion 62. DOI: 10.1046/j.1365-2036.1996.22164021.x.

Vanderbeek, Brian L.; Zacks, David N.; Talwar, Nidhi; Nan, Bin; Musch, David C.; Stein, Joshua D. (2011): Racial differences in age-related macular degeneration rates in the United States: a longitudinal analysis of a managed care network. In: *American journal of ophthalmology* 152 (2), 273-282.e3. DOI: 10.1016/j.ajo.2011.02.004.

Vingerling, J. R.; Hofman, A.; Grobbee, D. E.; Jong, P. T. de (1996): Age-related macular degeneration and smoking. The Rotterdam Study. In: *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)* 114 (10), S. 1193–1196. DOI: 10.1001/archopht.1996.01100140393005.

- Waisbourd, Michael; Loewenstein, Anat; Goldstein, Michaela; Leibovitch, Igal (2007): Targeting vascular endothelial growth factor: a promising strategy for treating age-related macular degeneration. In: *Drugs & aging* 24 (8), S. 643–662. DOI: 10.2165/00002512-200724080-00003.
- Wang, Chunxin; Youle, Richard J. (2009): The role of mitochondria in apoptosis*. In: *Annual review of genetics* 43, S. 95–118. DOI: 10.1146/annurev-genet-102108-134850.
- Wang, Jinmei; Iacovelli, Jared; Spencer, Carrie; Saint-Geniez, Magali (2014): Direct Effect of Sodium Iodate on Neurosensory Retina. In: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 55 (3), S. 1941–1953. DOI: 10.1167/iov.13-13075.
- Wong, Wan Ling; Su, Xinyi; Li, Xiang; Cheung, Chui Ming G.; Klein, Ronald; Cheng, Ching-Yu; Wong, Tien Yin (2014): Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. In: *The Lancet Global Health* 2 (2), e106-e116. DOI: 10.1016/S2214-109X(13)70145-1.
- Xu, Jian; Lamouille, Samy; Derynck, Rik (2009): TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. In: *Cell research* 19 (2), S. 156–172. DOI: 10.1038/cr.2009.5.
- Yang, I-Hui; Lee, Jong-Jer; Wu, Pei-Chang; Kuo, Hsi-Kung; Kuo, Yu-Hsia; Huang, Hsiu-Mei (2020): Oxidative stress enhanced the transforming growth factor- β 2-induced epithelial-mesenchymal transition through chemokine ligand 1 on ARPE-19 cell. In: *Scientific reports* 10 (1), S. 4000. DOI: 10.1038/s41598-020-60785-x.
- Yang, Song; Zhou, Jun; Li, Dengwen (2021a): Functions and Diseases of the Retinal Pigment Epithelium. In: *Frontiers in pharmacology* 12, S. 727870. DOI: 10.3389/fphar.2021.727870.
- Yang, Yang; Chen, Miao; Li, Jingrui; Hong, Renjie; Yang, Jia; Yu, Fan et al. (2021b): A cilium-independent role for intraflagellar transport 88 in regulating angiogenesis. In: *Science Bulletin* 66 (7), S. 727–739. DOI: 10.1016/j.scib.2020.10.014.
- Yates, John R. W.; Sepp, Tiina; Matharu, Baljinder K.; Khan, Jane C.; Thurlby, Deborah A.; Shahid, Humma et al. (2007): Complement C3 variant and the risk of age-related macular degeneration. In: *The New England journal of medicine* 357 (6), S. 553–561. DOI: 10.1056/NEJMoa072618.
- Zhang, Hongqiao; Davies, Kelvin J. A.; Forman, Henry Jay (2015): Oxidative stress response and Nrf2 signaling in aging. In: *Free radical biology & medicine* 88 (Pt B), S. 314–336. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.036.
- Zhang, Youwen; Cross, Samuel D.; Stanton, James B.; Marmorstein, Alan D.; Le, Yun Zheng; Marmorstein, Lihua Y. (2017): Early AMD-like defects in the RPE and retinal degeneration in aged mice with RPE-specific deletion of Atg5 or Atg7. In: *Molecular vision* 23, S. 228–241.
- Zhang, Zi-Yuan; Bao, Xiao-Li; Cong, Yun-Yi; Fan, Bin; Li, Guang-Yu (2020): Autophagy in Age-Related Macular Degeneration: A Regulatory Mechanism of Oxidative Stress. In: *Oxidative medicine and cellular longevity* 2020. DOI: 10.1155/2020/2896036.

