

HTRA1: Ein Kandidatengen für die Altersbedingte Makuladegeneration?

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. nat. med.

der Medizinischen Fakultät

und

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Sarah Vierkotten

aus Bergisch Gladbach

Köln, September 2011

Berichtersteller/Berichterstellerin: Prof. Dr. Mats Paulsson
Prof. Dr. Sigrun Korsching

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 11.11.2011

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	4
Abstract	6
1. Einleitung	8
1.1 Die Makula	8
1.2 Die Struktur der Retina	9
1.3 Das retinale Pigmentepithel (RPE)	11
1.4 Die Bruchsche Membran (BrM)	12
1.5 Die Pathogenese der AMD	13
1.5.1 Frühes Stadium der AMD	13
1.5.2 Spätes Stadium der AMD	15
1.5.3 Die Rolle des RPE und der BrM in der Pathogenese der AMD	17
1.6 Risikofaktoren der AMD	19
1.7 Genetische Faktoren	19
1.7.1 CFH	20
1.7.2 HTRA1/ARMS2-Locus	21
1.8 Humanes HTRA1	22
1.8.1 HTRA1-Struktur	23
1.8.2 HTRA1-Assoziation mit humanen Krankheiten	24
1.8.3 HTRA1 und AMD	25
1.9 Zielsetzung der Arbeit	27
2. Material und Methoden	28
2.1 Material	28
2.1.1 Puffer und Lösungen	28
2.1.2 Oligonukleotide	30
2.1.3 Enzyme	31
2.1.4 Antikörper	32
2.1.5 Biologisches Material	33
2.1.6 Verbrauchsmaterial	34
2.1.7 Geräte	37
2.1.8 Analyse Software	38
2.1.9 Statistik	39

2.2 Methoden	39
2.2.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden.....	39
2.2.2 Proteinbiochemische Methoden	45
2.2.3 Zellkultur	52
2.2.4 Tierexperimentelle Arbeiten.....	55
2.2.5 Lichtmikroskopie	65
2.2.6 Immunfluoreszenz-Mikroskopie.....	66
2.2.7 Elektronenmikroskopie	67
3. Ergebnisse	68
3.1 Etablierung einer <i>Htra1</i> -transgenen Mauslinie	68
3.1.1 Herstellung und Aufreinigung des pCI- <i>Rpe65-Htra1</i> -Konstrukts.....	68
3.1.2 Nachweis des Transgens in Mäusen.....	73
3.1.3 Nachweis und Quantifizierung der <i>Htra1</i> -mRNA mittels quantitativer Echtzeit-PCR	76
3.2 Nachweis und Quantifizierung von HTRA1-Protein mittels Western Blot-Detektion	80
3.2.1 Herstellung eines HTRA1-Antikörpers.....	81
3.2.2 Vergleich der HTRA1-Expression in RPE-/BrM-/Choroidea-Lysaten	84
3.2.3 Vergleich der HTRA1-Expression in Lysaten von Hirn, Leber, Milz und Niere ..	85
3.2.4 Nachweis der Sekretion von HTRA1	86
3.3 Mikroskopische Untersuchungen der Retina	86
3.3.1. Hämatoxylin- und Eosin-Färbung	86
3.3.2 Immunfluoreszenzfärbungen der Retina.....	87
3.4 CNV-Induktion durch Laserkoagulation.....	89
3.4.1 Messung der CNV-Aktivität mittels Fluoreszenz-Angiographie (FAG)	90
3.4.2 Messung der CNV-Aktivität mittels spektraler optischer Kohärenztomographie (SD-OCT).....	94
3.4.3 Auswertung der CNV-Aktivität mittels mikroskopischer Untersuchungen.....	98
3.5 Analyse von Wachstumsfaktoren in RPE-/BrM-/Choroidea-Lysaten	101
3.6 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).....	104
3.6.1 Semidünnschnitte.....	104
3.6.2 Ultradünnschnitte	105
3.7 Expressionsanalyse von EZM-Proteinen in RPE-/BrM- /Choroidea-Lysaten ..	108
3.8 Untersuchung der Proteaseaktivität von Δ mac25HTRA1	111
3.8.1 Nachweis der spezifischen Aktivität des aufgereinigten Proteins.....	111
3.8.2 Untersuchung der Proteaseaktivität mit verschiedenen Substraten	112

3.9 Expression von HTRA1 im Zellkulturmodell	114
3.9.1 Herstellung des pCEP-Pu- <i>Htra1</i> -Konstrukts.....	114
3.9.2 Transfektion und Überexpression des pCEP-Pu- <i>Htra1</i> -Konstrukts.....	117
3.9.3 Expressionsanalyse der rekombinanten Proteine.....	117
3.9.4 Untersuchung der Konzentration von Wachstumsfaktoren in Zellkulturüberständen	118
3.9.5 Untersuchung zur Adhäsion der transfizierten Zellen	119
4. Diskussion	121
4.1 Generierung der <i>Htra1</i> -transgenen Maus.....	121
4.2 Phänotyp der <i>Htra1</i> -transgenen Maus	123
4.2.1 Die HTRA1-Überexpression im RPE führt zu einer erhöhten Expression von Fibronectin und Fibronectin-Fragmenten.....	124
4.2.2 Die HTRA1-Überexpression im RPE führt zu einer gestörten Elastogenese in der BrM	126
4.2.3 Die HTRA1-Überexpression im RPE führt nicht zur Ausbildung einer CNV	129
4.3 HTRA1 kann mit anderen AMD-Risikogenen in Verbindung gebracht werden	135
4.4 Ausblick.....	137
Literaturverzeichnis.....	140
Abkürzungen.....	152
Danksagung	156
Erklärung.....	157
Lebenslauf	158

Zusammenfassung

Polymorphismen in der chromosomalen Region 10q26 sind stark mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko der Altersabhängigen Makuladegeneration (AMD) assoziiert. In diesem Bereich liegt das Gen *high temperature requirement protein A1 (HTRA1)*. Das Gen kodiert eine Serinprotease, die vor allem in der Qualitätskontrolle von Extrazellulärmatrix (EZM)-Proteinen eine Rolle spielt. Der *single nucleotide polymorphism* (SNP) rs11200638 im Promotor des *HTRA1*-Gens verursacht eine Überexpression von HTRA1 im retinalen Pigmentepithel (RPE) und erhöht das Erkrankungsrisiko der AMD deutlich. In AMD-Patienten wurde eine zwei- bis dreifache Überexpression an HTRA1-Protein in RPE-Zellen nachgewiesen. Bislang gab es jedoch keine funktionellen Studien zur Überexpression von HTRA1 im RPE, die Aufschluss über die Beteiligung von HTRA1 an der Entstehung der AMD geben könnten.

In dieser Arbeit wurde die Rolle der HTRA1-Überexpression in der Pathogenese der AMD untersucht. Dazu wurden transgene Mäuse generiert, die HTRA1-Protein im RPE 2,7-fach überexprimierten. Die *Htra1*-transgenen Mäuse entwickelten keine spontane choroidale Neovaskularisation (CNV) in der Retina. Die CNV-Induktion mittels Laserkoagulation ließ in der Fluoreszenz-Angiographie (FAG), der spektralen optischen Kohärenztomographie (SD-OCT) und histologischen Untersuchungen nicht auf eine erhöhte Angiogenese durch die HTRA1-Überexpression schließen. Ebenfalls besaßen *Htra1*-transgene Mäuse im Vergleich zum Wildtypen keine Expressionsunterschiede vom transformierenden Wachstumsfaktor-beta (TGF- β), vom Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktors-1 (IGF-1) und vom vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) im Auge. Unterdessen zeigte sich in Zellkulturüberständen *Htra1*-transfizierter Nierenzellen (HEK-293-EBNA) eine reduzierte Konzentration von VEGF, Endostatin und Angiogenin im Vergleich zu nicht-transfizierten Zellen und Kontrollen. Die Konzentration von Angiopoietin-1 war dagegen leicht erhöht.

Anhand von Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)-Bildern war eine Fragmentierung der elastischen Schicht (EL) der Bruchschichten Membran (BrM) in *Htra1*-transgenen Mäusen zu beobachten. Zusätzlich kam es zu verminderten Expressionen von Fibulin-5 und Tropoelastin (TE) in Protein-Lysaten von RPE, BrM und Choroidea. Versuche mit rekombinantem HTRA1 bestätigten weiterhin den Abbau von Fibulin-5 durch HTRA1. Diese Daten deuten auf eine gestörte Elastogenese in der BrM von *Htra1*-transgenen Mäusen hin. Interessanterweise sind Mutationen im *FBLN5* (Fibulin-5)-Gen, die zu einer reduzierten Sekretion von Fibulin-5 führen, mit der AMD assoziiert. Darüber hinaus war die Stabilität der BrM weiterhin durch den HTRA1-bedingten Abbau von Fibronectin gestört. So war die Expression von Fibronectin und Fibronectin-Fragmenten in den transgenen Mäusen erhöht und die Adhäsion *Htra1*-transfizierter Nieren- und RPE (ARPE-19)-Zellen an Fibronectin deutlich reduziert. Zudem wurden Fibronectin und Nidogen-1 und -2, aber nicht Laminin-1

und Kollagen IV von rekombinantem HTRA1-Protein proteolytisch gespalten. Die Immunfluoreszenzfärbungen auf Paraffinschnitten der Retinae *Htra1*-transgener und Wildtyp-Mäuse ließen allerdings keine Änderungen in der Farbintensität oder Verteilung von Nidogen-1 und -2 und auch Laminin-1 und Kollagen IV erkennen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die BrM eine wichtige Rolle bei der Entstehung der AMD hat. Eine HTRA1-Überexpression führt durch die Reduktion von Fibulin-5 und TE zu einer gestörten Elastogenese in der EL der BrM. Auf Grund dieser Ergebnisse kann HTRA1 auch mit anderen AMD-Risikogenen wie *MMP-9* (Matrixmetalloproteinase-9), *TIMP-3* (Gewebeinhibitor von Metalloproteinasen-3) und *FBLN-3, -5* und *-6* in Verbindung gebracht werden.

Abstract

Variants in the chromosomal region 10q26 are strongly associated with an increased risk for age-related macular degeneration (AMD). The *high-temperature requirement protein A1* (*HTRA1*) gene is located in this region. The gene encodes for a serine protease, which is implicated in the quality control of extracellular matrix (ECM) proteins. Previous studies have suggested that the single nucleotide polymorphism (SNP) rs11200638 in the promotor region of *HTRA1* results in overexpression of HTRA1 protein and contributes to AMD pathology. A two to threefold overexpression of HTRA1 has been found in retinal pigment epithelium (RPE) cells of AMD patients. To date, there is no functional evidence of HTRA1 involvement in the disease.

This study investigated the role of HTRA1 overexpression in the pathogenesis of AMD. Transgenic *Htra1* mice overexpressing the murine protein in the retinal pigment epithelium (RPE) 2,7 fold were generated. These mice showed no signs of spontaneous choroidal neovascularization (CNV) development. CNV induction via laser coagulation did not display an increased angiogenesis in *Htra1* overexpressing mice when analyzed via fluorescence angiography (FAG), spectral domain optical coherence tomography (SD-OCT) and histology. No differences in expression of transforming growth factor-beta (TGF- β), insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and vascular endothelial growth factor (VEGF) could be observed in the eye, while cell culture supernatants of *Htra1* transfected kidney cells revealed lower concentrations of VEGF, endostatin and angiogenin when compared to untransfected cells and controls. A higher concentration could be observed for angiopoietin 1.

Transmission electron microscopy images demonstrated the fragmentation of the elastic layer (EL) of Bruch's membrane (BrM) in *Htra1* transgenic mice. Subsequent Western Blot analysis revealed a reduction of fibulin 5 and tropoelastin (TE) in the RPE/BrM/Choroid layers. Furthermore, cleavage of fibulin 5 by recombinant HTRA1 lacking the N-terminal domain could be demonstrated. Fibulin 5 is essential for elastogenesis by promoting elastic fiber assembly and maturation. Therefore, the data implicate that HTRA1 overexpression leads to an altered elastogenesis in BrM through fibulin 5 cleavage. Intriguingly, mutations in the *FBLN5* (fibulin 5) gene, which result in a reduced secretion of fibulin 5 are associated with AMD. The integrity of BrM is further compromised through HTRA1 cleavage of fibronectin. The expression of fibronectin and fibronectin fragments was increased in the RPE/BrM/Choroid layers of *Htra1* transgenic mice and the adhesion properties of *Htra1* transfected RPE cells to fibronectin were significantly reduced. Recombinant HTRA1 cleaved fibronectin, nidogen 1 and nidogen 2 but not laminin 1 and collagen IV. Meanwhile, no differences in staining intensities and distribution were observed for nidogen 1 and nidogen 2 via immunofluorescence staining of retina sections. Taken together, the data hint to an important function of BrM in the development of AMD. HTRA1 overexpression leads to an

altered elastogenesis in the EL of BrM through a reduction of fibulin 5 and TE. It highlights the importance of ECM related proteins in the development of AMD and links *HTRA1* to other AMD risk genes such as *MMP9* (matrix metalloproteinase 9), *TIMP3* (tissue inhibitor of metalloproteinases 3) as well as *FBLN3*, 5 and 6.

1. Einleitung

Die Altersbedingte Makuladegeneration (AMD) wurde 1875 das erste Mal als „*symmetrical central choroidoretinal disease occurring in senile persons*“ beschrieben (Hutchison and Tay, 1875). Es handelt sich um eine degenerative Erkrankung der Makula, die ab dem 50. Lebensjahr auftritt und zu einem fortschreitenden Sehverlust führt.

Heutzutage ist die AMD mit rund 14 Millionen Betroffenen weltweit einer der häufigsten Gründe für unheilbare Blindheit (Resnikoff et al., 2004). In der älteren Bevölkerungsgruppe ist die AMD sogar der Hauptgrund einer Erblindung (Gehrs et al., 2006). Die Krankheitshäufigkeit (Prävalenz) steigt mit dem Alter an: In den USA liegt sie noch bei 0,05% bei den unter 50jährigen, während sie bei den über 80jährigen auf 11,77% steigt (Friedman et al., 2004). Da die Lebenserwartung für Menschen in der westlichen Welt immer höher wird, vermutet man, dass die Zahl der Betroffenen in den USA vom Jahr 2000 bis zum Jahr 2020 um mehr als 50% (von 1,25 Millionen Patienten im Jahr 2000 auf errechnete 2,95 Millionen Patienten im Jahr 2020) steigen wird.

Um die AMD-Pathogenese zu beschreiben, wird im Folgenden auf den Aufbau und die Struktur der Makula eingegangen.

1.1 Die Makula

Die *Macula lutea* (kurz: Makula) oder auch „Gelber Fleck“ genannt, befindet sich zentral am hinteren Pol der Retina und hat einen Durchmesser von etwa 4 mm (Kolb, 1995) (Abb. 1.1). In der Makula, etwa 3,4 mm von der Sehnervenpapille (*Papilla nervi optici*) entfernt, liegt die *Fovea centralis* (kurz: Fovea) mit einem Durchmesser von etwa 1 mm. Sie ist der Ort des schärfsten Sehens.

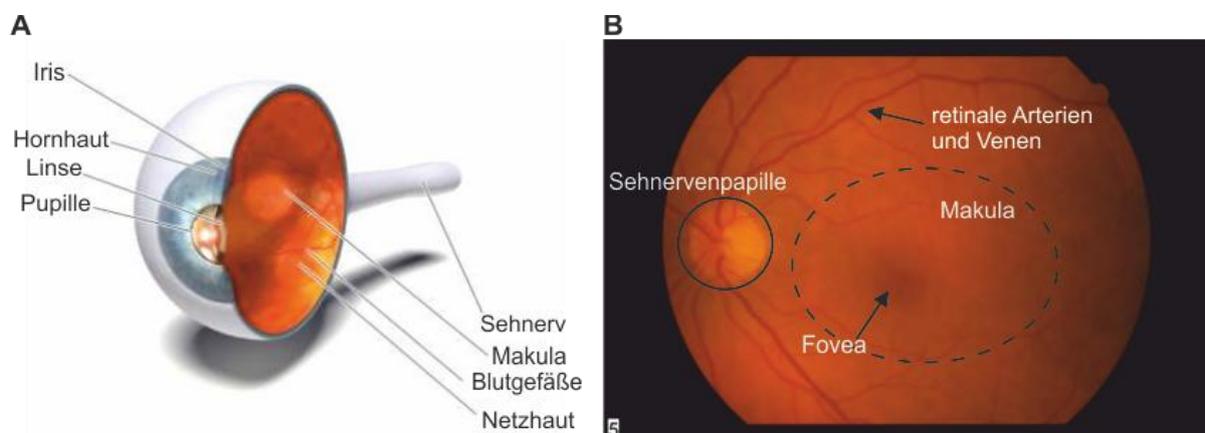


Abb. 1.1 Die Makula. (A) Querschnitt durch das Auge. Am hinteren Pol des Auges befindet sich seitlich der Sehnervenpapille die Makula. Der vordere Augenabschnitt besteht aus Iris, Pupille, Linse und der darüber gelagerten Hornhaut. (übernommen von <http://www.informedhealthonline.org>) (B) Fundusfoto einer gesunden Retina. Die Sehnervenpapille sowie die Makula mit der mittig gelegenen

1. Einleitung

Fovea sind auf dem Augenhintergrund gut zu erkennen. (Originalfoto freundlicherweise von Dr. Philipp Mütter zur Verfügung gestellt)

Von den zwei Photorezeptortypen, den Zapfen und Stäbchen, sind die Stäbchen mit einer Anzahl von 110-125 Millionen (Kolb, 1995) am zahlreichsten in der Retina vorhanden. Sie ermöglichen durch die Aufnahme von kurzwelligem Licht das Dunkel- und Schwarz-Weiß-Sehen (skotopisches Sehen). Die 6,4 Millionen Zapfen hingegen ermöglichen das Tag- und Farb-Sehen (photopisches Sehen). Die Makula weist im Vergleich zur Peripherie eine höhere Dichte an Zapfen auf, wobei die Dichte in der Fovea am höchsten ist. Dadurch kommt es zu der erhöhten Sehschärfe in diesem Bereich. In der Mitte der Fovea liegt mit einem Durchmesser von 200 μm die Foveola. Dort kommen nur Zapfen und keine Stäbchen vor (Borwein et al., 1980). Die Dichte der Stäbchen hingegen nimmt Richtung Fovea immer mehr ab, aber erhöht sich in Richtung Peripherie.

1.2 Die Struktur der Retina

Die Retina (Netzhaut) liegt an der hinteren Innenseite des Auges von Wirbeltieren und hat eine mittlere Dicke von 200 μm . Sie besteht aus zehn verschiedenen Gewebe- und drei Neuronenschichten (NS), die außen an das retinale Pigmentepithel (RPE) und innen an den Glaskörper grenzen (Abb. 1.2).

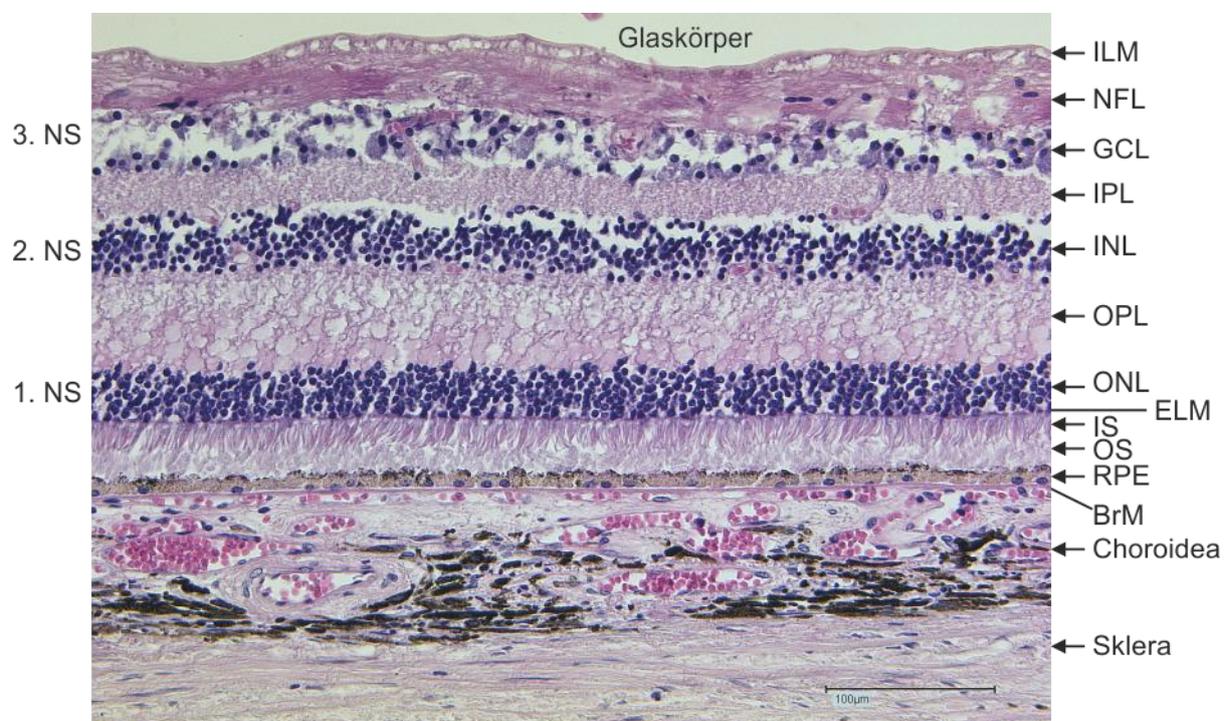


Abb. 1.2 Aufbau der humanen Retina. Horizontaler Schnitt durch Retina, Choroidea (Aderhaut) und Sklera (Lederhaut). Hämatoxylin und Eosin (HE)-Färbung einer humanen Retina; BrM, Bruchsche Membran; ELM, äußere Grenzmembran; GCL, Ganglienzellschicht; ILM, innere Grenzmembran; INL, innere Körnerschicht; IPL, innere plexiforme Schicht; IS, innere Segmente der Photorezeptoren; NFL,

Nervenfaserschicht; ONL, äußere Körnerschicht; OPL, äußere plexiforme Schicht; OS, äußere Segmente der Photorezeptoren; Maßstabsbalken, 100 µm.

Die innere Grenzmembran (*inner limiting membrane*; ILM) oder *Membrana limitans interna* ist die innerste Schicht der Retina. Es handelt sich um die Basalmembran der Müllerzellen, die den Glaskörper von der Retina abgrenzt. Ihr schließen sich die Nervenfaserschicht (*nerve fiber layer*, NFL) und die Ganglienzellschicht (*ganglion cell layer*, GCL) an. Die Ganglienzellschicht beinhaltet die Zellkörper der Ganglienzellen und ist die dritte Neuronenschicht der Retina. Ihre Axone erstrecken sich in die Nervenfaserschicht und leiten die verarbeiteten Impulse der Photorezeptoren durch den Sehnerv (*Nervus opticus*) weiter ans visuelle Zentrum des Gehirns. Die Dendriten der Ganglienzellen erstrecken sich in die innere plexiforme Schicht (*inner plexiform layer*, IPL) und bilden über ihre Synapsen Kontakte zu den dort lokalisierten Axonen der Amakrin- und Bipolarzellen aus. Die Zellkörper der Amakrin- und Bipolar- sowie der Horizontal- und Müllerzellen sind in der inneren Körnerschicht (*inner nuclear layer*, INL) lokalisiert, während ihre Dendriten in die äußere plexiforme Schicht (*outer plexiform layer*, OPL) reichen, wo sie Kontakte zu den Axonen der Photorezeptoren ausbilden. Die Horizontalzellen vermitteln die Signalweiterleitung zwischen den Photorezeptoren durch sogenannte (sog.) *Feedback-Signale* in der OPL. Die Bipolarzellen übermitteln die Lichtsignale in die IPL und bilden dort Kontakte mit den Amakrin- und Ganglienzellen aus. Die INL ist die zweite Neuronenschicht der Retina, während die Zellkörper der Photorezeptoren in der äußeren Körnerschicht (*outer nuclear layer*; ONL) die erste Neuronenschicht bilden. Von dort erstrecken sich die Axone der Photorezeptoren bis in die äußere plexiforme Schicht (*outer plexiform layer*, OPL) und enden in hochspezialisierten Synapsen. Diese Synapsen bilden den Kontakt zu den Horizontal- und Bipolarzellen des Auges. Die äußere Grenzmembran (*external limiting membrane*; ELM) oder *Membrana limitans externa* besteht aus Zellverbindungen (*Zonulae adherentes*) zwischen Müllerzellen und den inneren Segmenten der Photorezeptoren (*inner segments*; IS). Die Müllerzellen sind Gliazellen, die zwischen der ILM und ELM liegen. Dort fungieren sie unter anderem (u. a.) dazu das einfallende Licht an die Photorezeptoren weiterzuleiten (Franze et al., 2007). An der ELM bilden sie Zellfortsätze, die sich bis zu den Mikrovilli des RPE erstrecken und die Photorezeptoren untereinander verbinden (Kellner and Wachtlin, 2008). Die lichtempfindliche Photorezeptorschicht wird von der Photorezeptormatrix umgeben. Die zwei Arten von Photorezeptoren, Stäbchen und Zapfen, bestehen aus äußeren und inneren Segmenten, die durch ein Verbindungscilium (*connecting cilium*; CC) miteinander verbunden sind. Die äußeren Segmente (*outer segments*; OS) der Stäbchen bestehen aus Membranscheiben und die OS der Zapfen aus großflächigen Membraneinfaltungen. Sie sind der Ort der Phototransduktion, da das zum Sehen erforderliche Rhodopsin (Stäbchen) beziehungsweise (bzw.) das Opsin der Zapfen in ihnen

eingelagert ist. Nach der Neusynthese der Membranscheiben am Cilium werden die äußeren Membranscheiben der OS beider Photorezeptoren abgeschnürt und vom anliegenden RPE phagozytiert (Anderson et al., 1978). Dort fusionieren die Phagosomen mit Lysosomen zu Phagolysosomen und ihr Inhalt wird von acht lysosomalen Enzymen des RPE abgebaut (Boulton et al., 1994). Die inneren Segmente der Photorezeptoren (*inner segments*; IS) beinhalten die Zellorganellen, wie die Mitochondrien und das endoplasmatische Retikulum (ER). Hier erfolgt die notwendige Proteinbiosynthese für die Neubildung der Membranscheiben der OS. Die Photorezeptoren und das RPE werden durch die Choroidea (Aderhaut) mit Sauerstoff versorgt. Die Choroidea ist eine pigmentierte, vaskularisierte Schicht zwischen der Bruchschens Membran (BrM) und der Sklera (Lederhaut).

1.3 Das retinale Pigmentepithel (RPE)

Das RPE wurde nach den zahlreichen Melaninpigmenten in seinem Zytoplasma benannt. Es handelt sich um eine einzellige post-mitotische Schicht, deren hexagonale polarisierte Zellen basal zur BrM und apikal zu den Photorezeptoren reichen. Das RPE ist zum Erhalt der Retina sowie der Choroidea von besonderer Bedeutung (Strauss, 2005). So übernimmt es neben der Phagozytose der Membranscheiben noch weitere wichtige Aufgaben. Dazu gehören u.a. die Aufrechterhaltung der äußeren Blut-Retina-Schranke durch *tight junctions* (Bok, 1993, Rizzolo et al., 2011), der Transport von Flüssigkeiten und Ionen zwischen der Choroidea und den Photorezeptoren (Steinberg, 1985) und die Regeneration von Rhodopsin (Baehr et al., 2003). Das in den OS der Stäbchen lokalisierte Rhodopsin detektiert Licht mit der Hilfe des Chromophors Retinal. Das Retinal liegt als ungesättigtes Aldehyd 11-*cis*-Retinal vor und erfährt bei der Aufnahme eines Lichtphotons eine Isomerisierung in all-*trans*-Retinylester (Alberts et al., 1994). Das RPE₆₅-Enzym in den RPE-Zellen wandelt den all-*trans*-Retinylester wieder in 11-*cis*-Retinal um (Redmond et al., 1998) und erhält damit die Lichtsignalkaskade aufrecht.

Zwei besonders im Bezug auf diese Arbeit entscheidende Aufgaben des RPE sind: 1) Die Sekretion von Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF), dem basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF), dem vom Pigmentepithel-abgeleiteten Faktor (PEDF), dem Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor-1 (IGF-1) und dem von Blutplättchen (Thrombozyten)-abgeleiteten Wachstumsfaktor (PDGF) zum Erhalt der Homöostase von Photorezeptoren und Choroidea (Rosenthal et al., 2004, Bost et al., 1994, Campochiaro et al., 1994, Kuroki et al., 1996, Nagineni et al., 2003, Ogata et al., 2002, Miyamoto et al., 2008, Witmer et al., 2003). 2) Der Erhalt der extrazellulären Matrix (EZM). Da die BrM eine azelluläre Schicht ist, benötigt Sie das anliegende RPE und die Choroidea zur Herstellung seiner extrazellulären Bestandteile wie Laminin, Kollagen,

Proteoglykanen und Fibronectin (van Soest et al., 2007, Campochiaro et al., 1986, Booij et al., 2010).

1.4 Die Bruchsche Membran (BrM)

Die BrM ist eine EZM, die zwischen dem RPE und der Choroidea lokalisiert ist. Die BrM besteht aus fünf Schichten (Abb. 1.3) angefangen bei der Basalmembran des RPE, gefolgt von der inneren kollagenen Schicht (*inner collagenous layer*, ICL), der elastischen Schicht (*elastin layer*, EL), der äußeren kollagenen Schicht (*outer collagenous layer*, OCL) und schließlich der Basalmembran der Choroidea (Hogan, 1961).

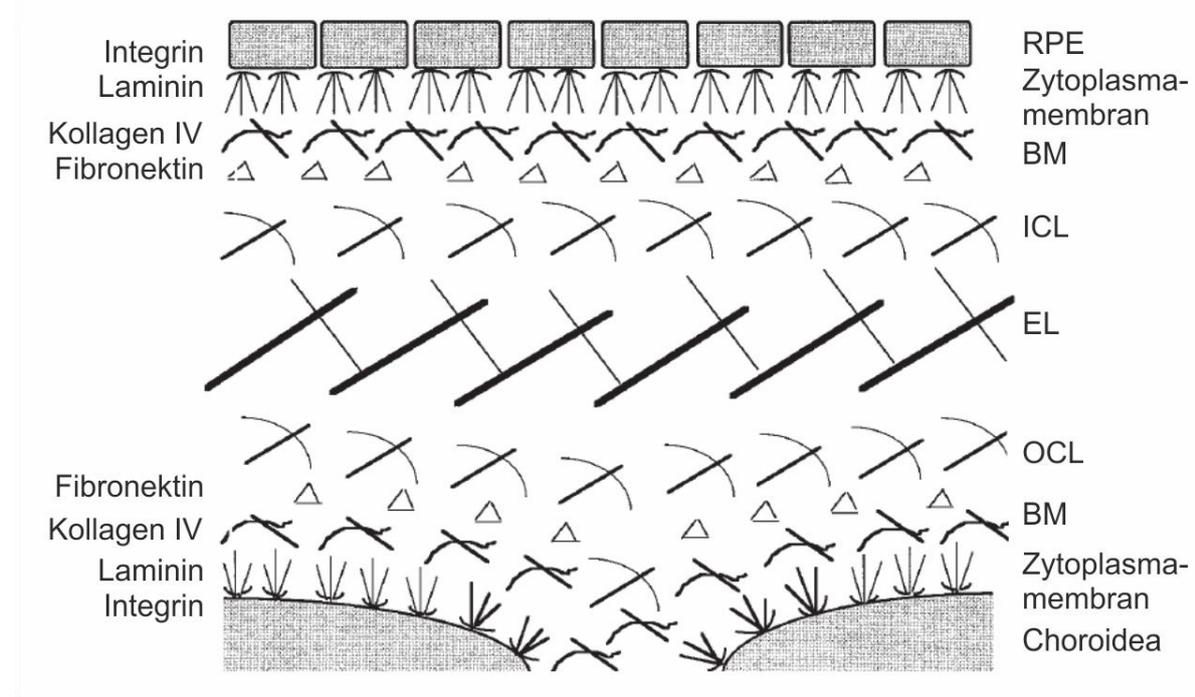


Abb. 1.3 Schematischer Aufbau der Bruchschen Membran. BM, Basalmembran; EL, elastische Schicht; ICL, innere kollagene Schicht; OCL, äußere kollagene Schicht; RPE, retinales Pigmentepithel. (übernommen von Pauleikhoff et al., 2000)

Insgesamt hat die BrM eine ungefähre Dicke von 2-4 μm . Die Basalmembran des RPE hat die typischen Eigenschaften humaner Basalmembranen und besteht größtenteils aus Kollagen IV, Laminin, Fibronectin und Heparansulfat (Chen et al., 2003, Aisenbrey et al., 2006, Pauleikhoff et al., 1992, Clark et al., 2011). Die Adhäsion des RPE an die BrM wird durch die Interaktion von Laminin an Integrin vermittelt (Aisenbrey et al., 2006). Die ICL sowie die OCL bestehen hauptsächlich aus gestreiften Fasern von Kollagen I, III und V, die netzförmig angelegt sind (Marshall et al., 1994) und von verschiedenen Proteoglykanen umgeben werden (Hewitt et al., 1989). Die EL dagegen ist aus Elastinfasern, die linear angeordnet sind, sowie aus Kollagen IV und Fibronectin zusammengesetzt (Zarbin, 2004). In menschlichen Augen aller Altersgruppen konnte nachgewiesen werden, dass die EL im

Bereich der Makula drei- bis sechsmal dünner und zwei- bis fünfmal poröser ist als in der Peripherie (Chong et al., 2005). Die Basalmembran der Choroidea besteht wie die Basalmembran des RPE aus Kollagen IV, Laminin, Fibronektin und Heparansulfat, aber enthält zusätzlich noch Kollagen VI. Es wird angenommen, dass Kollagen VI die Adhäsion der Basalmembran an die Endothelzellen der Choroidea vermittelt (Marshall et al., 1994) und mit Kollagen I interagiert (Roberts and Forrester, 1990).

Funktionell ist die BrM notwendig zur Adhäsion und Differenzierung der RPE-Zellen (Del Priore and Tezel, 1998, Gong et al., 2008). Weiterhin reguliert die BrM den Austausch von Molekülen, u.a. von Nährstoffen sowie von Abfallprodukten, zwischen dem RPE und der Choroidea (Booij et al., 2010). Die passiven Diffusionseigenschaften hängen dabei von der Struktur und der molekularen Zusammensetzung der BrM ab. So konnte gezeigt werden, dass die Durchlässigkeit für Wasser durch die Ansammlung von membranösem Abfall und von Lipiden in der BrM beeinflusst wird (Huang et al. 2007). Auch unterstützt die BrM das RPE bei der Aufrechterhaltung der äußeren Blut-Retina-Schranke, da sie retinale und choroidale Zellmigration verhindert (Goldberg, 1976). Es wird angenommen, dass vor allem Kollagen IV in der Basalmembran der Choroidea die Migration von Endothelzellen inhibiert (Roberts and Forrester, 1990). Die BrM nimmt also eine wichtige Rolle als physikalische Barriere zwischen RPE und Choroidea ein.

1.5 Die Pathogenese der AMD

Die AMD betrifft die äußere Retina mit den Photorezeptoren sowie den Ruyschen Komplex bestehend aus dem RPE, der BrM und der Choroidea. Dabei sind vor allem das RPE und die BrM von altersbedingten Veränderungen betroffen.

1.5.1 Frühes Stadium der AMD

Im frühen Stadium der AMD sind die visuellen Symptome unauffällig und die Krankheit ist charakterisiert durch Drusen in der Makula (Abb. 1.4)



Abb. 1.4 Feinste Drusen im Bereich der Makula. Im Fundusfoto sind die feinen Drusen im frühen Stadium der AMD im Bereich der Makula kaum zu erkennen. (Originalfoto freundlicherweise von Dr. Philipp Mütter zur Verfügung gestellt)

Drusen sind weiß-gelbliche Ablagerungen bestehend aus extrazellulärem Material zwischen dem RPE und der BrM (Abb.1.8 B). Es gibt zwei Arten von Drusen (Green, 1999): Die basal laminaren Drusen liegen zwischen der Plasmamembran und der Basalmembran des RPE. Sie bestehen hauptsächlich aus granulösem Material wie z.B. Kollagen IV, Laminin, Glykosaminoglykanen (GAG) und Vitronektin (van der Schaft et al., 1993, Lommatzsch et al., 2008). Die basal linearen Drusen hingegen sind zwischen der Basalmembran des RPE und der kollagenen Schicht der BrM lokalisiert. Sie bestehen hauptsächlich aus membranösem Material und sind mit dem frühen Stadium der AMD assoziiert (Sarks et al., 2007). Insgesamt konnte eine Vielzahl von Proteinen in Drusen nachgewiesen werden (Crabb et al., 2002). Dazu zählen sowohl Komplement-Proteine (Hageman et al., 2001), die auf einen inflammatorischen Aspekt bei der Entstehung hinweisen, als auch Proteine, die mit Alzheimer-Plaques in Verbindung gebracht werden (Johnson et al., 2002). Wie genau es zur Entstehung von Drusen kommt ist bisher unbekannt. Man nimmt an, dass die meisten Bestandteile in Drusen von RPE- und Choroidea-Zellen stammen (Booi et al. 2010)

Klinisch unterscheidet man dabei zwischen „harten“ und „weichen“ Drusen. Harte Drusen sind kleiner und haben klare Konturen, während weiche Drusen generell größer sind und keine klaren Konturen aufzeigen (Ding et al., 2009, de Jong, 2006). Drusen sind in der Fundus-Fotographie ab einer Größe von 25 μm sichtbar (Sarks et al., 1999) und je größer sie sind, desto größer ist das Risiko eine AMD zu entwickeln (Klein et al., 2002).

1.5.2 Spätes Stadium der AMD

Im späten Stadium kommt es zum Verlust des Sehens. Man unterscheidet hier zwischen der trockenen, atropen und der feuchten, exsudativen Form.

Die trockene Form zeigt sich visuell durch „Löcher im Bild“ (Abb.1.5 C und D) und ist gekennzeichnet durch große Drusen (größer als 125 µm) (Abb. 1.6). Diese Form vollzieht sich langsam und es kann Jahre bis zur Erblindung dauern.

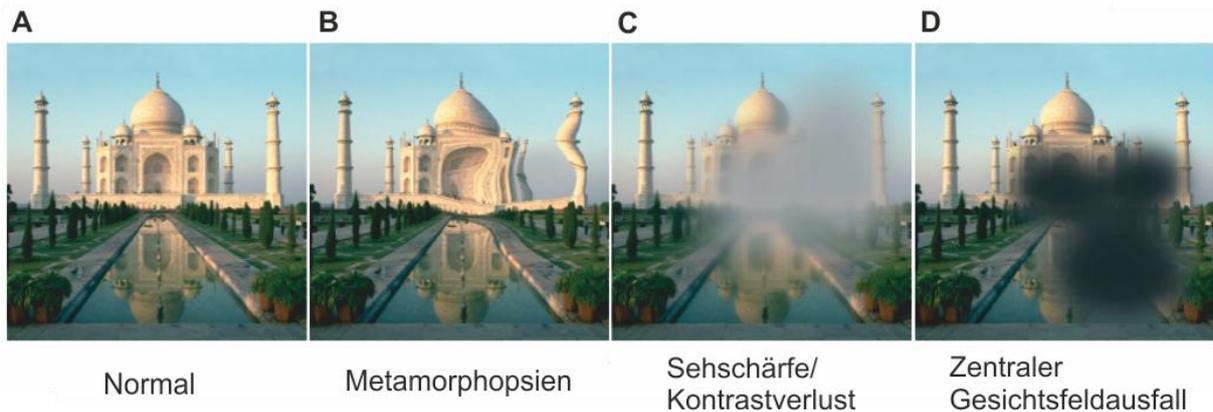


Abb. 1.5 Symptome der AMD. Mit fortschreitendem Krankheitsstadium kann es durch Metamorphopsien, Verlust der Sehschärfe sowie des Kontrasts und zentralen Gesichtsfeldausfall zum Verlust des Sehens kommen. (verändert übernommen von <http://www.feuchte-amd.ch/platform/content/element/2172/amd-poster.pdf>)

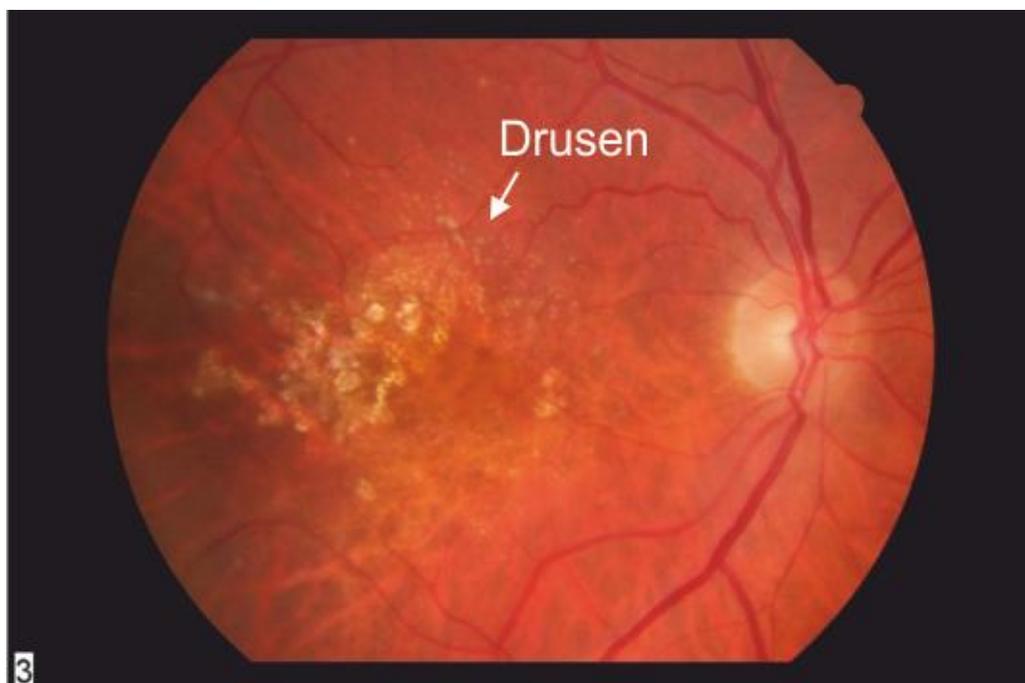


Abb. 1.6 Große Drusen im Bereich der Makula. Im Fundusfoto sind die Drusen im späten Stadium der AMD gut als weiß-gelbe Ablagerungen im Bereich der Makula zu erkennen. (Originalfoto freundlicherweise von Dr. Philipp Mütter zur Verfügung gestellt)

Durch den kontinuierlichen Verlust von RPE-Zellen kommt es zu einer geographischen Atrophie (GA), die an dieser Stelle zum Verlust der Photorezeptoren führt (Abb. 1.8 C).

Bei der feuchten Form bilden sich neue Blutgefäße aus der Aderhaut, die in den subretinalen Raum wachsen (Abb. 1.8 D). Abbildung 1.7 zeigt Blutungen im Fundusfoto eines AMD-Patienten.

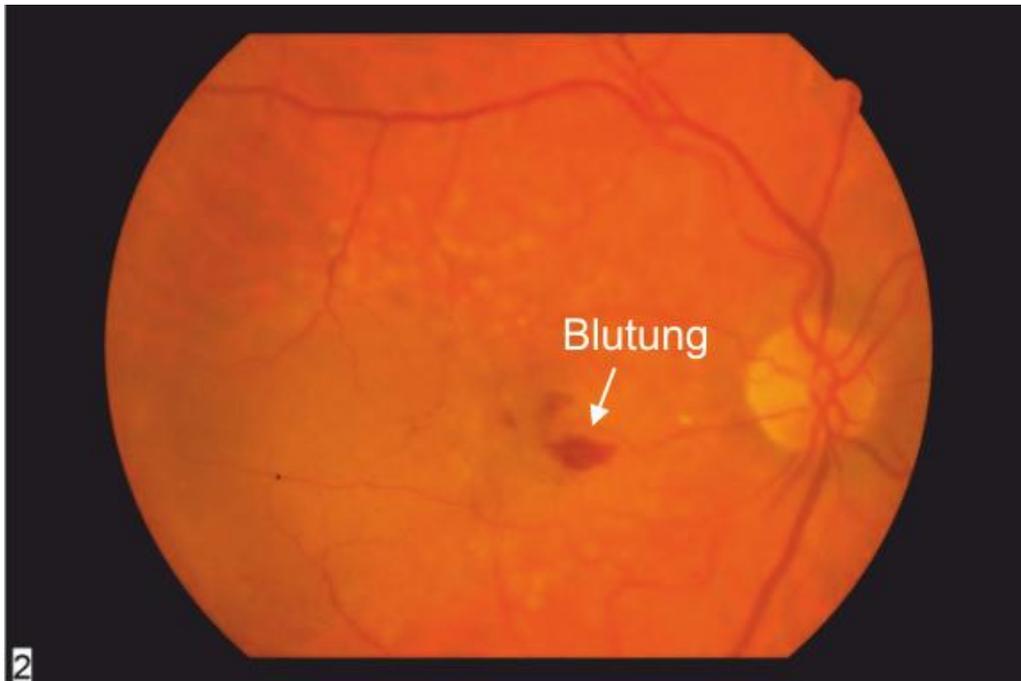


Abb. 1.7 Blutung im Bereich der Makula. Im Fundusfoto sind Blutungen im spätem Stadium der AMD im Bereich der Makula zu erkennen. (Originalfoto freundlicherweise von Dr. Philipp Mütter zur Verfügung gestellt)

Dieser Vorgang wird als choroidale Neovaskularisation (CNV) bezeichnet und bedingt eine Trennung der Neuroretina oder des RPE von der BrM (Abb. 1.8 D), wodurch eine Disposition der Photorezeptoren mit einhergehenden Bildverzerrungen (Metamorphopsien) erzeugt wird (Abb. 1.5 B). Innerhalb von Tagen oder Monaten können neue Blutungen hinzukommen, die unbehandelt zur Blindheit führen. Dieser Prozess geht häufig mit einer Erhöhung von VEGF im Auge einher (Witmer et al., 2003). Daher ist die zur Zeit erfolgreichste Therapie der exsudativen AMD eine Behandlung mit VEGF-Antikörpern (Anti-VEGF) (Chiang and Regillo, 2011). Wie jedoch in transgenen Mäusen mit einer Überexpression von VEGF im RPE gezeigt werden konnte, scheint die Überexpression alleine keine CNV zu induzieren (Schwesinger et al., 2001). Dies deutet darauf hin, dass die Barrierefunktion der BrM für die Entstehung einer CNV geschädigt sein muss.

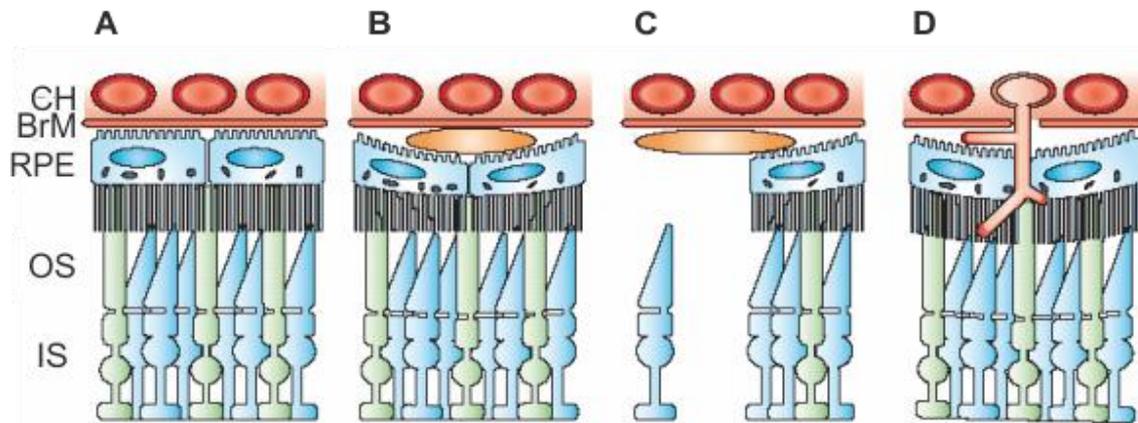


Abb. 1.8 Pathogenese der AMD. (A) Die äußeren Strukturen der Retina im gesunden Zustand. (B) Im frühen Stadium der AMD kommt es zu Ablagerungen (Drusen) zwischen dem RPE und der BrM, was im späten Stadium in eine GA übergehen kann (C). (D) Bei der feuchten Form der AMD kommt es zur Ausbildung von Gefäßen im subretinalen Raum. IS, innere Segmente der Photorezeptoren; OS, äußere Segmente der Photorezeptoren, RPE, retinales Pigmentepithel; BrM, Bruchsche Membran; CH, Choroidea. (verändert übernommen von Rattner and Nathans, 2006)

1.5.3 Die Rolle des RPE und der BrM in der Pathogenese der AMD

Zusätzlich zu den oben erwähnten Drusen sind histologisch eine Anhäufung von Lipofuscin im RPE (Abb. 1.9 B) und eine Verdickung der BrM (Abb. 1.9 D) mit einer veränderten EZM in AMD-Patienten entdeckt worden (Hogan, 1972, Roth et al., 2004). Diese Veränderungen findet man zwar auch bei normal gealterten Retinae, sie scheinen jedoch bei AMD-Patienten ausgeprägter vorzukommen. Der Hauptbestandteil von Lipofuscin ist das Fluorophor A2E (N-Retinyl-N-Retinylidene Ethanolamin), ein Vitamin-A-Derivat und ein Abfallprodukt der Phago lysosomen. Die Anhäufung von Lipofuscin im RPE wird mit einem Anstieg an oxidativem Stress für die Zelle verbunden, da A2E ein breites lichtabsorbierendes Spektrum besitzt und so lichtinduziert O_2^- (Hyperoxid-Anion) und H_2O_2 (Wasserstoffperoxid) generieren kann (Rozanowska et al., 1995, Rozanowska et al., 1998). Zusätzlich schädigt A2E in ausreichender Konzentration die Phagozytose in RPE-Zellen, indem es das Membranpotential an Mitochondrien verringert und die oxidative Phosphorylierung zur Gewinnung von Adenosin triphosphat (ATP) inhibiert (Vives-Bauza et al., 2008). Diese Prozesse können zu einem Absterben der Photorezeptoren führen.

Im Alter kommt es in der BrM vor allem zu Veränderungen ihrer Permeabilität und Elastizität. So konnte an isolierten menschlichen BrM-Choroidea-Komplexen gezeigt werden, dass die Elastizität linear mit dem Alter abnimmt, während das Rückstoßvermögen gleich bleibt (Ugarte et al., 2006). Vor allem in der ICL und OCL kommt es zu einer Verdickung (Pauleikhoff et al., 1990) und zur Vernetzung der kollagenen Fasern, wodurch die Permeabilität und die Elastizität der BrM erniedrigt wird (Ramrattan et al., 1994). Verstärkt wird dieser Effekt durch die erhöhte Zahl von Glykosylierungs endprodukten (AGEs) durch

post-translationale Modifikation in der alternden BrM (Glenn et al., 2007), wodurch es ebenfalls zu Vernetzungen kommen kann (Nakata et al., 2005, Bando et al., 2007). Die Permeabilität der BrM wird auch durch die erhöhte Konzentration von Lipiden wie z.B. Cholesterin im Bereich der Makula (Sheraidah et al., 1993, Holz et al., 1994, Moore and Clover, 2001) herabgesetzt. Die eingeschränkte Permeabilität kann zu einer geringeren Diffusion von Sauerstoff und somit zu einer Hypoxie im Bereich des RPE und der Photorezeptoren führen. Das wiederum kann im RPE zu einer Überexpression von VEGF und schließlich zu einer CNV-Entwicklung beitragen (Schlingemann, 2004). Die Elastizität dagegen wird zusätzlich durch die Mineralisierung bzw. Kalzifizierung der BrM verringert (Spraul et al., 1999). Die BrM wird brüchig und es können Risse entstehen, die die Neovaskularisation begünstigen. Auch kann es im Alter zu Veränderungen im Elastin-Metabolismus und zur Entstehung von Elastin-Peptiden kommen (Chong et al., 2005). Im Serum von AMD-Patienten wurden erhöhte Mengen von Elastin-Peptiden gefunden (Sivaprasad et al., 2005) und durch *in vitro* Versuche wurde gezeigt, dass diese Elastin-Fragmente die Migration von choroidalen Endothelzellen durch Chemoattraktion begünstigen (Skeie and Mullins, 2008).

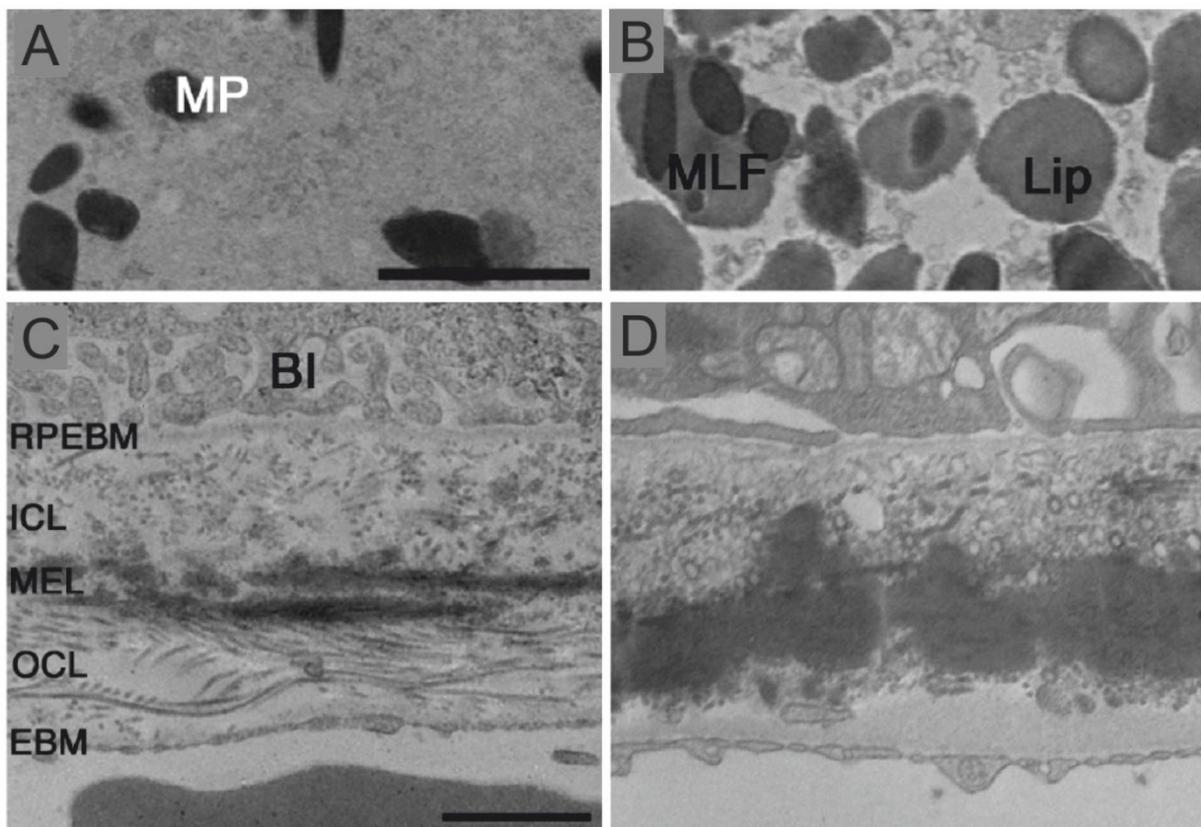


Abb. 1.9 Altersbedingte Änderungen des RPE und der BrM. Elektronenmikroskopische Aufnahmen junger (A) und alter RPE-Zellen (B) sowie junger (C) und alter BrM (D). (A) Junge RPE-Zellen mit Melaninpigmenten (MP). (B) Alte RPE-Zellen zeigen Melanolipofuscin (MLF) und Lipofuscin (Lip)-Körner. (C) Junge BrM ohne altersbedingte Veränderungen. (D) Alte BrM mit Verdickungen. Maßstabsbalken, 2 μm (A und B); 1 μm (C und D); Abkürzungen: RPEBM, retinale Pigmentepithel-

Basalmembran; ICL, innere kollagene Schicht; MEL, mittlere elastische Schicht; OCL, äußere kollagene Schicht; EBM, choroidale Endothelzell-Basalmembran. (verändert übernommen von Bonilha, 2008)

1.6 Risikofaktoren der AMD

Da die AMD zu den komplexen Krankheiten gehört, gibt es außer dem Alter noch andere wichtige Risikofaktoren, die zur Ausbildung der Krankheit führen können. Dazu gehören genetische Prädispositionen und Umweltfaktoren wie das Rauchen (Smith et al., 1996, Vingerling et al., 1996, Thornton et al., 2005), die Ernährung (Goldberg et al., 1988, VandenLangenberg et al., 1998, Snellen et al., 2002) und UV-Strahlung (Young, 1988, Roduit and Schorderet, 2008, Fletcher et al., 2008).

Von diesen drei Umweltfaktoren ist das Rauchen am stärksten mit dem Risiko, eine AMD zu entwickeln, assoziiert (Klein, 2007). Als möglicher Mechanismus könnte oxidativer Stress durch die Entstehung von Sauerstoffradikalen zugrunde liegen. Zwei Studien von Pons und Marin-Castano (Pons and Marin-Castano, 2011b, Pons and Marin-Castano, 2011a) verbinden die, durch das Rauchen bedingte, Aufnahme von Nikotin bzw. Hydroquinon mit einer erhöhten VEGF und einer reduzierten PEDF Expression, wodurch die Entstehung einer CNV begünstigt wird. Bei der Ernährung ist die Einnahme von bestimmten Fetten mit einem erhöhten Risiko für AMD assoziiert (Seddon et al., 2003, Johnson, 2005), während die Einnahme von Antioxidantien und Omega-3 Fettsäuren eine schützende Wirkung aufweist (AREDS, 2001, Tan et al., 2009). Vor allem die Einnahme von Zink soll nach der AREDS-Studie den Übergang vom frühem in das späte Stadium der AMD verzögern. Das Risiko für AMD wird auch durch UV-Strahlung erhöht. Dadurch kommt es zur Erhöhung von Sauerstoffradikalen im RPE (Roduit and Schorderet, 2008), die zur Apoptose der Zellen führen kann.

1.7 Genetische Faktoren

Da die AMD erst im Alter einsetzt und außerdem eine komplexe Krankheit mit vielen Ursachen ist, sind genetische Studien schwierig durchzuführen. Es konnten jedoch einige genetische Faktoren durch Familien- und Zwillingsstudien sowie Assoziationsstudien identifiziert werden. Dazu gehören u.a. Polymorphismen in den *APOE* (Apolipoprotein E)-, *TIMP-3* (Gewebeinhibitor von Metallotroteinasen-3)- und *FBLN-5* (Fibulin-5)-Genen (Stone et al., 2004, Baird et al., 2006, Chen et al., 2010).

Die Varianten mit dem höchsten Risiko für AMD liegen jedoch im Komplementfaktor H (*CFH*)-Gen und dem *age-related maculopathy susceptibility 2 (ARMS2)/high-temperature requirement protein A1 (HTRA1)-Locus*. Zusammen machen sie etwa 50% des Risikos für AMD aus (Maller et al., 2006).

1.7.1 CFH

Das *CFH*-Gen liegt auf Chromosom 1q23-32 in einer Region, die stark mit AMD assoziiert ist (Klein et al., 1998). CFH ist ein Teil des Komplementsystems, das zur angeborenen Immunantwort gehört. Es gibt drei verschiedene Signalkaskaden, die durch die Erzeugung von C3b aus dem Komplementfaktor 3 (C3) in einem terminalen Signalweg konvergieren, der zur Phagozytose und Lyse der Zielzelle führt. C3b muss zur Aktivierung des terminalen Signalwegs an die Zielzelle binden. CFH inhibiert vor allem den alternativen Signalweg, indem es an freies C3b bindet und es inaktiviert (Jozsi et al., 2004). Da CFH an körpereigenen Zelloberflächen liegt, werden nur körperfremde Zellen über den alternativen Signalweg zerstört. Der am höchsten mit AMD assoziierte *single nucleotide polymorphism* (SNP) ist die Y402H-Variante (rs1061170) des *CFH*-Gens (Edwards et al., 2005, Hageman et al., 2005, Haines et al., 2005, Klein et al., 2005). Dabei kommt es zu einem Austausch von Tyrosin zu Histidin an der Aminosäure 402 des CFH-Proteins. Der SNP ist stark mit der trockenen Form der AMD assoziiert und befindet sich in der *short consensus repeat 7* (SCR7)-Domäne des Proteins, die die Bindestelle für das C-reaktive Protein (CRP) und Heparin beinhaltet (Giannakis et al., 2003). Aufgrund des Aminosäureaustauschs an Position 402 wird spekuliert, dass CFH mit geringerer Affinität an die Proteoglykane auf den RPE Zelloberflächen bindet (Abb. 1.10) und so die Zellen nicht mehr ausreichend vor einer Überaktivierung des Komplementsystems schützt (Skerka et al., 2007).

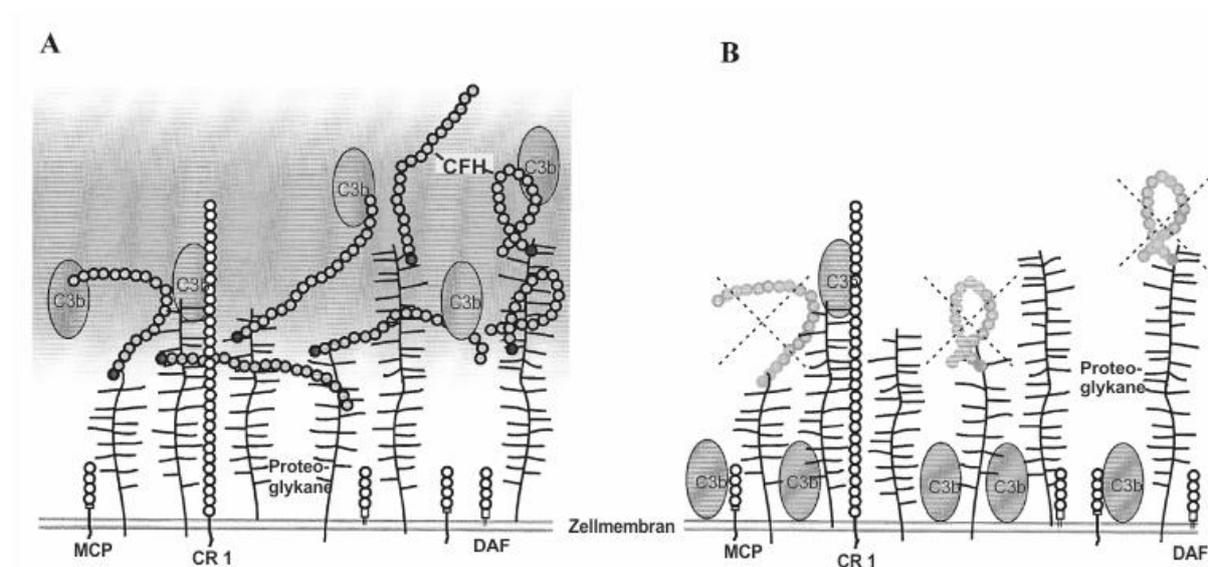


Abb. 1.10 Möglicher Effekt von CFH an Zelloberflächen (hier Endothelzellen). Das Komplementsystem wird durch membrangebundene Regulatoren wie DAF, MCP und CR1 und CFH, das an Proteoglykane auf Zelloberflächen bindet, kontrolliert. Die Zelle wird so vor dem Komplementsystem geschützt und C3b kann nicht an die Zelloberfläche binden. (B) Wenn CFH in der risikoassoziierten Variante vorliegt, kann es schlechter an Proteoglykane binden und es kommt zur C3b-Bindung an die Zelloberfläche, was eine Aktivierung des Komplementsystems auslöst. CR1, Komplement-Rezeptor-1; DAF, abbaubeschleunigender Faktor; MCP, Membran-Kofaktor-Protein. (übernommen von Jozsi et al., 2004)

Bei homozygoten Trägern der Variante (Genotyp CC) wurde jedoch kein Unterschied von CFH- und CRP-Mengen in Drusen im Vergleich zu Kontrollen (Genotyp TT) entdeckt (Anderson et al., 2010). Außer im *CFH*-Gen wurden auch Polymorphismen in anderen Genen des Komplementsystems gefunden, die entweder mit einem Risiko oder schützenden Eigenschaften für AMD assoziiert sind. So scheinen Polymorphismen in Komplementfaktor 2 (C2) und Faktor B (FB) vor allem schützende Eigenschaften zu besitzen (Gold et al., 2006). Durch die hohe Assoziation des *CFH*-SNP mit AMD und die Tatsache, dass noch viele andere Komplementgene mit AMD assoziiert sind, wird von einer wichtigen Rolle chronischer Entzündungsreaktionen bei der AMD-Pathogenese und vor allem der Ausbildung von Drusen ausgegangen (Anderson et al., 2010).

1.7.2 HTRA1/ARMS2-Locus

Auf dem Chromosom 10q26-Locus wurden mehrere Polymorphismen mit einer hohen Assoziation zur AMD gefunden (Majewski et al., 2003). Diese Region überspannt die Gene *PLEKHA1*, *ARMS2* und *HTRA1* (Abb. 1.11). Die stärkste Assoziation wurde zwischen *ARMS2* und *HTRA1* entdeckt (Jakobsdottir et al., 2005). Durch die unmittelbare Nähe der beiden Gene ist es jedoch schwierig zwischen den jeweiligen SNP zu differenzieren. Um genauere Aussagen treffen zu können, wurden Assoziationsstudien durchgeführt. Dabei wird das sog. Kopplungsungleichgewicht (*linkage disequilibrium*, LD) zwischen Genen ausgenutzt. Es konnten zwei SNP von *ARMS2* und ein SNP von *HTRA1*, die in einem starken LD liegen, identifiziert werden. Jedoch reichte die statistische Teststärke (*Power*) nicht aus, um zwischen *ARMS2* und *HTRA1* zu differenzieren (Fritsche et al., 2008). Da bislang keine funktionellen Studien für eine mögliche Beteiligung von *ARMS2* oder *HTRA1* an der Entstehung von AMD vorliegen, gibt es eine große Kontroverse auf diesem Gebiet.



Abb. 1.11 Genregion des 10q25 Locus mit SNP in *ARMS2* und *HTRA1*. Die blauen Kästen stellen Exone dar und die violetten Kästen untranslatierte Regionen. Die Region des Kopplungsungleichgewichts (LD-Block) ist als gelbe Linie dargestellt. (verändert übernommen von Allikmets and Dean, 2008)

ARMS2 ist ein sekretiertes Protein, das mit Proteinen der EZM interagiert (Kortvely et al., 2010). Besonders die Interaktion mit Fibulin-6 und Emilin-2, wichtige Proteine der Elastogenese, bringt ARMS2 in Verbindung mit AMD.

HTRA1 ist eine Serinprotease, die ebenfalls in die EZM sekretiert wird. Die rs11200638 Variante führt zu einer erhöhten Expression des Proteins (Dewan et al., 2006, Yang et al., 2006). Dabei wird angenommen, dass der Polymorphismus (625G>A, 512bp aufwärts der Transkriptionsstartseite) in der mutmaßlichen konservierten Binderegion der zwei Transkriptionsfaktoren *adaptor-related protein complex 2a* (AP2a) and *serum response factor* (SRF) liegt und die Promotoraffinität ändert. So konnte in primären RPE-Zellen mit dem homozygoten Risikogenotyp (Genotyp AA) eine erhöhte *HTRA1*-mRNA-Expression gezeigt werden (An et al., 2010). Andere Studien jedoch konnten diese Ergebnisse nicht bestätigen (Kanda et al., 2007, Kanda et al., 2010). Ob es also wirklich zu einer Überexpression von HTRA1 durch den SNP rs11200638 in der Promotorregion kommt, ist unklar. Die Risikovariante ist mit der feuchten (Dewan et al., 2006) und der trockenen Form (Cameron et al., 2007) der AMD assoziiert.

Ebenso ist es möglich, dass die Polymorphismen beider Gene einen gemeinsamen Effekt haben. So zeigte eine Fall-Kontroll-Studie, dass die Varianten in *ARMS2* und *HTRA1* beide zum Risiko einer AMD beitragen (Francis et al., 2008).

1.8 Humanes HTRA1

Als erstes Mitglied der HTRA Familie wurde DegP in *Escherichia coli* (*E. coli*) als Hitzeschockprotein (HSP) mit einer Toleranz gegenüber gesteigerten Temperaturen gefunden (Lipinska et al., 1988, Strauch and Beckwith, 1988). DegP besitzt zur Qualitätskontrolle von Proteinen sowohl eine Protease- als auch eine Chaperon-Aktivität. Bei gesteigerten Temperaturen ist die Proteaseaktivität von DegP für den Abbau von denaturierten Proteinen essentiell (Krojer et al., 2002).

Homologe zu HTRA1 wurden in vielen Prokaryonten und auch Eukaryoten gefunden und der Grad der Konservierung zwischen bakteriellem DegP und eukaryotischem HTRA ist sehr hoch (Clausen et al., 2002). Humanes *HTRA1* wurde als Gen identifiziert, das in einer humanen Fibroblasten-Zelllinie nach Transfektion mit dem onkogenen *Simian Virus 40* (SV40) herunterreguliert wurde (Zumbrunn and Trueb, 1996). Die Proteaseaktivität von HTRA1 wird durch Stress induziert. Es fungiert aber im Gegensatz zu DegP weder als HSP noch als Chaperon. Im humanen Gewebe wird HTRA1 ubiquitär und in großen Mengen in Endothel, Epidermis und Plazenta exprimiert (De Luca et al., 2003). Zusätzlich zur AMD wird HTRA1 mit Krankheiten wie Arthrose, Morbus Alzheimer (AD), zerebrale autosomal

rezessive Arteriopathie mit subkortikalen Infarkten und Leukoenzephalopathie (CARASIL) und einigen Krebsformen in Verbindung gebracht.

1.8.1 HTRA1-Struktur

Die humane HTRA-Familie besteht aus vier Mitgliedern, HTRA1-4, die eine hoch konservierte Trypsin-ähnliche Serinprotease-Domäne und eine C-terminale PDZ-Domäne besitzen. Das *HTRA1*-Gen hat neun Exone und das Protein besteht aus 480 Aminosäuren. In Abbildung 1.12 ist die Struktur von HTRA1 dargestellt.



Abb. 1.12 Struktur von HTRA1. Das 480 Aminosäuren große HTRA1 Protein besitzt N-terminal ein Signalpeptid (S) zur Sekretion und die Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor bindendes Protein-Domäne (IGFBP/MAC25) gefolgt von der Kazal Inhibitor-Domäne (KI). Die Protease-Domäne besitzt eine katalytische Triade mit Histidin (H), Asparagin (D) und Serin (S). Durch die C-terminale Proteininteraktionsdomäne (PDZ) bindet HTRA1 an seine Substrate.

Am N-Terminus besitzt HTRA1 ein Signalpeptid aus 22 Aminosäuren, das das Protein für Sekretion markiert. Nach der Sekretion wird das Signalpeptid vom Protein gespalten und HTRA1 liegt erst jetzt in seiner aktiven Form vor (Zymogen). Das prozessierte Protein hat ein Molekulargewicht von 50 kDa. Hinter dem Signalpeptid schließt sich die MAC25-Domäne des Proteins an. Diese Domäne besitzt eine Homologie zu dem Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor-bindendem Protein (IGFBP) und zu Follistatin. MAC25 wurde erst als IGFBP charakterisiert, aber hat eine viel geringere Affinität zu IGF als authentische IGFBPs. Schließlich konnte gezeigt werden, dass MAC25 mit Follistatin, einem Activin-bindendem Protein, verwandt ist und ebenfalls an Activin, das zur Familie des transformierenden Wachstumsfaktor-beta (TGF- β) gehört, bindet.

Kazal Inhibitoren sind Serinprotease-spezifische Inhibitoren, die u.a. Trypsin und Elastase inhibieren (Rawlings et al., 2004). Die Funktion der Kazal Inhibitor (KI) -Domäne in HTRA1 ist zurzeit noch nicht eindeutig geklärt. Die Domäne deutet jedoch darauf hin, dass HTRA1 als selbst-regulierendes Enzym arbeitet oder andere Serinproteasen inhibiert. Die größte Domäne von HTRA1 ist die Protease-Domäne mit der katalytischen Triade aus Histidin (His220), Asparagin (Asp250) und Serin (Ser328), die HTRA1 als Serinprotease definiert. Im aktiven Zustand formt HTRA1 Homotrimere über N-terminale Aminosäurereste der Protease-Domäne. Die Proteininteraktionsdomäne (PDZ) bindet sequenzspezifisch an kurze C-terminale oder interne Peptide von hydrophoben Sequenzen. Dabei sind die PDZ-Domänen

der HTRA-Familie unterschiedlich, wenn es um Liganden-Spezifität geht. Bisher wurde angenommen, dass die PDZ-Domäne die proteolytische Aktivität von HTRA1 negativ reguliert. So soll die Proteaseaktivität erst aktiviert werden, wenn die PDZ-Domäne an Liganden gebunden hat (Murwantoko et al., 2004). Kürzlich jedoch zeigten die Arbeitsgruppen von Tim Clausen und Michael Ehrmann anhand der Kristallstruktur von HTRA1-Trimeren (Abb. 1.13), dass die Substratbindung für eine Konformationsänderung des aktiven Zentrums auszureichen scheint (Truebestein et al., 2011). Demnach wären für die Aktivierung von HTRA1 im Gegensatz zur Aktivierung vom bakteriellen DegP keine allosterischen Liganden notwendig.

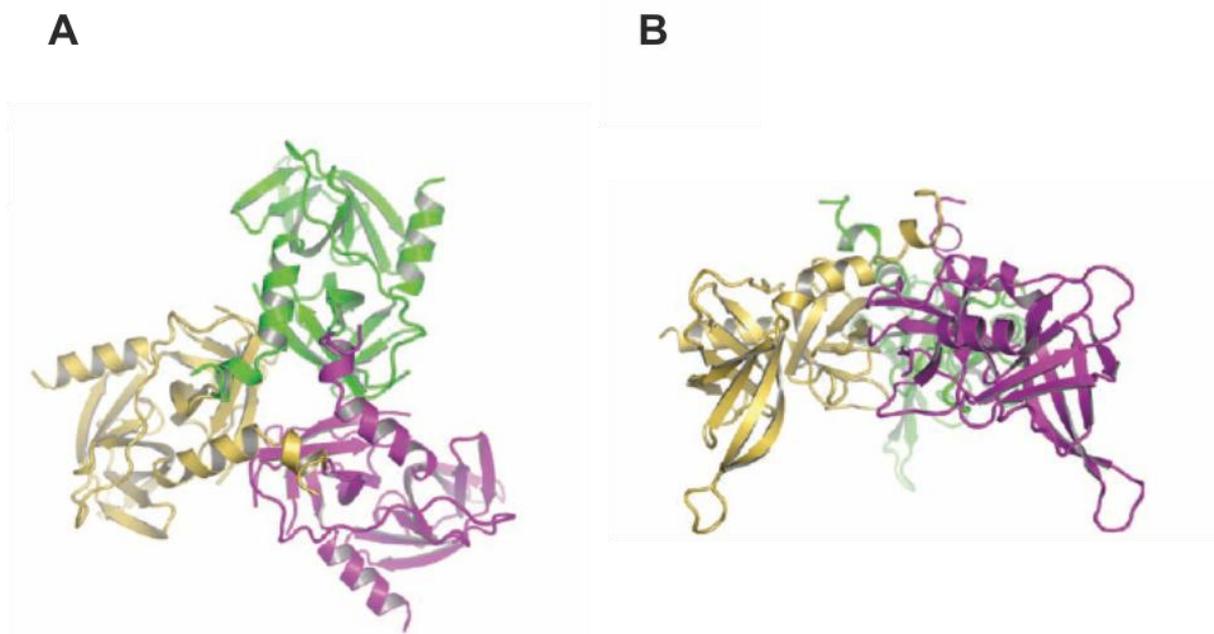


Abb. 1.13 Aufbau von HTRA1. HTRA1 formt Homotrimeren. (A) Blick von oben auf die Bänderstruktur von HTRA1. (B) Blick von der Seite auf die Bänderstruktur von HTRA1. Die einzelnen Monomere sind in verschiedenen Farben angegeben. (verändert übernommen von Truebestein et al., 2011)

1.8.2 HTRA1-Assoziation mit humanen Krankheiten

Als sekretierte Protease spielt HTRA1 vor allem bei der Qualitätskontrolle von Proteinen in der EZM eine Rolle. HTRA1 reguliert den Abbau von EZM-Proteinen, was den Zugang anderer abbauender Matrixenzyme wie Kollagenasen und Matrixmetalloproteinasen (MMP) zu ihren Substraten erleichtern könnte. Als Substrate für HTRA1 konnten z.B. Aggrecan, Biglykan, Decorin, Fibromodulin und Fibronectin identifiziert werden (Tsuchiya et al., 2005, Grau et al., 2006, Chamberland et al., 2009). Diese EZM-Proteine sind Bestandteile der perizellulären Matrix von Gelenknorpel. In Mäusen kann ein *Knockout* (KO) von Fibromodulin und Biglykan Arthrose erzeugen (Wadhwa et al., 2005). Ebenfalls konnte bei Arthrose eine erhöhte Anzahl an Fibronectin-Fragmenten nachgewiesen werden (Forsyth et

al., 2002). Diese Fragmente können eine erhöhte Expression von MMP-1 und MMP-3 induzieren, was zum gesteigerten Abbau von EZM Proteinen führt (Grau et al., 2006). Diese Beobachtungen legen also die Beteiligung abbauender Matrixenzyme an der Entstehung einer Arthrose nahe. So wurde eine erhöhte Expression von HTRA1 in Gelenken von Arthrose-Patienten (Hu et al., 1998) gefunden und eine achtfach höhere Expression von *HTRA1*-mRNA in einem experimentellen Mausmodell der Krankheit nachgewiesen (Polur et al., 2010). Die erhöhte Expression von HTRA1 in diesen Mäusen resultierte im Abbau der perizellulären Matrix, gefolgt von einer erhöhten Discoidin-Domäne-Rezeptor-2 (DDR2)-Expression in Chondrozyten mit anschließender erhöhter Synthese von MMP-13.

Ein *Knockdown* von HTRA1 wiederum scheint eine erhöhte Mineralisierung der EZM zu bewirken. So konnte gezeigt werden, dass HTRA1 die Mineralisation von Osteoblasten durch die Inhibierung des TGF- β -Signalwegs sowie durch den Abbau von Decorin und Matrix Gla Protein (MGP) reguliert (Hadfield et al., 2008). HTRA1 inhibiert den TGF- β -Signalweg, indem es intrazellulär im endoplasmatischen Retikulum (ER) an Pro-TGF- β bindet und proteolytisch spaltet (Shiga et al., 2011). Das wiederum führt zum ER-assoziierten Abbau von TGF- β in der Zelle. Dabei ermöglicht allein die *Linker*-Region vor der Protease-Domäne die Bindung an TGF- β (Oka et al., 2004). Mutationen in *HTRA1*, die zu einer geringeren Proteaseaktivität des Proteins führen, sind mit CARASIL assoziiert (Hara et al., 2009). In CARASIL sind die kleinen Arterien des Gehirns beeinträchtigt und der Patient leidet häufig unter kleineren Schlaganfällen und im fortgeschrittenen Stadium unter Demenz. Eine erhöhte Expression von extrazellulärem TGF- β führt zu einer gestörten Angiogenese sowie einer gestörten EZM mit gesteigerter Expression von Fibronektin und Versikan (ten Dijke and Arthur, 2007).

In bösartigen Melanosomen und in Eierstockkrebs ist HTRA1 herunterreguliert und es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression in der Inhibition von Tumorwachstum und -proliferation resultiert (Baldi et al., 2002, Chien et al., 2004). HTRA1 könnte also als Tumorsupressor wirken.

Während der Schwangerschaft ist HTRA1 in der Plazenta hochreguliert und kann sowohl intrazellulär als auch extrazellulär gefunden werden (De Luca et al., 2004). Man nimmt an das etwa 80% des Proteins sekretiert werden, während etwa 20% intrazellulär verbleiben. Intrazellulär bindet HTRA1 durch die PDZ-Domäne an Mikrotubuli und inhibiert bei erhöhter Expression die Zellmigration (Chien et al., 2009). Die genauen Mechanismen dieser Inhibition sind allerdings noch nicht geklärt.

1.8.3 HTRA1 und AMD

Über die funktionelle Beteiligung von HTRA1 in der AMD ist bisher wenig bekannt. In Überständen primärer RPE-Zellen wurden Interaktionspartner von HTRA1 gefunden, die

sowohl mit dem Komplementsystem (z.B. Clusterin, Vitronektin, Fibromodulin) als auch mit Amyloid-Deposition (z.B. Clusterin, Alpha-2 Makroglobulin, ADAM9) assoziiert sind (An et al., 2010). Clusterin und Vitronektin sind Negativregulatoren des Komplementsystems, da sie die Bildung des terminalen Komplexes inhibieren. Fibromodulin bindet an CFH und inhibiert den alternativen Signalweg. Dabei ist die Bindeaffinität von Fibromodulin an die Y402H Variante des *CFH*-Gens herabgesetzt (Sjoberg et al., 2007). Zusätzlich konnte Komplementfaktor D (CFD) als Interaktionspartner von HTRA1 identifiziert werden (Stanton et al., 2011). Pro-CFD wird von HTRA1 gespalten und so aktiviert. CFD selbst ist eine Serinprotease, die bei Aktivierung des alternativen Signalwegs des Komplementsystems FB spaltet. HTRA1 ist also mit dem Komplementsystem assoziiert und könnte durch eine Fehlregulation an der Entstehung einer AMD beteiligt sein.

Amyloid ist ein Bestandteil von Drusen und Amyloid-Plaques werden im Gehirn von AD Patienten beobachtet. HTRA1 ist sowohl in Drusen (Cameron et al., 2007) als auch im Gehirn mit Amyloid co-lokalisiert und es spaltet das Amyloid-Vorstufen-Protein C99 (Grau et al., 2005). Die Rolle von HTRA1 in AD ist jedoch weiterhin unbekannt. Alpha-2 Makroglobulin und ADAM9 spalten ebenfalls Amyloid-Vorstufen-Proteine. Bei einer Überexpression von HTRA1 könnte es durch geringere Aktivität dieser beiden Proteine zu einer Akkumulation von Amyloid im RPE-Bereich kommen. Dafür spricht, dass ADAM9 KO-Mäuse retinale Degeneration aufweisen (Parry et al., 2009). Clusterin fungiert als Chaperon, das vor Amyloid-Deposition schützt und der Abbau von Clusterin durch HTRA1 kann zu unkontrollierter Amyloid-Deposition führen. Diese Ergebnisse bringen HTRA1 also auch mit einer veränderten Amyloid-Deposition in AMD-Patienten in Verbindung.

Weiterhin moduliert HTRA1 die Angiogenese indirekt durch die proteolytische Spaltung von IGFBP und der damit zusammenhängenden Freisetzung von IGF-1 (Zumbrunn and Trueb, 1996). Die erhöhte Konzentration an freiem IGF-1 könnte eine Erhöhung von VEGF in RPE-Zellen bewirken (Punglia et al., 1997), die wiederum zur Entstehung einer CNV beitragen. Auch könnte die Spaltung von TGF- β durch HTRA1 zu einer veränderten Angiogenese im Auge führen.

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Die AMD ist in Deutschland die häufigste Erblindungsursache. Trotz ihrer Bedeutung verstehen wir aber bisher nur sehr unzureichend die Entstehung der Erkrankung. Mehrere Untersuchungen deuten auf eine erhebliche genetische Komponente hin. Im Hinblick auf die feuchte AMD ist das *HTRA1*-Gen besonders interessant. Es kodiert eine Serinprotease, die den Abbau von Komponenten der EZM reguliert. Eine erhöhte Aktivität könnte die Integrität der BrM und damit die Anfälligkeit für die Gefäßneubildung aus der Aderhaut erhöhen. In einer chinesischen Population konnte ein Zusammenhang zwischen der *HTRA1*-Variante und speziell der feuchten AMD gezeigt werden.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Herstellung und Charakterisierung einer transgenen Maus mit einer zellspezifischen Überexpression von HTRA1 im RPE. Dabei soll untersucht werden, ob eine erhöhte Expression der Serinprotease HTRA1 im RPE zu einer vermehrten CNV-Bildung führt. Die Hypothese lautet, dass HTRA1 sowohl zu einer Schädigung der BrM führt als auch die Angiogenese beeinflusst und damit die Bildung einer CNV begünstigt. Dies wäre ein möglicher Mechanismus der feuchten AMD beim Menschen. Die Mäuse sollen dafür mit verschiedenen Techniken charakterisiert werden. Mittels Fluoreszenz-Angiographie, optischer Kohärenztomographie und histologischer Methoden soll die CNV-Aktivität nach Laserkoagulation untersucht werden. Zusätzlich soll die Verteilung und Expression relevanter EZM-Proteine mittels immunhistochemischen Färbungen und biochemischen Methoden analysiert werden. Eventuelle Veränderungen in der BrM sollen mittels EM ermittelt werden. Parallel zum Tiermodell soll im Zellkulturmodell untersucht werden, ob die Überexpression von HTRA1 zu einer Veränderung der Zytokinexpression in Zellen oder der EZM führt und ob die Adhäsion der Zellen an EZM-Proteine durch eine gesteigerte Proteolyse moduliert wird. Schließlich soll die Proteolyseaktivität von HTRA1 für verschiedene Substrate mit rekombinantem HTRA1-Protein getestet werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Puffer und Lösungen

Sämtliche Lösungen wurden in hochreinem, deionisiertem Wasser (EASYpure II UF ultrapure water system, Werner Reinstwassersysteme, Leverkusen, Deutschland) angesetzt. Angegebene pH-Werte beziehen sich auf Raumtemperatur (RT). Hitzebeständige Lösungen, Plastik und Glasgegenstände wurden 40 min bei 121°C autoklaviert.

Die Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, in Analysequalität von den Firmen Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland) und Bio-Rad (München, Deutschland) bezogen.