- Zhao, Zhenyang; Chen, Yan; Wang, Jian; Sternberg, Paul; Freeman, Michael L.; Grossniklaus, Hans E.; Cai, Jiyang (2011): Age-related retinopathy in NRF2-deficient mice. In: *PloS one* 6 (4), e19456. DOI: 10.1371/journal.pone.0019456.
- Zhou, Hongjie; Zhang, Huina; Yu, Aiqing; Xie, Jiajun (2018): Association between sunlight exposure and risk of age-related macular degeneration: a meta-analysis. In: *BMC ophthalmology* 18 (1), S. 331. DOI: 10.1186/s12886-018-1004-y.
- Zhou, Peng; Kannan, Ram; Spee, Christine; Sreekumar, Parameswaran G.; Dou, Guorui; Hinton, David R. (2014): Protection of retina by α B crystallin in sodium iodate induced retinal degeneration. In: *PloS one* 9 (5), e98275. DOI: 10.1371/journal.pone.0098275.
- Zhou, Peng; Zhou, Jun (2020): The Primary Cilium as a Therapeutic Target in Ocular Diseases. In: *Frontiers in pharmacology* 11, S. 977. DOI: 10.3389/fphar.2020.00977.
- Zhou, Shuyan; Taskintuna, Kaan; Hum, Jacob; Gulati, Jasmine; Olaya, Stephanie; Steinman, Jeremy; Golestaneh, Nady (2024): PGC-1 α repression dysregulates lipid metabolism and induces lipid droplet accumulation in retinal pigment epithelium. In: *Cell death & disease* 15 (6), S. 385. DOI: 10.1038/s41419-024-06762-y.
- Zhu, Ke; Zhang, Meng-Lu; Liu, Shu-Ting; Li, Xue-Yan; Zhong, Shu-Min; Li, Fang et al. (2017): Ghrelin Attenuates Retinal Neuronal Autophagy and Apoptosis in an Experimental Rat Glaucoma Model. In: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 58 (14), S. 6113–6122. DOI: 10.1167/iovs.17-22465.

9 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
AMD	altersabhängige Makuladegeneration
ANG	Angiogenin
AP-1	Aktivator-Protein 1
ARE	antioxidant response element
ARMS2/HTRA1	age-related maculopathy susceptibility 2/high temperature requirement A serine peptidase 1
ARPE19	Adult Retinal Epithelial Cell 19, adulte RPE-Zelllinie 19
ATG5/7	Autophagosomen 5/7
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl2	B-cell lymphoma 2
BM	Bruchsche Membran
BMI	Körpermasseindex (body mass index)
BMI	Body-Maß-Index
Bspw.	beispielsweise
C3	Komplementfaktor 3 (complement factor 3)
C57BL/6	Inzuchtlinie einer Labormaus
C9	Komplementfaktor 9 (complement factor 9)
CCL2	CC-Chemokin-Ligand-2
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
CFB	Komplementfaktor B (complement factor B)
CFH	Komplementfaktor H (complement factor H)

CFI	Komplementfaktor I (complement factor I)
CFI	Komplementfaktor I
NV	Choroidale Neovaskularisation
CO2	Kohlenstoffdioxid
COX4	(Cytochrom-c-Oxidase, Untereinheit 4, Isoform 1
DAPI	4',6-Diamidin-phenylindol
DMEM	KnockOut™ Dulbecco's Modified Eagle Medium
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EMT	Epitheliale-mesenchymale Transition
Engl.	englisch
EZM	Extrazelluläre Matrix
FGF9	Fibroblasten-Wachstumsfaktor-9
GA	Geographische Atrophie
GF	Wachstumsfaktor (growth factor)
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
h	Stunde(n)
H2O2	Wasserstoffperoxid
hiPSC	humane induzierte pluripotente Stammzelle (human induced pluripotent stem cell)
hiPSC-RPE-Zellen	hiPSC abgeleitete RPE-Zellen
HMOX-1	Hämoxygenase 1
HNE	Hydroxynonenal
HPRT	Hypoxanthin-guanin-Phosphoribosyltransferase
HR	Hoher AMD-Risikograd (high risk)
ICC	Immunzytochemie

KLF4	Kruppel-ähnlicher Faktor 4 (Kruppel-like factor 4)
KOSR	KnockOut™ Serum Replacement
LR	Niedriger AMD-Risikograd (low risk)
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumdichlorid
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMP	Matrix-Metallo-Protease
MnSOD	Mangan-Superoxid-Dismutase
mRNA	messenger RNA
ms	Millisekunden
mtDNA	Mitochondriale DNA
MW	Mittelwert
NA	Nikotinamid
NaCl	Natriumchlorid
NAD ⁺	Nikotinamidadenindukleotid
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
ng	Nanogramm
nm	nanometer
NMN	Nikotinmononukleotid
NQO1	NAD(P)H Dehydrogenase Quinon 1
NRF2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (peripheral blood mononuclear cell)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction)