Ampicillin-Stocklösung (200 mg/ml)	1 g Ampicillin in 5 ml Wasser lösen und bei -20°C lagern
APS-Stocklösung (10%)	1 g Ammoniumperoxidsulfatlösung (APS) in 10 ml Wasser lösen und bei -20°C lagern
Bleilösung	1,3 M Natriumcitrat, 1 M Bleicitrat, 1 M NaOH mit H ₂ O dest. mischen und steril filtrieren
Coomassie-Färbelösung	0,125% Coomassie Brilliant Blue R25, 10% Essigsäure, 50% Methanol Die Lösung wird durch einen „Whatman No. 1“-Filter filtriert, um Schwebeteilchen zu entfernen.
Coomassie-Entfärbelösung	7% Essigsäure, 40% Methanol
Denaturierungs-Lösung	500 mM NaOH, 1500 mM NaCl
Detektions-Lösung	0,1M Tris-HCl, 0,1M NaCl pH 9,0
Dialyse-Puffer	50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 500 mM NaCl
Digestions-Puffer	25 mM Tris-HCl (pH 8,5), 25 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5% SDS
DNA-Digestions-Puffer	50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM NaCl, 100 mM EDTA (pH 8,0), 1% SDS Proteinase K wird in einer Endkonzentration von 0,5 mg/ml hinzugegeben.
Fixierlösung für Silberfärbung von	30% Ethanol, 10% Eisessig

SDS-Gelen

FPLC-Lysis-Puffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl mit HCl auf pH 7,4 einstellen
FPLC-Wasch-Puffer I	10mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl
FPLC-Wasch-Puffer II	100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 5 mM β-Mercaptoethanol, 30 mM Imidazol
FPLC-Elutions-Puffer	100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 5 mM β-Mercaptoethanol, 150 mM Imidazol
FPLC-HPS-Start-Puffer	50 mM NaCl, 50 mM HEPES auf selben pH wie HPS-End-Puffer einstellen
FPLC-HPS-End-Puffer	50 mM NaCl, 50 mM HEPES, 500 mM KH ₂ PO ₄
High Salt-Puffer	1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 1 mM EDTA
High Stringency-Puffer	2 x SSC, 0,1% SDS
Luria-Bertani (LB)-Agar	LB-Medium, 1,5% Agar
Luria-Bertani (LB)-Medium	1% NaCl, 0,5% Hefe Extrakt, 1,5% Pepton
Low Salt-Puffer	0,2 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7,4), 1 mM EDTA
Low Stringency-Puffer	2 x SSC, 0,1% SDS
Maleinsäure-Puffer	100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl (pH 7,5), 0,3% Tween 20
Methacarn	60% Methanol, 30% 1,1,1-trichlorethan (TCE), 10% Essigsäure
Mikroinjektions-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,1mM EDTA
Narkoselösung	0,6 ml Ketavet (Ketaminhydrochlorid 100 mg/ml), 0,2 ml 2% Rompun (Xylazinhydrochlorid), 3,2 ml 0,9% NaCl
Neutralisations-Lösung	500 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1500 mM NaCl
10% Paraformaldehyd-Stocklösung	10 g Paraformaldehyd (PFA) werden in 70 ml H ₂ O gelöst und die Suspension wird unter dem Abzug auf 60°C erwärmt. 0,5 M NaOH wird tropfenweise unter Rühren dazugegeben, bis sich das Paraformaldehyd gelöst hat. Zu der klaren Lösung wird 10 ml 10x PBS-Puffer gegeben und anschließend der pH-Wert auf 7,3 mit HCl eingestellt. Die Lösung wird mit H ₂ O auf 100 ml aufgefüllt und bei 4°C gelagert.
PBS-Puffer	140 mM NaCl, 10 mM KCl, 8 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄ mit HCl auf pH 7,4 einstellen
Ponceau	10% Ponceau S-Stocklösung in PBS-Puffer

S-Färbelösung

Sammelgel-Lösung 5%ig (Maniatis, 1989)	125 mM Tris-HCl (pH 6,8), 5% Polyacrylamid (Stock: 30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid), 0,1% SDS, 0,1% APS , 0,01% TEMED
SDS-Gellaufpuffer	25 mM Tris-HCl (pH 8,3), 250 mM Glycin, 0,1% SDS
SSC-Puffer (20x)	3000 mM NaCl, 300 mM NaHCO ₃ mit HCl pH 7,0 einstellen
TAE-Puffer	40 mM Tris-HCl (pH 8,0), 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA
TBS-Puffer	50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl
TBST-Puffer	150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 0,05% Tween 20
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA
Trenngel-Lösung 10%ig (Maniatis, 1989)	375 mM Tris-HCl (pH 8,8), 10% Polyacrylamid, 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,01% TEMED
TSS-Puffer	85% LB-Medium, 10% Polyethylenglykol, 5% DMSO, 50mM MgCl ₂ (pH 6,5)
Waschpuffer	0,1 M Maleic acid, 0,15M NaCl pH7,5 0,3% Tween 20

2.1.2 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden bei Biolegio (Nijmegen, Niederlande) bezogen und sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Tab. 2.1 Verwendete Oligonukleotide mit dazugehöriger Sequenz.

Bezeichnung	Sequenz
RPEfor	5'-GCGAGATCTTTATTTAGTCTCTGAGTGCAGAACA-3'
RPErev	5'-GCGAAGCTTTTTTCTTCCAGTGAAGATTAGAGAG-3'
RPEfor2	5'-GCAGGCTCCTCCAATAAGG-3'
HTRA1rev5	5'-AAGGAAGGAGCCGCTAGCAG-3
G953>A-F	5'-TCTTTGCTACTGCTGCTACTAGCGGCTCCTTCC-3'
G953>A-R	3'-AGAAACGATGACGACGATGATCGCCGAGGAAGG-5'
Nhelfor	5'-AGCCGCTAGCCGTCGGAGTCGTCATGCAGT-3'
Notlrev	5'-AAACATGAGCGGCCGCTCCTGCCTCTGCCT-3'
SpCl-RPEfor	5'- CGGTTCCCTGGCCTTTTGCTG -3'
SpCl-RPErev	5'- CGAGACTGTTGTGTCAGAAGCACT -3'
SpCl-HTRA1	5'-GGTGTCCACTCCCAGTTCAA-3'
shtra1-for1	5'-CGGAACTCCGATATGGACTAC-3'

T7	5'-GCCCTATAGTGAGTCGTATTAC-3'
HTRA1#88left	5'-AGTGGGTCAGGATTCATCGTA-3'
HTRA1#88right	5'-GTGACCACGTGAGCATTGT-3'
β -Aktin#101left	5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3'
β -Aktin#101right	5'-CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA-3'

Die Oligonukleotide RPEfor und RPErev wurden für die PCR des *Rpe65*-Promotors zur Amplifikation eingesetzt.

Die Oligonukleotide RPEfor2 und HTRA1rev5 wurden zur Genotypisierung der Mäuse eingesetzt.

Die Oligonukleotide G953>A-F und G953>A-R werden für die *site-directed mutagenesis* der *Htra1*-cDNA zur Klonierung des pCEP-Pu-*Htra1* Vektors eingesetzt.

Die Oligonukleotide Nhelfor und Notlrev zur Einbringung der NheI und NotI Schnittstelle an die *Htra1*-cDNA eingesetzt.

Die Oligonukleotide SpCI-RPEfor und SpCI-RPErev wurden zur Sequenzierung des *Rpe65*-Promotors eingesetzt.

Die Oligonukleotide SpCI-HTRA1 und shtra1-for1 wurden zur Sequenzierung der *Htra1*-cDNA verwendet.

T7 wurde für die Sequenzierung des Übergangs vom Vektor pCI-*Rpe65* zum *Insert* verwendet.

Die Oligonukleotide HTRA1#88left und HTRA1#88right wurden zur Amplifikation der murinen *Htra1*-cDNA in der quantitativen Echtzeit-PCR eingesetzt.

Die Oligonukleotide β -Aktin#101left und β -Aktin#101right wurden zur Amplifikation der murinen *β -Aktin*-cDNA in der quantitativen Echtzeit-PCR eingesetzt.

2.1.3 Enzyme

Alle Restriktions- und DNA-modifizierende Enzyme wurden von Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) oder Invitrogen (Darmstadt, Deutschland) erworben und immer mit den mitgelieferten Puffern unter den vorgegebenen Bedingungen genutzt.

Tab. 2.2 Verwendete Enzyme und Hersteller

Enzyme	Hersteller
Restriktionsenzyme	Fermentas
T4 DNA Ligase	Fermentas
<i>shrimp alkaline phosphatase</i> (SAP)	Fermentas
Taq Polymerase	Fermentas
RNase H	Fermentas
Platinum qPCR Supermix-UDG	Invitrogen
Proteinase K	Fermentas
SuperScript III First Strand	Invitrogen

2.1.4 Antikörper

2.1.4.1 Erstantikörper

Tab. 2.3: Tabellarische Aufführung aller verwendeten Erstantikörper.

Bezeichnung	Wirt	Western Blot Verdünnung	Immunfluoreszenz Verdünnung	Hersteller
Antiserum gegen HTRA1 (aff.)	Kanninchen	1:1000	1:500	eigen*
beta-Actin (ACTB) (AC-15)	Maus	1:15000		Abcam
CD31	Ratte		1:100	BD Biosciences Pharmingen
c-myc (A-14)	Kanninchen	1:1000		Santa Cruz Biotechnologies
EHS-Laminin	Kanninchen		1:1000	U. Hartmann
EMILIN-1 (H-80)	Kanninchen	1:200		Santa Cruz Biotechnologies
Fibulin-4 (H-40)	Kanninchen	1:200		Santa Cruz Biotechnologies
Fibulin-5 (H-60)	Kanninchen	1:400		Santa Cruz Biotechnologies
Fibrillin-1 (H-109)	Kanninchen	1:200		Santa Cruz Biotechnologies

2. Material und Methoden

Fibronectin	Kanninchen	1:5000		U. Hartmann
Kollagen IV	Kanninchen	1:1000	1:500	U. Hartmann
LOXL-1 (H-165)	Kanninchen	1:200		Santa Cruz Biotechnologies
Nidogen-1	Kanninchen	1:2000	1:1000	U. Hartmann
Nidogen-2	Kanninchen		1:1000	U. Hartmann
Tropoelastin	Kanninchen	1:1000		Elastin Products Company, INC

Neben den Herstellern und den Wirtstieren sind die entsprechend eingesetzten Verdünnungen für die aufgeführten Anwendungen angegeben. Die Antikörper gegen Kollagen IV, EHS Laminin, Fibronectin, Nidogen-1 und Nidogen-2 wurden freundlicherweise von Dr. Ursula Hartmann (Institut für med. Biochemie II, Universität zu Köln, Deutschland) zur Verfügung gestellt. * Die Angabe eigen bedeutet, dass das Antigen selbst hergestellt und die Immunisierung durch die Firma Pineda, Berlin durchgeführt wurde. aff., affinitätsgereinigt

2.1.4.2 Zweitantikörper

Tab. 2.4: Tabellarische Aufführung aller verwendeten Zweitantikörper.

Antigen	Wirt	Western Blot Verdünnung	Immunofluoreszenz Verdünnung	Markierung	Hersteller
Kanninchen IgG	Ziege	1:4000		HRP	DAKO
Maus IgG	Ziege	1:4000		HRP	DAKO
Kanninchen IgG	Ziege		1:1000	Alexa Fluor 488	Molecular Probes
Maus IgG	Ziege		1:1000	Alexa Fluor 546	Molecular Probes

Neben der Spezifität, den Wirtstieren, der Markierung mit Chromophoren bzw. dem Enzym HRP (Meerrettich-Peroxidase) und den Herstellern sind die eingesetzten Verdünnungen für die aufgeführten Anwendungen angegeben.

2.1.5 Biologisches Material

2.1.5.1 *E. coli*-Bakterien-Stämme

Klonierungen wurden im *Escherichia coli* (*E. coli*)-Stamm JM109 (Promega, Madison, WI, USA) durchgeführt. Der Genotyp ist unten angegeben. Die Bakterien wurden bei -80°C gelagert und vor Gebrauch erneut transformationskompetent gemacht.

Genotyp JM109 *endA, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (r_K⁻, m_K⁺), relA1, supE44, Δ(lac-proAB), [F', traD36, proAB, lac^qZΔM15]*

Zur Proteinexpression wurde der *E. coli*-Stamm BL21CodonPlus-(DE3) (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) benutzt. Expressionsvektoren wie z.B. pET, die unter der Kontrolle des T7-Promotors stehen, können durch die Induktion der T7-RNA-Polymerase nach IPTG-Zugabe in BL21CodonPlus (DE3) zur genutzt werden. Der Genotyp ist unten angegeben.

Genotyp BL21(DE3) *F⁻ ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) dcm⁺ Tet^r galλ(DE3) endA Hte [argU proL Cam^r] [argU ileY leuW Strep/Spec^r]*

2.1.5.2 Eukaryotische Zellen

HEK 293-EBNA Humane embryonale Nierenzelllinie (Yates et al., 1985)

ARPE-19 Humane retinale Epithelzelllinie (Dunn et al., 1996)

2.1.5.3 Mausstämme

Die Mäuse wurden unter streng kontrollierten, artgerechten und hygienischen Bedingungen gehalten. Futter und Wasser war den Tieren frei zugänglich. Der Tag-Nacht Rhythmus war 12 h/12 h.

C57BL/6N (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland)

2.1.6 Verbrauchsmaterial

Dialysiermaterialien VISKING Typ 20/30 (Roth)

FPLC-Säulen Ni-NTA Superflow Cartridge, 5 ml (QIAGEN, Hilden, Deutschland)

Bio-Scale Ceramic Hydroxyapatite, Type I Column, 10 ml (Bio-Rad)

Handschuhe Peha-Soft (Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland)

Peha-Soft nitrile (Paul Hartmann AG)

Homogenisatoren Wheaton-Mikro-Gewebe-Hand-Homogenisator 0,2 ml (über neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland)

	Hand-Homogenisator 2/10 ml nach Dounce (B. Braun Biotech. International GmbH, Mesungen, Deutschland)
Kulturschalen	EasyFlask Zellkulturflaschen 25/75 mm ² (Nunc, Langenselbold, Deutschland)
Küvetten	UVette (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
	Makroküvetten 1,5 ml (VWR, Darmstadt, Deutschland)
Membranen und Filterpapier	Nylonmembran, positiv geladen (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)
	PVDF Membran, Amersham Hybond-P (GE Healthcare, München, Deutschland)
	3MM Chr Whatman Papier, 15 x 100 cm (über VWR)
Mikrotiterplatten	96-well Platten (Nunc)
	96-well PCR-Platte, Low 96-well clear (Bio-Rad)
Objektträger und Deckgläser	StarFrost, 76x26 mm (Waldemar Knittel Glasbearbeitungs GmbH, Braunschweig, Deutschland)
	Deckglas, 23,8 x 50 mm (Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland)
	CultureSlides, 2/8-Kammer-Aufsatz (Polystyrol) auf Glas- Objektträger (BD Biosciences)
Ohrmarken und Zange	Laborohrmarken nummeriert (H. Hauptner & Richard Herberholz GmbH und Co. KG, Solingen, Deutschland)
	Ohrmarkenzange für Labortiere (Hauptner-Herberholz)
PCR Sealers	Microseal 'B' Film (Bio-Rad)
Pipetten	Research 2,5/10/100/1000 (Eppendorf) Pipettierhilfe accu-jet pro (Brand)
Pipettenspitzen	Biosphere Filter Tip 10/200/1000 (Sarstedt)
	Serologische Pipette 5/10/25 ml (Sarstedt)
Polyacrylamid-Fertiggele	Criterion TGX Gel, Any kD, 12+2 well, 45 µl, 13,3 x 8,7 cm (W x L) (Bio-Rad)
	Criterion XT Bis-Tris Gel, 4-12%, 12+2 well, 45 µl,

	13,3 x 8,7 cm (W x L) (Bio-Rad)
	Criterion Tris-HCl Gel, 10%, 12+2 well, 45 µl, 13,3 x 8,7 cm (W x L) (Bio-Rad)
Präzisionsschere und Skalpelle	Superfine Vannas 501778 (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA)
	Disposable Scapel No. 10/11 (Feather Safety Razor Co., LTD., Osaka, Japan)
Reaktionsgefäße	PCR-Mikropipettiergefäße 0,2 ml (Brand, Wertheim, Deutschland)
	Mikropipettiergefäße 0,5/1,5/2 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
	Zentrifugen-Röhrchen 15 und 50 ml (Greiner Bio-One, Solingen, Deutschland)
Spritzen und Nadeln	Discardit II 1/5/10/20 ml Spritzen (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland)
	Microlance 3 Needle 27G x 3/4"-Nr.20, 0,4 x 19 mm (BD Biosciences)
Spritzenfilter	Rotilabo, steril, 0,22 µm (Roth)

Kits

Sämtliche Kits wurden ausschließlich mit den mitgelieferten Lösungen und Puffern sowie nach beiliegenden Protokollen benutzt.

Tab 2.5 Bezeichnung und Hersteller der in dieser Arbeit verwendeten Kits.

Bezeichnung	Hersteller
BCA Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, USA
Pierce Silver Stain Kit	Pierce
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN
Endofree Plasmid Maxiprep	QIAGEN
RNeasy Mini Kit	QIAGEN
MILLIPLEX MAP Kit	Millipore, Billerica, MA, USA
QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, La Jolla, CA, USA
PCR DIG Probe Synthesis Kit	Roche, Basel, Schweiz
DIG Nucleic Acid Detection Kit	Roche
Amersham ECL Plus Western Blotting Detection System	GE Healthcare

2.1.7 Geräte

2.1.7.1 Mikroskope und Zubehör

Tab 2.6 Bezeichnung und Hersteller der verwendeten Mikroskope.

Bezeichnung	Hersteller
DIAVERT	Leica, Wetzlar, Deutschland
EM 902A	Zeiss
TCS SP5	Leica
VANOX AHBT3	Olympus, Hamburg, Deutschland

2.1.7.2 Zentrifugen

Tab 2.7 Bezeichnung und Hersteller der verwendeten Zentrifugen.

Bezeichnung	Hersteller
EBA12	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Rotina 420R	Hettich
Centrifuge 5415R	Eppendorf

2.1.7.3 Analytische Geräte

Tab 2.8 Bezeichnung und Hersteller der verwendeten analytischen Geräte.

Bezeichnung	Hersteller
Bio Photometer	Eppendorf
MRX Revelation Absorbance Reader	Dynex Technologies, Denkendorf, Deutschland
Mastercycler epgradient S	Eppendorf
Ultraschallprozessor Vibra Cell 72434	Fisher Bioblock Scientific, Illkirch Graffenstaden, Frankreich
ÄKTAFPLC	GE Healthcare
Elektrophorese-System Criterion mit PowerPac HC	Bio-Rad
Mx3000P QPCR System	Stratagene
Fluorchem2	Alpha Innotech, Santa Clara, CA, USA
Luminex 200	Luminex, Austin, TX, USA

2.1.7.4 Allgemeine Geräte

Tab 2.9 Bezeichnung und Hersteller der verwendeten Geräte.

Bezeichnung	Hersteller
CO ₂ -Inkubator CO ₂ -Auto-Zero B 5061 EC	Heraeus, Dormagen, Deutschland
Inkubator mit integriertem Kreisschüttler SI500	Bibby Scientific (Stuart), Staffordshire, UK
Kipproller SRT6	Stuart
Mikroprozessor pH Meter p5 535 Multical	WTW Wissenschaftliche-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Deutschland
Power Supply PPS 200-1D	MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland
Schüttler IKA-VIBRAX-VXR	IKA, Staufen, Deutschland
Sterilbank MSC Advantage	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Thermomixer compact 5350	Eppendorf
Ultracut UCT Mikrotom	Leica
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Waage P160	Mettler-Toledo, Giessen, Deutschland
Wasserbad	Köttermann, Uetze/Hänigsen, Deutschland

2.1.8 Analyse Software

Tab 2.10 Bezeichnung und Hersteller der verwendeten Software.

Bezeichnung	Hersteller
Cell*	Olympus
LAS AF Lite	Leica
Opticon Monitor 3	Bio-Rad
Quantity One	Bio-Rad
Vector NTI	Invitrogen
xPonent	Luminex

2.1.9 Statistik

Die statistischen Auswertungen wurden mit dem Program PASW (*Predictive Analytics Software*) durchgeführt. Für diese Arbeit wird der t-test für unverbundene Stichproben angewandt, um Mittelwertunterschiede zwischen transgenen und Wildtyp-Mäusen auszuwerten.

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 DNA-Plasmid Präparation aus Bakterien in kleinem Maßstab

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus einer Bakterien-Kultur wurde das Protokoll von Birnboim angewendet (Birnboim und Doly, 1979; Birnboim, 1983). Dazu wurden 2 ml einer Übernachtskultur 10 min bei 10000 xg in einem Eppendorfgefäß zentrifugiert und das Bakterienpellet in 150 µl gekühltem P1-Puffer durch Schütteln resuspendiert. Nach Zugabe von 150 µl P2-Puffer wurde der Ansatz sechs- bis achtmal invertiert und maximal 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. In dieser Zeit wurden die Bakterien alkalisch lysiert, indem die Zellmembranen durch das im P2-Puffer enthaltene NaOH aufgebrochen und Proteine durch das ionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert wurden. Anschließend wurde der pH-Wert durch 150 µl P3-Puffer neutralisiert und ebenfalls sechs- bis achtmal invertiert. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis wurde der aus Proteinen, Zellorganellen und Membranbestandteilen bestehende Niederschlag 15 min bei 10000 xg abzentrifugiert. Der Überstand, der die Plasmid-DNA enthält, wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 1 ml eisgekühlten Ethanol (96%, -20°C) für 30 min bei -80°C gefällt. Anschließende Zentrifugation für 15 min bei 10000 xg sedimentierte die Plasmid-DNA, welche dann mit 200 µl 80%igem Ethanol gewaschen wurde. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet bei RT getrocknet und in 20 µl H₂O aufgenommen.

2.2.1.2 DNA-Plasmid Präparation aus Bakterien in großem Maßstab

Um Plasmid-DNA im größeren Maßstab zu isolieren, wurde ein Kit der Firma QIAGEN verwendet, wobei die Reinigungsmethode auf einer chromatographischen Trennung mittels einer Silica-Säule basiert. Eine Bakterienkultur wurde über Nacht in 100 ml LB-Medium/ 20 mg Ampicillin bei 37°C geschüttelt (220 rpm) und am nächsten Tag für 15 min bei 5000 xg zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 10 ml gekühltem P1-Puffer resuspendiert und dann durch 10 ml P2-Puffer nach sechs- bis achtmaligem Invertieren für

maximal 5 min bei RT alkalisch lysiert. Anschließend wurde der pH-Wert durch 10 ml P3-Puffer neutralisiert und 5 min auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde durch einen QIAfilter gereinigt. Währenddessen wurde die Säule mit 10 ml QBT-Puffer äquilibriert und dann das gereinigte Lysat hinzu gegeben. Nach Durchlaufen des Lysats wurde die Säule zweimal mit je 30 ml ethanolhaltigen QC-Puffer gewaschen und mit 15 ml QN-Puffer wurde die an die Säulenmatrix adsorbierte DNA von der Säule in ein Corex-Röhrchen eluiert. Zu der DNA-Lösung wurden 10,5 ml Isopropanol gegeben und diese für 30 min bei 15000 xg zentrifugiert, um die DNA zu fällen. Das DNA-Pellet wurde mit 5 ml 70% Ethanol gewaschen und der Überstand nach Zentrifugation für 10 min bei 15000 xg verworfen. Zuletzt wurde die DNA bei RT getrocknet und in 100 µl H₂O aufgenommen.

2.2.1.3 Messung der Plasmid-DNA Konzentration

Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde mittels UV-Spektrometrie bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Dazu wurde die Plasmid-DNA, die aus der Präparation im großen Maßstab gewonnen wurde, 1:100 mit H₂O verdünnt und der Referenzwert, H₂O ohne DNA, von dem ermittelten Wert der Plasmid-DNA abgezogen. Dabei gilt für doppelsträngige (ds) DNA (Lehninger, 2000):

- 1 OD₂₆₀ (optische Dichte) entspricht 50 µg/µl dsDNA.

Die Konzentration ergibt sich aus folgender Formel:

- dsDNA Konzentration [^{µg}/_{ml}] = (OD₂₆₀ - OD₂₈₀) x 2 x 50 x Verdünnungsfaktor

Zusätzlich wurde die DNA bei 280 nm gemessen und der Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀ berechnet, um eine Verunreinigung durch Proteine zu erfassen.

- Quotient ≥1,8 bedeutet nicht durch Proteine verunreinigte DNA

2.2.1.4 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Restriktionsenzyme sind meist bakteriellen Ursprungs und erkennen kurze, oft palindromische Sequenzen -in der Regel vier bis acht Nukleotidpaare- von meist unmethylierter DNA. Diese schneiden sie an der Erkennungssequenz oder unweit davon entfernt. Durch den Schnitt eines Restriktionsenzym können entweder so genannte stumpfe Enden (*blunt ends*) oder versetzte und daher überlappende, einzelsträngige Enden (*sticky ends*) entstehen (Alberts, 1994). Diese molekularbiologischen Scheren ermöglichen das Klonieren und Umklonieren von DNA in gewünschte Expressionsvektoren oder Markierungsvektoren. Dafür wurde der Restriktionsverdau in einem Endvolumen von 20 µl durchgeführt.

- 0,5 µg DNA
- 1-5 U Restriktionsenzym

- 2 µl entsprechender 10x Puffer

Die Reaktion erfolgte für mindestens eine Stunde bei der für das Enzym optimalen Temperatur und wurde zur Kontrolle oder Aufreinigung elektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.1.5 Dephosphorylierung und Ligation von DNA-Fragmenten

Die durch Restriktionsenzyme linearisierten Vektoren sollten vor der Ligation mit einem DNA-Fragment (*Insert*) an den freien Enden dephosphoryliert werden, um eine Religation zu verhindern und eine Identifizierung von positiven Klonen zu ermöglichen. Die alkalische Phosphatase SAP (*Shrimp alkaline phosphatase*, Amersham Biotech) aus *Pandalus borealis* entfernt ein Phosphat von den 5`-Enden der DNA. Je nach Art der Schnittstelle des linearisierten Vektors variiert die Aktivität des Enzyms und muss entsprechend angepasst werden. Das Endvolumen der Reaktion betrug 20 µl:

linearisierte Plasmid-DNA	0,5 µg
SAP für 5`-überhängende Enden	0,1 U
SAP für glatte Enden	0,3 U
SAP für 3`-überhängende Enden	0,5 U
10x SAP-Puffer	2 µl

Der Reaktionsansatz wurde für eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend das Enzym für 15 min bei 65°C hitzeinaktiviert. Für die Ligation eines Vektors mit einem DNA-Fragment, wovon beide mit dem gleichen Restriktionsenzym geschnitten wurden, wurde das Enzym T4-DNA-Ligase verwendet. Die Ligase knüpft eine Phosphodiesterbindung zwischen dem phosphoryliertem 5`-Ende und der OH-Gruppe eines 3`-Endes mit Hilfe des Phosphat-Gruppen liefernden Nukleotids Adenosintriphosphat (ATP). Das Endvolumen des Ligationsansatz betrug 10 µl:

linearisierter und dephosphorylierter Vektor	10 ng
DNA-Fragment	25-100 ng
T4-DNA-Ligase Puffer	1 µl
T4-DNA-Ligase	4 U

Falls das DNA-Fragment größer als der Vektor war, galt die allgemeine Mengenangabe:

Vektor:DNA Fragment	1: 5-10
---------------------	---------

Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 4°C inkubiert und am nächsten Tag in kompetente Bakterien wie z.B. JM109 transformiert.

2.2.1.6 Agarose-Gelelektrophorese und Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Durch die Agarose-Gelelektrophorese wurden DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt, wobei die kleinen Fragmente schneller durch das Agarose-Netzwerk wanderten

als große. Die Prozentigkeit des Agarosegels kann so angepasst werden, dass eine möglichst gute Auftrennung der DNA erfolgt; für kleine DNA-Fragmente (200-4000 bp) wählt man zwischen 1-1,5% der Agarose und für große (4000-10000 bp) 0,8%. Wenn ein elektrisches Feld angelegt wird, läuft die DNA aufgrund ihres negativen Zuckerphosphat-Rückgrats zur Anode. Durch einen Blaumarker, der unter anderem Glycerin zur Verhinderung der Diffusion von DNA aus den Geltaschen, Xylencyanol und Bromphenolblau enthält, wird die Lauffront der DNA farblich sichtbar gemacht. Das im Agarosegel enthaltene Ethidiumbromid interkaliert zwischen den Basenpaaren der DNA und ist unter UV-Licht sichtbar. So können die DNA-Fragmente nach der Auftrennung auf ihr Vorhandensein überprüft und bei Bedarf ausgeschnitten werden. Für ein 1%iges Gel wurde 1 g Agarose abgewogen und mit 100 ml 1x TAE-Puffer aufgekocht, bis eine klare Lösung entstand. Nach Abkühlen der Lösung auf ca. 50-60°C wurde Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5 µg/ml) dazugegeben und die Lösung in eine Flachgelkammer (MWG Biotech) gegossen, um sie darin auszuhärten. Danach wurden die Geltaschen mit den Proben inklusive Blaumarker gefüllt und die Elektrophorese durch Anlegen eines elektrischen Feldes von 80 mA und 400 V gestartet. Nach ausreichender Auftrennung konnte das Bandenmuster der DNA-Fragmente auf einem UV-Transilluminator, der an einem Computer mit Photosystem (Fluorchem 2) angeschlossen ist, fotografiert werden. Der mit aufgetragene kb-Leiter diente als Referenz, um die Größen der Banden abschätzen zu können. Wenn die DNA-Fragmente z.B. für einen Restriktionsansatz oder Ligation verwendet werden sollten, konnten sie aus dem Agarosegel eluiert werden. Dazu wurde die gewünschte Bande mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt. Zur Extraktion der DNA aus dem Gelstück wurden Kits von QIAGEN („QIAquick Gel Extraction Kit“) verwendet. Als Beispiel wird die Durchführung des Kits erläutert. Zuerst wurde das Gelstück inklusive DNA gewogen, 300 µl QG-Puffer/100 mg Gel dazugegeben und 10 min bei 50°C in einem Blockthermostat inkubiert, bis sich das Gel vollständig gelöst hat. Dann wurde die 100 µl Isopropanol/ 100 mg Gel dazugegeben, gemischt und die Lösung auf eine QIAquick Säule gegeben, welche wiederum in einem 2 ml Sammelgefäß steckte. Während einer Zentrifugation für 1 min bei 10000 xg band die DNA an die Silica-Säulenmatrix. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule mit 750 µl PE-Puffer gewaschen. Nach einer Zentrifugation für 1 min bei 10000 xg wurde der Durchfluss verworfen und die Säule nochmal 1 min bei 10000 xg zentrifugiert, um restliches Ethanol zu entfernen. Anschließend wurde die Säule auf ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß gesetzt und die DNA mit 30 µl EB-Puffer eluiert. Dazu wurde sie 1 min mit dem EB-Puffer bei RT inkubiert und dann 1 min auf höchster Stufe zentrifugiert.

2.2.1.7 Aufreinigung der Plasmid-DNA zur Mikroinjektion in die befruchtete Eizelle

Nach dem Restriktionsverdau der Plasmid-DNA mit BspHI und ClaI und Gel Extraktion der Transgen-Bande aus dem Agarose-Gel wurde die Transgen-DNA zuerst über eine Phenol/Chloroform-Fällung nach Maniatis und anschließender Ethanol-Präzipitation aufgereinigt. Dazu wurde 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamyl Alkohol (25:24:1) (Roth) zur DNA gegeben und für 5 Min auf höchster Stufe zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen, mit 1/10 Volumen 3 M Natrium-Acetat und 2,5 Volumina 100%igen eiskaltem Ethanol gemischt und bei -80°C für 30 min inkubiert. Das Gemisch wurde dann für 30 min bei 8000 xg und 4°C zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Dann wurde das Pellet mit eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen und luftgetrocknet bevor es in TE-Puffer pH 8,0 aufgenommen wurde. Als letzter Reinigungsschritt wurde die DNA über eine Elutip-D-Säule (Whatman) gegeben. Dazu wurde die Säulenmatrix als erstes mit *Low Salt*-Puffer gewaschen. Dann wurde die DNA in *Low Salt*-Puffer an die Säulenmatrix gebunden und danach mit mehr *Low Salt*-Puffer gewaschen. Zur Elution der DNA wurde 400 µl *High Salt*-Puffer verwendet. Die aufgereinigte DNA wurde erneut mit eiskaltem Ethanol präzipitiert, das Pellet an der Luft getrocknet und in steril gefiltertem Mikroinjektionspuffer aufgenommen.

2.2.1.8 Herstellung von kompetenten Bakterien

Kompetente Bakterien mussten hergestellt werden, damit Plasmid-DNA transformiert und z.B. in JM109 (Promega) amplifiziert werden konnte oder Proteine z.B. in BL21 (Studier und Moffatt, 1986) exprimiert werden konnten. Die Herstellung von kompetenten Bakterien erfolgte nach der Methode von Chung (Chung et al., 1989). Zuerst wurden mit einer sterilen Pipettenspitze Bakterien von einem bei -80°C gelagerten Stock abgekratzt und auf einer LB-Platte ausgestrichen, welche über Nacht bei 37°C inkubiert wurde. Von den sich bildenden Kolonien wurde eine Kolonie mit einer neuen Pipettenspitze gepickt und eine 5 ml LB-Flüssigkultur damit angeimpft. Nach der Übernacht-Inkubation bei 37°C (220 rpm) wurde 1 ml der Kultur zur Animpfung einer 100 ml LB-Flüssigkultur verwendet und so lange inkubiert, bis die Bakteriendichte eine OD₆₀₀ von 0,5 + 0,03 erreicht hatten. Dann wurde die Bakterienkultur 20 min auf Eis gehalten, 5 min bei 1200 xg zentrifugiert und anschließend vorsichtig in gekühltem TSS-Puffer resuspendiert. Aliquots von 200 µl wurden bei -80°C gelagert.

2.2.1.9 Transformation von kompetenten Bakterien

Um rekombinante Plasmid-DNA in Bakterien stabil zu amplifizieren, muss diese von Bakterien aufgenommen werden und diese Vorteile gegenüber Bakterien, die keine DNA aufgenommen haben, vermitteln. Dafür dient der Resistenzmarker - in den meisten Fällen Antibiotika-Resistenz - auf dem Vektor der Plasmid-DNA. Für die Transformation wird zuerst

ein 200 µl-Aliquot kompetenter Bakterien (2.2.1.7) auf Eis aufgetaut und dann 100 µl der Bakterien steril in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert. Es werden 10 ng des zu transformierenden Plasmids dazugegeben und durch Schnippen gemischt. Der Ansatz wird für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend ein Hitzeschock für 50 sek in einem 42°C warmen Wasserbad durchgeführt. Nach 2-minütiger Inkubation auf Eis werden 900 µl-Medium zu den Bakterien gefügt und diese zur Regeneration eine Stunde bei 37°C unter Schütteln (220 rpm) kultiviert. Danach können die Bakterien zur Selektion auf eine LB/Resistenzantibiotikum (RA)-Platte ausgestrichen werden oder bereits selektierte Plasmide zur Quantifizierung für die Animpfung einer 100 ml LB/RA-Flüssigkultur verwendet werden. Einzelne Kolonien werden von der Platte gepickt, eine 2 ml LB/RA-Flüssigkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln (220 rpm) inkubiert.

2.2.1.10 Mutagenese

Die *site-directed mutagenesis* Methode wurde verwendet, um gezielt eine Base zu mutieren (Punktmutation). Hier sollte die NheI Restriktionsschnittstelle in der *Htra1*-cDNA durch einen Basenaustausch so verändert werden, dass NheI dort nicht mehr schneiden kann (*silent mutation*). Dafür wurde das *QuikChangeLightning Kit* (Stratagene) für die *site-directed mutagenesis* nach Herstellerangaben verwendet. Die Primer (2.1.2) wurden dabei so gewählt, dass sie die Mutation flankiert von der unmodifizierten Nukleotidsequenz enthielten. Der Reaktionsansatz wurde wie folgt pipettiert:

Reaktionspuffer	5 µl
dsDNA	10 ng
Primer 1	125 ng
Primer 2	125 ng
dNTP-Mix	1 µl
QuikSolution Reagenz	1,5 µl
QuikChange Lightning Enzym	1 µl
H ₂ O	auf 50 µl auffüllen

und mit folgendem Programm im Thermocycler inkubiert:

95°C	2 min	
95°C	20 sek	← 18 Zyklen
60°C	10 sek	
68°C	30 sek/ pro kb Plasmidlänge	
68°C	5 min	

Der amplifizierte Ansatz wurde für 2 min auf Eis abkühlt und dann mit 1 µl DpnI nach kurzem Mischen für 1 h bei 37°C inkubiert. DpnI zerschneidet dabei spezifisch die methylierten und somit unmutierten DNA-Stränge. Die DNA wurde nun in die im Kit enthaltenen kompetenten

Zellen transformiert, auf LB-Ampinocillin-Agar-Platten ausgestrichen und für >16 h bei 37°C inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden gepickt und die DNA im kleinen Maßstab aufbereitet. Die Mutation wurde durch Sequenzierung und Restriktionsverdau verifiziert.

2.2.1.11 Auffüll-Reaktion des Vektors

Um den leeren Vektor zu religieren, wurden zunächst die überhängenden 5'-Enden aufgefüllt. Für die Reaktion wurde 1 µg Plasmid-DNA in einen 20 µl-Ansatz eingesetzt. Zusammen mit einfach eingesetztem Puffer, 2 mM dNTPs und 1 U T4-DNA-Polymerase wurde der Ansatz 5 min bei Raumtemperatur und anschließend zur Inaktivierung des Enzyms für 10 min bei 70°C inkubiert. Der Ansatz wurde direkt für die Ligationen mit glatten Enden weiter verwendet. Dazu wurde der komplette Ansatz der Auffüllreaktion verwendet. Diesem wurde einfach eingesetzter Enzympuffer, Polyethylenglykol (5%) und 5 U T4-Ligase (Fermentas) zugesetzt. Nach 1 h bei 22 °C und 10 min bei 65 °C zur Enzyminaktivierung wurden 30 ng DNA aus dem Ligationsansatz zur Transformation eingesetzt.

2.2.1.12 Sequenzierung

Es wurden 600 ng DNA mit 0,5 µl eines Sequenzierprimers (10 µM) versetzt und auf das Endvolumen von 6 µl mit H₂O aufgefüllt. Die erhaltene lineare Basensequenz sowie ein Chromatogramm der Basenpeaks wurden mit dem Softwareprogramm Vector NTI (Invitrogen) analysiert und mit entsprechenden Sequenzen aus eigenen Datenbanken verglichen. Die Sequenzierung wurde durch die Zentrale Bioanalytik (ZBA) des ZMMK-Labors durchgeführt.

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Auftrennung von Proteinen durch SDS-PAGE

Durch die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) wurden Proteine nach ihrem Molekulargewicht linear aufgetrennt und konnten so nach einer Aufreinigung aus Bakterien, Zellen oder Gewebe nachgewiesen werden. Die Methode basiert auf einer diskontinuierlichen Elektrophorese, bestehend aus einem Tris-Chlorid/Tris-Glycin-System und einem Sammel- bzw. Trenngel. SDS ist ein Detergenz, welches mit dem hydrophoben Kohlenstoffschwanz die Tertiärstruktur des Proteins aufbricht und mit dem polaren Kopf eine Negativladung an das Protein bringt. Die Negativladung ist proportional zur Länge der linearisierten Ketten und somit zum Molekulargewicht des Proteins, da das Verhältnis bindendes SDS:Aminosäure konstant ist (1:2). Zusätzlich reduziert das ebenfalls im Probenpuffer enthaltene β-Mercaptoethanol Disulfidbrücken, was eine vollständige

Reduktion des Proteins in seine Primärstruktur zur Folge hat. Das chemisch inerte Gel besteht aus polymerisierten Acrylamid-Monomeren und Quervernetzungen mit Methylenbisacrylamid. Die Porengröße ist -ähnlich dem Agarosegel- variabel und kann den aufzutrennenden Proteinen angepasst werden. Das denaturierte Protein wandert, nachdem ein elektrisches Feld angebracht wird, im Gel zur Anode, wobei kleine Proteine schneller laufen als große. Zuerst wurde ein Trenngel und nach dessen Polymerisation auf dieses ein 5%iges Sammelgel gegossen, in das ein 12-Taschen-Kamm eingebettet wurde. Um einen gleichmäßigeren Übergang von Sammelgel zu Trenngel und vor allem den großen Proteinen den Eintritt in das Trenngel zu ermöglichen, konnte ein Gradientengel mithilfe einer Gradientengel-Gießstation gegossen werden. Die fertigen Gele wurden in eine Vertikalelektrophorese-Apparatur eingespannt und mit SDS-Gellaufpuffer bedeckt. Zu der Proteinlösung wurde reduzierender SDS-PAGE-Probenpuffer pipettiert, gemischt und 5 min bei 95°C zur vollständigen Denaturierung der Proteine aufgeköcht. Anschließend folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 11000 xg, um unlösliche Aggregate zu pelletieren. Der Überstand sowie ein HMW (*high molecular weight*)-Marker wurden in die Taschen des Sammelgels pipettiert und ein elektrisches Feld angelegt. Die Spannung lag für kleine Gele bei 30 mA und für große Gele bei 40 mA unter maximaler Voltzahl.

HMW-Marker	kDa
Prestained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas)	
β-galactosidase	120
Bovine serum albumin	86
Ovalbumin	47
Carbonic anhydrase	34
β-lactoglobulin	26
Lysozyme	20

2.2.2.2 Nachweis von Proteinen innerhalb eines Polyacrylamidgels durch Coomassie-Färbung

Nach SDS-PAGE konnten die aufgetrennten Proteine innerhalb des Polyacrylamidgels durch den Farbstoff Coomassie Brilliant Blue R250 sichtbar gemacht werden, indem sich der anionische Triphenylmethan-Textilfarbstoff an kationische und unpolare hydrophobe Seitenketten der Proteine bindet. Das Gel wurde für eine Stunde mit der Coomassie-Färbelösung unter Schwenken inkubiert und anschließend unspezifisch gebundener Farbstoff durch mehrmaligen Wechsel der Coomassie-Entfärbelösung entfernt. Sobald Proteinbanden zu erkennen waren und der Hintergrund klarer geworden war, wurde das Gel über Nacht in einer 5%igen Essigsäurelösung gelagert, damit die Färbung fixiert und

Proteinbanden deutlicher hervortraten. Anschließend konnte das Gel fotografiert (Fluorchem 2) und mit dem Computerprogramm Photoshop 7.0 bearbeitet werden.

2.2.2.3 Nachweis von Proteinen innerhalb eines Polyacrylamidgels durch

Silberfärbung

Zum Nachweis geringer Proteinmengen im Polyacrylamidgel, die unterhalb der Nachweisgrenze von Coomassie Brilliant Blue liegen, wurde die Silberfärbung benutzt. Die Nachweisgrenze bei der Silberfärbung liegt bei etwa 10 ng Protein pro Bande. Zur Färbung wird das *SilverStain Kit* (Pierce) verwendet. Das SDS-Polyacrylamidgel wurde zuerst in hochreinem H₂O zweimal 5 min gewaschen. Pro Gel wurde jeweils ein Lösungsvolumen von 50 ml verwendet. Anschließend wurde das Gel in 30% Ethanol/10% Essigsäure-Lösung zweimal 15 min fixiert und dann in 10% Ethanol zweimal 5 min gewaschen. Danach wurde das Gel zweimal 5 min in hochreinem H₂O gewaschen und für 1 min in *Sensitizer Working Solution* inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde das Gel für 30 min in *Stain Working Solution* inkubiert und dann erneut zweimal 20 sek gewaschen bevor die *Developer Working Solution* zum Gel gegeben wurde. Bis zur Vollentwicklung der Banden wurde das Gel in der *Developer Working Solution* inkubiert (2-3 min). Gestoppt wurde die Reaktion in 5%iger Essigsäure.