PFA	Paraformaldehyd
POS	Äußeres Segment der Photorezeptoren (photoreceptor outer segment)
PPARGC1A	peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNase	Ribonuklease
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
RPE	Retinales Pigmentepithel
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
s. o.	Siehe oben
SFD	Sorsby Fundus Dystrophie
SI	Natriumiodat (sodium iodate)
SIRT1	Sirtuin-1
SOD2	Superoxid-Dismutase 2
TEER	Transepithelischer elektrischer Widerstand (transepithelial electrical resistance)
TF	Transkriptionsfaktor
TGFβ(2)	transforming growth factor beta (2)
Überl.	überlagert
UV-A/UV-B	Ultraviolettstrahlung A/B
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor)
w	Woche(n)
ZO-1	Zonula occludens 1

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des menschlichen Auges mit gesunder Retina und von AMD-betroffener Retina.....	9
Abbildung 2: Übersicht über die verschiedenen Kultivierungsbedingungen acht Wochen alter iPSC-RPE-Zellen.....	39
Abbildung 3: Relative mRNA-Expression der Autophagie-bezogenen Genmarker <i>ATG5</i> und <i>ATG7</i> bei acht Wochen alten iPSC-RPE-Zellen nach NA-Entzug und oxidativem SI-Stress.	41
Abbildung 4: Relative mRNA-Expression der mitochondrialen Genmarker <i>COX4I1</i> und <i>SOD2</i> bei acht Wochen alten iPSC-RPE-Zellen nach NA-Entzug und oxidativem SI-Stress.....	44
Abbildung 5: Relative mRNA-Expression der mitochondrialen Genmarker <i>BCL2</i> und <i>PPARGC1A</i> bei acht Wochen alten iPSC-RPE-Zellen nach NA-Entzug und oxidativem Stress.....	46
Abbildung 6: Relative mRNA-Expression von Genmarkern des Immunsystems (<i>CCL2</i>) und des Komplementsystems (<i>CFI</i>) in acht Wochen alten iPSC-RPE-Zellen nach NA-Entzug und oxidativem SI-Stress.....	49
Abbildung 7: Zytokin-Array von acht Wochen alten iPSC-RPE-Zellen nach NA-Entzug.. ..	51
Abbildung 8: Relative CCL2-Proteinsekretion im apikalen Kompartiment von acht Wochen alten iPSC-RPE-Zellen nach NA-Entzug.	52
Abbildung 9: Zytokin-Arrays von acht Wochen alten iPSC-RPE-Zellen nach SI-vermitteltem Stress, jeweils in Kulturmedium mit und ohne NA (1. Replikat).	53
Abbildung 10: Relative Proteinsekretion ins apikale Mediumskompartiment acht Wochen alter iPSC-RPE-Zellen nach SI-vermittelten oxidativen Stress, jeweils in Kulturmedium mit und ohne NA (1. Replikat).....	55
Abbildung 11: Zytokin-Arrays von acht Wochen alten iPSC-RPE-Zellen nach SI-vermitteltem Stress, jeweils in Kulturmedium mit und ohne NA (2. Replikat).	57
Abbildung 12: Relative Proteinsekretion ins apikale Mediumskompartiment acht Wochen alter iPSC-RPE-Zellen nach SI-vermittelten oxidativen Stress, jeweils in Kulturmedium mit und ohne NA (2. Replikat).....	59

Abbildung 13: Relative mRNA-Expression von <i>VEGF</i> (A), <i>FGF9</i> (B) und <i>TGFβ2</i> (C) in acht Wochen alten iPSC-RPE-Zellen nach SI-vermitteltem Stress in NA-zugesetztem und NA-freiem Kulturmedium.	61
Abbildung 14: VEGF-Sekretion ins basale Mediums von acht Wochen alten iPSC-RPE-Zellen nach NA-Entzug und oxidativem SI-Stress.....	64
Abbildung 15: Übersicht der Ergebnisse zu Zytokin-Arrays (apikales Kompartiment), der ELISA (basales Kompartiment) und der qRT-PCR von acht Wochen alten iPSC-RPE-Zellen nach SI-Stress.....	65
Abbildung 16: Verifizierung der RPE-Zellmorphologie und der Integrität des Monolayers.	66
Abbildung 17: TEER-Messung an sechs Wochen alten ungestressten iPSC-RPE-Zellen.	67
Abbildung 18: Übersicht der verschiedenen Kultivierungsbedingungen von neun/elf Wochen alten iPSC-RPE-Zellen nach SI-vermitteltem oxidativen Stress.....	68
Abbildung 19: Verifizierung der RPE-Zellmorphologie und der Integrität des Monolayers nach einwöchigem oxidativem SI-Stress.....	69
Abbildung 20: Relative mRNA-Expressionsanalyse von <i>HMOX1</i> und <i>NQO1</i> bei acht Wochen alten iPSC-RPE-Zellen nach zusätzlichem einwöchigem SI-Stress.....	71
Abbildung 21: Verifizierung der RPE-Zellmorphologie und der Integrität des Monolayers nach zehnwöchiger Kultivierungszeit und zusätzlichem einwöchigen SI-Stress.....	72
Abbildung 22: Relative mRNA-Expressionsanalyse von <i>HMOX1</i> und <i>NQO1</i> nach zehnwöchiger Kultivierungszeit und zusätzlichem einwöchigem SI-Stress.....	74
Abbildung 23: Verifizierung der RPE-Zellmorphologie und der Integrität des Monolayers nach dreiwöchigem oxidativem SI-Stress.....	76
Abbildung 24: Relative mRNA-Expressionsanalyse von <i>HMOX1</i> und <i>NQO1</i> bei acht Wochen alten iPSC-RPE-Zellen nach zusätzlichem dreiwöchigem SI-Stress.....	78
Abbildung 25: Direktionaler Vergleich der Aktivierung des NRF2-Signalweges bei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen.....	79
Abbildung 26: Verifizierung der RPE-Zellmorphologie und Integrität des Monolayers nach Induktion eines physiologischen Stresses durch POS.	81
Abbildung 27: Relative mRNA-Expressionsanalyse der antioxidativen Genmarker <i>HMOX1</i> und <i>NQO1</i> nach neunwöchiger Kultivierungszeit und zusätzlichem zweiwöchigen POS-induziertem Stress.....	83

Abbildung 28: Relative mRNA-Expression von <i>VEGF</i> (A), <i>FGF9</i> (B) und <i>TGFβ2</i> (C) von acht Wochen alten iPSC-RPE-Zellen nach SI-vermittelten Stress in NA-zugesetztem und NA-freiem Kulturmedium.	96
---	----

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete RPE-Zelllinien und deren Ursprung.....	21
Tabelle 2: RPE-Zellkulturmedien und Zellkulturzusätze.....	21
Tabelle 3 : Zusammensetzung der Block- und Antikörperlösungen für die.....	
Immunzytochemie (ICC).....	22
Tabelle 4: Primärantikörper für die Immunzytochemie.....	23
Tabelle 5: Sekundärantikörper für die Immunzytochemie	23
Tabelle 6: Verwendete Kitsysteme	23
Tabelle 7: Verwendete Chemikalien	24
Tabelle 8: Verwendete Verbrauchsmaterialien	25
Tabelle 9: Verwendete Geräte und Instrumente	26
Tabelle 10: Verwendete Software.....	28
Tabelle 11: Zusätze zum DMEM	29
Tabelle 12: Zusammensetzung des Taurin-Puffers für POS-Isolation	32
Tabelle 13: Übersicht der Lösungen mit verschiedenen Sucrose-Gradienten für die POS-Isolation	32
Tabelle 14: Zusammensetzung des Mastermixes für die cDNA-Synthese.....	34
Tabelle 15: Reaktionsschritte des Thermocyclers für die cDNA-Synthese.....	34
Tabelle 16: Zusammensetzung des Mastermixes für die qRT-PCR.....	35
Tabelle 17: Reaktionsschritte der qRT-PCR.....	35
Tabelle 18: Taqman-qRT-Genmarker. F: <i>forward primer</i> , R: <i>reverse primer</i>	36

12 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlichst bei Herrn Prof. Dr. Bernhard Weber für die Möglichkeit bedanken, unter Ihrer Betreuung in einem so spannenden Bereich der medizinischen Forschung zu promovieren. Ihre konstruktive Kritik zu sowohl methodischen als auch inhaltlichen Fragen waren allzeit hilfreich und haben mir zur Verfassung dieser Dissertation enorm geholfen.

Ein großer Dank gilt Dr. Karolina Plöchl, die mir ab Beginn meiner Promotion tagtäglich beratend und wegweisend zur Seite stand. Ohne deine Organisation, deine Geduld und dem regelmäßigen Austausch während der Zusammenarbeit wäre es schwer möglich gewesen, eine Arbeit nach höchsten wissenschaftlichen Standards durchzuführen.

Für die Übernahme der Zweitgutachtung möchte ich mich ebenfalls bei Frau Prof. Dr. Caroline Brandl bedanken, ebenso wie bei Dr. Christina Kiel für die Zusammenarbeit in der statistischen Auswertung.

Zuletzt möchte ich dem gesamten Team des Instituts für Humangenetik im Universitätsklinikum Regensburg, sowie meiner Familie und Freunden für die liebevolle Unterstützung danken.

13 Lebenslauf

14 Selbstständigkeitserklärung

Ich, Nico Kleinhölting, geboren am 21.12.1995 in Coesfeld, erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den 05.06.2025

Nico Kleinhölting