2.2.2.4 Western-Blot und Immundetektion

Beim Western-Blot wurden die nach der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran durch Elektronentransfer übertragen und somit immobilisiert. Es gibt verschiedene Blotsysteme wie z.B. Halb-Trocken-Western-Blot (*Semidry-Blotting*) und (*Tankblotting*), die für das Blotten verwendet werden können; hier wurde der Nass-Western-Blot angewendet. Dazu wurde eine mit Methanol aktivierte PVDF-Membran auf das Polyacrylamidgel inklusive aufgetrennter Proteine in Richtung Anode gelegt und von jeweils zwei mit Borat-Transferpuffer angefeuchteten Whatman-Papieren eingerahmt. Diese Stapelschicht wird in einen Käfig mit Schwammauslegung gespannt und in eine Blotkammer gestellt, welche Borat-Transferpuffer enthielt. Der Transfer erfolgte entweder für 2 h bei 400 mA oder über Nacht bei 100 mA mit maximaler Spannung und bei 4°C. Nach dem erfolgreichen Transfer wurde die Membran für 5 min unter Schwenken in eine Ponceau S-Färbelösung gelegt, um so die Proteine reversibel auf der Membran anzufärben und anschließend für zweimal 5 min in 5% Essigsäure gewaschen, um den Hintergrund zu entfärben. Dies diente als Ladungskontrolle. Als Marker wurde ein *prestained* Marker der Firma Fermentas benutzt, so dass die Markerbanden auf der Membran sichtbar wurden. Die Membran wurde zwischen zwei durchsichtige Folien gelegt und eingescannt. Dann folgte ein Waschschriff von 10 min mit TBST-Puffer, um Reste der Essigsäure zu entfernen. Danach wurde die Membran mit

5% Milchpuffer/TBST für 1 h blockiert, um unspezifische Anlagerungen des Antikörpers im Vorhinein zu verhindern. Drei Waschschriffe für je 10 min mit TBST-Puffer entfernten überschüssige Blockierungslösung von der Membran. Ein zum Protein-Antigen spezifischer Erstantikörper wurde in entsprechender Verdünnung in der Regel eine Stunde bei RT unter Schwenken auf die Membran gegeben und diese anschließend erneut dreimal mit TBST-Puffer gewaschen. Der zum Erstantikörper passende Zweitantikörper, der die schweren Ketten der Spezies-abhängigen Immunglobuline erkennt und an den zusätzlich die Meerrettich-Peroxidase (HRP, horse radish peroxidase) gekoppelt ist, die entscheidend für die Entwicklung des späteren Lichtsignals ist, wurde in entsprechender Verdünnung eine Stunde bei RT unter Schwenken zur Membran gegeben. Zweimaliges Waschen mit TBST-Puffer für 10 min und kurzes Waschen mit H₂O entfernte das Detergenz Tween von der Membran und sorgt so für einen klaren Hintergrund auf dem Röntgenfilm. Das Protein-spezifische Signal wurde durch einminütiges Schwenken der Membran in der Chemolumineszenz-Detektionslösung erzeugt. Der Nachweis des Signals erfolgt im Imager (Fluorchem 2) mit unterschiedlichen Expositionszeiten. Das in der Detektionslösung enthaltende Luminol wurde durch H₂O₂ aktiviert, durch das Enzym HRP oxidiert und gelangte dadurch in einen angeregten Zustand. Beim Zurückfallen in den Grundzustand wurde eine elektromagnetische Strahlung mit der Wellenlänge von 428 nm emittiert und es zeigt sich im Imager genau dort ein Signal, wo der Antikörper band bzw. sich das Protein auf der Membran befand. Nach der Aufnahme des Signals konnte die Größe des Proteins mithilfe der Markerbanden abgeschätzt werden. Um die Bandenintensität im Vergleich zu einer Ladekontrolle wie z.B. β -Aktin auszuwerten, wurden desitometrische Auswertungen mittels der Quantity One Software (BioRad) durchgeführt und wie folgt berechnet:

Die relative Signalstärke von HTRA1:

$$\text{Relative Signalstärke HTRA1} = \frac{\text{Signalintensität HTRA1}}{\text{Signalintensität } \beta\text{-Aktin}}$$

Um eine relative Aussage über die Expressionsänderung von HTRA1 im Vergleich zum Wildtyp zu machen, wurden die relativen Signalstärken von transgenen Mäuse durch die relativen Signalstärken der Wildtypen geteilt.

$$\text{Relative Expressionsänderung von HTRA1} = \frac{\text{relative Signalstärke HTRA1 Transgen}}{\text{relative Signalstärke HTRA1 Wildtypen}}$$

2.2.2.5 Wiederverwendungen einer Membran

Eine Membran konnte mit mehr als einem Erstantikörper umgesetzt werden auch wenn diese Proteine gleicher Größe erkennen, indem sie nach der ersten Umsetzung „gestrippt“ wurde. Die an ein Protein gekoppelten Erst- und Zweitantikörper wurden dabei entfernt. Dafür wurde die Membran nach der ersten Immundetektion für 5 min mit H₂O inkubiert, gefolgt von 1-5 min mit 0,2 M Natronlauge. Dieser Vorgang sollte nicht zu lange andauern, da sonst die Gefahr besteht, dass sich auch die aufgetrennten Proteine von der Membran ablösen. Es erfolgte ein weiterer Waschschrift für 5 min mit H₂O und anschließend konnte wie unter 2.2.2.4 beschrieben mit der Blockierung der Membran fortgefahren werden.

2.2.2.6 Konzentrationsbestimmungen von Proteinen

Die BCA Methode basiert auf der Eigenschaft von Proteinen in alkalischer Umgebung Cu²⁺-Ionen zu Cu⁺-Ionen zu reduzieren (Biuret Reaktion). Die Reduktion erfolgt durch Cystein-, Tryptophan- und Tyrosinreste der Proteine sowie durch Peptidbindungen. Bicinchoninsäure (BCA) hingegen bildet in alkalischer Umgebung einen stabilen Chelatkomplex mit Cu⁺-Ionen in dem konstanten Verhältnis 2 BCA:1 Cu⁺-Ion (Smith et al., 1985). Der Komplex hat eine intensive violette Farbe und lässt sich bei seinem Absorptionsmaximum von 562 nm messen. Entscheidend ist, dass die Intensität des Farbkomplexes proportional zur Proteinmenge ist und so die Proteinkonzentration genau bestimmt werden kann. Für die genaue Proteinkonzentrationsbestimmung wurde das *BCA Protein Assay Kit* (Pierce) verwendet. Zuerst wurde eine BSA-Standardreihe hergestellt, die in dem gleichen Puffer angesetzt werden muss, in dem das zu messende Protein vorliegt. Dann wurde Lösung A, die unter anderem Bicinchoninsäure enthält, 1:50 mit Lösung B, 4% Kupfersulfat, gemischt. Je 25 µl der Standardreihe, der Probe (Doppelbestimmung) und eines Leerwertes (nur Probe) wurden in eine Vertiefung der 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert und 200 µl der gemischten Lösungen A und B hinzugefügt. Der Reaktionsansatz wurde für 30 min bei 37°C inkubiert und direkt danach in dem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen. Von den erhaltenen Werte für die Standardreihe und der Probe wurde der Leerwert abgezogen und die Werte der Standardreihe gegen die Konzentration in dem Computerprogramm Microsoft Excel aufgetragen. Die Geradengleichung dieser Eichgeraden diente dazu die Konzentration der Proteinlösung zu bestimmen.

2.2.2.7 Expression und Aufreinigung von HTRA1 Fusionsprotein mittels FPLC

Die FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) wurde zur Isolation und Aufreinigung des Δmac25HTRA1 Fusionsprotein verwendet. Das geschlossene Säulensystem lieferte endotoxin und pyrogenfreies Protein. Zudem liessen sich analytische Messgrößen wie z. B. pH-Wert, Säulendruck und Leitfähigkeit mit der FPLC aufzeichnen. Dabei übernahm eine

Pumpe den Auftrag der Proteinprobe und sorgte für einen konstanten Fluss des Puffers über die Säule (Gentechnische Methoden, Monika Jahnsohn, 4. Auflage).

Affinitätschromatographie

His (Histidin) –tags sind 6-10 Histidinreste lang und erleichtern die Aufreinigung von Proteinen aus Bakterien, da Histidin spezifisch an zweiwertige Nickel-Ionen bindet. Hierbei gibt es die native oder die denaturierende Reinigungsmethode. Bei der denaturierenden Methode wird die native Konformation des Proteins durch Zugabe von Harnstoff oder Guanidin-Chlorid zerstört und somit der His-tag freigelegt. Diese Methode findet auch Anwendung, wenn das Protein in Einschlusskörpern von *E.coli* liegt. Hier wurde die native Methode verwendet, da das His-getaggte Protein nativ in Lösung vorliegt. Dabei war darauf zu achten, dass die Ni-Chelat-Säule nach Absorption der Probe mit einer geringen Konzentration Imidazol (hier 30 mM) gewaschen wurde. An das Säulenmaterial binden nämlich auch leicht Metalloproteasen oder histidinhaltige Proteine, die keinen His-tag besitzen und durch den Imidazol-Puffer entfernt werden. Zum Eluieren wurde Imidazol hier in einer Konzentration von 150 mM benutzt, da es in dieser Konzentration mit Histidin um die Ni-Chelat-Bindungsstellen konkurriert.

Zur Expression des His-tag-Fusionsproteins wurde ein Expressionsvektor (z.B. pET) mit einem induzierbaren Promotor verwendet. Am ersten Tag wurde der Expressionsvektor inklusive cDNA des gewünschten Proteins, die hinter den His-tag ins korrekte Leseraster kloniert wurde (Michael Ehrmann, Universität Duisburg-Essen), in Bakterien des Stammes BL21 transformiert (2.2.1.8) und eine 200 ml LB_{Amp}-Flüssigkultur über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurde die Übernachtskultur zur Animpfung von 4 L LB_{Amp}-Flüssigkultur verwendet und bis zu einer OD₆₀₀ = 0,6 wachsen gelassen (ca. 1,5 h). Durch Zugabe von 100 µl 250mM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactosid) wurde die Proteinexpression induziert, indem IPTG mit dem Lac-Repressor komplexiert, so den *lac*-Operator frei hält und den Promotor zugänglich für die RNA-Polymerase macht. Die induzierte Bakterienkultur wurde für 5 Stunden bei 25°C kultiviert und für 30 min bei 4000 xg zentrifugiert. Das Pellet wurde über Nacht bei -20°C eingefroren. Am dritten Tag wurde das Pellet aufgetaut und unter Zugabe von Proteaseinhibitor (Sigma) in 20 ml FPLC-Lysis-Puffer resuspendiert. Die Bakterien wurden mit Homogenisierung auf Eis und anschließender Sonifikation für zweimal 20 sek mit einer Amplitude von 70 W und einem Zyklus von eins aufgeschlossen. Danach wurde die Proteinlösung 30 min bei 19000 xg zentrifugiert und der Überstand in ein neues 50 ml Falcon überführt. Zwischendurch wurde die Ni²⁺-NTA Säule (QIAGEN) vorbereitet, indem sie mit 8-10 Säulenvolumen FPLC-Wasch-Puffer mit einer Flussrate von 4 ml/ min gewaschen wurde. Dann wurde der Proteinüberstand mit Hilfe einer Injektionsschleife injiziert und die Säule nach dem Beladen solange gewaschen bis der UV nahe 0 lag.

Anschließend wurde die Säule mit FPLC-Wasch-Puffer II gewaschen und das His-tag-Protein wurde mit FPLC-Elutions-Puffer in 1 ml Fraktionen eluiert. Alle diese Schritte erfolgten mit einer Flussrate von 3 ml/min. Die erhaltenen Fraktionen wurden über SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung überprüft. Die reinsten Fraktionen wurden gepoolt und für die nachfolgende Hydroxyapatit (HA)-Chromatographie verwendet.

Hydroxyapatit (HA)-Chromatographie

HA ist ein Calciumphosphatmineral, das basische als auch saure Proteine bindet. Basische Proteine binden über ihre Aminogruppen an die negative Oberfläche des Materials, während saure Proteine über ihre Carboxylgruppen Komplexbindungen mit dem Ca^{2+} des Minerals bilden (Der Experimentator Proteinbiochemie/Proteomics, 2006). Das Fusionsprotein ist ein saures Protein und wurde daher mit einer Phosphatsalzlösung eluiert. Hierbei erfolgte die Elution in einem Gradienten (FPLC-HPS-Start-Puffer – FPLC-HPS-End-Puffer).

Zunächst wurde die HA-Säule (Bio-Rad) mit 1 M NaCl gewaschen und die gepoolten Fraktionen der Affinitätschromatographie mit der Injektionsschleife injiziert. Die Säule wurde mit 100 ml FPLC-HPS-Start-Puffer gewaschen und das Fusionsprotein mit einem Gradienten von FPLC-HPS-Start-Puffer nach FPLC-HPS-End-Puffer über 125 min in 5 ml Fraktionen und einer Flussrate von 4 ml/min eluiert. Die Reinheit der Fraktionen wurde mit SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung geprüft, die reinsten Fraktionen wurden dreimal 30 min in Dialyse-Puffer dialysiert und mit 10% Glycerin bei -80°C aufbewahrt.

2.2.2.8 Digestions-Assay

Beim Digestions-Assay wurden verschieden extrazellulär Matrix (EZM)-Proteine mit $\Delta\text{mac}25\text{HTRA}1$ inkubiert. Dafür wurden 5 μg EZM-Protein mit 2,5 μg $\Delta\text{mac}25\text{HTRA}1$ und 10 μl Digestions-Puffer (50 mM Tris, 5 mM CaCl_2 , 150 mM NaCl) bei 37°C für 1, 3 und 18 Stunden inkubiert. Zur Kontrolle wurden Ansätze mit HTRA1-Inhibitor NVP-LEB748 (Novartis) in einer Konzentration von jeweils 500 μM mit $\Delta\text{mac}25\text{HTRA}1$ für 20 min vorinkubiert. Anschließend wurde das jeweilige EZM-Protein in entsprechender Konzentration hinzugegeben und für 18 h bei 37°C inkubiert. Zusätzlich wurde $\Delta\text{mac}25\text{HTRA}1$ allein für 0 bzw. 18 h bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden vor dem Wegfrieren mit Probenpuffer versetzt, später für 5 min bei 99°C gekocht und für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert bevor sie auf ein SDS-Gel aufgetragen wurden. Nach dem Lauf wurden die Proteinbanden mit einer Silberfärbung sichtbar gemacht.

2.2.3 Zellkultur

Alle Experimente mit Zellen wurden unter der Sterilbank ausgeführt und es wurde unter sterilen Bedingungen gearbeitet. Verwendete Lösungen und Materialien, wie z.B. Glaspipetten und Vorratsgefäße, wurden autoklaviert oder waren steril verpackte. Nach dem Gebrauch wurden alle Materialien autoklaviert. Die verwendeten Zelllinien HEK-293-EBNA-Nierenzellen und retinale ARPE-19-Pigmentepithelzellen sind adhärente Zellen, die am Boden der Kulturschale haften und eine zweidimensionale Zellschicht bilden. Sie wurden in begasten Brutschränken mit einer wassergesättigten Atmosphäre bei 37°C und 5%iger CO₂-Atmosphäre kultiviert.

2.2.3.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zellen können lange in flüssigen Stickstofftanks gelagert werden. Zum Einfrieren von Zellen wurde zuerst Kulturmedium mit 10% *fetal calf serum* (FCS) und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) auf 4°C vorgekühlt und die Zellsuspension einer 10 cm-Kulturschale für 5 min mit 200 xg bei RT zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml der vorgekühlten Lösung resuspendiert und in ein Einfriereröhrchen pipettiert. Das Röhrchen wurde in ein Styroporgefäß gestellt und langsam auf -80°C abgekühlt. Um die Zellen wieder aufzutauen, wurde das entnommene Aliquot schnell im Wasserbad bei 37°C erwärmt, damit mögliche Beschädigungen der Zellen durch das zum Einfrieren dazugegebene DMSO minimiert wurden. Dann wurden die Zellen in 10 ml Medium resuspendiert, 5 min bei 500 xg zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Zellpellet wurde schließlich in 10 ml Kulturmedium aufgenommen und in eine 10 cm-Kulturschale überführt.

2.2.3.2 Medienwechsel und Passagierung

Das Medium der Zellen musste in Abhängigkeit von ihrer Dichte alle zwei bis vier Tage gewechselt werden. Dabei wurden die adhärennten Zellen zuerst mit 10 ml PBS-Puffer gewaschen und dann für 5 min im Brutschrank mit 2 ml einer 1%igen Trypsin/EDTA-Lösung vom Boden der Kulturschale abgelöst. Die enzymatische Reaktion wurde mit 4 ml Medium abgestoppt und die Zellsuspension 5 min bei 200 xg in einem 15 ml Falcon zentrifugiert, um das Trypsin entfernen zu können. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 5 ml neuem Medium resuspendiert und je nach Bedarf einige Tropfen in eine neue mit 10 ml Medium gefüllte 10 cm-Kulturschale gegeben. Die geteilten Zellen wurden weiter im Brutschrank kultiviert.

2.2.3.3 Transfektion von Zellen

Mit Hilfe eukaryotischer Expressionvektoren können gezielt endo- oder exogene Proteine in Zellen überexprimiert werden und auch mutierte Proteine auf ihre Funktion und intrazelluläre Lokalisation analysiert werden, indem die Zellen mit diesen Vektoren transfiziert werden. Die Zellen liessen sich effizient mit dem Transfektionsreagenz FuGENE 6 (Roche) transfizieren. Dafür wurde eine pelletierte Zellsuspension einer konfluenten 10 cm-Zellplatte in 5 ml Medium resuspendiert und zwei bis drei Tropfen davon zu 2 ml Medium in eine Vertiefung einer 6-Loch-Kulturplatte (*6-well-plate*) pipettiert. Kurz vor Transfektion wurde das Kulturmedium gegen 500 μ l serumfreies Medium ausgetauscht. Danach wurden 3 μ l FuGENE 6 in 97 μ l serumfreiem Medium in einem Reaktionsgefäß (1,5 ml) verdünnt und 5 min bei RT inkubiert. In ein anderes Reaktionsgefäß (1,5 ml) wurde 1 μ g DNA gegeben. Nachfolgend wurde das verdünnte FuGENE 6 (Roche) zur DNA hinzugegeben und vorsichtig gemischt. Nach 15 min Inkubation bei RT wurde der Ansatz tröpfchenweise bei begleitendem leichtem Schütteln auf die Zellen gegeben. Nach 24 h konnte die Selektion mit Puromycin (1 μ g/ml) gestartet werden.

2.2.3.4 Isolierung primärer retinaler Pigmentepithel (RPE)-Zellen

Die isolierten Mäuseaugen wurden unter der sterilen Zellkulturbank mit PBS gewaschen und der vordere Augenabschnitt sowie die Linse wurden entfernt. Der Augenbecher wurde mit PBS gewaschen und die Retina vorsichtig mit einem Skalpell entfernt. Anschließend wurde der Augenbecher mit Trypsin/EDTA-Lösung für 30 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die RPE-Zellen konnten nun mit Hilfe eines Skalpells von der Choroidea in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) gelöst werden. Nach einem Zentrifugationschritt konnten die Zellen ausplattiert werden.

2.2.3.5 Proteinpräparation aus Zellen

Mit dieser Methode können endogene sowie überexprimierte Proteine analysiert werden, indem sie intakt aus den Zellen präpariert werden. Dafür wurde zuerst das Medium einer konfluenten 10 cm-Zellplatte abgesaugt und diese zweimal mit 10 ml PBS-Puffer gewaschen. Die Ablösung der Zellen von dem Boden erfolgte durch Abkratzen der Zellen. Die gelösten Zellen wurden in 1 ml PBS-Puffer aufgenommen und in ein Eppendorfgefäß überführt. Danach wurden die Zellen 5 min bei 500 xg wieder pelletiert, um sie in neuen 500 μ l vorgekühltem RIPA-Puffer inklusive 5 μ l Proteaseinhibitor und Phosphataseinhibitor (alles Santa Cruz) aufnehmen zu können. Die Zellen wurden durch Ultraschall-Sonifikation auf Eis aufgeschlossen und nach 40minütiger Inkubation auf Eis für 15 min bei 10000 xg und 4°C zentrifugiert. Dadurch wurden alle nicht-löslichen Moleküle und Zelltrümmer

sedimentiert. Der Proteinüberstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bis zur weiteren Analyse auf Eis gehalten bzw. bei -20°C gelagert.

2.2.3.6 Adhäsionsassay

Die Versuche wurden in 96-er Multiwell Platten durchgeführt, welche sowohl unbeschichtet als auch mit EZM-Komponenten beschichtet verwendet wurden. Das in gelöster Form vorliegende Fibronectin wurde mittels serumfreien Gewebekulturmediums auf die gewünschte Konzentration eingestellt und pro Kavität wurden 100 µl pipettiert. Die Multiwellplatte wurde verschlossen und 30 min bei 37°C inkubiert. Die Beschichtung mit 1%iger BSA-Lösung wurde auf die vorherige EZM-Beschichtung aufgetragen und diente der Unterdrückung unspezifischer Proteinbindungen. Dazu wurde die ECM-Beschichtung vorsichtig ohne den Boden der Kavität zu berühren abgesaugt, 100 µl einer 1%igen BSA-Lösung in jede Kavität gegeben und für 30 min im Wärmeschrank bei 37°C inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die Lösung vorsichtig abgesaugt und jede Kavität mit 100µl PBS-Gebrauchslösung gespült. Bis zur Zellaussaat erwärmte man die Multiwellplatten im Wärmeschrank. Die für die Versuche verwendeten Zellen wurden abgelöst und mittels serumfreien Mediums resuspendiert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels Thoma-Zellzählkammer. Nach diesem Wert konnte die gewünschte Zellkonzentration mit serumfreiem Medium hergestellt und pro Kavität jeweils 100µl pipettiert werden. Es wurde ein Zelladhäsionsassay mit dem Farbstoff Kristallviolett verwendet, bei dem die Zahl der adhärenen Zellen nach Farbstoffmarkierung photometrisch durch Extinktion bestimmt wurde. In die vorbereiteten 96er Multiwellplatten wurden nach Absaugen der PBS-Gebrauchslösung Zellen in serumfreiem Medium in einer definierten Dichte ausgesät: 50000 Zellen/well. Diese wurden dann 30 min im Brutschrank (37°C, 5% CO₂, 10% O₂) inkubiert. Nicht adhärenente Zellen wurden anschließend zusammen mit dem Medium abgesaugt. Die nun in den Kavitäten verbleibenden adhärenen Zellen wurden mittels 100 µl 70%igem Ethanol (bei RT) je well auf dem Gefäßboden fixiert. Nach dem Absaugen des Ethanols und einer Färbung mit 0,1% Kristallviolett (100 µl/well, 20 min, RT) wurden die Platten mehrmals gründlich in einem Bad mit Aqua dest. solange gespült und auf einer Papierunterlage ausgeschlagen, bis keine Farbstofflösung mehr sichtbar war. Nun wurden die Platten 24 h bei RT getrocknet. Die fixierten und gefärbten Zellen wurden auf der Schüttelplatte mittels 0,02%iger Triton-X-100 Lösung (50µl/well, 30 min, 500 U/min) lysiert, gefolgt von einer Isopropanol-Überschichtung (50µl/well, 5 min, 500 U/min). Anschließend wird die Extinktion bei 590 nm im Elisa-Reader gemessen. Zur Berücksichtigung der nicht zellvermittelten Farbstoffabsorption an BSA und der jeweiligen Beschichtungssubstanz wurde jeweils ein Leerwert ohne Zellen ermittelt und von den gemessenen Werten mit Zellen subtrahiert. Der hier beschriebene leicht modifizierte Adhäsionsassay wurde zuvor bereits

von Aumailley/Timpl (1989), Stefansson/Lawrence (1996) und Borntäger (1999) vorgestellt und verwendet.

2.2.4 Tierexperimentelle Arbeiten

2.2.4.1 Mikroinjektion

Die Mikroinjektion des Transgens wurde von Mitarbeitern des Zentrums für Molekulare Medizin der Universität zu Köln (ZMMK) durchgeführt. Dabei wurde die DNA des Transgens durch einen Mikromanipulator in den männlichen Pronucleus der befruchteten Eizelle einer B6SJLF1/J-Maus mikroinjiziert (Abb. 3.8). B6SJLF1/J (C57BL/6 X SJL/J) werden routinemäßig für die Mikroinjektion genutzt, da sie eine hohe Anzahl an injizierbaren Embryonen erzeugen.

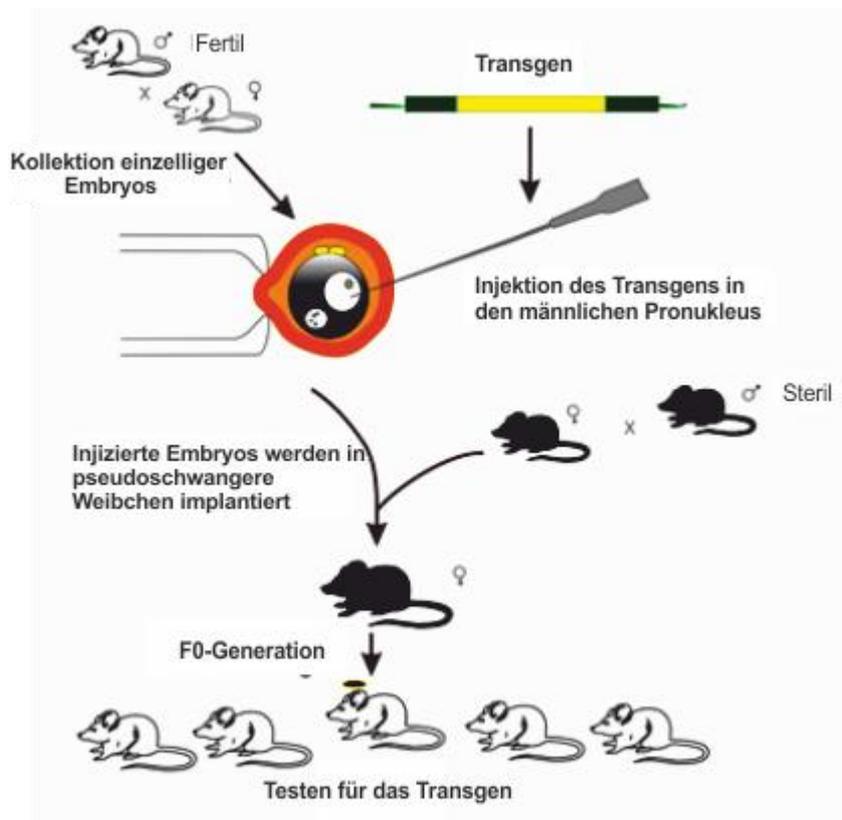


Abb. 2.1 Mikroinjektion des Transgens. Das Transgen wird in den männlichen Pronucleus der befruchteten Eizelle einer Maus injiziert und anschließend werden die mikroinjizierten Embryos in scheinchwangere Ammenmütter, die Mäuse der sogenannte *Founder*- oder F0-Generation gebären, implantiert (verändert übernommen von <http://www.barshop.uthscsa.edu/CoreTransgenic.html>).

Nach der Mikroinjektion wurden die Embryos in scheinchwangere Ammenmütter implantiert, die nach ca. drei Wochen die sog. *Founder*- oder F0-Generation gebären. Erfolgt die Integration des Transgens im Einzellstadium, sind alle Zellen genetisch identisch. Somit

verläuft die Vererbung nach den Mendelschen Regeln und nur die Hälfte der F1-Generation wird ein Exemplar des Transgens besitzen. Erfolgt die Integration des Transgens jedoch im späteren Mehrzellstadium, bildet sich ein sog. „Mosaik“ aus genetisch unterschiedlichen Zellen. Dabei kann es auch zu Zellen mit unterschiedlicher Transgenanzahl kommen. Liegt das Transgen nun nicht in den Keimbahnzellen der F0-Maus vor, wird diese Maus keine transgenen Nachkommen liefern (Mülhardt, 2009). Diese Mäuse wurden mittels PCR (2.2.4.5) auf das Transgen getestet und mit C57BL/6N-Wildtyp-Mäusen gekreuzt.

2.2.4.2 Mauspräparation

Transgene Tiere, die für Gewebentnahmen benötigt wurden, wurden durch Strecken (zervikale Dislokation) oder CO₂-Begasung getötet. Die Gewebe wurden unmittelbar entnommen und entweder in geeigneten Gefäßen gelagert oder sofort weiterverarbeitet. Für die RNA-Isolation oder Proteinextraktion wurden entsprechende Gewebe in sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße oder Plastikröhrchen überführt, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert. Gewebe für histologische Analysen wurden in entsprechende Fixierlösungen überführt.

2.2.4.3 Amputation der äußeren Schwanzspitze

Jungen Mäusen (2-3 Wochen) wurden ca. 0,3-0,5 cm ihrer Schwanzspitze zur Genotypisierung mit einem scharfen Skalpell abgeschnitten. Blutungen wurden mit einem Druckverband unterbunden.

2.2.4.4 Isolierung der genomischen DNA aus Schwanzbiopsien

Die genomische DNA wurde jeweils aus der Schwanzspitze gewonnen, welche zuerst über Nacht in 500 µl DNA Digestions-Puffer mit 0,5 mg/ml Proteinase K bei 55°C im Thermomixer leicht schüttelnd inkubiert wurde. Anschließend wurde die DNA mit 700 µl Phenol/Chloroform/Isoamyl Alkohol (25:24:1) (Roth) gemischt und 1 h leicht schüttelnd inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit wurden 500 µl der oberen Phase in ein neues Eppendorfgefäß transferiert und mit 1 ml 100% Ethanol solange gemischt bis ein Präzipitat entstand (nicht vortexen). Anschließend wurde die Probe wieder für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und das Pellet mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen, in 200 µl TE Puffer pH 8,0 aufgenommen, drei Stunden bei 55°C inkubiert und schließlich bei 4°C gelagert.

2.2.4.5 Amplifikation von DNA (Polymerasekettenreaktion, *Polymerase Chain Reaction*)

Die PCR ermöglicht es eine DNA-Sequenz milliardenfach zu amplifizieren (Alberts, 1994), wenn die Anfangs- und Endsequenz bekannt sind. Dazu werden zwei synthetisch hergestellte DNA-Oligonukleotide, so genannte Primer - *sense* und *antisense* -, verwendet, die jeweils komplementär zu der Sequenz eines Strangs der Doppelhelix sind und unter optimalen Temperaturbedingungen spezifisch an die DNA binden. Die Temperatur hängt unter anderem von der Basenpaarzusammensetzung, insbesondere dem G-C Gehalt ab. Die DNA-Polymerase kann mit zusätzlich bereitgestellten Nukleotiden die DNA-Synthese an den Primern beginnen und entlang des vorgegebenen Strangs die DNA-Sequenz kopieren. Entscheidend ist, dass die dsDNA vorher in Einzelstränge denaturiert wird, damit die Primer und die DNA-Polymerase überhaupt an die DNA binden können. Dafür wird eine hohe Temperatur benötigt, was wiederum zu der Wahl der thermostabilen *Taq*-Polymerase von *Thermus aquaticus* führt. Bei der PCR kann man 3 Schritte definieren: (1) Die DNA wird bei mindestens 94°C denaturiert, um die Anlagerung des Primers an die Einzelstränge zu ermöglichen. (2) Nach Abkühlen auf eine für den Primer optimalen *Annealingtemperature* erfolgt die Hybridisierung des Primers an die komplementäre Sequenz der DNA. (3) Die DNA-Polymerase synthetisiert einen neuen DNA-Strang unter optimalen Temperaturbedingungen. Zyklen, die aus den drei Schritten bestehen, werden solange wiederholt bis ausreichende DNA-Mengen vorliegen. Es sollte darauf geachtet werden, dass eine zu niedrige *Annealingtemperature* zu unspezifischen Bindungen des Primers an die DNA und eine zu hohe Zyklenanzahl zu Fehlern in der DNA-Synthese führen kann. Das Endvolumen des PCR-Reaktionsansatzes beträgt 50 µl:

10x <i>Taq</i> Puffer	5 µl
MgCl ₂	8 µl
dsDNA	8-10 ng
<i>sense</i> Primer (10 µM)	1 µl
<i>antisense</i> Primer (10 µM)	1 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
<i>Taq</i> DNA Polymerase	1 U

Das PCR-Programm wurde in dem PCR-Thermocycler automatisch durchgeführt:

1. 94°C	2 min		35 Zyklen
2. 94°C	20 sek		
3. 63°C	30 sek		
4. 72°C	1 min/kb		
5. 72°C	15 min		
6. 4°C	Pause		

Die *Annealingtemperatur* unter 3. stellt die optimale Temperatur für die unter 2.1.4 verwendeten Primer RPEfor und HTRA1rev zur Genotypisierung der *Htra1*-transgenen Mäuse dar.

2.2.4.6 Gesamt RNA-Isolierung aus tierischen Zellen und Gewebe

Zur Isolierung der gesamt RNA aus tierischen Zellen und Geweben wurde das *RNeasy Mini* Kit von QIAGEN verwendet. Die Durchführung des Kits wird wie folgt erläutert. Zunächst wurde das RPE-/BM-/Chorioid-Gewebe aus den Mäuseaugen präpariert und in einem Eppendorfgefäß gewogen. Es sollte darauf geachtet werden nicht mehr als 30 mg Gewebe genutzt werden. Zu dem Gewebe wurde als nächstes RLT-Puffer (600 µl/30 mg) hinzugegeben und das Gemisch wird mit einem kleinen Hand-Homogenisator (2.1.6; Wheaton-Mikro-Gewebe-Hand-Homogenisator 0,2 ml) homogenisiert und anschließend durch einen *QIAshredder* Homogenisator für 2 min bei maximaler Umdrehung zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das erhaltene Lysat wurde mit 70% Ethanol gemischt. Der Ansatz wurde dann auf eine *RNeasy* Säule, die in ein 2 ml Reagiergefäß gestellt wurde, gegeben. Der Durchfluss wurde verworfen und 700 µl RW1-Puffer auf die Säule gegeben. Nach erneuter Zentrifugation für 15 sek bei 8000 xg und nach Verwerfen des Durchflusses wurde zum Waschen 500 µl RPE-Puffer auf die Säule gegeben und wieder für 15 sek bei 8000 xg zentrifugiert. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt bevor die Säule in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß gestellt wurde und zur Elution 30-50 µl RNase-freies H₂O direkt auf die Säulenmembran gegeben wurde. Zum Schluss wurde die Säule für 1 min bei 8000 xg zentrifugiert. Das Eluat befand sich nun im Reagiergefäß und die RNA-Konzentration konnte anhand der optischen Dichte gemessen werden.

2.2.4.7 Messung der RNA-Konzentration

Die Konzentration der RNA wurde wie die DNA-Konzentration mittels UV-Spektrometrie bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Dazu wurde die RNA 1:100 mit H₂O verdünnt und der Referenzwert H₂O ohne RNA von dem ermittelten Wert der RNA abgezogen. Dabei gilt für RNA:

- 1 OD₂₆₀ entspricht 40 µg/µl RNA.

Die Konzentration ergibt sich aus folgender Formel:

- RNA-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{ml}$] = (OD₂₆₀ - OD₂₈₀) x 2 x 40 x Verdünnungsfaktor

2.2.4.8 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Die gewonnene gesamt RNA wurde zur Synthese der cDNA mittels des *SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix* von Invitrogen verwendet. Zunächst wurde die isolierte RNA (1-2 µg) mit den Primern (Oligo dTs) und dem *Annealing*-Puffer bei 65°C für 5 min inkubiert und anschließend sofort auf Eis gestellt:

RNA	1-2 µg
Primer (Oligo dTs)	1 µl
<i>Annealing</i> Puffer	1 µl
Diethylpyrocarbonat (DEPC)- <i>treated</i> H ₂ O	3 µl

Dann wurde auf Eis der *2x First-Strand Reaction Mix* und der *Enzyme Mix* hinzupipettiert:

2x First-Strand Reaction Mix	10 µl
Enzyme Mix	2 µl

und die Proben im Thermocycler bei folgendem Programm inkubiert:

50 min	50°C
5 min	85°C

Anschließend wurde der Ansatz mit RNase H für 20 min bei 37°C verdaut und für 10 min bei 65°C inaktiviert.

2.2.4.9 quantitative Echtzeit-PCR

Für die quantitative Echtzeit-PCR wurde die aus 2.2.4.7 gewonnene cDNA verwendet. Dazu wurden die entsprechenden Primer (2.1.2) und die Sonde mittels der *Universal ProbeLibrary* von Roche für *Htra1* (Sonde #88) und β -Aktin (Sonde #101) ermittelt. Diese Sonden sind sog. Hydrolyse-Sonden, die an ihrem 5'-Ende mit dem Farbstoff Fluoreszein (FAM) und an ihrem 3'-Ende mit einem dunklen *Quencher* Farbstoff gekoppelt sind. Dabei wird die 3'-5'-Exonuclease-Aktivität der *Taq*-Polymerase genutzt, indem sie die Sonde am 5'-Ende des Gegenstranges abbaut. Dadurch wird FAM (*Reporter*) freigesetzt und die Signalstärke steigt proportional zu DNA-Synthese an. Hier diente β -Aktin als Bezugsgen für die Expression des *Htra1*-Gens. Der Ansatz wurde in 3er Ansätzen wie folgt pipettiert (insgesamt 25 µl):

Universal Probe	0,25 µl
Primer 1	1 µl
Primer 2	1 µl
H ₂ O	5,25 µl
qPCR mix	12,5 µl
cDNA	5 µl (1:10 verdünnt)

und mit folgendem Programm laufen gelassen:

50°C	2 min
------	-------

95°C	2 min		
95°C	15 sek	←	50 Zyklen
60°C	30 sek		
Plate read			
10°C	endlos		

Die Ergebnisse der quantitativen Echtzeit-PCR wurden mittels der *Opticon 3 Monitor* Software ausgewertet. Die Berechnung der Daten erfolgte durch die Pfaffl Methode (Pfaffl, 2001). Dazu musste zunächst die Effizienz der Amplifikation berechnet werden. Liegt die Effizienz bei 100%, wird die DNA in jedem Zyklus verdoppelt. Die Effizienz wurde mit folgender Formel errechnet:

$$E = 10^{-1/\text{Steigung}} - 1 ; E = \text{Effizienz}$$

Die Steigung m ergibt sich aus der Standardkurve der spezifischen quantitativen Echtzeit-PCR.

Mit der Pfaffl Methode wurde die relative mRNA Expression wie folgt berechnet:

$$\text{Verhältnis} = \frac{(E_{\text{Zielgen}} + 1)^{\Delta\text{Ct Zielgen (Wildtyp-transgene Linie)}}}{(E_{\text{Bezugsgen}} + 1)^{\Delta\text{Ct Bezugsgen (Wildtyp-transgene Linie)}}$$

E = Effizienz

ΔCt = Differenz der Ct-Werte

2.2.4.10 Southern Blot

Als Southern Blot bezeichnet man den Transfer der im Agarosegel aufgetrennten DNA auf eine Nylonmembran. Anschließend erfolgte die Identifizierung spezifischer Fragmente durch Hybridisierung mit einer Digoxigenin (DIG)-markierten DNA-Sonde. Um später eine größenspezifische Zuordnung des DIG-Signals zu ermöglichen, wurde ein DIG-markierter Marker mit aufgetragen. Danach wurde die DNA im Gel zweimal für 15 min in Denaturierungs-Lösung inkubiert, mit H₂O dest. gewaschen und zweimal 15 min in Neutralisierungs-Lösung inkubiert. Anschließend wurde die DNA in 20 x SSC äquilibriert und über Nacht auf eine Nylonmembran transferiert. Der Transfer wurde wie folgt aufgebaut: Ein Whatman 3MM Papier wurde in 20 x SSC getaucht und auf eine Brücke, die auf 20 x SSC Puffer lag, gelegt. Darauf wurde das Gel gelegt und alles glatt gestrichen. Die trockene Nylonmembran wurde auf das Gel gelegt und ebenfalls glatt gestrichen. Es wurde darauf

geachtet, dass keine Luftblasen vorhanden waren. Auf die Membran wurde ein Whatman Papier, ein Stapel Papiertücher, eine Glassplatte und ein Gewicht (200-500 g) gelegt.

2.2.4.11 Digoxigenin-Markierung doppelsträngiger DNA

Zur Digoxigenin-Markierung der DNA wurde das *DIG Nucleic Acid Detection* Kit (Roche) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die DNA wurde dafür durch UV-Vernetzung (*crosslinking*) an die Membran fixiert. Die feuchte Membran wurde auf ein in 20 x SSC getauchtes Whatman Papier gelegt und so 1-3 min auf einen UV Transilluminator gelegt. Die Sonde wurde mit Hilfe des *PCR DIG Probe Synthesis Kit* (Roche) nach Herstellerangaben synthetisiert. Der Blot wurde mit *DIG Easy Hyb*-Puffer (Roche) prehybridisiert. Dazu wurde die Hybridisierungstemperatur (T_{hyb}) ausgerechnet: $T_m: 49,82 + 0,41(\%G+C) - 600/L$ $T_{hyb}: T_m - (20^\circ\text{bis } 25^\circ\text{C})$ T_m : Schmelzpunkt der Sonde, L: Länge der Sonde

Für 100 cm² wurden 10 ml *DIG Easy Hyb*-Puffer vorgewärmt. Der Blot wurde in einen Plastikbeutel gelegt, der durch Schweißen eng um den Blot geschlossen wurde. Der vorgewärmte *DIG Easy Hyb*-Puffer wurde zur Membran gegeben, der Beutel fest verschlossen und die Membran im Beutel in einem schüttelnden Wasserbad für mindestens 30 min inkubiert. Dabei wurde die Membran mit Gewichten auf dem Boden des Wasserbads gehalten. Pro 1 ml *DIG Easy Hyb*-Puffer wurden 2 µl PCR-gelabelte DIG-Sonde dazupipittiert. Pro 100 cm² wurde 3,5 ml *DIG Easy Hyb*-Puffer benötigt. Die Sonde wurde wie folgt zum *DIG Easy Hyb*-Puffer hinzugegeben: Die benötigte Menge Sonde wurde zu 50 µl H₂O in ein Eppi gegeben. Das Eppi wurde für 5 min in ein kochendes Wasserbad gehalten, damit die DNA denaturiert. Dann wurde die Probe schnell auf Eis gekühlt. Die Probe wurde sofort dem vorgewärmten *DIG Easy Hyb*-Puffer hinzugefügt. Der Prehybridisierungspuffer wurde verworfen und der vorgewärmte Hybridisierungspuffer + Sonde wurde sofort zur Membran gegeben. Der Beutel wurde wieder verschweißt und die Membran über Nacht im Wasserbad mit der Sonde inkubiert. Der Beutel wurde aufgeschnitten und der Hybridisierungspuffer + Sonde in ein 15ml Falcon gegeben und bei -20°C aufbewahrt. Man konnte ihn weitere drei- bis fünfmal benutzen. Die Membran wurde zweimal 5 min schüttelnd in 200 ml *Low Stringency* Puffer inkubiert. Der *High Stringency*-Puffer wurde auf 68°C erhitzt. (50%GC) Die Membran wurde zweimal für 15 min mit dem *High Stringency*-Puffer inkubiert und in 100 ml Waschpuffer 2 min schüttelnd gewaschen. Dann wurde die Membran 30 min schüttelnd in Blockierungspuffer (10x *Blocking Solution* 1:10 mit *Maleic Acid Solution* verdünnen) inkubiert. Anti-Digoxigenin-Alkalische Phosphatase (AP) wurde für 5 min bei 8000 xg zentrifugieren und 1:5000 in der Blockierungslösung verdünnt. Die Antikörperlösung wurde 30 min schüttelnd inkubiert. Die Membran wurde dann zweimal 15 min mit Waschpuffer gewaschen und 3 min in 20 ml Detektionslösung äquilibriert. Anschließend wurde 200 µl der *nitro-blue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate* (NBT/BCIP)-

Lösung zu 10 ml Detektionslösung hinzugefügt. Die Membran wurde mit den 10 ml Farbsubstratlösung bedeckt und bis zu 16 h im Dunkeln ohne zu schütteln inkubiert. Die Farbreaktion wurde mit 5 ml TE-Puffer für 5 min abgestoppt. Die Membran wurde getrocknet und fotografiert und in TE-Puffer verwahrt.

2.2.4.12 Proteinextraktion aus Gewebe

Zur Proteinextraktion wurde das Mausauge mit einer Pinzette entnommen und mit Hilfe einer sehr feinen Präzisionsschere (World Precision Instruments) wurde der vordere Augenabschnitt und die Linse entfernt. Mit einem Skalpell wurden dann vier Entlastungsschnitte gemacht und die Netzhaut wurde entfernt. Der RPE-/BM-/Chorioid-Komplex konnte dann mit einem Skalpell vorsichtig isoliert, in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt und mit 50 µl RIPA-Puffer (Santa Cruz) + Protease-Inhibitoren aufgenommen werden. Nach Homogenisation mit einem Hand-Homogenisator für kleine Volumina (Wheaton) wurde die Suspension für eine Stunde im Kühlraum rollend inkubiert und dann bei 10000 xg für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei -20°C gelagert.

2.2.4.13 Luminex-Nachweisverfahren

Um verschiedene Wachstumsfaktoren in RPE-/BM-/Chorioid-Lysaten nachzuweisen, wurde die Luminex xMAP Technologie angewendet. Hierbei werden Analyt-spezifische Antikörper an farbkodierte Mikropartikel, sogenannte *beads*, gekoppelt. Durch die verschiedenartige Farbkodierung der *beads* können bis zu 100 Analyte simultan in einer Probe analysiert werden. Für die Messung der TGF- β Isoformen, IGF-1 und VEGF wurde das *MILLIPLEX MAP Kit* (Millipore) nach Herstellerangaben verwendet. Wenn die *beads* mit den Standards und RPE-/BM-/Chorioid-Lysaten inkubiert wurden, banden sie an die entsprechenden Analyte. Nach dem Waschen wurden Analyt-spezifische biotinylierte Antikörper hinzugegeben, die ebenfalls an das entsprechende Analyt und an Streptavidin-Phycoerythrin (Streptavidin-PE)-Konjugate binden. Diese Konjugate wurden ebenfalls mit dem Ansatz inkubiert und nach erneutem Waschen wurden die Proben im Luminex 200 Instrument gemessen. Die Suspension wurde dabei über eine Mikrokapillare hoch gezogen und mit einem roten (Klassifizierungs-) und einem grünen (Reporter-) Laser analysiert. Der Klassifizierungs-Laser erkannte die Farbkodierung der *beads*, während der Reporter-Laser die Fluoreszenz der Streptavidin-PE gekoppelten Analyt-spezifischen Antikörper erkannte. Abbildung 2.1 stellt das Prinzip des Nachweisverfahrens schematisch dar.

Bead mit Fänger-Antikörper

Fänger-Antikörper bindet Analyt

Fluoreszenz markierter Detektions-Antikörper bindet an den „gefangenen“ Analyt

Bead ID und Reportermenge werden durch die Laser ermittelt

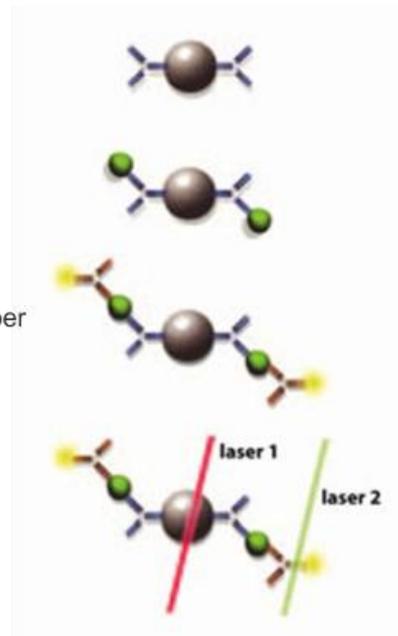


Abb. 2.2 Schematische Darstellung des Luminex Nachweisverfahrens. (geändert übernommen von http://www.lucerna-chem.ch/fileadmin/user_upload/content/Luminex2.jpg)

2.2.4.14 Laserkoagulationen der Retina

In tiefer Narkose (Rompun/Ketanest) wurde die Pupille durch Phenylephrine-HCl (0.25%)-Tropicamide (0.05%) erweitert. Dann wurde ein Kontaktglas auf die Hornhaut gesetzt und mit einem Argon-Laser, der auch beim Menschen eingesetzt wird, wurden vier Laser-Herde auf der Retina gesetzt (150 mW, 100 ms, 50 µm). Es wurde nur ein Auge behandelt, das Partnerauge diente als Kontrolle.

2.2.4.15 Fluoreszenz-Angiographien (FAG)

Es wurden 1, 7 und 14 Tage nach der Laserbehandlung zur Überprüfung der spontanen CNV-Bildung an Mäusen im Alter von 6 Monaten und 12 Monaten in Narkose (Rompun/Ketanest) eine FAG durchgeführt. Dazu wurden intraperitoneal 0,1 ml einer 2.5% Fluoreszein-Natrium-Lösung injiziert. Ein bis acht Minuten nach der Injektion wurden über ein Kamerasystem (Spectralis HRA+OCT, Heidelberg Engineering, Heidelberg, Deutschland), wie es auch beim Menschen eingesetzt wird, Aufnahmen des Augenhintergrunds gemacht.

2.2.4.16 Spektrale Optische Kohärenztomographie (SD-OCT, *Spectral domain optical coherence tomography*)

Die optische Kohärenztomographie ist eine nicht-invasive Methode zur Darstellung der Retina. Das durch die OCT erhaltene hochauflösende Tiefenprofil basiert auf Reflektion und korrelierte gut mit der Histologie. Allerdings sind in der SD-OCT elektronenarme aber membranreiche Bereiche wie z.B. die äußere plexiforme Schicht (OLP) im Gegensatz zur

Histologie dunkel dargestellt während elektronendichte und membranarme Bereiche wie die äußere Körnerschicht (ONL) sind hell dargestellt, da die SD-OCT auf Reflektion beruht (Abb. 2.2).

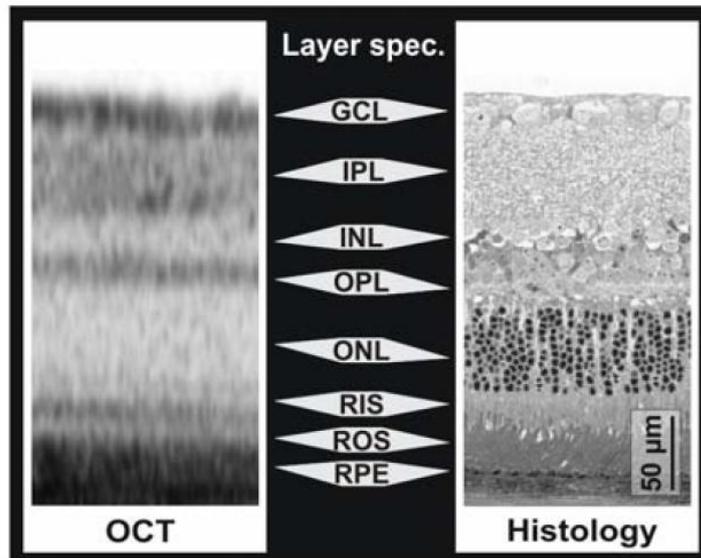


Abb. 2.3 Vergleich zwischen OCT (links) und Histologie (rechts). GCL: Ganglien-Zellschicht; IPL: innere plexiforme Schicht; INL: innere Körnerschicht; OPL: äußere plexiforme Schicht; ONL: äußere Körnerschicht; RIS: Innensegmente der Photorezeptoren; ROS: Außensegmente der Photorezeptoren; RPE: retinales Pigmentepithel. (übernommen von Fischer et al. 2009)

Die gelaserten Mäuse wurden unter Narkose (Rompun/Ketanest) und mit medikamentös erweiterter Pupille (0,25% Phenylephrine HCl/0,05% Tropicamide) am Spectralis HRA+OCT (Heidelberg Engineering) untersucht. Für jeden Laser-Herd wurden Volumina-Scans mit insgesamt 37 Zeilen und einem Zeilenabstand von 71 µm durchgeführt.

2.2.4.17 Perfusion der Mäuse mit Concanavalin A

Die Mäuse wurden für die Perfusion (2% Rompun/Ketavet) narkotisiert und rücklings auf dem OP-Tisch fixiert. Mit der Schere wurde das Fell entfernt und eine mediane Thorakotomie vorgenommen. Der rechte Vorhof des Herzens wurde mit einer Schere perforiert. In den linken Ventrikel wurde mit einer 30 G Nadel (BD Biosciences) zuerst PBS-Lösung, dann 4% PFA/PBS-Lösung und anschließend das Concanavalin A (200 µg/ml) injiziert. Zum Schluss wurde mit PBS-Lösung gewaschen, die Augen wurden mit einer Pinzette entnommen und vor der *flatmount*-Präparation für 1 h in 4% PFA/PBS Lösung nachfixiert.

2.2.4.18 Herstellung von chorioidalen *flatmounts*

Um chorioidale *flatmounts* zu präparieren wurde mit Hilfe einer sehr feinen Präzisionsschere (World Precision Instruments) der vordere Augenabschnitt des Mausauges mitsamt der Linse entfernt. Mit einem Skalpell wurden dann vier radiäre Entlastungsschnitte gemacht, so

dass der hintere Augenabschnitt flach auf dem Objektträger lag. Die Retina wurde vorsichtig mit einem Skalpell vom RPE abgenommen und entfernt. Der flatmount konnte nun mit PBS gewaschen und mit *DAKO fluorescent mounting medium* eingedeckt werden.

2.2.5 Lichtmikroskopie

2.2.5.1 Präparation von Paraffinschnitten

Zur Paraffineinbettung wurde das Gewebe zuerst zur Erhaltung der Gewebestruktur über Nacht in 5% Formalin bzw. „Methacarn“ fixiert, in Leitungswasser gewaschen und in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, bevor es in Xylol überführt und mit Paraffin infiltriert und eingebettet wurde. Die Paraffineinbettung der murinen Retina wurde von Frau Martina Becker (Universität zu Köln, Institut für Augenheilkunde, Histologisches Labor) durchgeführt.

70% Ethanol	1 h	RT
70% Ethanol	1 h	RT
70% Ethanol	über Nacht	RT
96% Ethanol	1 h	RT
96% Ethanol	1 h	RT
100% Ethanol	1 h	RT
100% Ethanol	1 h	RT
Butylacetat	45 min	RT
Butylacetat	45 min	RT
Paraffin + Butylacetat	1 h	58°C
Paraffin	1 h	58°C
Paraffin	über Nacht	58°C

Mittels Gießstation wurde anschließend das Gewebe in Plastik-Gussformen mit flüssigem Paraffin übergossen, ausgerichtet und zur Aushärtung für 3 h auf einer Kühlplatte bei 4°C inkubiert. Die Paraffin-Blöcke wurden bei 4°C im Kühlraum gelagert. Von dem im Paraffin-eingebetteten Gewebe wurden 5 µm dicke Schnitte mit Hilfe eines Mikrotoms angefertigt. Die Schnitte wurden zur Streckung kurz in einem 42°C warmen Wasserbad inkubiert und anschließend auf Objektträger (Starfrost) gezogen. Diese wurden über Nacht bei 60°C getrocknet und dann bei 4°C gelagert.

2.2.5.2 Immunhistochemische Übersichtsfärbung

Hämatoxylin & Eosin (HE)-Färbung

Als gebräuchlichste Übersichtsfärbung gilt die HE-Färbung. Hämatoxylin ist ein bei niedrigem pH Wert positiv geladener Farbstoff, welcher negativ geladene Strukturen anfärbt. Eosin ist ein negativ geladener Farbstoff und dient zur Gegenfärbung. Die entparaffinierten Schnitte wurden zunächst für 5 min mit Hämatoxylin gefärbt und in Leitungswasser bis zur Entstehung einer Blaufärbung gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte mit 1% Eosin für 5 min gegengefärbt. Zur Entwässerung folgte jeweils eine 2-minütige Inkubation in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 90%, 96%), Isopropanol sowie Xylol. Die Präparate wurden in Entellan (Sigma) eingedeckt. Durch die HE-Färbung erschienen die Zellkerne blau-schwarz, das Zytoplasma blassrot, rote Blutzellen rot-orange und Bindegewebe rot bis blassrosa-rot.

Toluidinblau Färbung

Die Toluidinblau Färbung diente hier der Übersichtsfärbung von Semidünnschnitten. Da es in Epoxidharz eindringen kann, ist es für Gewebe, das in Epoxidharz eingebettet ist, gut geeignet. Hierbei wurden die elektronendichten Regionen dunkelblau und die elektronenärmeren Regionen hellblau gefärbt. Die Semidünnschnitte wurden zwei bis drei min mit einer 1%igen Toluidinblau-Lösung gefärbt, mit H₂O gewaschen und wie oben beschrieben entwässert und eingedeckt.

2.2.6 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Der Nachweis von endogenen oder überexprimierten Proteinen in Gewebe erfolgte über Immunfluoreszenz-Mikroskopie. Dabei ist der Zweitantikörper mit Chromophoren markiert, die mit einem Fluoreszenz-Mikroskop wie z.B. dem Konfokalen Mikroskop Leica TCS 5 (Leica) oder dem Mikroskop VANOX AHBT3 (Olympus) durch Anregung mit der entsprechenden Wellenlänge und anschließender Emission von Strahlung sichtbar gemacht werden kann. Zuerst wurden die Präparate zweimal 5 min in Xylol entparaffiniert und dann durch eine jeweils 3-minütige Inkubation in einer absteigenden Ethanolalkoholreihe (96%, 70%, 50%) entwässert. Die Präparate wurden 5 min in TBS-Puffer gewaschen und dann für 10 min bei 37°C mit einer 0,005%igen Trypsin/0,1%igen CaCl₂-Lösung angedaut. Nach 5-minütigem Waschen in Leitungswasser und TBS-Puffer wurden die Präparate mit 0,25% Triton-X-100/TBS-Lösung für 10 min zur Permeabilisierung inkubiert. Anschließend wurden die Präparate für zweimal 10 min in TBS-Puffer gewaschen und in 5%iger BSA/TBS-Lösung für 1 h bei RT blockiert. Der Erstantikörper wurde in 0,8% BSA/TBS-Lösung verdünnt und für 1 h bei RT bzw. über Nacht bei 4°C auf den Geweben inkubiert. Die Präparate wurden dreimal mit TBS-Puffer gewaschen und dann mit dem fluoreszierenden Zweitantikörper in 0,8% BSA/3% *normal goat serum* (NGS)/TBS-Lösung für 1 h bei RT inkubiert. Die Inkubation sollte im Dunkeln stattfinden, weil die fluoreszierenden Chromophoren auch durch

Sonnenlicht angeregt werden und mit der Zeit ausbleichen. Die Gewebe wurden nach Inkubation zweimal für 5 min mit TBS-Puffer gewaschen und dann für 3 min mit Dapi-Lösung inkubiert. Zuletzt folgte das Eindecken der Objektträger mit *DAKO Fluorescent Mounting Medium* (DAKO). Die Objektträger wurden über Nacht bei 4°C getrocknet und konnten anschließend an einem Fluoreszenz-Mikroskop untersucht werden. An dem VANOX AHBT3 (Olympus)-Mikroskop wurden die Objekte mit der digitalen Kamera XC10 (Olympus) aufgenommen, wobei die Kamera mit der Software Cell* (Olympus) gesteuert wird; das Konfokale Mikroskop wird hingegen mit der Leica TCS LAS AF Software gesteuert.

2.2.7 Elektronenmikroskopie

Für die Elektronenmikroskopie wurden die Mäuse mit 2% PFA/2% Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylat-Puffer perfundiert und nach Entnahme der Augen wurde der hintere Augenabschnitt präpariert. Das Gewebe wurde über Nacht bei 4°C in 0,1 M Cacodylat gewaschen und am nächsten Tag für 2 h in 1,5% Osmiumtetroxid/0,2 M Cacodylat-Puffer inkubiert. Nach erneutem Waschen in 0,1 M Cacodylat wurde das Gewebe über eine aufsteigende Alkoholreihe in Epon 812 (Epoxidharz; Fluka) eingebettet. Die Einbettung der Proben wurde von Herrn Christian Hoffmann (Universität zu Köln, Anatomie, AG Prof. Addicks) durchgeführt.

50% Ethanol	20 min	RT
70% Etanol	20 min	RT
1,5% Uranylacetat in 70% Ethanol (1:1)	über Nacht	4°C
90% Ethanol	20 min	RT
96% Ethanol	20 min	RT
100% Ethanol	30 min	RT
100% Ethanol	30 min	RT
100% Ethanol	30 min	RT
Propylenoxid	15 min	RT
Propylenoxid	15 min	RT
Epon 812 in Propylenoxid (1:1)	1 h	RT
Epon 812 in Propylenoxid (3:1)	über Nacht	4°C
Epon 812 in Förmchen	2-3 Tage	60°C

Nach der Einbettung wurden die Proben getrimmt und am Mikrotom (Ultracut UCT; Leica) geschnitten. Semidünnschnitte wurden mit einem Glasmesser 500 nm dick geschnitten, auf einen Objektträger gelegt und mit Toluidinblau gefärbt. Ultradünnschnitte wurden mit einem Diamantmesser 50 nm dick geschnitten und auf Kupfernetze sog. *Grids* aufgezogen. Die Grids wurden dann mit 1,5% Uranylacetat und Bleilösung kontrastiert bevor im Elektronenmikroskop Aufnahmen gemacht wurden.

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung einer *Htra1*-transgenen Mauslinie

Während zahlreiche epidemiologische Studien auf *HTRA1* als potentielles AMD-Risikogen hindeuten, liegen noch keine funktionellen Studien vor, die eine Beteiligung von *HTRA1* an der Genese exsudativer AMD belegen. Um die Überexpression von *HTRA1* *in vivo* zu untersuchen und eine potentielle Beteiligung an Veränderungen der Bruchschalen Membran (BrM) zu zeigen, wurde ein transgenes Mausmodell etabliert.

3.1.1 Herstellung und Aufreinigung des pCI-Rpe65-Htra1-Konstrukts

Das verwendete Transgen setzt sich aus der murinen *Htra1*-cDNA und einem Teilstück des murinen *Rpe65*-Promotors zusammen. Einzelschritte der Herstellung und Aufreinigung sind im Folgenden erläutert.

3.1.1.1 Herstellung des pCI-Rpe65-Konstrukts

Als Grundlage diente der Expressionsvektor pCI von Promega (Abb. 3.1). Der Vektor enthält stromabwärts des CMV-I.E.-Promotors ein humanes β -Globin-Intron und ein Polyadenylierungssignal. In mehreren Studien mit transgenen Mausmodellen (Brinster et al., 1988, Choi et al., 1991) konnte gezeigt werden, dass für eine effiziente Expression des Transgens Spleissen (*Splicing*) und Polyadenylierung des Transgens notwendig sind.

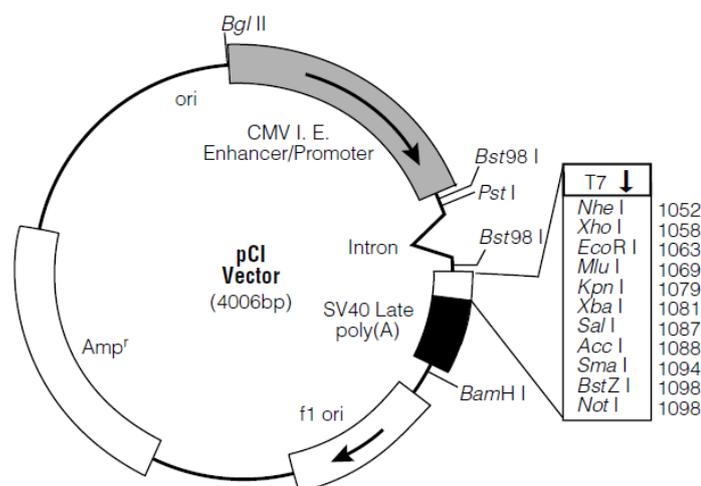


Abb. 3.1 Expressionsvektor mit einem Intron des humanen β -Globin und SV40 Poly(A)-Signal. (übernommen von www.promega.com)

Um die Expression der *Htra1*-DNA auf das retinale Pigmentepithel (RPE) zu beschränken, wurde der *Rpe65*-Promotor verwendet (Schwesinger et al., 2001). Ein Teilstück des murinen

3. Ergebnisse

Rpe65-Promotors wurde mittels PCR amplifiziert und anstelle des CMV-I.E.-Promotors in den Vektor kloniert. Dazu wurde zunächst der CMV-I.E.-Promotor mittels der Restriktionsenzyme BglIII und HindIII aus dem Vektorgerüst geschnitten und, um eine Religation zu vermeiden, mit Hilfe von SAP dephosphoryliert (2.2.1.5). Der Ansatz wurde anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 3.2), die Vektorbande aus dem Gel geschnitten und aufgereinigt (2.2.1.6).

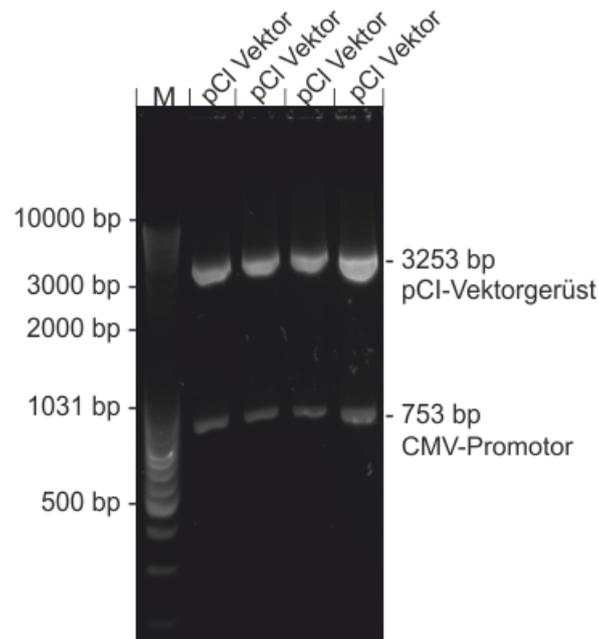


Abb. 3.2 Gelelektrophoretische Auftrennung des pCI-Restriktionsverdaus. Der Restriktionsverdau wurde mit den Restriktionsenzymen BglIII und HindIII durchgeführt und auf einem 1,5%igen Agarosegel aufgetragen. Die pCI-Vektorbande hat 3253 bp und der CMV-Promotor 753 bp. bp, Basenpaare; M, Marker.

Die *Rpe65*-DNA wurde mittels PCR amplifiziert, ebenfalls mit den Restriktionsenzymen BglIII und HindIII verdaut und über Gelelektrophorese aufgetrennt. Die prominente Bande (740bp) wurde unter UV-Licht aus dem Gel geschnitten und nach 2.2.1.6 aufgereinigt (Abb. 3.3).

3. Ergebnisse

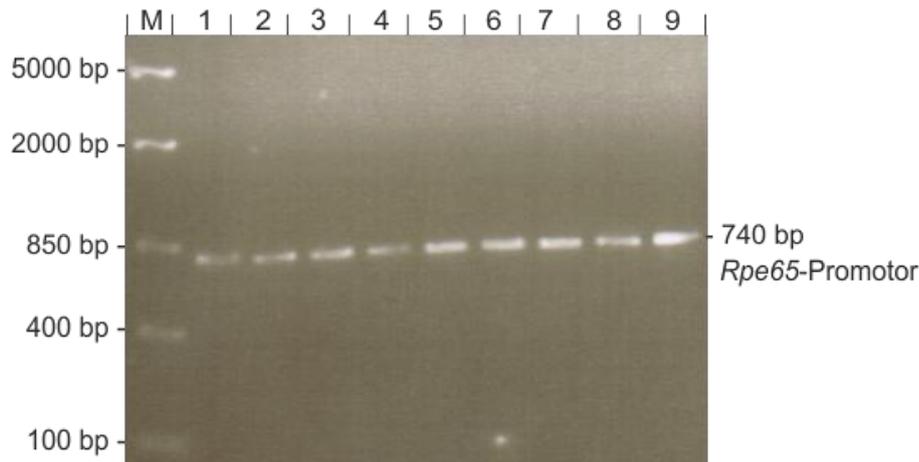


Abb. 3.3 Gelelektrophoretische Auftrennung der *Rpe65*-PCR nach dem Restriktionsverdau. Das PCR-Produkt wurde mit BglIII und HindIII verdaut und der Ansatz auf einem 1%igen Agarosegel aufgetragen. Die *Rpe65*-Bande hat eine Größe von 740 bp; bp, Basenpaare; M, Marker.

Die Ligation des Promotors mit dem Vektor erfolgte über die T4-Ligase. Nach Transformation in *E. coli*-Zellen (JM109) (2.2.1.9) und Präparation des pCI-*Rpe65*-Konstrukts in kleinem Maßstab (2.2.1.1) wurde die Integration des Promotors mittels Restriktionsverdau mit den Enzymen PciI und AseI überprüft. PciI schneidet den Promotor an Position 80 und AseI schneidet den Vektor an Position 2926. Damit ergeben sich bei positiver Integration zwei Fragmente von 2834 bp und 1155 bp (Abb. 3.4).

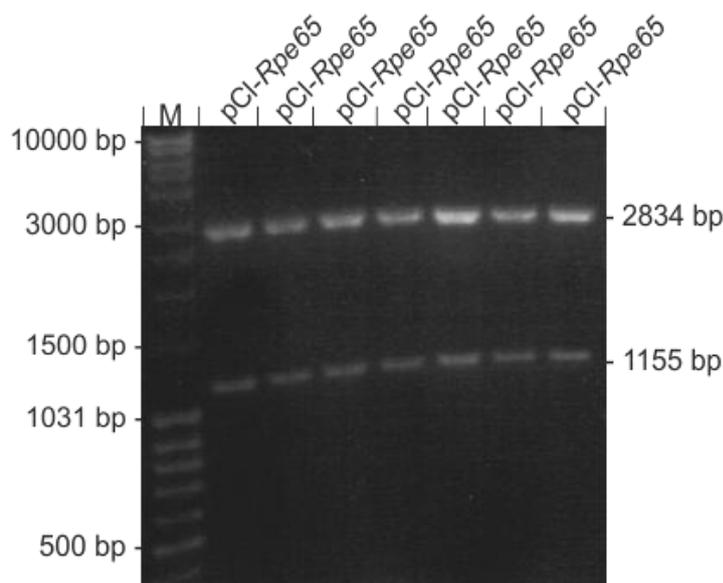


Abb. 3.4 Gelelektrophoretische Auftrennung des pCI-*Rpe65*-Vektors. Nach dem Verdau mit PciI und AseI ergeben sich im 1%igen Agarosegel zwei Banden mit einer Größe von 2834 bp und 1155 bp. bp, Basenpaare; M, Marker.

Die Nukleotidsequenz des pCI-*Rpe65*-Konstrukts wurde durch bidirektionale Sequenzierung überprüft. Die erhaltene Sequenz wurde mit Hilfe der Vector NTI-Software mit der Referenzsequenz verglichen und zeigte 100%ige Übereinstimmung.

3.1.1.2 Herstellung des pCI-*Rpe65-Htra1*-Konstrukts

Zur Herstellung des pCI-*Rpe65-Htra1*-Konstrukts wurden die positiven Klone des pCI-*Rpe65*-Konstrukts und murine *Htra1*-cDNA (imaGenes Klon 968) verwendet. Dazu wurde der pCI-*Rpe65*-Vektor mit den Restriktionsenzymen Sall und NotI in der multiplen Klonierungsregion (*Multiple Cloning Region*, MCR) geschnitten (Abb. 3.5) und, um eine Religation zu vermeiden, mit Hilfe von SAP dephosphoryliert. Da die murine *Htra1*-cDNA in DH10B *E. coli*-Zellen vorlag, war keine Transformation nötig, so dass diese nach Picken der Klone von einer Agar-Platte mittels DNA Präparation in kleinem Maßstab isoliert werden konnte. Nachfolgend wurde die *Htra1*-cDNA ebenfalls mit den Restriktionsenzymen Sall und NotI geschnitten. Die Ansätze wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und aufgereinigt (Abb. 3.5).

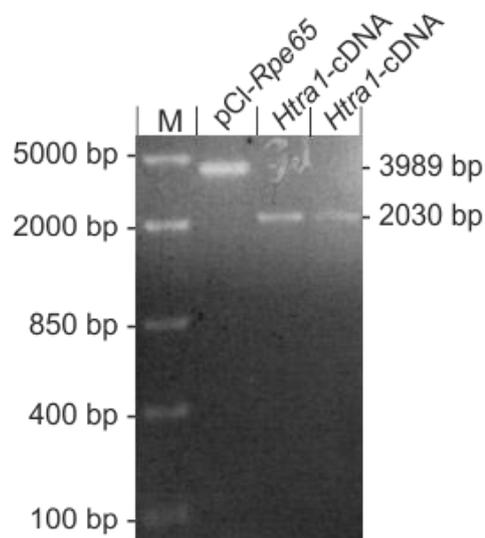


Abb. 3.5 Gelelektrophoretische Auftrennung des pCI-*Rpe65*-Vektors und der *Htra1*-cDNA. Sowohl der Vektor als auch die cDNA wurden mit Sall und NotI geschnitten und die Ansätze auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Für den pCI-*Rpe65*-Vektor ergibt sich eine Bande mit einer Größe von 3989 bp und für die *Htra1*-cDNA eine Bande bei 2030 bp. bp, Basenpaare; M, Marker.

Nach der Ligation des pCI-*Rpe65*-Vektors mit dem *Insert* durch T4-Ligase wurde das Konstrukt in *E. coli*-Zellen transformiert und die DNA in kleinem Maßstab isoliert. Die positive Integration und die Nukleotidsequenz des pCI-*Rpe65-Htra1*-Konstrukts wurden ebenfalls durch bidirektionale Sequenzierung überprüft und die erhaltene Sequenz wurde genau wie die pCI-*Rpe65*-Sequenz mit Hilfe der Vector NTI-Software mit der Referenzsequenz verglichen. Sie zeigte bei allen Klonen 100%ige Übereinstimmung. In Abbildung 3.6 ist das Konstrukt dargestellt.

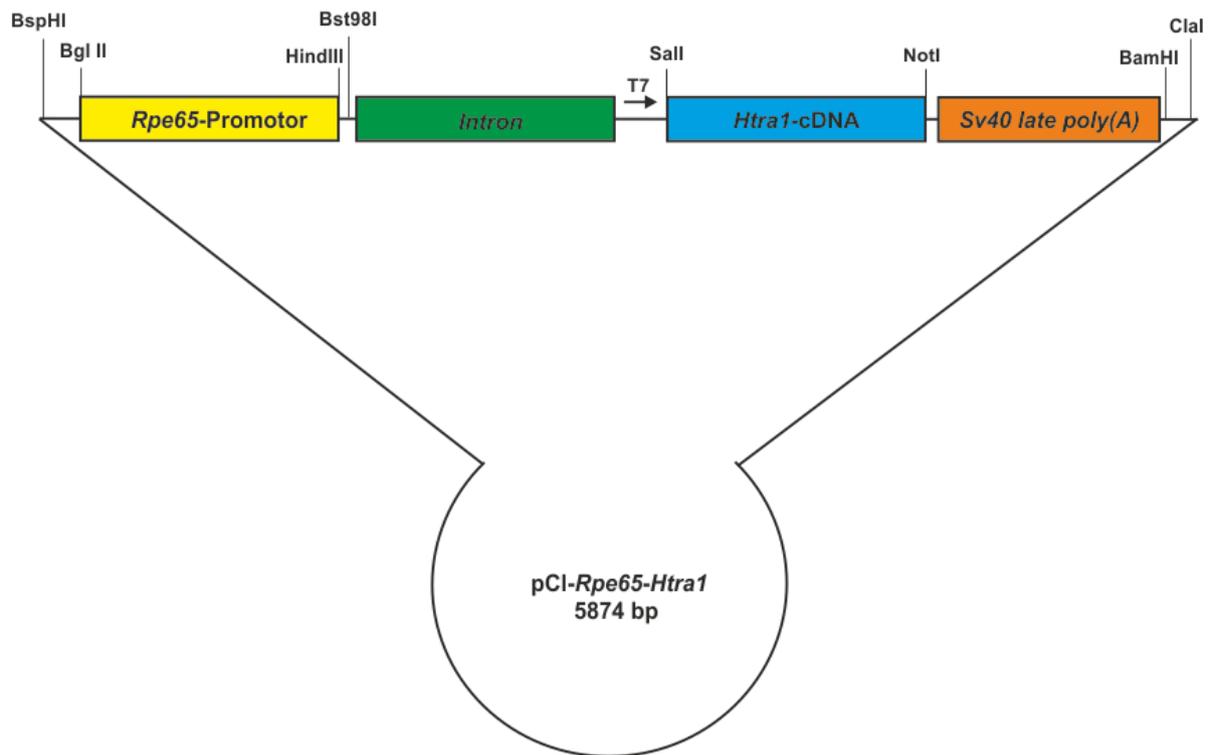


Abb. 3.6 Das pCI-Rpe65-Htra1-Konstrukt (5874 bp). Das Konstrukt besteht aus dem *Rpe65*-Promotor (740 bp), dem humanen β -Globin-Intron (132 bp), dem *SV40* poly(A)-Signal (221 bp) und dem *Htra1-Insert* (2030 bp). Zusätzlich sind die relevanten Restriktionsschnittstellen sowie die Bindestelle des T7-Primers eingezeichnet. bp, Basenpaare.

3.1.1.3 Aufreinigung des pCI-Rpe65-Htra1-Konstrukts für die Mikroinjektion

Zunächst wurde das Konstrukt im großen Maßstab aufgereinigt (2.2.1.2) und anschließend mit den Restriktionsenzymen BspHI und ClaI geschnitten. Dieser Schritt dient dazu Vektorsequenzen, die für die Transgen-Expression hinderlich sind, zu entfernen. Nach dem Restriktionsverdau wurde der Ansatz auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei waren vier Banden bei 105 bp, 820 bp, 1008 bp und 4086 bp zu erkennen (Abb. 3.7). Die 4086 bp-Bande erhielt die transgene Sequenz. Sie wurde ausgeschnitten und die DNA aus dem Gel extrahiert. Da für eine erfolgreiche Mikroinjektion eine große Reinheit des Transgens notwendig ist, wurde die DNA wie in 2.2.1.7 beschrieben über eine Whatman Elutip-D-Säule weiter aufgereinigt.

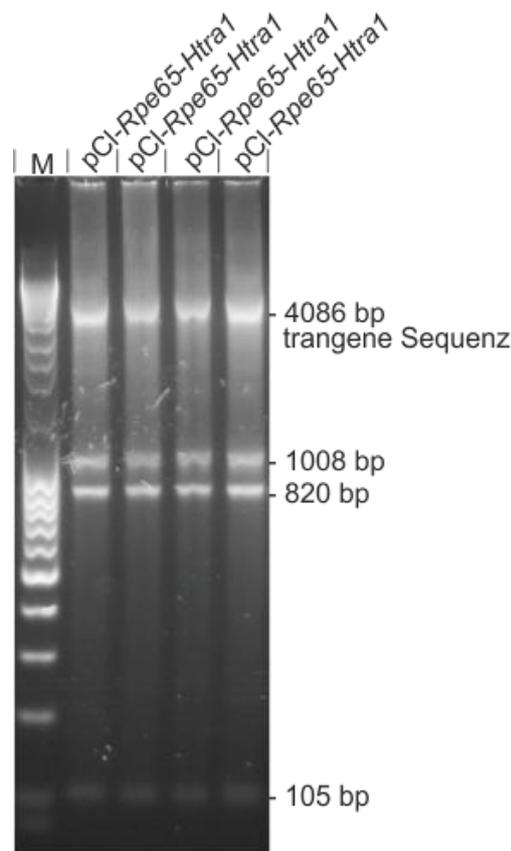


Abb. 3.7 Gelelektrophoretische Auftrennung des pCI-Rpe65-Htra1-Vektors. Der Vektor wurde mit BspHI und ClaI verdaut und der Ansatz auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen. Es ergaben sich vier Banden mit Größen von 105 bp, 820 bp, 1008 bp und 4086 bp. Die Bande bei 4086 bp enthält die transgene Sequenz. bp, Basenpaare; M, Marker.

3.1.2 Nachweis des Transgens in Mäusen

Die Mikroinjektion des Transgens wurde durch den ZMMK-Mikroinjektionsservice ausgeführt und ist unter 2.2.4.1 beschrieben. Zur Etablierung einer transgenen Mauslinie ist nun der Nachweis des Transgens in Mäusen der F₀-Generation und in allen folgenden Generationen, in denen transgene Mäuse mit C57BL/6N-Wildtyp-Mäusen gekreuzt wurden, unerlässlich. Insgesamt wurden 1089 Tiere untersucht. Der Nachweis des Transgens wurde mittels PCR (2.2.4.5) und Southern Blot-Hybridisierung (2.2.4.10) erbracht und wird im Folgenden beschrieben.

3.1.2.1 Nachweis des Transgens mittels Polymerase-Kettenreaktion

Von den drei bis vier Wochen alten Jungmäusen wurde ein 0,5-1 cm großes Stück Schwanzspitze abgenommen, aus dem mittels Phenol-Chloroform-Extraktion (2.2.4.4) die genomische DNA isoliert wurde. Die DNA wurde mit den PCR-spezifischen Primern in der Reaktion eingesetzt. Die Primer wurden so gewählt, dass der *forward*-Primer an die Sequenz des *Rpe65*-Promotors und der *reverse*-Primer an die *Htra1*-Sequenz bindet (2.1.2; Abb. 3.8).

3. Ergebnisse

Damit ist gewährleistet, dass nur Transgen-spezifische Sequenzen in der Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert werden können.



Abb. 3.8 Primer-Wahl für die Transgen-spezifische Polymerase-Kettenreaktion. Der *forward*-Primer erkennt sequenzspezifisch die *Rpe65*-Promotor-Region, während der *reverse*-Primer an die *Htra1*-cDNA-Sequenz bindet. Dadurch wird bei der PCR ein 455 bp großes DNA-Teilstück amplifiziert. Das transgene Konstrukt besteht aus dem *Rpe65*-Promotor (740bp), dem humanen β -Globin-Intron (132bp), dem SV40 poly(A)-Signal (221bp) und dem *Htra1*-Insert (2030bp).

Das *Rpe65-Htra1*-Produkt besitzt eine Größe von 455 bp. Als Positivkontrolle diente das pCI-*Rpe65-Htra1*-Plasmid. Abbildung 3.9 zeigt exemplarisch die gelelektrophoretische Analyse der PCR-Reaktionen von 15 Proben von Tieren der F0-Generation. Hier wurden sieben Mäuse positiv (Bahn 3, 5, 7, 9, 12, 13, 14) und acht Mäuse negativ (1, 2, 4, 6, 8, 10, 11, 15) auf das Transgen getestet. Die Positivkontrolle und die Negativkontrolle sind auf Bahn 16 bzw. 17 aufgetragen.

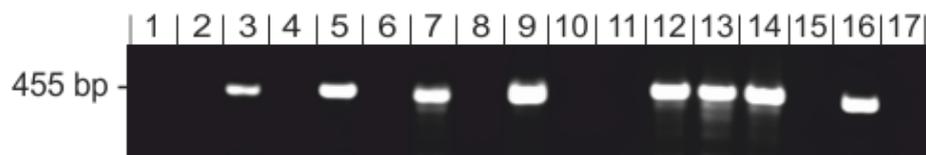


Abb. 3.9 PCR-spezifischer Nachweis des Transgens. Auf den Bahnen 3, 5, 7, 9, 12, 13 und 14 ist das PCR-spezifische Produkt zu erkennen. Auf Bahn 16 ist die Positivkontrolle und auf Bahn 17 die Negativkontrolle aufgetragen.

Insgesamt wurden von 74 Mäusen der F0-Generation acht Mäuse positiv auf das Transgen getestet (Linien 54, 60, 63, 65, 69, 72, 73, 74) und für Rückkreuzungen mit C57BL/6N-Mäusen ausgewählt. Ziel der Rückkreuzung war es, einen reinen C57BL/6N-Hintergrund der transgenen Mäuse zu erreichen. Dieser ist in der Regel nach sechs bis acht Rückkreuzungen zu erlangen. C57BL/6N-Mäuse wurden ausgewählt, da dieser Stamm keine Nicotinamid-Nukleotid-Transhydrogenase (*Nnt*)-Mutation besitzt. Der Verlust des NNT-Proteins in C57BL/6J-Mäusen wird mit einer gestörten Glucose-Homöostase, reduzierter Insulinsekretion und einer gestörten Mitochondrienfunktion (u.a. Schutz vor oxidativem Stress) assoziiert (Huang et al., 2006, Toye et al., 2005, Freeman et al., 2006).

Alle Nachkommen der Linie 63 wurden negativ getestet. Wie sich herausstellte, war die F0-Maus der Linie 69 infertil und zeugte keine Nachkommen. Außerdem verstarben die F0-Mäuse der Linien 72 und 73 bevor Nachkommen gezeugt werden konnten. Somit wurde mit den Linien 54, 60, 65 und 74 weiter gearbeitet. Aus jeder Generation wurden einige auf das

Transgen positiv getestete Tiere zur weiteren Zucht mit C57BL/6N-Mäusen rückgekreuzt. Bis heute sind so in Linie 54 fünf, in Linie 60 neun und in den Linien 65 und 74 vier weitere Generation entstanden. Aus allen Generationen und Linien wurden zudem Kontrollmäuse, die negativ auf das Transgen getestet wurden, mitgeführt. Von den insgesamt 1089 getesteten Tieren wurden 377 (34,62%) als transgen identifiziert.

3.1.2.2 Nachweis des Transgens mittels Southern Blot-Hybridisierung

Um die Integration des *Htra1*-Transgens in das Genom der Mäuse 54, 60, 63, 65, 69, 72, 73, 74 zu überprüfen, wurden DNA-Extrakte dieser Mäuse mittels Southern Blot-Hybridisierung untersucht. Zur Herstellung der Sonde wurde das Transgen-spezifische Fragment von 455bp aus 3.1.2.1 mit DIG (Digoxigenin)-markiert (Abb. 3.10 A). Die markierte Sonde läuft dabei etwas höher im Gel als die Kontrolle und das unmarkierte Fragment. Vor dem Southern Blot wurde der Verdau der genomischen DNA mit den Restriktionsenzymen BamHI und Psil getestet (Abb. 3.10 B). Bei dem Psil-Verdau zeigte sich ein 559 bp großes Fragment für das Transgen.

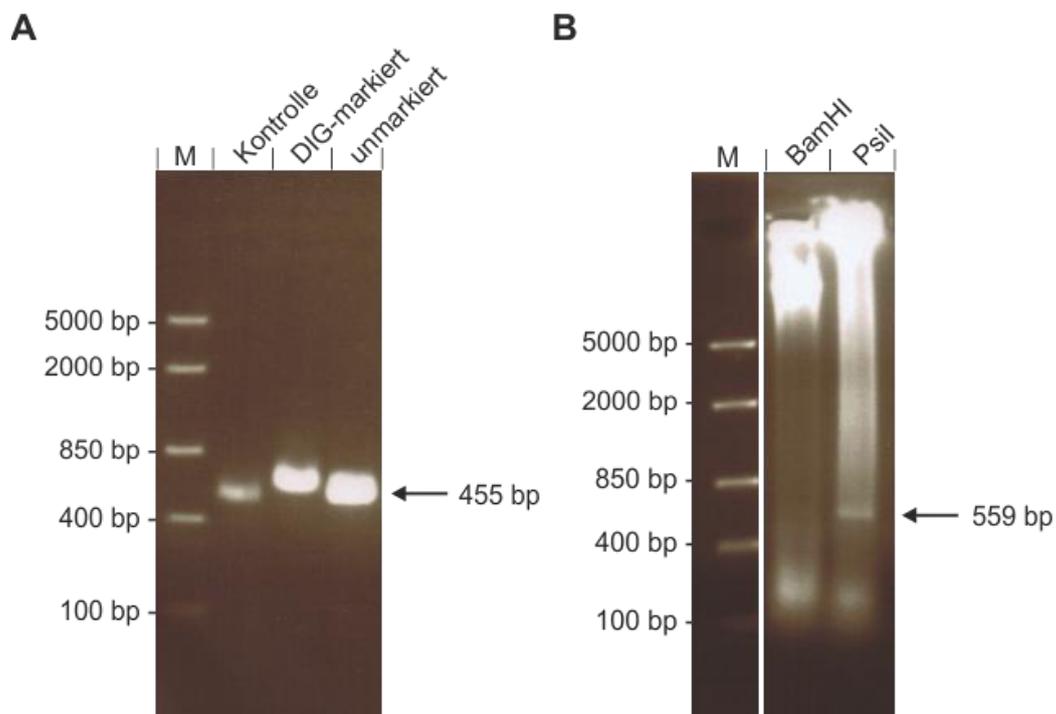


Abb. 3.10 Herstellung der DIG-markierten Sonde und Verdau genomischer DNA. (A) 1%iges Agarosegel mit der DIG-markierten Sonde, die etwas höher läuft als die Kontrollen; (B) Verdau genomischer DNA der transgenen Mäuse mit BamHI und Psil aufgetragen auf ein 1%iges Agarosegel. bp, Basenpaare; M, Marker.

Als Positivkontrolle für den Southern Blot wurde das komplette *Htra1*-Transgen verwendet. In Abbildung 3.11 ist der Southern Blot für die Mäuse 60, 63, 65, 69, 72, 73 und 74 dargestellt. Das Transgen wurde durch Psil-Restriktion freigeschnitten und die Ansätze

3. Ergebnisse

gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nylon-Membran wurden die DNA-Extrakte mit der Sonde hybridisiert und durch eine Farblösung sichtbar gemacht (2.2.4.10) (Abb. 3.11).

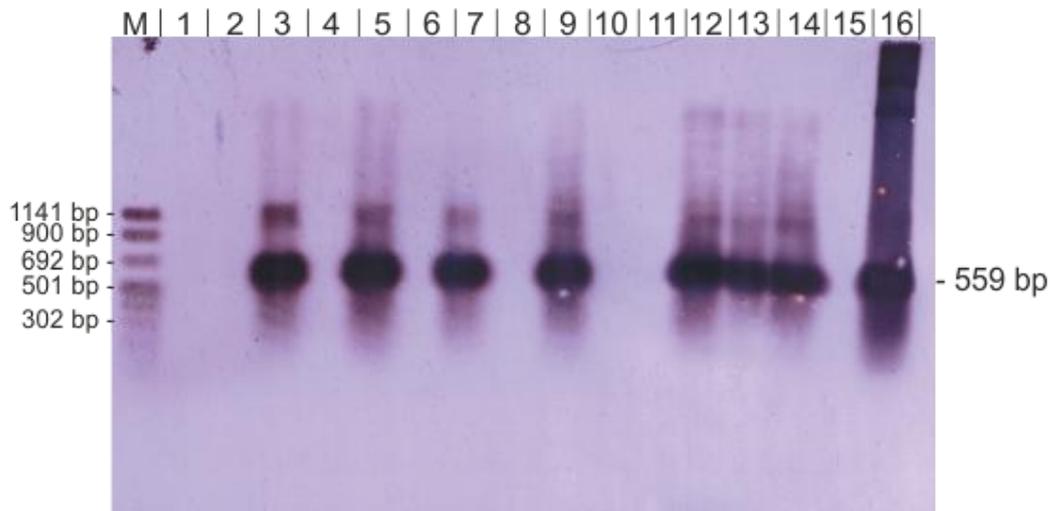


Abb. 3.11 Transgen-spezifischer Nachweis mittels Southern Blot. In den Bahnen 3, 5, 7, 9, 12, 13, 14 sind die DNA-Extrakte der transgenen Mäuse aufgetragen; auf Bahn 16 ist das komplette Transgen als Positivkontrolle aufgetragen. bp, Basenpaare; M, Marker.

3.1.3 Nachweis und Quantifizierung der *Htra1*-mRNA mittels quantitativer Echtzeit-PCR

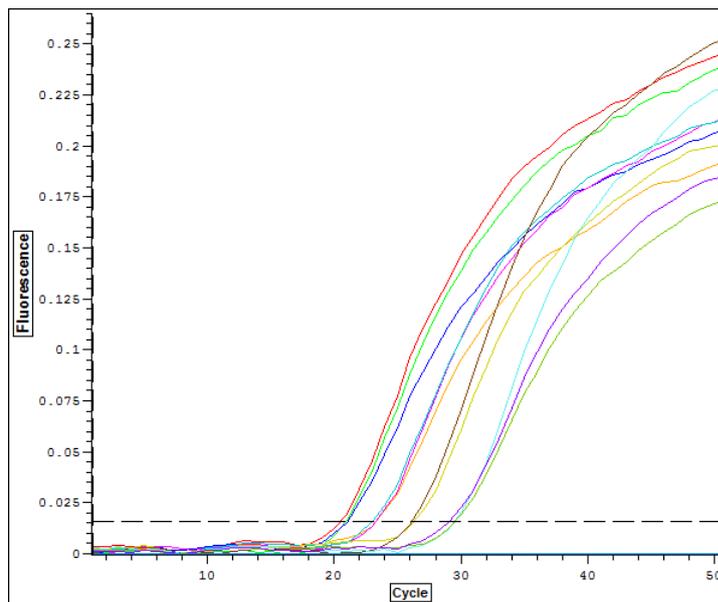
Um Aussagen über die transkriptionelle Aktivität des *Htra1*-Gens in transgenen Mäusen im Vergleich zum Wildtypen zu machen, wurde eine quantitative Echtzeit-PCR unter Verwendung von Hydrolyse-Sonden durchgeführt (2.2.4.9). Dabei diente β -Aktin zur Normalisierung. β -Aktin ist ein Haushaltsgen, von dem man annimmt, dass es konstant exprimiert wird. Die Sonden und die dazugehörigen Primer für β -Aktin und *Htra1* (2.1.2) wurden auf der UPL-Internetseite (Roche) entworfen.

Die Effizienz der spezifischen quantitativen Echtzeit-PCR wurde mit einer Zehnfach-Verdünnungsreihe getestet. Dazu wurde mRNA aus stabil *Htra1*-transfizierten HEK-293-EBNA-Zellen und die cDNA über Reverse Transkription (2.2.4.8) gewonnen. Diese cDNA wurde 10^{-1} bis 10^{-4} verdünnt und in der spezifischen β -Aktin- bzw. *Htra1*-PCR eingesetzt (Abb. 3.12 und 3.13).

Effizienz der spezifischen β -Aktin-PCR (Abb. 3.12):

$$E = 10^{-(1/-2,931)} - 1 = \mathbf{0,988}$$

A



B

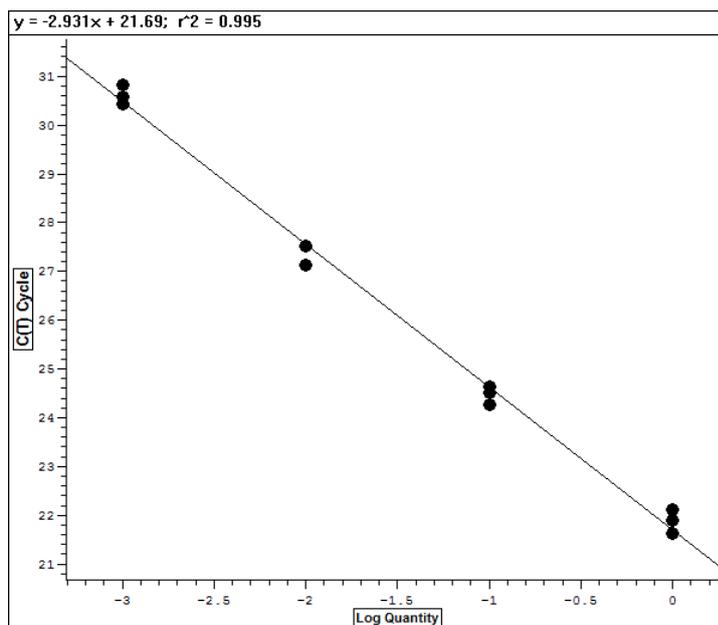
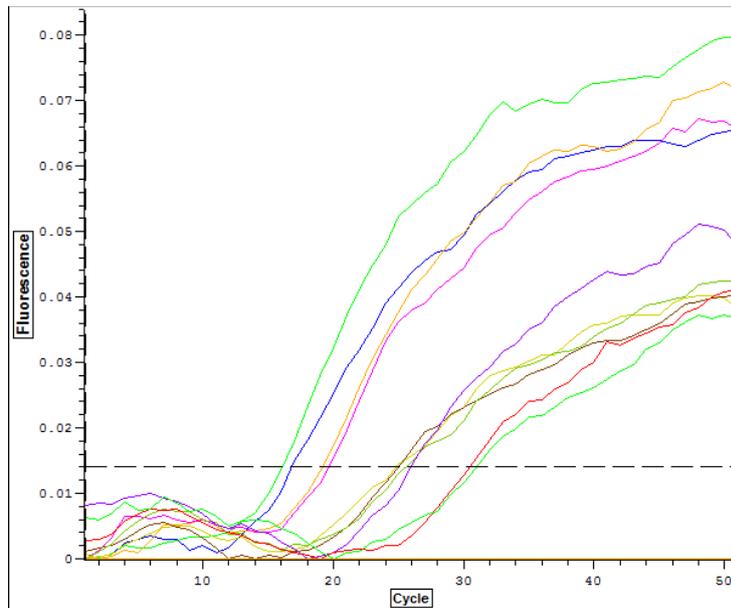


Abb.3.12 Auswertung der β -Aktin-Echtzeit-PCR. (A) Daten-Graph der Fluoreszenz. Auf der Y-Achse ist die Intensität der Fluoreszenz wiedergegeben, während auf der X-Achse die PCR-Zyklen angegeben sind. Der Schwellenwert, an dem die Fluoreszenz der Probe höher ist als der Hintergrund, wird als gestrichelte Linie angezeigt. (B) Standardkurve. Hier werden die C(t)-Werte (die PCR-Zykluszahl bei der die Fluoreszenz zum ersten Mal über dem Schwellenwert kommt) der Proben logarithmisch aufgetragen. Beide Graphen ergeben sich aus der Zehnfach-Verdünnungsreihe (10^{-1} - 10^{-4}) der quantitativen β -Aktin-Echtzeit-PCR.

Effizienz der spezifischen *Htra1*-PCR (Abb. 3.13):

$$E = 10^{-(1/-3,619)} - 1 = \mathbf{0,998}$$

A



B

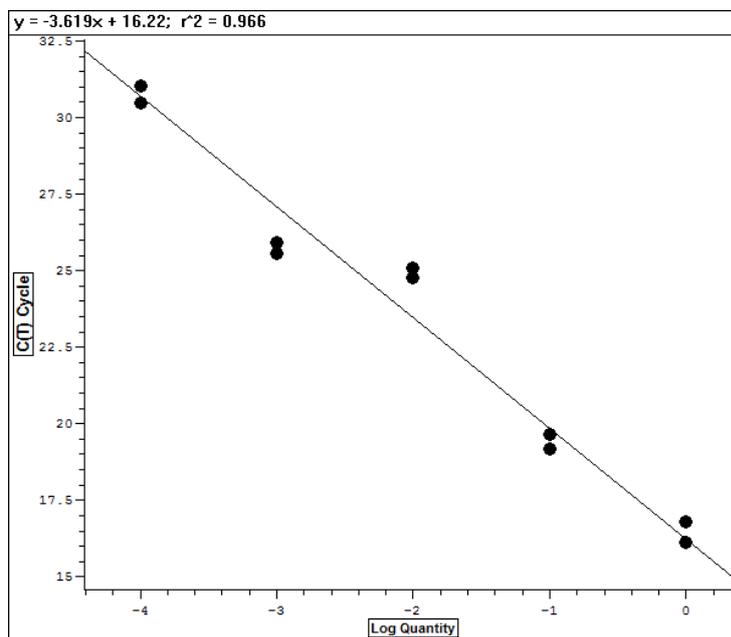


Abb. 3.13 Auswertung der *Htra1*-Echtzeit-PCR. (A) Daten-Graph der Fluoreszenz. Auf der Y-Achse ist die Intensität der Fluoreszenz wiedergegeben, während auf der X-Achse die PCR-Zyklen angegeben sind. Der Schwellenwert, an dem die Fluoreszenz der Probe höher ist als der Hintergrund, wird als gestrichelte Linie angezeigt. (B) Standardkurve. Hier werden die C(t)-Werte (die PCR-Zykluszahl bei der die Fluoreszenz zum ersten Mal über dem Schwellenwert kommt) der Proben logarithmisch aufgetragen. Beide Graphen ergeben sich aus der Zehnfach-Verdünnungsreihe (10^{-1} - 10^{-4}) der quantitativen *Htra1*-Echtzeit-PCR.

3. Ergebnisse

Um die Expression des Transgens in Zellen des RPE zu untersuchen, wurde von jeweils drei Tieren einer transgenen Linie (54, 60, 65, 74) bzw. der Wildtypen eine Probe der RPE-/BrM-/Choroidea-Schichten des Auges entnommen. Nach RNA-Extraktion (2.2.4.6) und reverser Transkription mit Oligo-dT-Primern wurden sowohl eine *β-Aktin*- als auch eine *Htra1*-spezifische quantitative Echtzeit-PCR durchgeführt. In Abbildung 3.14 ist die relative Fluoreszenz der Proben gegen den Zellzahlzyklus (Ct) exemplarisch aufgetragen.

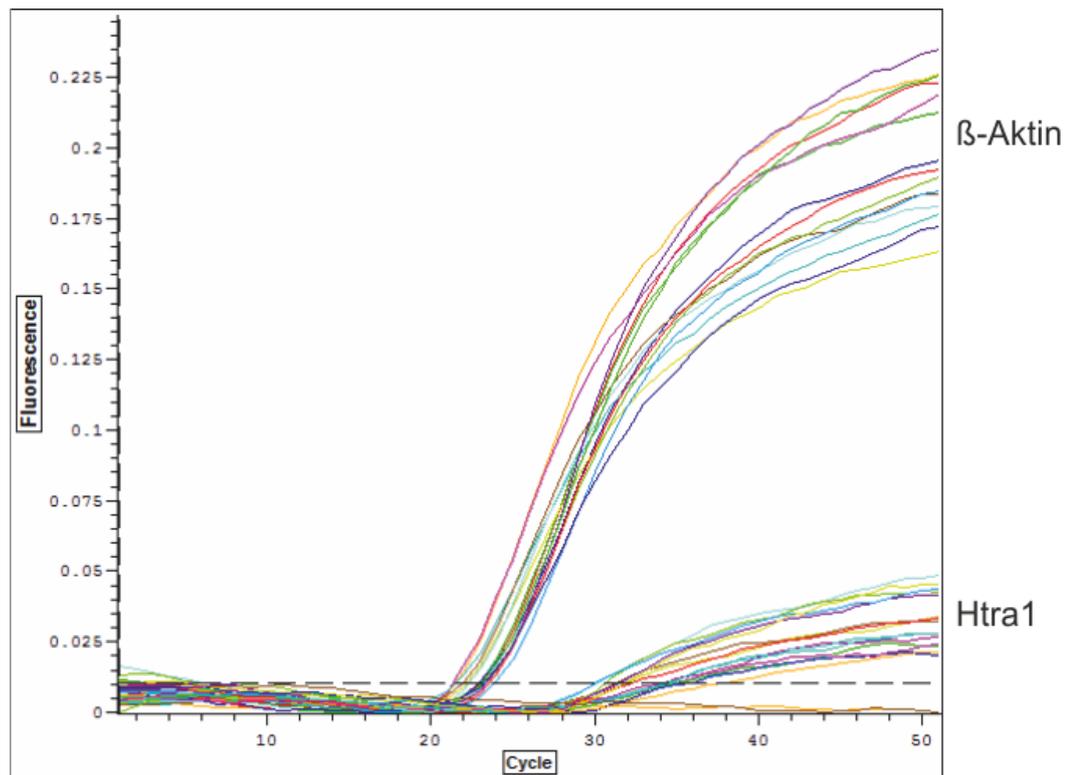


Abb. 3.14 Auswertung der quantitative Echtzeit-PCR. Daten-Graph der Fluoreszenz gegen den Ct-Wert der *β-Aktin*- und *Htra1*-spezifischen PCR von den transgenen Linien und vom Wildtypen. Auf der Y-Achse ist die Intensität der Fluoreszenz wiedergegeben, während auf der X-Achse die PCR-Zyklen angegeben sind. Der Schwellenwert, an dem die Fluoreszenz der Probe höher ist als der Hintergrund, wird als gestrichelte Linie angezeigt.

Mit der Pfaffl-Methode (Pfaffl, 2001) konnte nun die relative mRNA-Expression berechnet werden (2.2.4.9). Da man den C(t)-Wert der transgenen Linie von der des Wildtypen abzieht, erhält man entweder einen positiven oder einen negativen Wert für die Differenz der Ct-Werte. Ein positiver Wert bedeutet, dass die mRNA-Menge in der transgenen Linie gestiegen und das Verhältnis >1 ist. Ist die mRNA-Expression dagegen gesunken, ist die Differenz der Ct-Werte negativ und das Verhältnis <1 .

Rechenbeispiel für Linie 54:

Gerechnet wurde mit den gemittelten Werten aus drei unabhängigen Experimenten.

3. Ergebnisse

$$\text{Verhältnis} = \frac{(0,998+ 1)^{\Delta\text{Ct Zielgen (33,1-30,39)}}}{(0,988+ 1)^{\Delta\text{Ct Bezugsgen (23,78-22,2)}}} = \frac{(1,998)^{2,71}}{(1,988)^{1,58}} = \frac{6,53}{2,96} = 2,21$$

Daraus ergab sich für Linie 54 im Vergleich zum Wildtypen ein 2,2-facher Anstieg der *Htra1*-mRNA-Expression. Linie 60 und 65 zeigten einen 2,8- bzw. 1,7-fachen Anstieg in der *Htra1*-mRNA-Expression, während Linie 74 weniger *Htra1*-mRNA exprimiert als die Wildtypen (Verhältnis = 0,9). In Abbildung 3.15 werden die Ergebnisse der quantitativen Echtzeit-PCR für die relative mRNA-Menge der transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp in einem Säulendiagramm mit den entsprechenden Standardabweichungen angegeben.

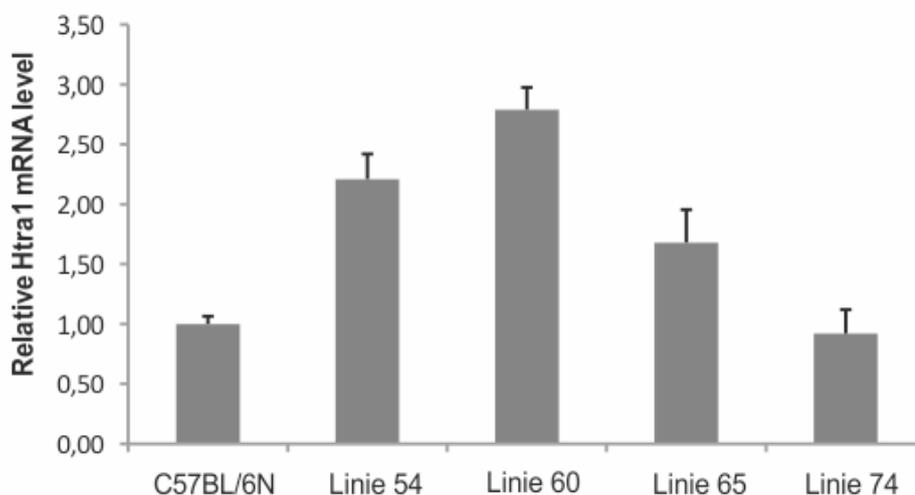


Abb. 3.15 Auswertungen der quantitativen Echtzeit-PCR. Das Säulendiagramm zeigt die gemittelten, relativen Werte der *Htra1*-mRNA-Level von Wildtypen (C57BL/6N) und transgenen Linien (54, 60, 65, 74). Die Standardabweichungen sind über der Säule angegeben.

Da Linie 60 mit einem 2,8-fachem Anstieg die höchste mRNA-Expression im Vergleich zum Wildtyp und eine gute Fruchtbarkeitsrate zeigte, wurde die Linie durch sechs Rückkreuzungen als erstes in den definierten C57BL/6N-Hintergrund gebracht. In den transgenen Linien 54, 65 und 74 konnte somit nicht ausgeschlossen werden, dass Unterschiede durch Zucht- bzw. Stammvariationen entstehen und es wurden alle folgenden Experimente ausschließlich mit Mäusen der Linie 60 durchgeführt.

3.2 Nachweis und Quantifizierung von HTRA1-Protein mittels Western Blot-Detektion

Da mRNA-Mengen nicht unbedingt mit Proteinmengen korrelieren, ist die Protein-Expression von HTRA1 nicht durch die *Htra1*-mRNA-Expression vorhersagbar. Um das HTRA1-Protein im Wildtypen und in der transgenen Linie 60 nachzuweisen, wurden Western Blot-Analysen

mit einem HTRA1-Antikörper durchgeführt. Zur Quantifizierung der HTRA1-Proteinmenge im Vergleich zum Wildtypen wurden densitometrische Messungen der Western Blot-Banden (2.2.2.4) durchgeführt.

3.2.1 Herstellung eines HTRA1-Antikörpers

Kommerziell erworbene HTRA1-Antikörper lieferten bei der Western Blot-Detektion kein zufriedenstellendes Ergebnis. Um Western Blot-Analysen mit Protein-Lysaten murinen Gewebes durchführen zu können, wurde über die Firma Pineda-Antikörper-Service (Berlin, Deutschland) HTRA1-Antikörper hergestellt. Zunächst wurde dazu rekombinantes humanes Δ mac25HTRA1-Protein (pPET- Δ mac25HTRA1-Plasmid freundlicherweise von M. Ehrmann, Universität Duisburg-Essen zur Verfügung gestellt) in *E. coli* hergestellt. Es besitzt einen His-tag und konnte so mittels Ni^{2+} -NTA- und anschließender Hydroxyapatit (HPS)-FPLC aufgereinigt werden (2.2.2.7). Nach der Ni^{2+} -NTA-FPLC wurden die reinsten Fraktionen mittels SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung identifiziert und für die Aufreinigung mittels der Hydroxyapatit-FPLC verwendet (Abb. 3.16). Dem rekombinanten HTRA1-Protein mit einem Molekulargewicht von 37 kDa fehlt sowohl die N-terminale IGFBP/MAC25 als auch die Kazal Inhibitor-Domäne. Nach der Aufreinigung wurde das Protein zu der Firma Pineda-Antikörper-Service geschickt. Dort wurden zwei Kaninchen mit dem Protein immunisiert. Der Antikörper wurde nach zwei Monaten aus dem Blutserum der Kaninchen gewonnen und die monospezifischen IgG-Fractionen wurden mittels Affinitätschromatographie aus dem Blutserum gereinigt.

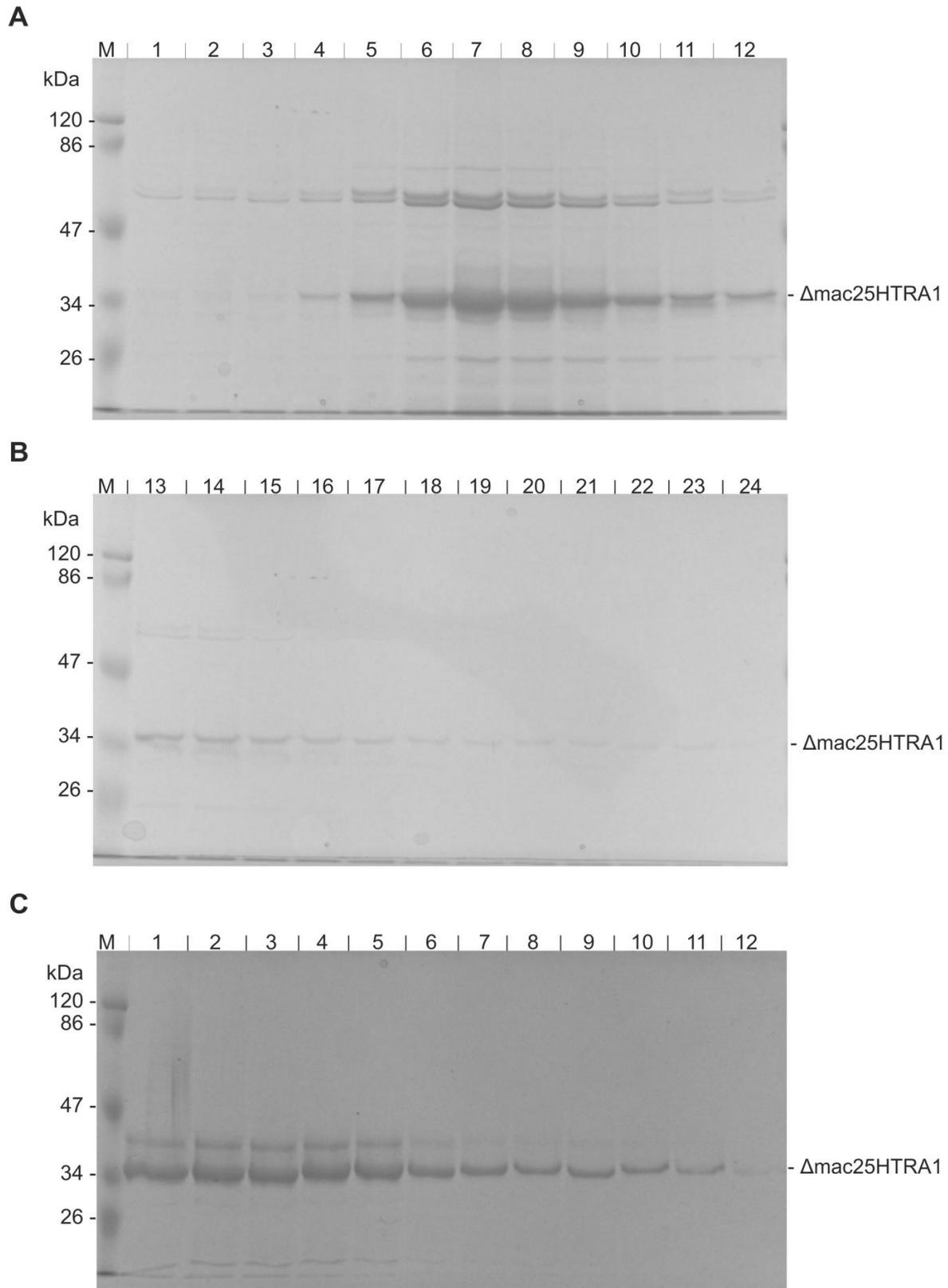


Abb. 3.16 Aufreinigung von Δ mac25HTRA1-Protein. Nach der Ni^{2+} -NTA-FPLC wurden die Fraktionen 1-24 aufgefangen und die reinsten Fraktionen über HPS-FPLC aufgereinigt. (A) Coomassie-gefärbtes 10%iges SDS-Gel der Fraktionen 1-12 der Ni^{2+} -NTA-FPLC und (B) der Fraktionen 13-24 der Ni^{2+} -NTA-FPLC. (C) Coomassie-gefärbtes 10%iges SDS-Gel der Fraktionen 13-24 der HPS-FPLC. Das Δ mac25HTRA1-Protein hat ein Molekulargewicht von 37 kDa. Nach der Ni^{2+} -NTA-FPLC ist das Protein noch nicht vollständig aufgereinigt. Man erkennt zusätzliche Banden bei 60

3. Ergebnisse

und 26 kDa. Nach der HPS-FPLC erkennt man neben der 37 kDa Bande noch eine darüber gelagerte Bande. kDa, Kilo-Dalton; M, Marker.

3.2.1.1 Nachweis der Identität des aufgereinigten Proteins

In SDS-Gelen zeigten sich immer zwei Banden (Abb. 3.17; Bande A und B) für das aufgereinigte Δ mac25HTRA1-Protein. Um zu gewährleisten, dass es sich bei dem aufgereinigten Protein um Δ mac25HTRA1 handelt, wurden die zwei Banden ausgeschnitten und zur Qualitätskontrolle zum *peptide mass fingerprinting* (PMF) an die zentrale Bioanalytik (Universität zu Köln, ZMMK) gegeben. Die erhaltenen Daten zeigten, dass es sich in beiden Fällen um humanes Δ mac25HTRA1 handelt (Abb. 3.17).

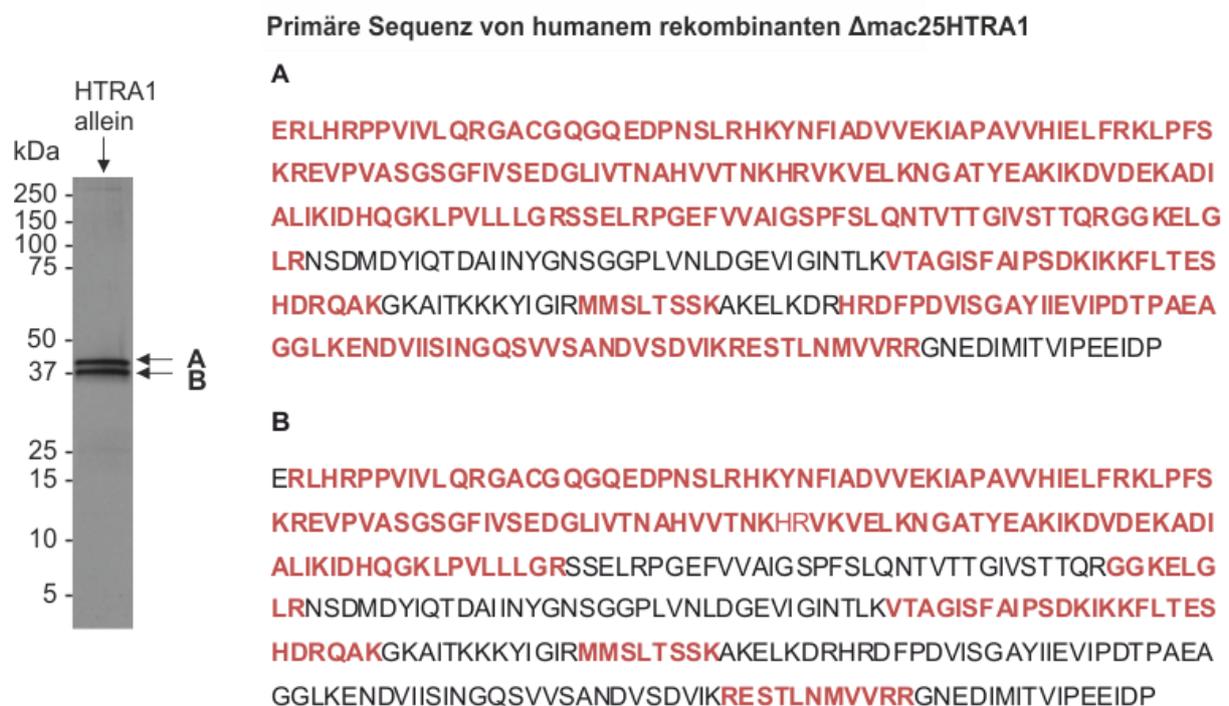


Abb. 3.17 Qualitätskontrolle von humanem rekombinanten Δ mac25HTRA1-Protein. Links, abgebildet ist ein Silber-gefärbtes 4-12%iges SDS-Gel, in dem sich für HTRA1 allein zwei Banden (A) und (B) zeigen; rechts, die mit der primären Sequenz von Δ mac25HTRA1 korrespondierenden Peptidsequenzen von Bande (A) und (B) sind rot gekennzeichnet. kDa, Kilo-Dalton.

3.2.1.2 Qualitätskontrolle des HTRA1-Antikörpers

Um die Qualität des HTRA1-Antikörpers im Western Blot-Verfahren zu beurteilen, wurden Protein-Lysate verschiedener Gewebe von Wildtyp-Mäusen angefertigt und der Western-Blot dieser Lysate mit dem HTRA-1-Antikörper detektiert. Abbildung 3.18 zeigt deutlich eine prominente Bande für HTRA1 bei 50 kDa. Auf den Immunoblots des Gehirn- und des Leber-Lysates sind weitere schwache Banden zu erkennen. Ansonsten werden keine weiteren

3. Ergebnisse

Banden durch den HTRA1-Antikörper detektiert. Im Gehirn ist außerdem die höchste und in der Niere die niedrigste Expression von HTRA1 auszumachen.

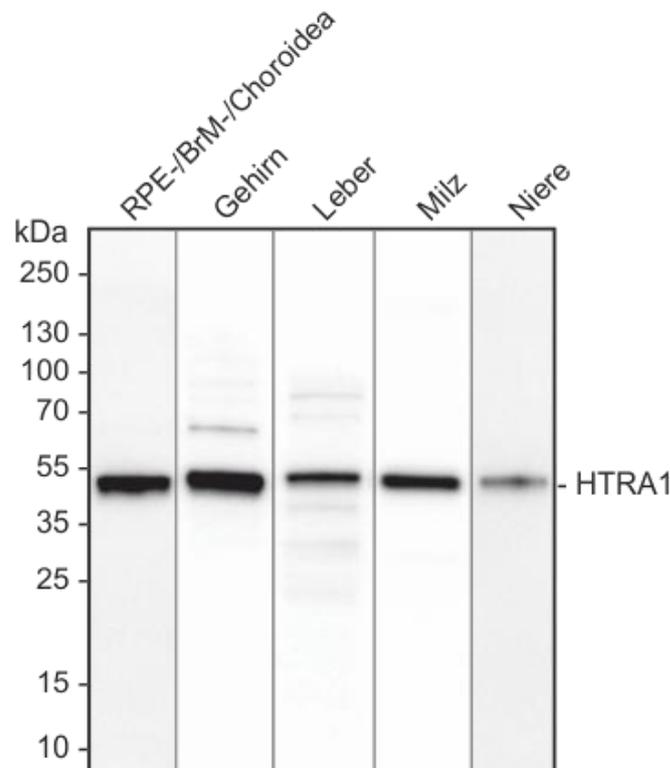


Abb. 3.18 Der HTRA1-Antikörper detektiert HTRA1 bei 50 kDa. Zur Qualitätskontrolle des HTRA1-Antikörpers im Western Blot-Verfahren wurden verschiedene Lysate einer Wildtyp-Maus angefertigt und mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Western Blot wurden die Membranen mit HTRA1-Antikörper detektiert. Dabei konnte eine prominente Bande für HTRA1-Protein bei 50 kDa detektiert werden. Der Antikörper detektierte ansonsten nur im Gehirn- und im Leber-Lysat weitere Banden, die jedoch im Vergleich zur HTRA1-Bande schwach ausgeprägt waren. BrM, Bruchsche Membran; kDa, Kilo-Dalton; RPE, retinales Pigmentepithel.

3.2.2 Vergleich der HTRA1-Expression in RPE-/BrM-/Choroidea-Lysaten

Zum Nachweis und Vergleich des HTRA1-Proteins in transgenen und Wildtyp-Mäusen wurde zuerst ein Protein-Lysat des RPE-/BrM-/Choroidea-Gewebes der Mäuseaugen (2.2.4.12) angefertigt. Auf Grund der dünnen Strukturen sind diese Gewebe im Mausauge kaum voneinander zu trennen. Es wurden jeweils sechs Tiere vom Wildtyp- und von transgenen Mäusen der Linie 60 verwendet. Abbildung 3.19 zeigt den Western Blot für die HTRA1- und β -Aktin-Antikörper.

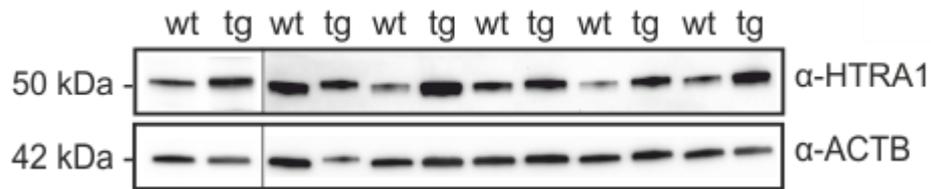


Abb. 3.19 Vergleich der HTRA1-Expression in RPE-/BrM-/Choroidea-Lysaten. Für den Immunoblot wurden Protein-Lysate von transgenen (tg) und C57BL/6N- (wt) Mäusen angefertigt und nach SDS-PAGE und Western Blot mit HTRA1 (α -HTRA1)- und β -Aktin (α -ACTB)-Antikörpern detektiert. Dabei konnte eine erhöhte HTRA1-Expression in *Htra1*-transgenen Mäusen gegenüber Wildtyp-Mäusen festgestellt werden. kDa, Kilo-Dalton.

Im Anschluss wurden die Banden mit Hilfe der Quantity One-Software (BioRad) zur semiquantitativen Analyse der HTRA1-Expression densitometrisch ausgewertet. Dazu wurden die Signalintensitäten sowohl von HTRA1 als auch die von β -Aktin gemessen, um eventuelle Abweichungen in der Auftragsmenge zu berücksichtigen und die relative Signalstärke von HTRA1 nach 2.2.2.4 zu berechnen. Bei der semiquantitativen Analyse der Western Blots zeigte sich, dass Mäuse der Linie 60 HTRA1 im Schnitt 2,7-fach höher exprimierten als C57BL/6N-Mäuse. Dieser Wert korreliert gut mit den oben dargestellten Daten der quantitativen Echtzeit-PCR, in der Mäuse der Linie 60 einen 2,8-fachen Anstieg der mRNA-Expression im Vergleich zum Wildtypen zeigten.

3.2.3 Vergleich der HTRA1-Expression in Lysaten von Hirn, Leber, Milz und Niere

Um nachzuweisen, dass die Expression des Transgens auf das RPE in Mäuseaugen beschränkt ist, wurden Hirn-, Leber-, Milz- und Nieren-Protein-Lysate von C57BL/6N- und *Htra1*-transgenen Mäusen angefertigt. Wie die Western Blot-Detektion mit HTRA1- und β -Aktin-Antikörpern in Abbildung 3.20 zeigt, ließ sich bezogen auf die β -Aktin-Expression keine erhöhte Expression von HTRA1 in Linie 60 im Vergleich zum Wildtypen feststellen.



Abb. 3.20 Vergleich der HTRA1-Expression in Hirn, Leber, Milz und Niere. Für den Immunoblot wurden Protein-Lysate verschiedener Gewebe von C57BL/6N- (wt) und transgenen (tg) Mäusen angefertigt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die HTRA1- und β -Aktin-Expression wurde nach Western Blot auf der Membran mit HTRA1 (α -HTRA1)- und β -Aktin (α -ACTB)-Antikörpern detektiert. Es ließen sich keine Unterschiede im Bezug auf die HTRA1-Expression in den verschiedenen Geweben feststellen. kDa, Kilo-Dalton.

3.2.4 Nachweis der Sekretion von HTRA1

Da durch die Analyse von RPE-/BrM-/Choroidea-Lysaten keine Aussage zur erfolgreichen Sekretion des HTRA1-Proteins aus den RPE-Zellen zu machen ist, wurden primäre Zellkulturen der RPE-Zellen aus C57BL/6N- und *Htra1*-transgenen Mäusen angelegt (2.2.3.4). Die Western Blot-Detektion der Zellkulturüberstände mit HTRA1-Antikörper (Abb. 3.21) zeigte, dass sowohl die RPE-Zellen der Wildtypen als auch die der transgenen Mäuse HTRA1 sekretierten. Auffällig ist auch hier, dass die Überstände transgener Tiere eine erhöhte HTRA1-Menge im Vergleich zum Wildtypen zeigten.



Abb. 3.21 Vergleich der HTRA1-Expression in Zellüberständen. Zellkulturüberstände primärer RPE-Zellen von transgenen (tg) und C57BL/6N- (wt) Mäusen wurden nach SDS-PAGE und Western Blot mit HTRA1-Antikörper detektiert. Die Expression von HTRA1 war in den Zellkulturüberständen transgener primärer RPE-Zellen deutlich erhöht. kDa, Kilo-Dalton.

3.3 Mikroskopische Untersuchungen der Retina

Sowohl von transgenen als auch von Wildtyp-Mäusen wurden Augen in Paraffin eingebettet und histologische Schnitte angefertigt (2.2.5.1), um eventuelle morphologische Unterschiede bzw. Unterschiede in der Verteilung einzelner Proteine mikroskopisch zu untersuchen.

3.3.1. Hämatoxylin- und Eosin-Färbung

Um einen Überblick über die Gewebestrukturen der Retina in transgenen Mäusen zu bekommen, wurden zunächst Hämatoxylin- und Eosin- (HE) Färbungen von Paraffinschnitten der Retina angefertigt (2.2.5.2). Hämatoxylin färbt basophile Komponenten, wie Zellkerne und das raue endoplasmatische Retikulum blau an, während Eosin azidophile Komponenten, wie Zytoplasma und extrazelluläre Matrix (EZM)-Bestandteile rot anfärbt. In Abbildung 3.22 sind zwei Präparate der HE-Färbung von C57BL/6N- und transgenen Mäusen der Linie 60 exemplarisch dargestellt. Während die Strukturen der Retina gut erkennbar waren, ließen sich jedoch keine morphologischen Unterschiede zwischen transgenen und Wildtyp-Mäusen feststellen.

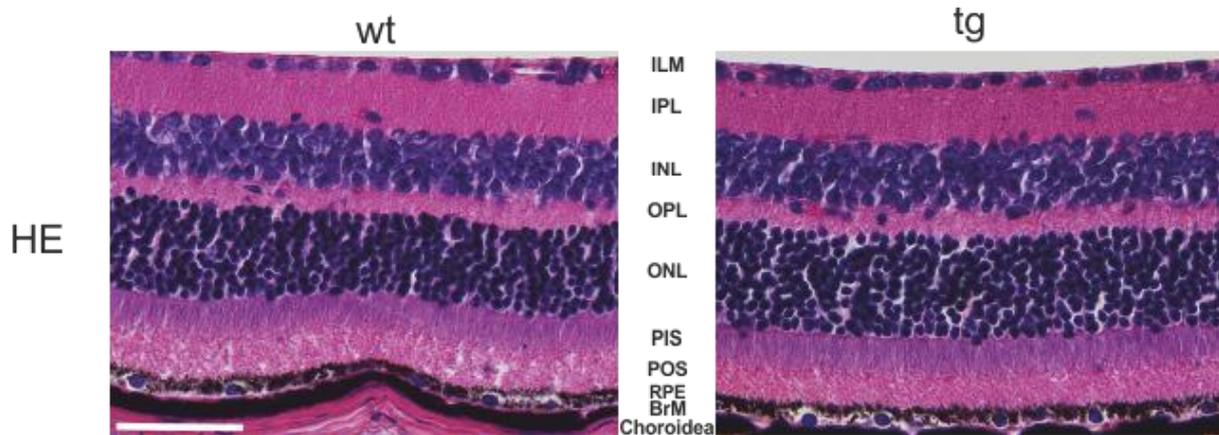


Abb. 3.22 Morphologische Untersuchung der murinen Retina. Paraffinschnitte drei Monate alter transgener (tg) und Wildtyp-Mäuse (wt) wurden HE gefärbt. In der HE-Färbung waren keine Unterschiede in Aufbau und Struktur der Retina transgener Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen zu erkennen. BrM, Bruchsche Membran; ILM, innere Grenzschiicht; INL, innere Körnerschicht; IPL, innere plexiforme Schicht; ONL, äußere Körnerschicht; OPL, äußere plexiforme Schicht; PIS, innere Schicht der Photorezeptoren; POS, äußere Schicht der Photorezeptoren; RPE, retinales Pigmentepithel; Maßstabsbalken, 100µm; Paraffinschnitte, 5 µm.

3.3.2 Immunfluoreszenzfärbungen der Retina

Die Verteilung verschiedener EZM-Proteine wie Laminin, Kollagen IV, Nidogen-1 und Nidogen-2 in der BrM wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung untersucht. Dabei wurden Unterschiede in der Gefäßausbildung der Retina (z.B. Kollagen IV-Färbung) in der Expression mittels der Farbintensität ausgemacht. Für die Färbungen wurden Präparate von drei Monate alten Mäusen angefertigt. In Abbildung 3.23 sind die Immunfluoreszenzfärbungen für Laminin, Kollagen IV, Nidogen-1 und Nidogen-2 in einer transgenen und einer Wildtyp-Maus exemplarisch dargestellt.

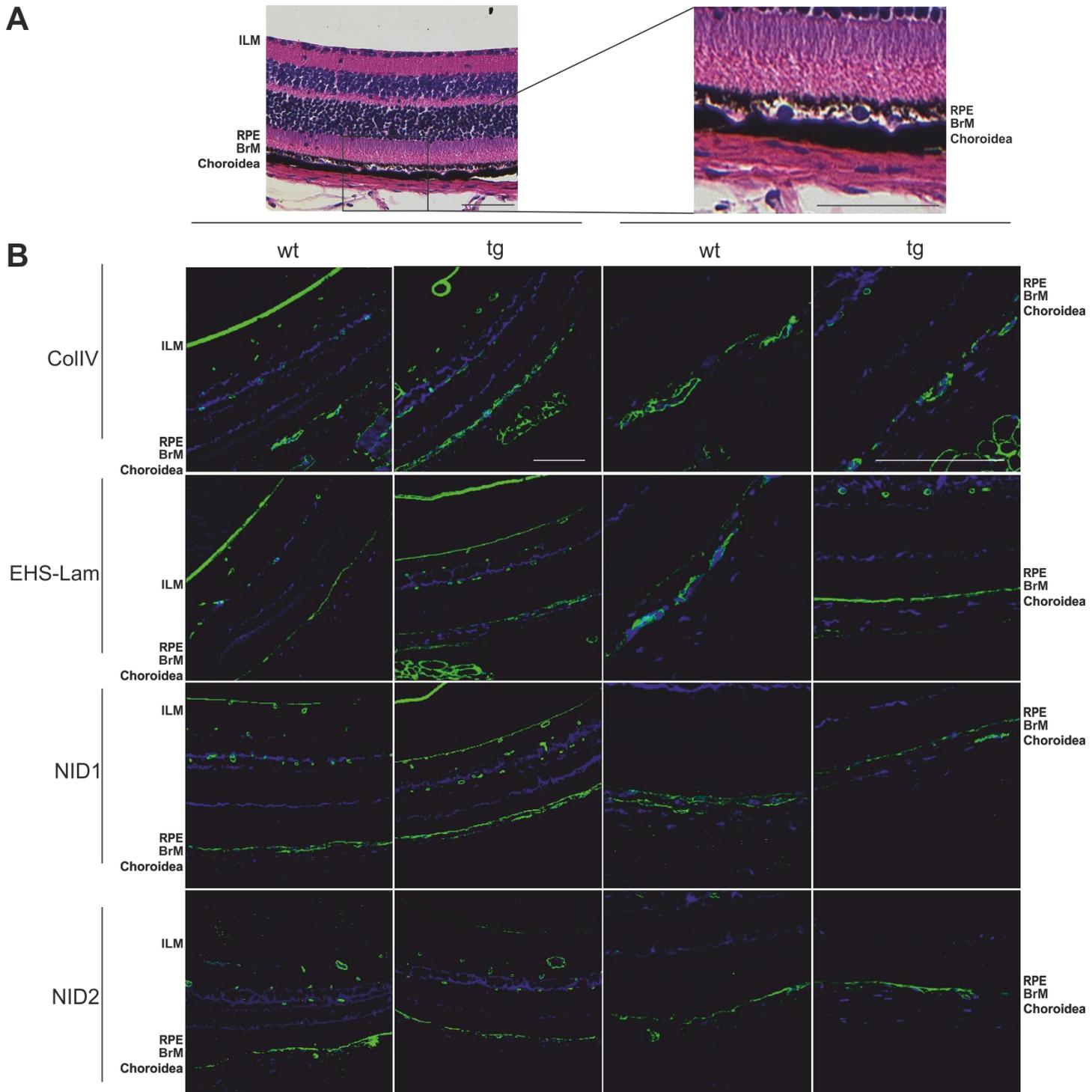


Abb. 3.23 Immunfluoreszenzfärbungen der Retina. (A) Zur besseren Übersicht über die Aufnahmeorte der Fluoreszenzbilder wurden hier HE-Bilder in unterschiedlicher Vergrößerung abgebildet; (B) Fluoreszenzbilder von transgenen (tg) und Wildtyp-Mäuseaugen (wt). Für die verschiedenen Antikörper waren keine Unterschiede in der Farbintensität oder der Verteilung auszumachen. Blau, Dapi; BrM, Bruchsche Membran; CollIV, Kollagen Typ-IV; EHS-Lam, Engelbreth-Holm-Sarcoma-Laminin; ILM, innere Grenzmembran; NID-1, Nidogen-1; NID-2, Nidogen-2; RPE, retinales Pigmentepithel; Maßstabsbalken, 100µm; Paraffinschnitte, 5 µm.

Sowohl in der transgenen Maus als auch im Wildtypen war eine Färbung für die spezifischen EZM-Proteine zu erkennen. Die Kollagen IV-Färbung zeigte deutlich, dass keine Unterschiede in der Gefäßausbildung existieren. Die Gefäße in Choroidea und Retina waren in der transgenen und der Wildtyp-Maus normal ausgebildet. Die Farbintensität und Verteilung von Laminin war bei transgenen und Wildtyp-Mäusen gleich. Laminin wird außer in der BrM noch in den Basalmembranen retinaler Gefäße und der inneren Grenzschicht exprimiert, zeigte aber auch hier keinen Unterschied in der Farbintensität. Sowohl die Färbungen für Nidogen-1 als auch die für Nidogen-2 zeigten keine Unterschiede für transgene und Wildtyp-Mäuse. Die BrM, die Basalmembranen der retinalen Gefäße und die innere Grenzschicht wurden mit gleicher Farbintensität angefärbt.

3.4 CNV-Induktion durch Laserkoagulation

Da es bei den transgenen *Htra1*-Mäusen zu keiner spontanen Ausbildung einer choroidalen Neovaskularisation (CNV) kommt, wurde die CNV mittels Laserkoagulation der Retina induziert (2.2.4.14). Das Ziel der CNV-Induktion war es, Unterschiede in der Angiogenese-Aktivität durch das Ausmaß der Leckage sichtbar zu machen. Durch die Hitzeentwicklung bei der Laserkoagulation wurde die BrM zerstört und es kam zum Austritt seröser Flüssigkeiten (Entstehung einer CNV). Trotz der Unterschiede zu humaner exsudativer AMD, ist die Laserkoagulation ein etabliertes Modell für die CNV-Induktion in Mäusen (Semkova et al., 2006). Dabei wurden fünf Laser-Herde mit einem Argon-Laser auf die Retina der Mäuse gesetzt (Abb. 3.24). Es wurde nur ein Auge behandelt, das Partnerauge diente als Kontrolle. Insgesamt wurden jeweils zehn sechs Monate alte transgene und Wildtyp-Mäuse gelasert. Demnach wurden jeweils 50 Laser-Herde von transgenen bzw. Wildtyp-Mäusen untersucht und statistisch ausgewertet.

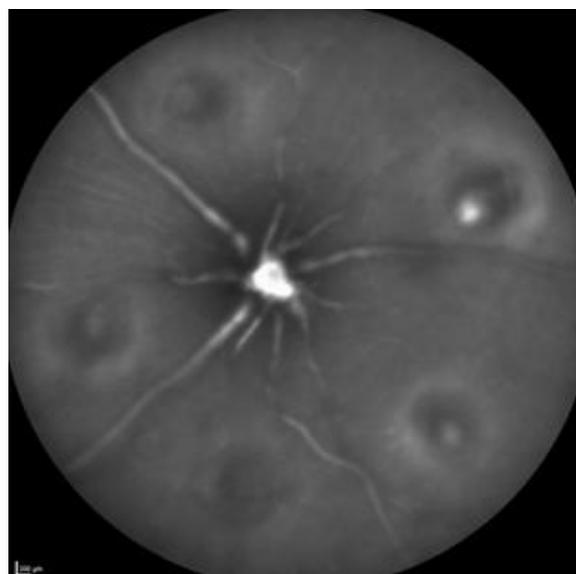


Abb. 3.24 Fünf Laser-Herde auf der Retina einer Wildtyp-Maus. Die Laser-Herde wurden einen Tag nach der Laserbehandlung mit einem Argon-Laser unter Infrarot-freiem Licht aufgenommen. Zu sehen sind fünf Laser-Herde in der Retina einer Maus. In der Mitte des Bildes ist die Sehnervenpapille, aus der die retinalen Gefäße austreten, zu erkennen.

3.4.1 Messung der CNV-Aktivität mittels Fluoreszenz-Angiographie (FAG)

Die Fluoreszenz-Angiographie (FAG) ist eine etablierte Methode (2.2.4.15), um die CNV der gesetzten Laser-Herde auszuwerten. Dabei wird das Gefäßsystem der Netzhaut mit dem Farbstoff Fluoreszein dargestellt. Hier wurde die FAG einen, sieben und vierzehn Tage nach der Laserbehandlung zum CNV-Nachweis durchgeführt. Über ein Kamerasystem, das auch beim Menschen eingesetzt wird, wurden Aufnahmen des Augenhintergrunds gemacht. Hier wurden sowohl die choroidalen als auch die retinalen Ebenen in der Frühphase (früh; zwei Minuten nach Injektion) und der Spätphase (spät; sieben Minuten nach Injektion) dokumentiert. Abbildung 3.25 zeigt exemplarisch die retinalen Aufnahmen des Augenhintergrunds in transgenen und Wildtyp-Mäusen einen, sieben und vierzehn Tage nach der Laserkoagulation.

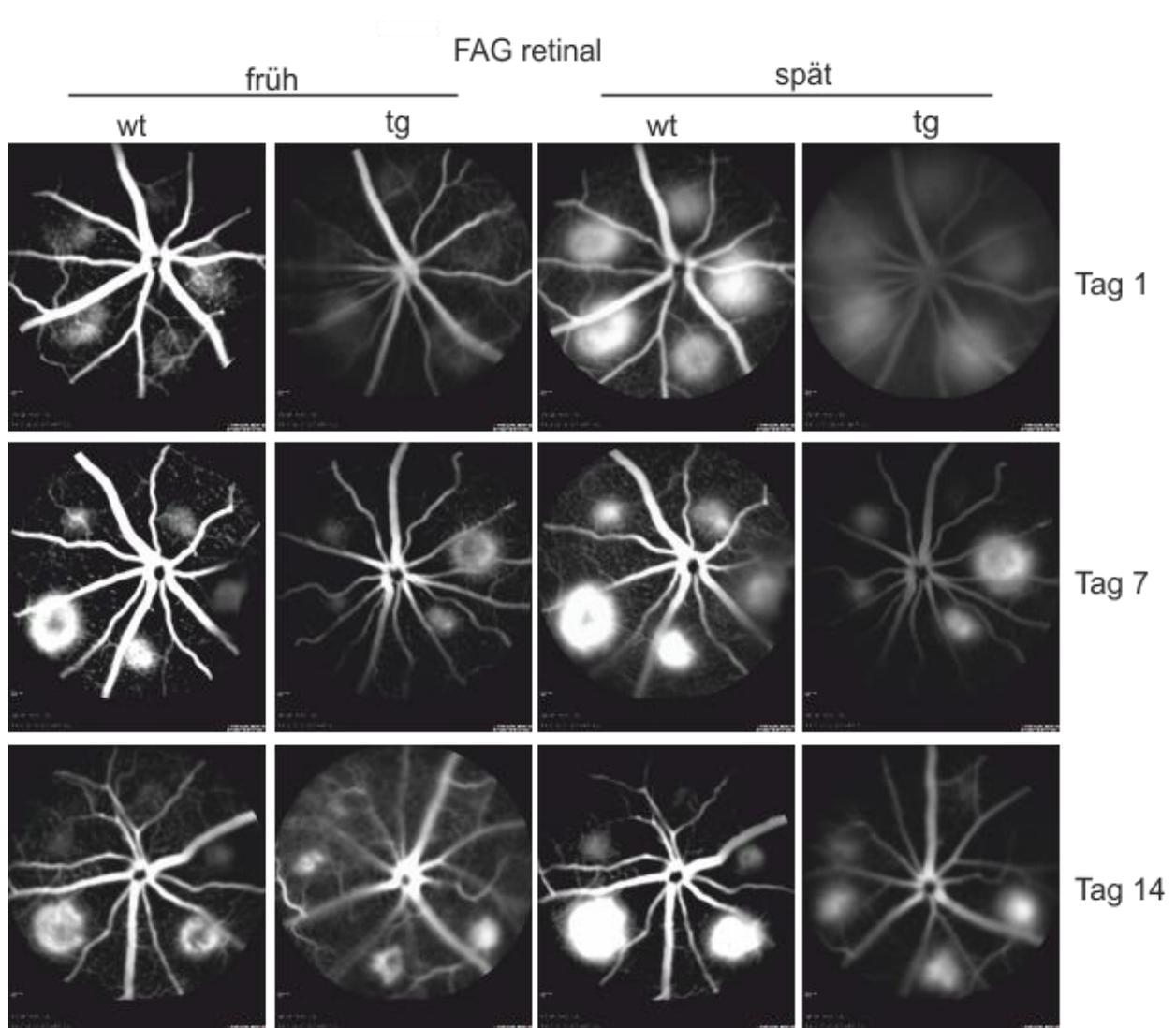


Abb. 3.25 Retinale FAG nach Laserkoagulation. Die FAG von transgenen (tg) und Wildtyp-Mäusen (wt) wurde einen, sieben und vierzehn Tage nach der Laserkoagulation durchgeführt. Die Leckagen sind als kreisförmige helle Punkte erkennbar. Die retinalen Abbildungen sind sowohl in der Frühphase (früh; 2 min) als auch in der Spätphase (spät; 7 min) aufgenommen. Es zeigten sich keine Unterschiede in der CNV-Aktivität.

An Tag 1 waren die Leckagen in der Spätphase deutlich besser erkennbar als in der Frühphase. Beim transgenen Tier zeigte sich in der Spätphase eine häufig vorkommende Hornhauttrübung, die durch die Narkose (reversibel) bzw. ein Katarakt, der durch den Laser (irreversibel) hervorgerufen wurde. Dadurch erscheint die Aufnahme verschleiert. An Tag 7 und 14 war die CNV bei einigen Laser-Herden noch ausgeprägt, während andere Laser-Herde bereits eine verminderte Leckage zeigten. In Ausbreitung und Größe schienen sich die Laser-Herde bzw. Leckagen zwischen transgenen und Wildtyp-Mäusen zu den jeweiligen Zeitpunkten jedoch nicht wesentlich zu unterscheiden. Um das Ausmaß der CNV zu bewerten, wurden die Flächen der einzelnen Spots ermittelt und statistisch ausgewertet. Obwohl das Ausmaß der Leckage an Tag 7 nach der Laserkoagulation in transgenen Tieren

3. Ergebnisse

im Vergleich zum Wildtyp leicht erhöht schien, war kein statistisch signifikanter Unterschied auszumachen (Abb. 3.26).

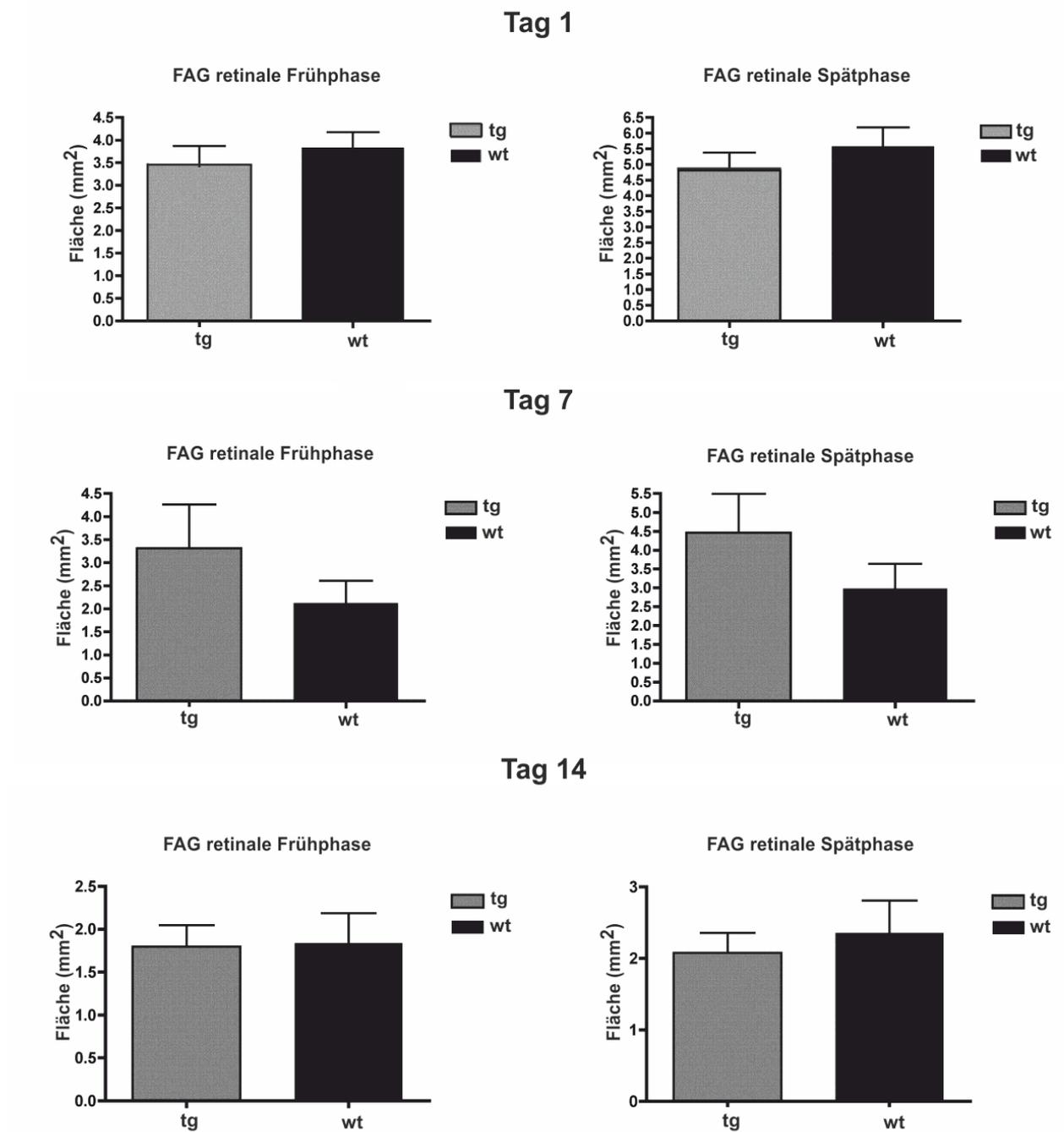


Abb. 3.26 Statistische Auswertungen der retinalen FAG nach Laserkoagulation. Die Mittelwerte der Messungen sind in Form eines Säulendiagramms dargestellt; die Standardabweichungen sind als Balken angegeben. Die Flächen (mm²) der Laser-Herde bzw. der Leckagen von transgenen (tg) und Wildtyp-Mäusen in der Fluoreszenz-Angiographie (FAG) der retinalen Früh- und Spätphase an den Tagen 1, 7 und 14 nach Laserkoagulation wurden mittels *student t-test* ausgewertet. Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede.

3. Ergebnisse

Abbildung 3.27 zeigt exemplarisch die Aufnahmen in der choroidalen Ebene des Augenhintergrunds in transgenen und Wildtyp-Mäusen einen, sieben und vierzehn Tage nach der Laserkoagulation. Bis auf die allgemein leicht verringerte Farbintensität, zeigte sich kein wesentlicher Unterschied zu den FAG Aufnahmen der retinalen Ebene. Auch durch die statistischen Auswertungen zur Größe der Laser-Herde bzw. Leckagen von transgenen Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen ließ sich kein signifikanter Unterschied ermitteln (Abb. 3.28).

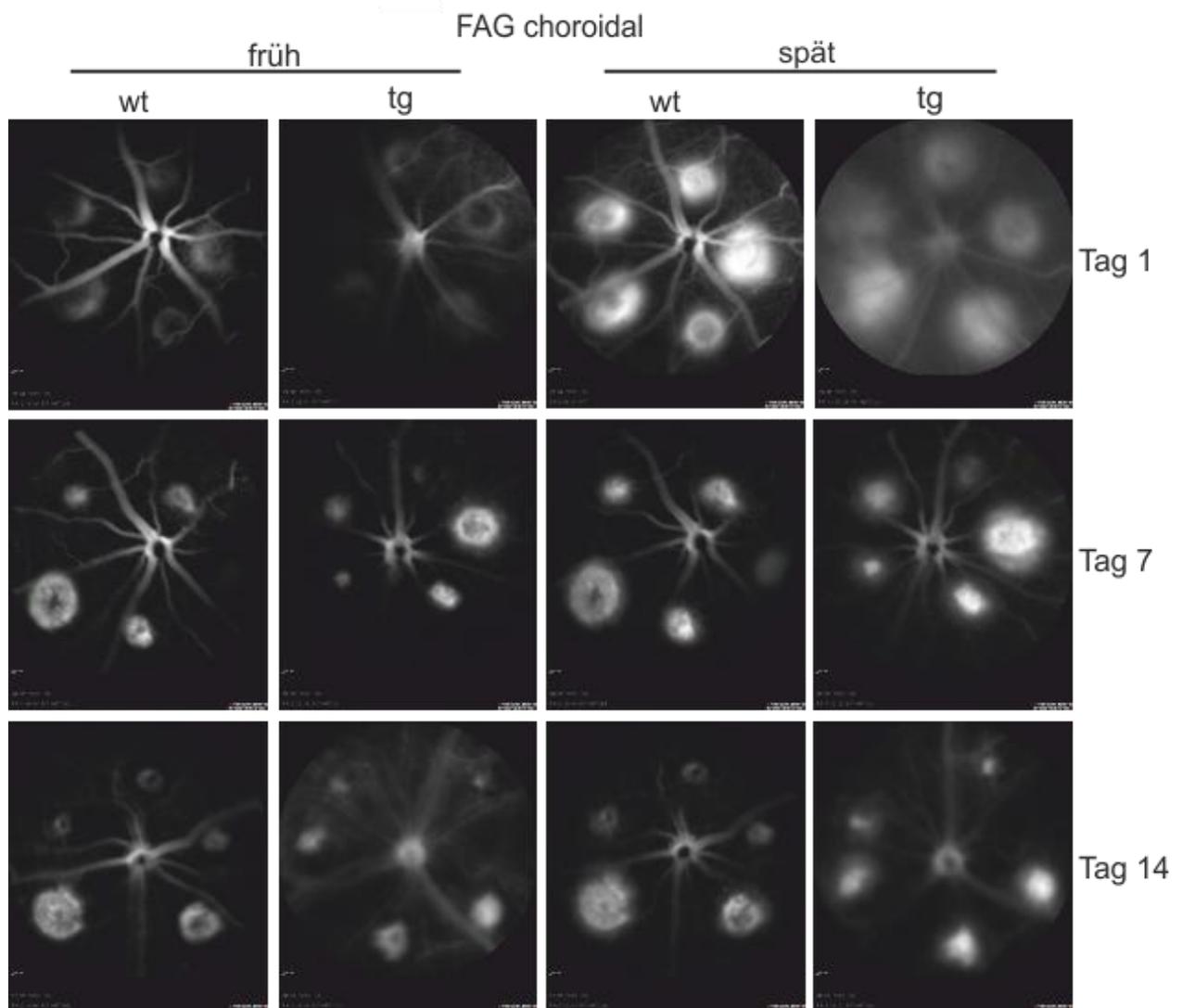


Abb. 3.27 Choroidale FAG nach Laserkoagulation. Die FAG von transgenen (tg) und Wildtyp-Mäusen (wt) wurde einen, sieben und vierzehn Tage nach der Laserkoagulation durchgeführt. Die Leckagen sind als kreisförmige helle Punkte erkennbar. Die choroidalen Abbildungen sind sowohl in der Frühphase (früh; 2 min) als auch in der Spätphase (spät; 7 min) aufgenommen. Es zeigten sich keine Unterschiede in der CNV-Aktivität.

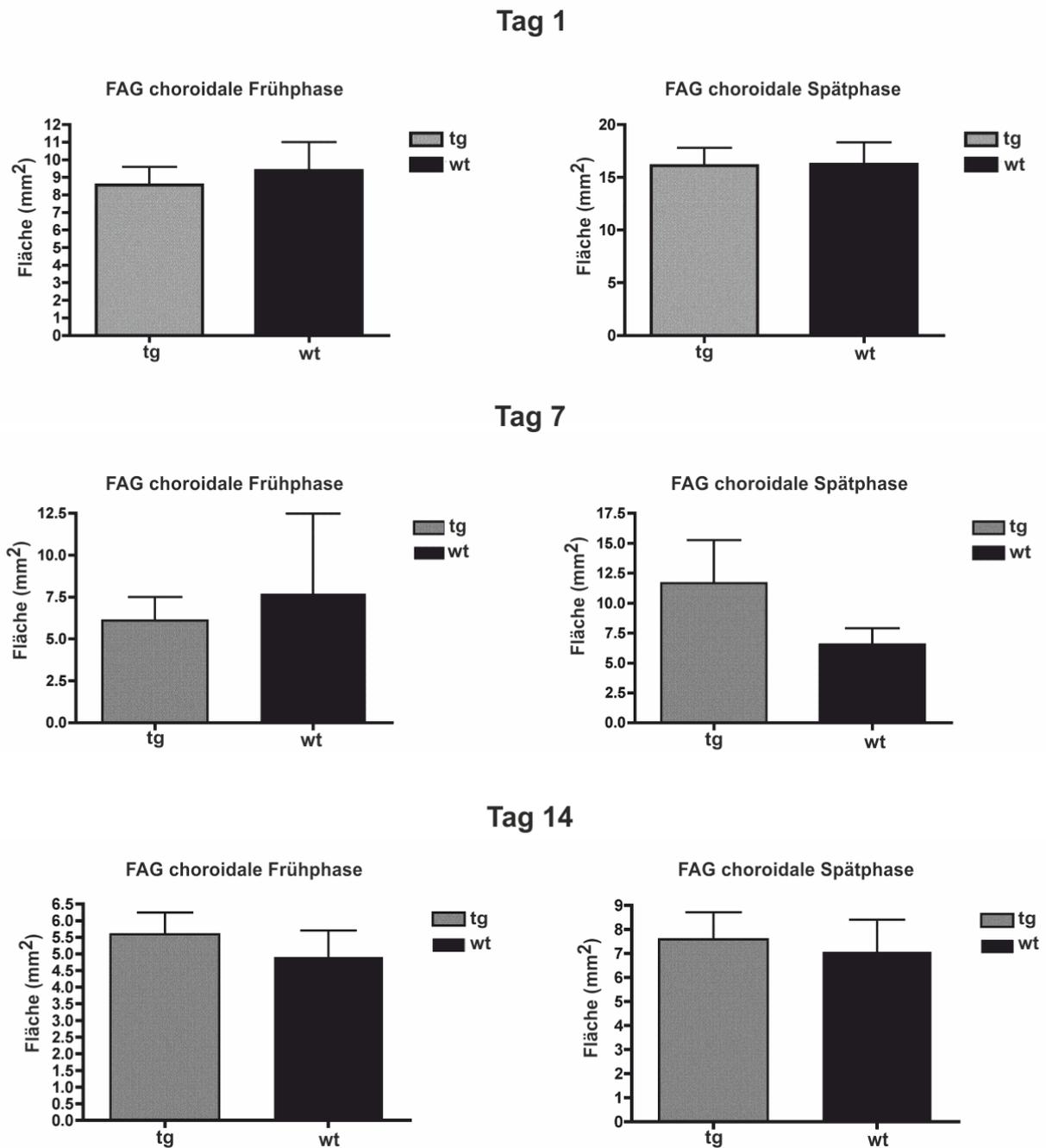


Abb. 3.28 Statistische Auswertungen der choroidalen FAG nach Laserkoagulation. Die Mittelwerte der Messungen sind in Form eines Säulendiagramms dargestellt; die Standardabweichungen sind als Balken angegeben. Die Flächen (mm²) der Laser-Herde bzw. der Leckage von transgenen (tg) und Wildtyp-Mäusen in der Fluoreszenz-Angiographie (FAG) der choroidalen Früh- und Spätphase an den Tagen 1, 7 und 14 nach Laserkoagulation wurden mittels *student t-test* ausgewertet. Auch hier waren keine statistisch signifikanten Unterschiede erkennbar.

3.4.2 Messung der CNV-Aktivität mittels spektraler optischer Kohärenztomographie (SD-OCT)

Die spektrale optische Kohärenztomographie (SD-OCT) ist eine nicht-invasive Methode (2.2.4.16), die ein Tiefenprofil der Retina und teilweise auch der Choroidea ermöglicht, das gut mit der Histologie korreliert. Beim Menschen gehört es zur Standarduntersuchung bei

3. Ergebnisse

AMD und wird im Mausmodell zusammen mit der FAG zur Untersuchung der CNV nach Laserkoagulation angewendet (Giani et al., 2011). Besonders Veränderungen in der longitudinalen retinalen Morphologie sowie der Austritt von Flüssigkeiten nach Laserbehandlung können mittels der hochauflösenden SD-OCT-Aufnahmen ausgewertet werden. Abbildung 3.29 zeigt exemplarisch die Laser-Herde (links) und einen repräsentativen Zeilen-Scan (rechts) zu den verschiedenen Zeitpunkten.

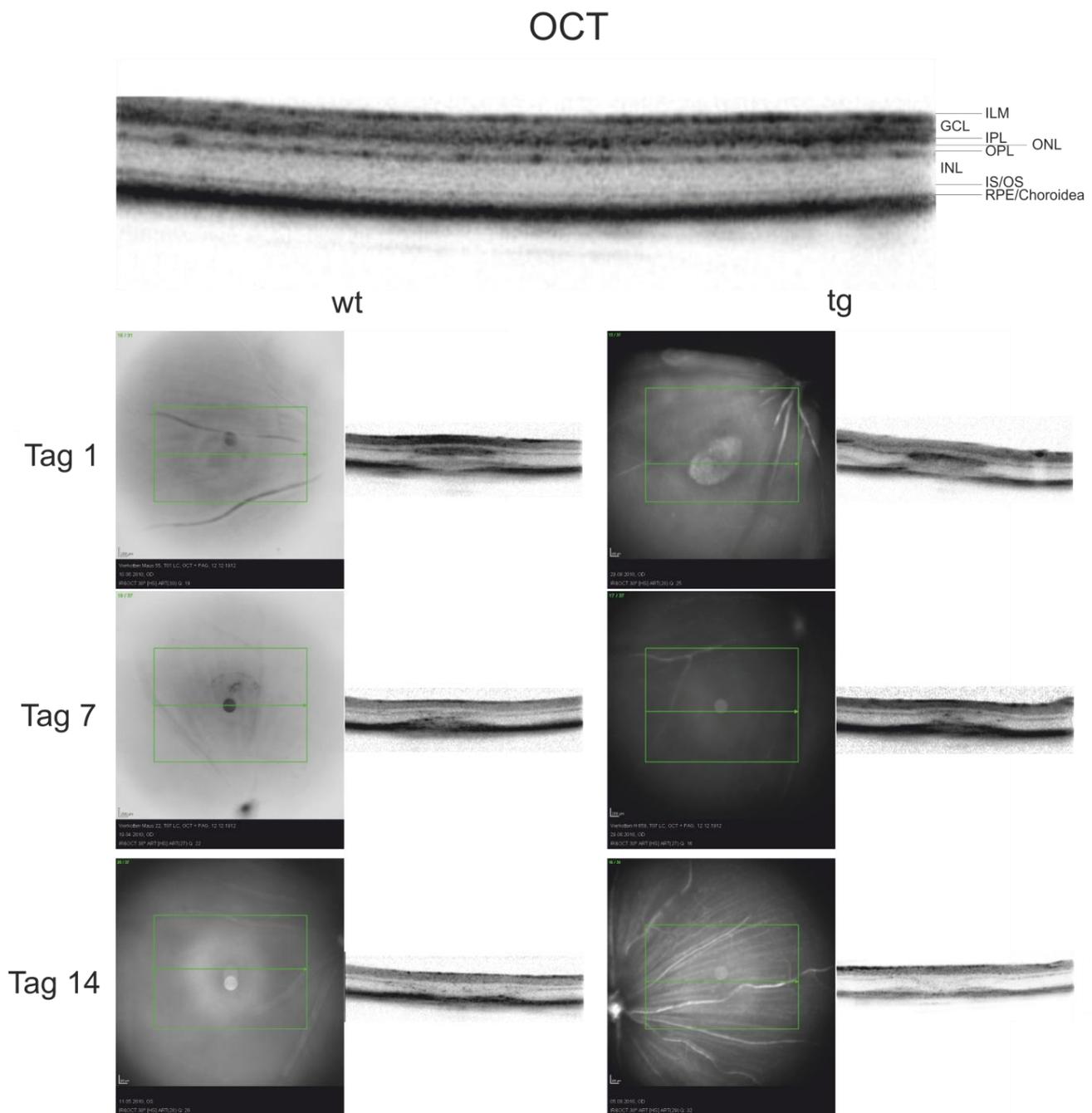


Abb. 3.29 SD-OCT-Aufnahmen von Laser-Herden. Einen, sieben und vierzehn Tage nach der Laserkoagulation wurden SD-OCT-Aufnahmen von transgenen (tg) und Wildtyp-Mäusen (wt) durchgeführt. Oben, Abbildung einer SD-OCT-Aufnahme einer Maus-Retina ohne Laser-Herd. Links, die Infrarot-freie Aufnahme des Laser-Herds; das grüne Rechteck zeigt die Region des Volumina-Scans; die grüne Linie im Rechteck kennzeichnet die Stelle des Zeilen-Scans der rechts dargestellten

3. Ergebnisse

SD-OCT-Aufnahme. Rechts, die SD-OCT-Aufnahmen zeigen deutlich die Veränderungen in der Retina zu den verschiedenen Zeitpunkten nach der Laserkoagulation. An Tag 1 ist das RPE und die Photorezeptoren-Schicht verringert. Ab Tag 7 bis einschließlich Tag 14 kommt es zur Verdickung des RPE, während die Photorezeptoren und die OPL atrophisch bleiben. ILM, innere Grenzschicht; INL, innere Körnerschicht; IPL, innere plexiforme Schicht; IS, innere Schicht der Photorezeptoren; ONL, äußere Körnerschicht; OPL, äußere plexiforme Schicht; OS, äußere Schicht der Photorezeptoren; RPE, retinales Pigmentepithel.

Am ersten Tag nach der Laserkoagulation war eine erhöhte Reflektion sowohl der äußeren Körnerschicht (ONL) als auch der äußeren plexiformen Schicht (OPL) zu erkennen. Die Photorezeptor-Schicht (PRL) und das RPE waren durch Koagulationsnekrose verringert. An Tag 7 zeigte die OPL eine verminderte Reflektion, während die Reflektion der ONL erhöht blieb. Die PRL erschien immer noch verringert, aber das RPE zeigte eine beginnende Verdickung und eine erhöhte Reflektion. An Tag 14 blieben die OPL und PRL atrophisch und die ONL zeigte eine leicht erhöhte Reflektion. Währenddessen war eine weitere Verdickung und ausgeprägt erhöhte Reflektion des RPE erkennbar. Auch hier zeigte sich augenscheinlich kein großer Unterschied zwischen transgenen und Wildtyp-Mäusen. Deswegen wurde die zentrale Netzhautdicke der Laser-Herde ermittelt und statistisch ausgewertet (Abb. 3.30).

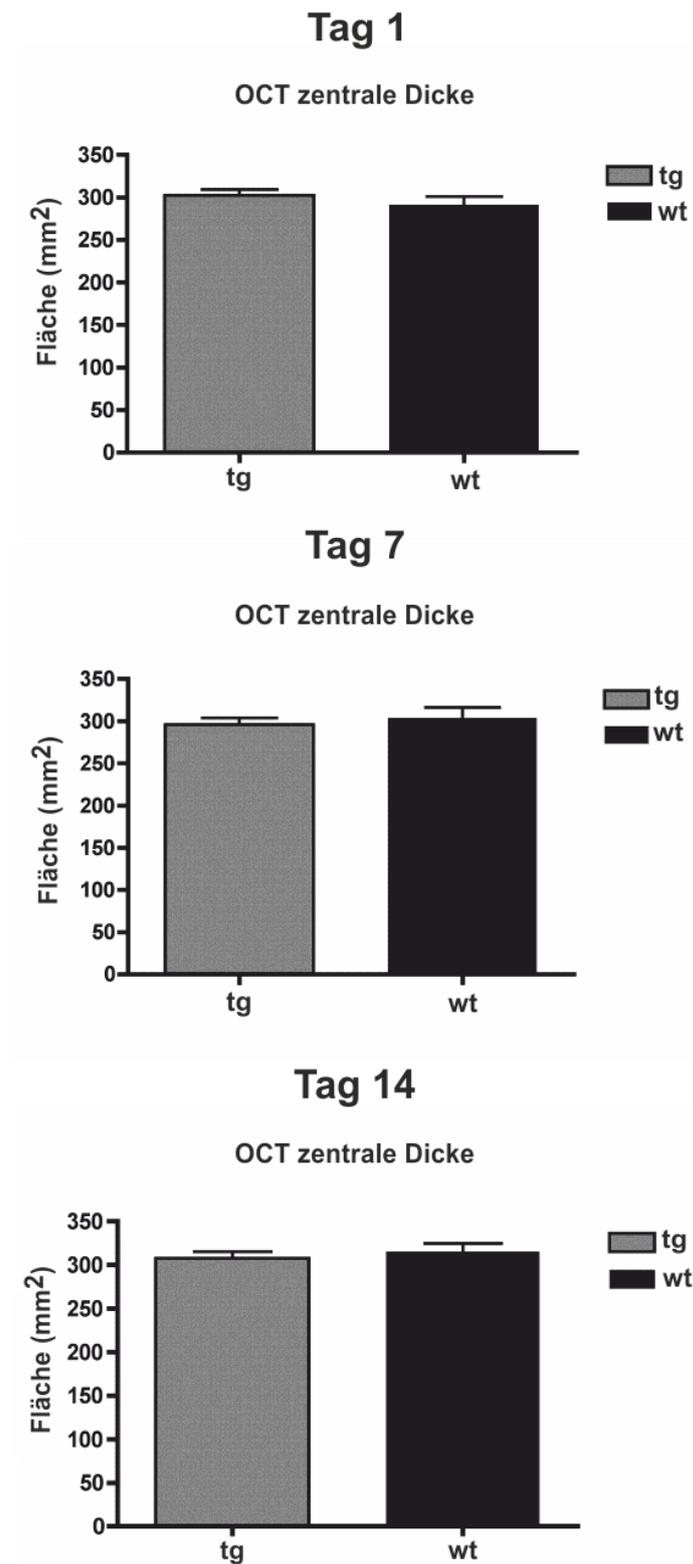


Abb. 3.30 Statistischen Auswertungen der SD-OCT Aufnahmen nach Laserkoagulation. Die Mittelwerte der Messungen sind in Form eines Säulendiagramms dargestellt; die Standardabweichungen sind als Balken angegeben. Die zentrale Netzhautdicke (mm²) der Laser-Herde von transgenen (tg) und Wildtyp-Mäusen wurde im SD-OCT an den Tagen 1, 7 und 14 nach Laserkoagulation mit dem *student t-test* ausgewertet. Es waren keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der transgenen und der Wildtyp-Maus vorhanden.

Die Auswertung zeigt, dass es keinen signifikanten Unterschied in den Netzhautdicken der Laser-Herde von transgenen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen gibt. Auch war weder bei den transgenen noch bei den Wildtyp-Mäusen das Auftreten von Flüssigkeiten in Form von weißen Arealen erkennbar. Im SD-OCT gab es also keinen Hinweis auf eine aktive CNV in den Mäusen.

3.4.3 Auswertung der CNV-Aktivität mittels mikroskopischer Untersuchungen

Um die CNV nach der Laserkoagulation histologisch zu untersuchen und mit der FAG und dem SD-OCT zu vergleichen, wurden Paraffinschnitte und *flatmounts* (2.2.4.18) der Retina angefertigt. Die FAG kann keine Erkenntnisse über den Grad der Zerstörung in den einzelnen retinalen Schichten geben und Unterschiede in der Gefäßneubildung nur in Form der Leckage wiedergeben. Die SD-OCT-Aufnahmen dagegen geben die retinalen Strukturen gut wieder und korrelieren mit der Histologie. Zusätzlich können Flüssigkeitsansammlungen in Form von weißen Arealen detektiert werden. Dennoch sind die Auswertungen schwer zu beurteilen, da die einzelnen Strukturen durch Vernarbung teilweise verdichtet sein können. Ebenfalls können Bildstörungen, sog. Artefakte vorkommen, die die Auswertung erschweren. Daher ist es unerlässlich, die retinalen Strukturen und die Gefäßneubildung nach der Laserkoagulation in der Histologie zu untersuchen.

3.4.3.1 Hämatoxylin- und Eosin-Färbung an Paraffinschnitten

Es wurden HE-Färbungen von Paraffinschnitten der Laser-Herde angefertigt, um die Veränderungen in der Retina nach der Laserkoagulation zu untersuchen (Abb. 3.31). Der Vorteil der Histologie ist, dass sich hier im Gegensatz zum SD-OCT die einzelnen Zelltypen erkennen lassen und man Vernarbungsprozesse dadurch besser beurteilen kann.

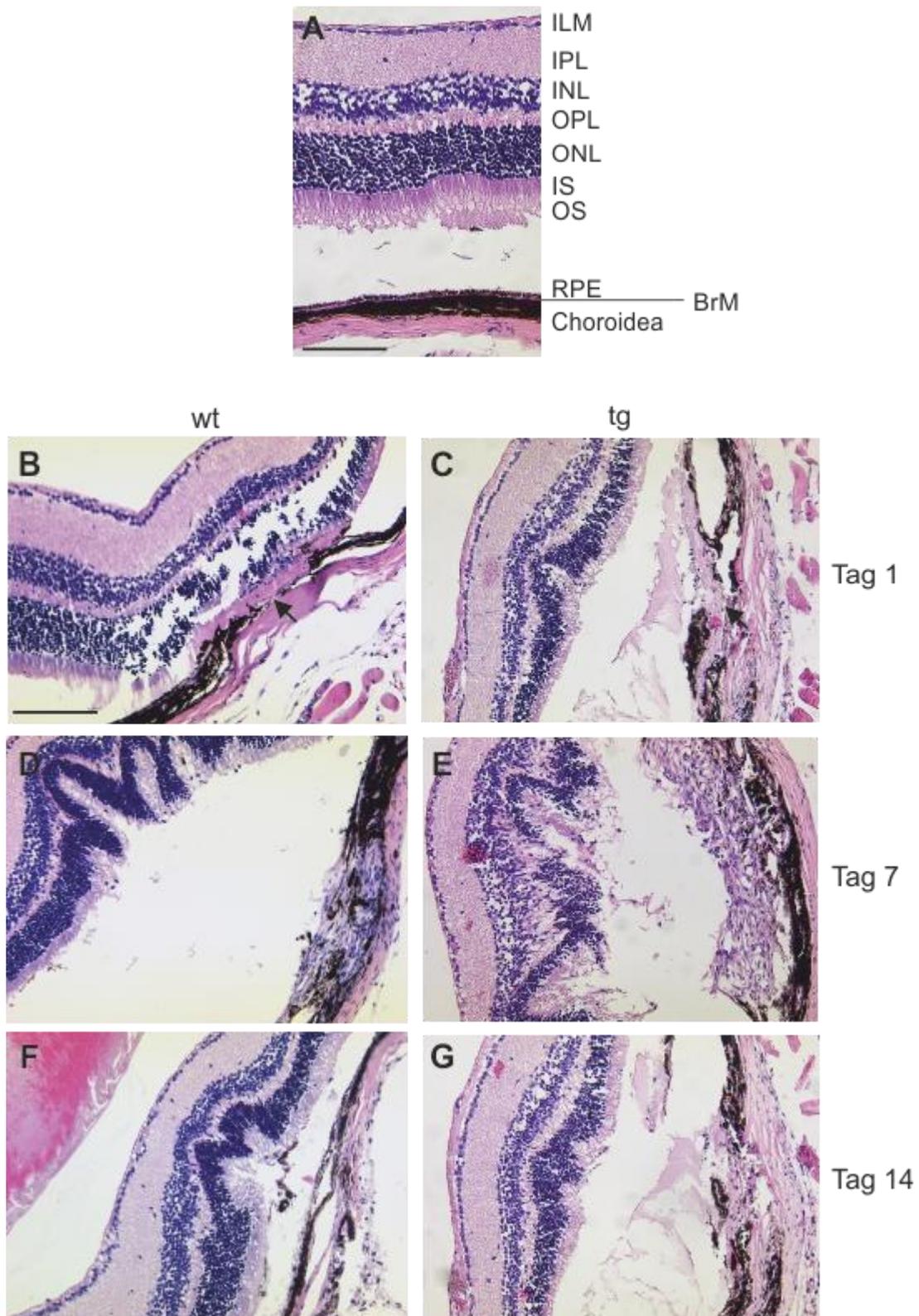


Abb. 3.31 HE-Färbungen der Laser-Herde in der Retina. Paraffinschnitte der Laser-Herde von transgenen (tg) und Wildtypen (wt) an Tag 1, Tag 7 und Tag 14. (A) Normale Retina ohne Laser-Herd. (B) Wildtyp-Retina mit Laser-Herd an Tag 1. (C) Transgene-Retina mit Laser-Herd an Tag 1. (D) Wildtyp-Retina mit Laser-Herd an Tag 7. (E) Transgene-Retina mit Laser-Herd an Tag 7. (F) Wildtyp-Retina mit Laser-Herd an Tag 14. (G) Transgene-Retina mit Laser-Herd an Tag 14. An Tag 1 ist die Zerstörung der BrM gut sichtbar (Pfeile), während an Tag 7 bereits Vernarbungen entstehen. An Tag 14 ist ein Rückgang des fibrovaskulären Gewebes erkennbar. BrM, Bruchsche Membran; ILM, innere Grenzschicht; INL, innere Körnerschicht; IPL, innere plexiforme Schicht; ONL, äußere

Körnerschicht; OPL, äußere plexiforme Schicht; PIS, innere Schicht der Photorezeptoren; POS, äußere Schicht der Photorezeptoren; RPE, retinales Pigmentepithel; Maßstabsbalken, 100 µm; Paraffinschnitte, 5 µm.

Die histopathologische Untersuchung zeigte die Zerstörung der BrM sowohl in transgenen als auch in Wildtyp-Mäusen einen Tag nach der Laserbehandlung (Abb. 3.31 B und C, Pfeile). An Tag 7 kommt es zu Vernarbungsprozessen (Abb. 3.31 D und E). Es waren große Mengen fibrovaskulären Gewebes, das hauptsächlich aus azellulärem Material und dicht gepackten RPE-Zellen besteht, zu beobachten. Defekte in der BrM waren auch an Tag 14 nach Laserbehandlung noch erkennbar (Abb. 3.31 F und G). Jedoch waren ein Rückgang des fibrovaskulären Gewebes und eine Hypertrophie des RPE zu bemerken. Es zeigten sich deutliche Veränderungen in der retinalen Struktur, vor allem in der äußeren Körnerschicht (ONL) zu allen drei Zeitpunkten. Vergleichbare Ergebnisse lieferten die SD-OCT-Aufnahmen, in denen sich eine erhöhte Reflektion der ONL zu allen Zeitpunkten zeigte. Auch zeigte sich im SD-OCT ebenfalls ein leichter Rückgang der Laser-bedingten Veränderungen an Tag 14, wodurch auf eine Regeneration des Gewebes geschlossen werden kann. Allerdings war auch in den histologischen Abbildungen kein Unterschied im Ausmaß und der Größe der Laserherde zwischen transgenen und Wildtyp-Mäusen auszumachen.

3.4.3.2 Fluoreszenzfärbung histologischer RPE-/Choroidea-flatmounts

Da Endothelzellen und Gefäßstrukturen weder in der FAG noch im SD-OCT zu erkennen sind, wurden zur Untersuchung der Gefäßneubildung aus der Choroidea nach der Laserkoagulation histologische RPE-/Choroidea-flatmounts hergestellt. Diese Methode eignet sich histologisch am besten, um neugebildete Gefäßstrukturen in Choroidea und RPE sichtbar zu machen. Dazu wurden die Mäuse mit Rhodamin-markiertem Concanavalin-A (Con-A) perfundiert. Con-A ist ein Lektin aus der Jackbohne und wurde hier zur Visualisierung der choroidalen Gefäße und der CNV verwendet.

An Tag 1 nach der Laserbehandlung war die CNV mit klaren Abgrenzungen in der Con-A-Färbung im flatmount zu erkennen (Abb. 3.32). Tubuläre Strukturen, deren Ursprünge in den choroidalen Gefäßen liegen, zeigten ihr höchstes Wachstum am siebten Tag nach der Argon-Laserbehandlung und bildeten sich an Tag 14 wieder zurück. Diese Strukturen lagen vor allem am äußeren Rand und im zentralen Bereich der Laser-Herde und waren nicht zu vergleichen mit der homogenen Struktur der choroidalen Gefäße. Wie in der FAG ließ sich zwischen den Laser-Herden auf den flatmounts kein Unterschied in der Größe der Laser-Herde oder dem Maß der choroidalen Vaskularisation zwischen transgenen und Wildtyp-Mäusen ausmachen.

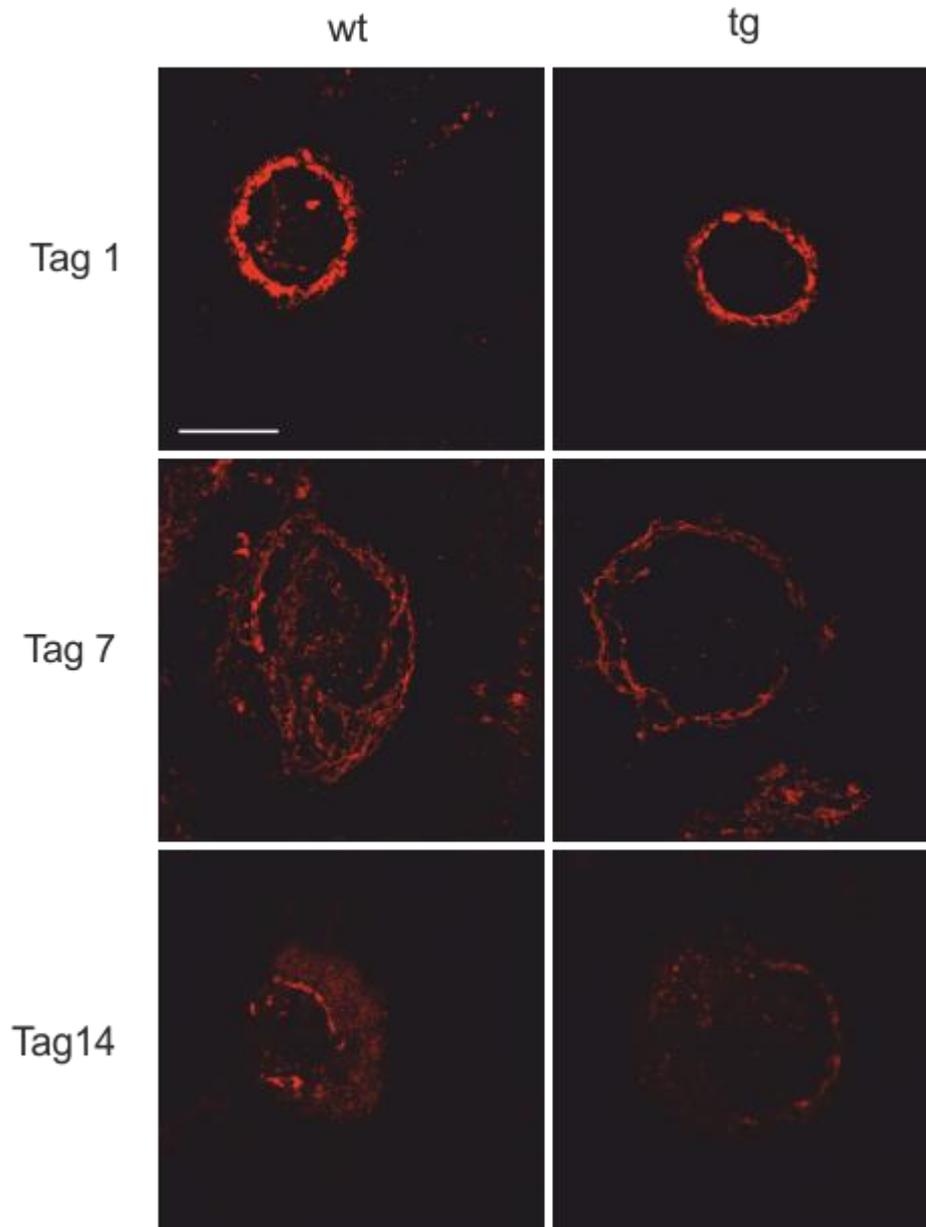


Abb. 3.32 Untersuchung der Gefäßneubildung aus der Choroidea. Immunfluoreszenz der Laserherde nach Perfusion mit Concanavalin A von Laser-Herden von Wildtypen (wt) und von transgenen (tg) Mäusen an Tag 1, Tag 7 und Tag 14. Die tubulären Strukturen sind gut an der roten Färbung zu erkennen. An Tag 7 zeigte sich die stärkste Vaskularisation, die sich an Tag 14 wieder zurück entwickelte. Maßstabsbalken, 100 μm .

3.5 Analyse von Wachstumsfaktoren in RPE-/BrM-/Choroidea-Lysaten

Da sich nach der Laserkoagulation keine Änderungen in der CNV-Aktivität transgener Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen zeigten, sollte im Folgenden die Proteinkonzentration von Wachstumsfaktoren in den RPE-/BrM-/Choroidea-Geweben gemessen werden. Von HTRA1 ist bekannt, dass es die Expression vom transformierenden Wachstumsfaktor-beta (TGF- β) und dem Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor-1 (IGF-1) und somit indirekt die Expression des

vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) beeinflusst. Diese drei Wachstumsfaktoren können als Modulatoren der Angiogenese wirken. So soll eine erhöhte VEGF-Konzentration die Ausbildung einer CNV begünstigen und eine erhöhte TGF- β -Konzentration durch den Verlust der Proteaseaktivität von HTRA1 im Gehirn (CARASIL) führt zu einer erhöhten Permeabilität von Gefäßen (Kwak et al., 2000, Shiga et al., 2011). Um zu untersuchen, wie und ob die HTRA1-Überexpression die Proteinkonzentration dieser Wachstumsfaktoren moduliert, wurden Protein-Lysate aus RPE-/BrM-/Choroidea-Gewebe hergestellt und mittels der Luminex xMAP-Technologie untersucht (2.2.4.13). Dazu wurden jeweils acht drei Monate alte und acht zwölf Monate alte transgene und Wildtyp-Mäuse verwendet. Verglichen mit den Wildtypen wurde in transgenen Mäusen bei den drei Isoformen von TGF- β weder in jungen noch in alten Mäusen ein signifikanter Unterschied in der Konzentration gemessen (Abb. 3.33 A). TGF- β 3 war nur in sehr geringer Konzentration vorhanden und war erst in zwölf Monate alten Mäusen detektierbar. Bei allen Tieren wurden die höchsten Konzentrationen bei der TGF- β 2-Isoform vorgefunden. Generell war die Konzentration der TGF- β -Isoformen in den Lysaten von alten Mäusen leicht erhöht. Der IGF-1-Gehalt zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied in jungen und alten transgenen und Wildtyp-Mäusen (Abb. 3.33 B). Insgesamt war die Konzentration von IGF-1 in den Lysaten jedoch höher als die Konzentration der TGF- β Isoformen. Die VEGF-Konzentration zeigte einen leichten Anstieg in zwölf Monate alten Tieren verglichen mit drei Monate alten Tieren, jedoch waren auch hier die Unterschiede in der Konzentration zwischen transgenen und Wildtyp-Tieren nicht signifikant und in transgenen Tieren nur minimal erhöht (Abb. 3.33 C). Es zeigte sich also, dass die HTRA1-Überexpression kaum einen Einfluß auf die Proteinkonzentration dieser drei Wachstumsfaktoren in den RPE-/BrM-/Choroidea-Schichten hat. Das könnte auch ein Grund dafür sein, dass die HTRA1-Überexpression in den transgenen Mäusen keinen großen Einfluss auf die CNV-Aktivität hatte.

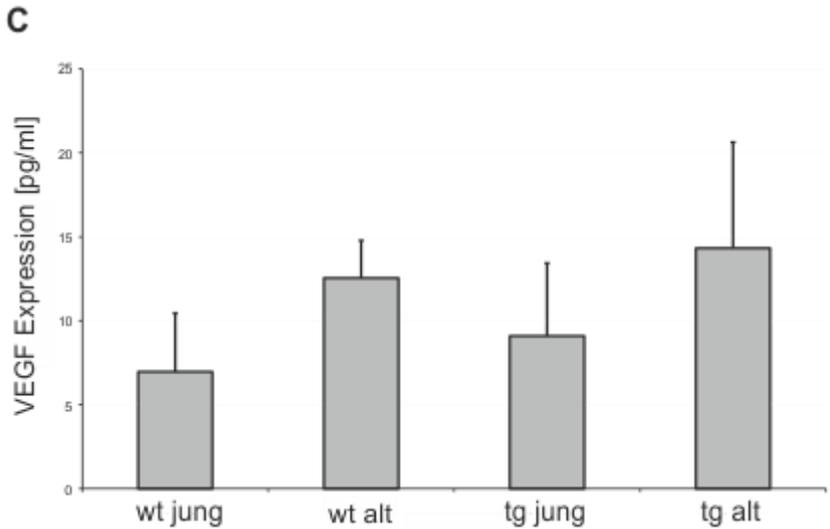
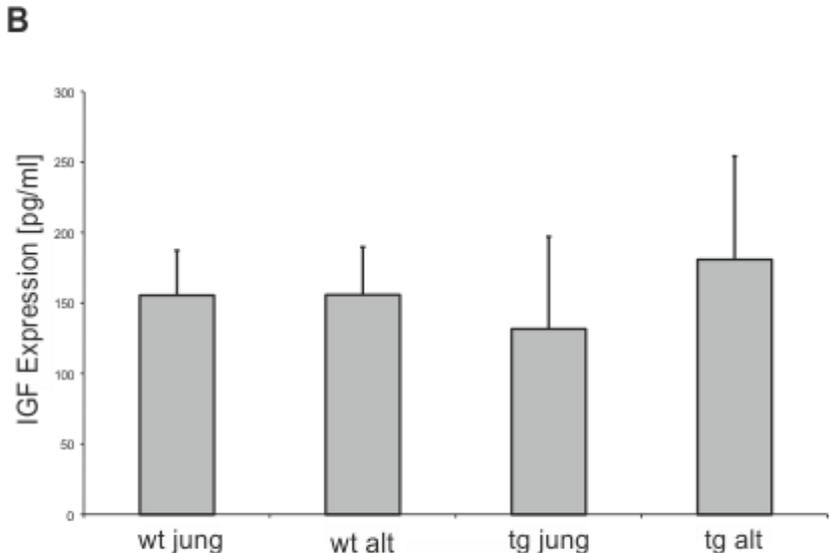
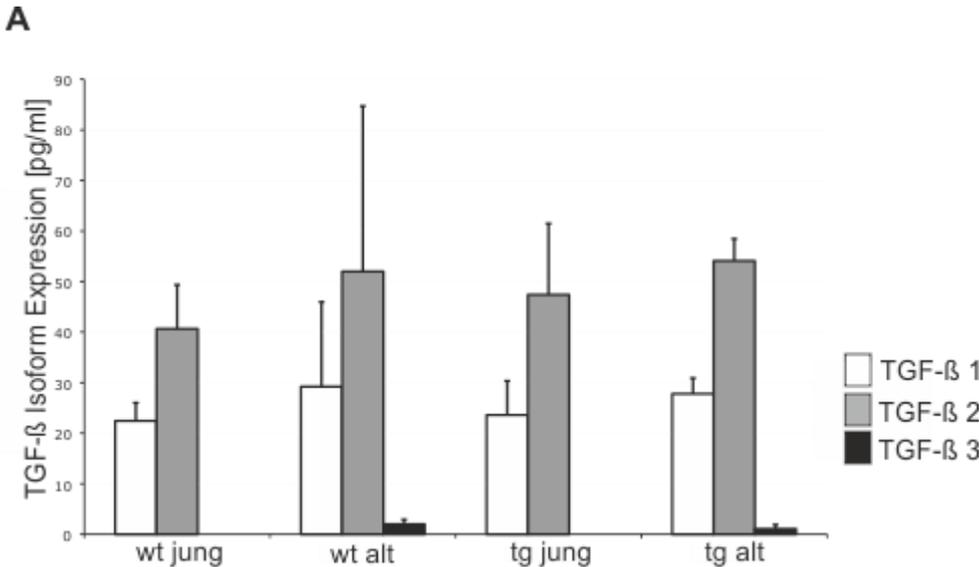


Abb. 3.33 Statistische Auswertungen der Wachstumsfaktoren-Konzentration. Die Mittelwerte der Messungen sind in Form eines Säulendiagramms dargestellt; die Standardabweichungen sind als Balken angegeben. (A) Konzentration der TGF- β -Isoformen in RPE-/BrM-/Choroidea-Lysaten von drei (jung) und zwölf (alt) Monate alten transgenen (tg) und Wildtyp-Mäusen (wt). (B) Konzentration von IGF-1 in RPE-/BrM-/Choroidea-Lysaten von drei (jung) und zwölf (alt) Monate alten transgenen (tg) und Wildtyp-Mäusen (wt). (C) Konzentration von VEGF in RPE-/BrM-/Choroidea-Lysaten von drei (jung) und zwölf (alt) Monate alten transgenen (tg) und Wildtyp-Mäusen (wt). Die Proteinkonzentrationen wurden mittels der Luminex xMAP-Technologie untersucht und am Luminex 200 Instrument gemessen. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Konzentration an Wachstumsfaktoren zwischen transgenen und Wildtyp-Mäusen.

3.6 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

In der Lichtmikroskopie waren keine Unterschiede zwischen den Retinae transgener und Wildtyp-Mäuse festzustellen. Die BrM ist jedoch eine sehr dünne amorphe Schicht, deren einzelne Schichten sich lichtmikroskopisch nicht ausreichend visualisieren ließen. Da HTRA1 aber die Qualitätskontrolle von EZM-Proteinen regulieren soll und bekannt ist, dass EZM-Proteine wie Fibronectin von HTRA1 abgebaut werden (Grau et al., 2006), sollte vor allem der Aufbau und die Struktur der BrM bei einer HTRA1-Überexpression näher untersucht werden. Die BrM ist von besonderer Bedeutung, weil sie eine Barrierefunktion besitzt und den Nährstoffaustausch zwischen dem RPE und der Choroidea reguliert (Booij et al., 2010). Um nun eine bessere Auflösung und kontrastreichere morphologische Darstellung der Retina und insbesondere der BrM als in der Lichtmikroskopie zu erlangen, wurden elektronenmikroskopische Semidünnschnitte und Ultradünnschnitte angefertigt (2.2.7). Dafür wurden drei und zwölf Monate alte transgene und Wildtyp-Mäuse perfundiert.

3.6.1 Semidünnschnitte

Die Schnitte dienen vor allem der Orientierung im Präparat vor der Elektronenmikroskopie, aber wurden auch auf sichtbare morphologische Veränderungen untersucht. Dazu wurden sie mit Toluidinblau angefärbt (2.2.5.2) und unter dem Lichtmikroskop beurteilt. Die Stärke der Blaufärbung gibt dabei Aufschluss über die relative Elektronendichte des Präparats. Die Präparate zeigten nach der Färbung einen guten Gewebeerhalt ohne sichtbare morphologische Veränderungen (Abb. 3.34).

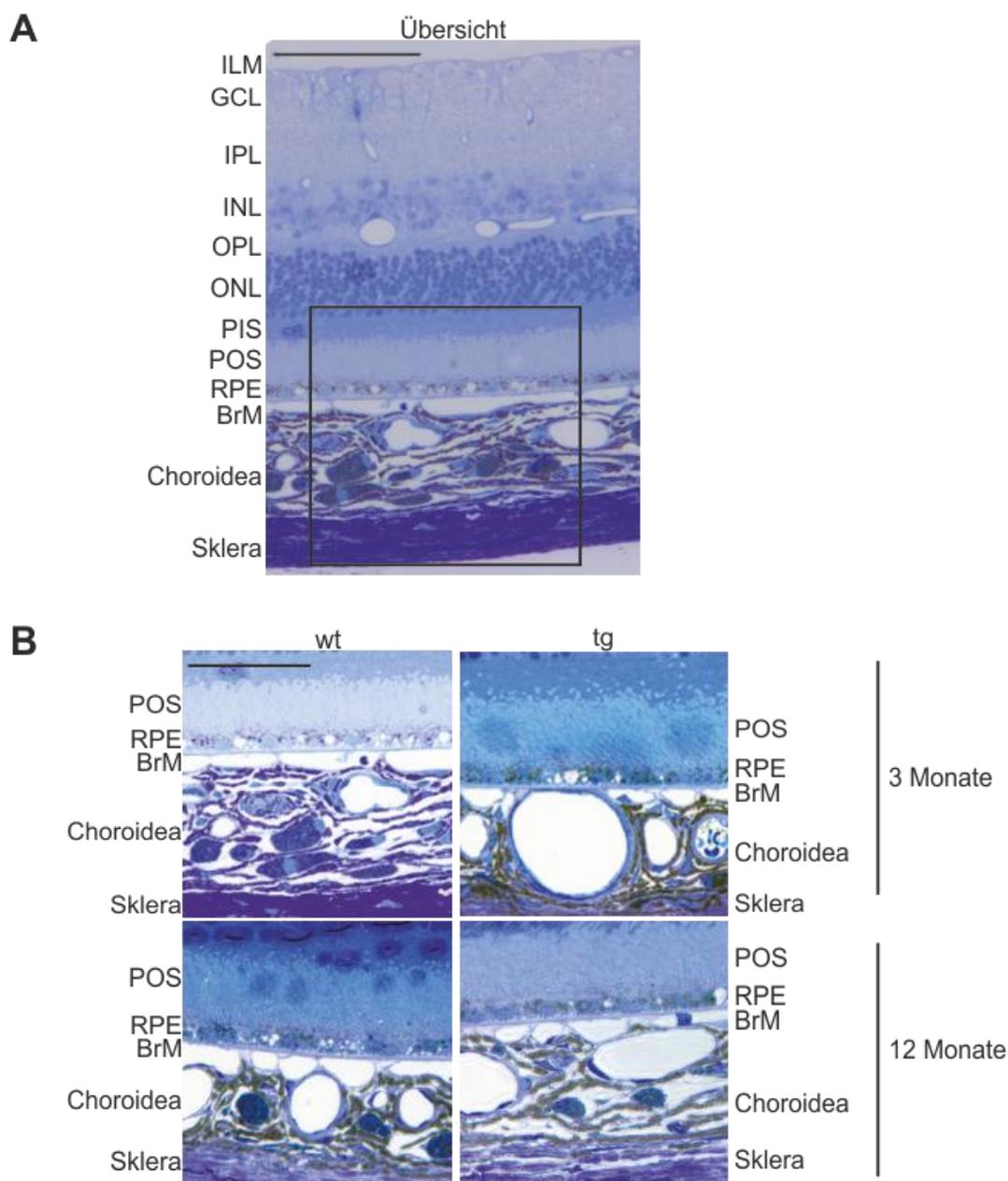


Abb. 3.34 Morphologische Untersuchungen der Retina. (A) Ein Toluidinblau-gefärbter Semidünnschnitt zur Übersicht und besseren Orientierung. (B) Abbildungen von Toluidinblau-gefärbten Semidünnschnitten des Augengewebes von Wildtyp- (wt) und transgenen (tg) Mäusen im Alter von 3 und 12 Monaten. Die Aufnahmen ließen keine morphologischen Veränderungen zwischen transgenen und Wildtyp-Mäusen erkennen. BrM, Bruchsche Membran; ILM, innere Grenzschrift; INL, innere Körnerschicht; IPL, innere plexiforme Schicht; ONL, äußere Körnerschicht; OPL, äußere plexiforme Schicht; PIS, innere Schicht der Photorezeptoren; POS, äußere Schicht der Photorezeptoren; RPE, retinales Pigmentepithel; Maßstabsbalken, 20 μ m; Semidünnschnitte, 500 nm.

3.6.2 Ultradünnschnitte

Die Ultradünnschnitte wurden auf Kupfernetzchen (*Grid*) aufgebracht und dann mit Bleicitrat und Uranylacetat kontrastiert (2.2.7). Die Begutachtung der Schnitte erfolgte am Elektronenmikroskop. Hierbei waren keine Unterschiede in den RPE-Zellen oder den Photorezeptoren festzustellen. Die BrM allerdings zeigte in den transgenen Mäusen eine

deutliche Veränderung der elastischen Schicht (EL) (Abb. 3.35). Während Wildtyp-Mäuse eine durchgehende EL aufwiesen (Abb. 3.35 C, G), war sie bei transgenen Mäusen fragmentiert und weniger kontinuierlich (Abb. 3.35 D, H). Die Sternchen in Abbildung 3.35 (D, H) kennzeichnen „Flecken“ aus elektronendichtem Material, die in der EL transgener Mäuse auftraten. Gefolgt wurden diese Flecken von „Löchern“, die kaum Elektronendichte aufwiesen und auf einen Verlust der elastischen Fasern schließen ließen. Diese Unterschiede konnten sowohl für die drei Monate alten als auch für die zwölf Monate alten Tiere festgestellt werden. In den zwölf Monate alten Mäusen zeigten sich im Unterschied zu den drei Monate alten Mäusen zudem altersbedingte Verdickungen der äußeren kollagenen Schicht der BrM, wodurch der Austausch von Nährstoffen zwischen dem RPE und der Choroidea behindert werden kann.

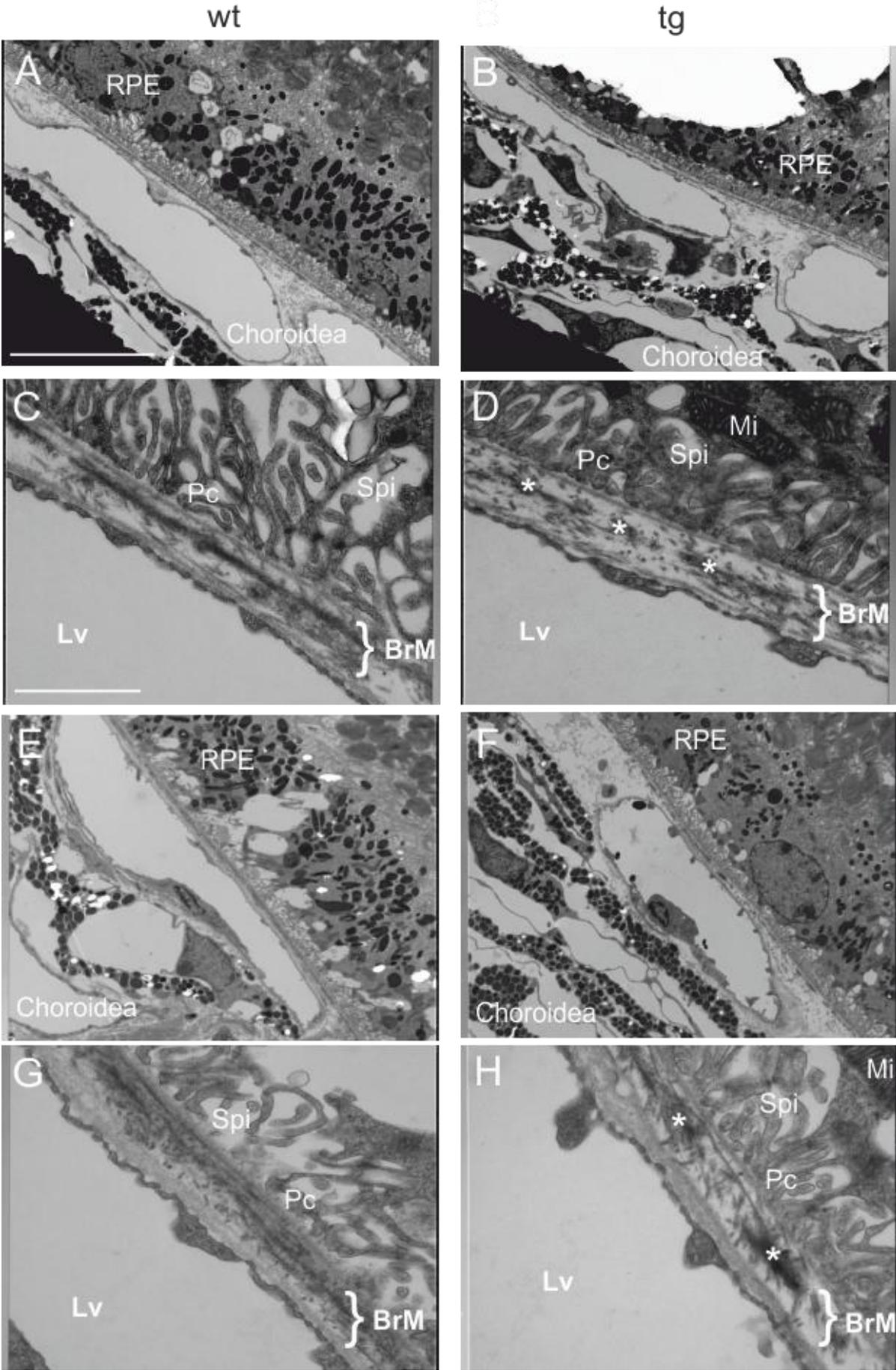


Abb. 3.35 Morphologische Untersuchungen des RPE-/BrM-/Choroidea-Gewebes. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Retina von transgenen (tg) und Wildtyp-Mäusen (wt) an Ultradünnschnitten. In A, E sowie B, F sind die Retinae in 3000-facher Vergrößerung aufgenommen. Die Strukturen des RPE, der BrM und der Choroidea sind gut erkennbar. In transgenen Mäusen zeigten sich bereits hier Veränderungen in der EL der BrM. In C, G sowie D, H sind die Retinae in 20000-facher Vergrößerung dargestellt. In der BrM von transgenen Mäusen kam es zu Fragmentierungen der EL dargestellt durch „Löchern“ mit geringerer Elektronendichte gefolgt von elektronendichtem Material (*). BrM, Bruchsche Membran; Lv, *Lumen vasculare* (Lumen der Gefäße); Mi, Mitochondrien; Pc, *Processus cellularis* (Zellfortsatz); RPE, retinales Pigmentepithel; Spi, *Spatium intermembranosum* (intermembranöse Spalte), Maßstabsbalken, 10 μm (3000 x) und 2 μm (20.000 x); Ultradünnschnitte, 50 nm.

Die Veränderungen der EL waren nicht nur lokal begrenzt, sondern über die gesamte Retina der transgenen Mäuse vorzufinden. Dafür wurden TEM-Bilder von der gesamten Region der zentralen und peripheren Retina aufgenommen und ausgewertet. Abbildung 3.36 ist exemplarisch und zeigt die in der BrM weit verbreitete Fragmentierung der EL in transgenen Mäusen. Bei Wildtyp-Mäusen war dagegen sowohl in der zentralen als auch in der peripheren Retina keine Fragmentierung der EL erkennbar.

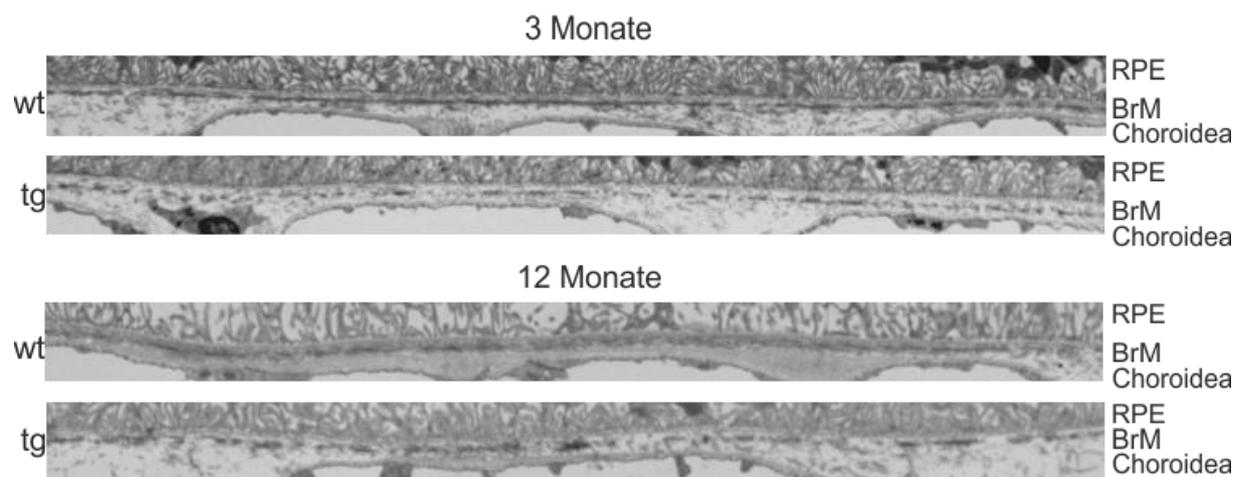


Abb. 3.36 Morphologische Untersuchung der BrM. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Retina von drei und zwölf Monate alten transgenen (tg) und Wildtyp-Mäusen (wt). Die Region der BrM wurde aus Bildern in 3000-facher Vergrößerung ausgeschnitten. Es zeigt sich, dass die Veränderungen der EL nicht lokal begrenzt sind. BrM, Bruchsche Membran; RPE, retinales Pigmentepithel.

3.7 Expressionsanalyse von EZM-Proteinen in RPE-/BrM-/Choroidea-Lysaten

Um die Regulation von Proteinen der EZM durch HTRA1 zu untersuchen, wurden Protein-Lysate aus RPE-/BrM-/Choroidea-Geweben von transgenen und Wildtyp-Mäusen hergestellt. Auf Grund der TEM-Ergebnisse, die eine Fragmentierung der EL in transgenen Mäusen gezeigt haben, wurden vor allem EZM-Proteine untersucht, die an der Elastogenese und somit an der Entstehung der EL in der BrM beteiligt sind. Dazu wurden jeweils drei Tiere vom

Wildtypen und von transgenen Mäusen der Linie 60 verwendet. Der Immunoblot wurde mit Nidogen-1-, Elastin-Mikrofibrillen-Interfacer-1-lokalisiertes Protein- (Emilin-1), Tropoelastin- (TE), Fibulin-5-, Fibulin-4-, Lysyl-Oxidase-ähnlich-1-(LOXL-1) und Fibronektin-Antikörpern als auch mit β -Aktin-Antikörper als Ladekontrolle detektiert. Abbildung 3.37 zeigt die Ergebnisse des Western Blots für die verschiedenen Antikörper.

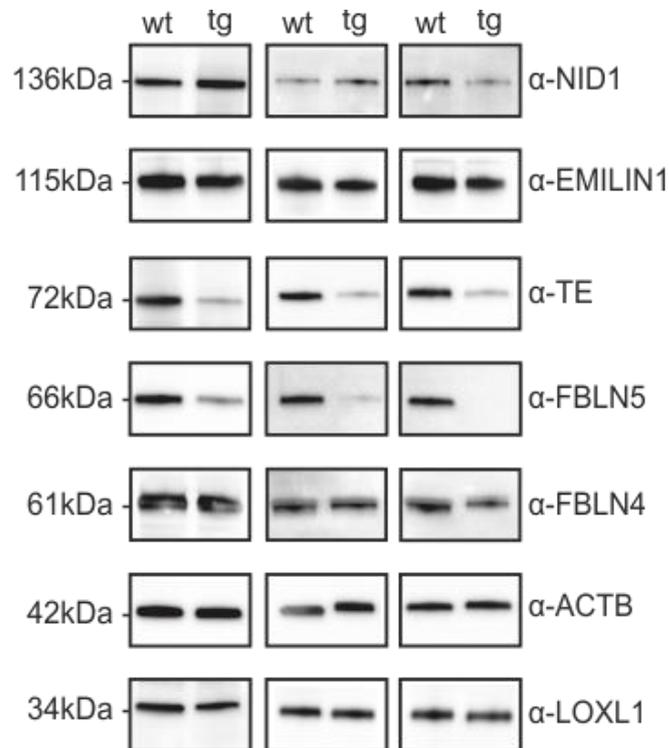


Abb. 3.37 Untersuchung der Expression von EZM-Proteinen. Western Blot-Analyse der murinen RPE-/BrM-/Choroidea-Lysate von jeweils drei transgenen (tg) und Wildtyp-Mäusen (wt). Die Lysate wurden mit Nidogen-1- (α -NID1), EMILIN-1- (α -EMILIN1), Tropoelastin- (α -TE), Fibulin-5- (α -FBLN5), Fibulin-4- (α -FBLN4), LOXL-1- (α -LOXL1) und β -aktin- (α -ACTB) Antikörpern detektiert. Es zeigte sich deutlich eine Reduktion der Fibulin-5- und TE-Expression in *Htra1*-transgenen Mäusen.

Die Banden wurden mit Hilfe der Quantity One-Software (BioRad) zur semiquantitativen Analyse der Expression densitometrisch ausgewertet (Abb. 3.38) Dazu wurden sowohl die Signalintensitäten der verschiedenen EZM-Proteine als auch die von β -Aktin gemessen, um eventuelle Abweichungen in der Auftragsmenge zu berücksichtigen. Die relativen Signalstärken der EZM-Proteine wurden wie unter 2.2.2.4 beschrieben berechnet.

Dabei wird deutlich, dass die Expression sowohl von TE als auch von Fibulin-5 in transgenen Mäusen wesentlich geringer war als in Wildtyp-Mäusen, während die anderen getesteten EZM-Proteine wenig Unterschiede in der Expression zeigten. TE ist die monomere Form von Elastin und wird durch den Prozess der Koazervierung mittels LOXL-1 zu polymeren Elastinfasern verbunden (Liu et al., 2004). Fibulin-5 spielt dabei eine bedeutende Rolle, da es die Lysyl-Oxidase mit TE verbindet (Hirai et al., 2007b).

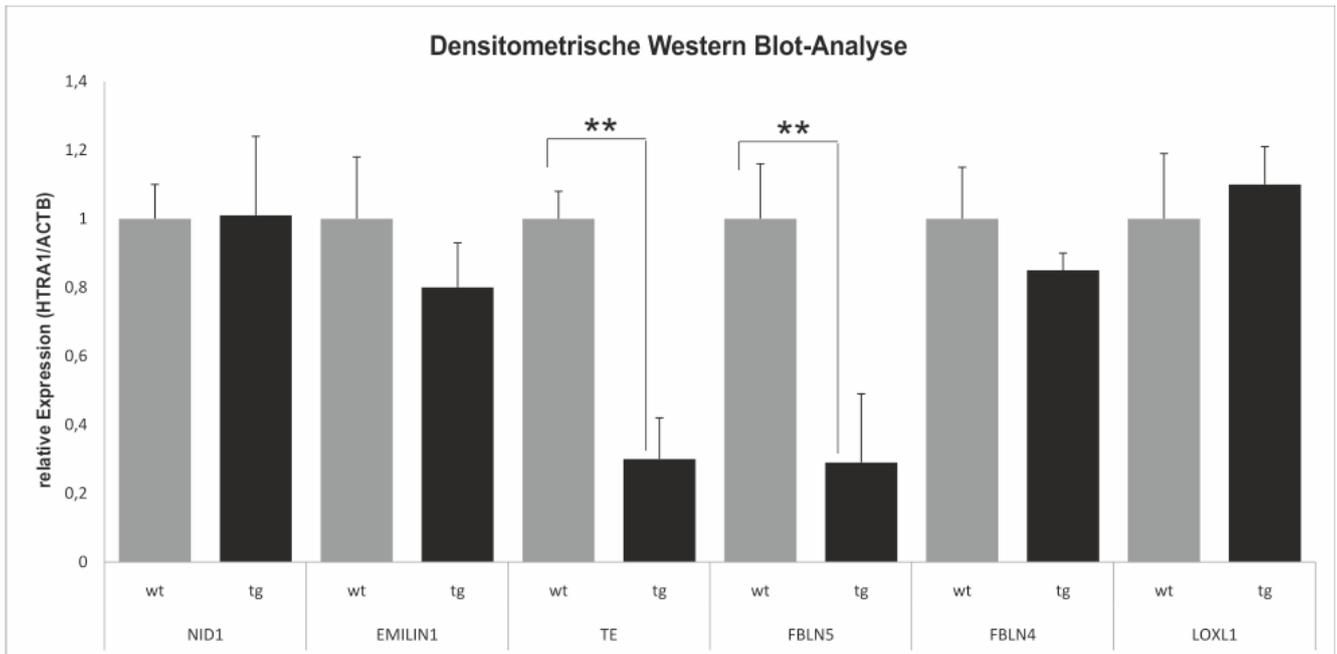


Abb. 3.38 Densitometrische Auswertungen der relativen Expressionsänderung von EZM-Proteinen im Bezug zur Ladekontrolle β -Aktin (ACTB). Im Säulendiagramm sind die relative Expression der Wildtypen (wt) links und die der transgenen Mäuse (tg) rechts dargestellt. Die Expression von TE und Fibulin-5 ist in transgenen Tieren signifikant erniedrigt. NID1, Nidogen-1; EMILIN1, Elastin Mikrofibrillen Interfacer-1; TE, Tropoelastin, FBLN5, Fibulin-5; FBLN4, Fibulin-4; LOXL1, Lysyl Oxidase-ähnlich-1; p-Wert: **, 0,01.

Fibronektin hingegen ist in der transgenen Maus deutlich erhöht und es zeigte sich ein Anstieg in der Expression von Fibronektin-Fragmenten (Abb. 3.39). Fibronektin-Fragmente induzieren eine erhöhte Expression von MMPs und werden häufig bei Arthrose-Patienten beobachtet (Grau et al., 2006).

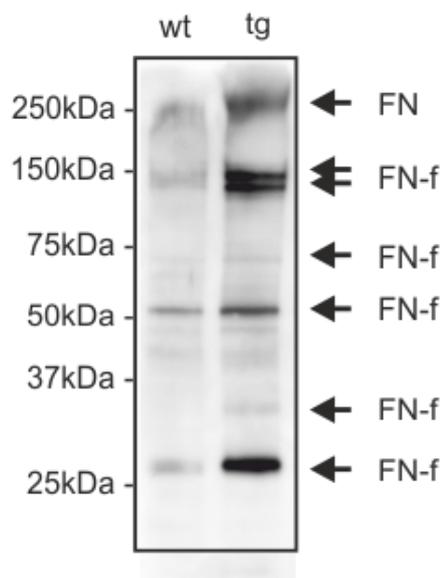


Abb. 3.39 Untersuchung der Fibronektin-Expression. Western Blot-Analyse der murinen RPE-/BrM-/Choroidea-Lysate von transgenen (tg) und Wildtyp-Mäusen (wt) mit Fibronektin (α -FN)-Antikörper. Die Pfeile indizieren die Banden für Fibronektin (FN) bzw. Fibronektin-Fragmente (FN-f). In transgenen Mäusen ist die Expression von Fibronektin und Fibronektin-Fragmenten erhöht.

3.8 Untersuchung der Proteaseaktivität von Δ mac25HTRA1

Da die Western Blot-Versuche mit RPE-/BrM-/Choroidea-Lysaten eine deutliche Reduktion von Fibulin-5 und TE sowie eine erhöhte Expression von Fibronectin zeigten, wurde mit Hilfe von rekombinantem HTRA1-Protein untersucht, ob HTRA1 diese EZM-Proteine proteolytisch abbaut. Im Fall von Fibronectin ist dies bereits zuvor nachgewiesen worden (Grau et al., 2006). Ebenfalls sollte ermittelt werden, ob noch andere wichtige EZM-Proteine wie z. B. Laminin und Kollagen IV als Substrate von HTRA1 identifiziert werden können. Um die Proteaseaktivität von HTRA1 *in vitro* zu analysieren, wurde rekombinantes humanes Δ mac25HTRA1-Protein (pPET- Δ mac25HTRA1-Plasmid freundlicherweise von M. Ehrmann, Universität Duisburg-Essen zur Verfügung gestellt) in *E. coli* hergestellt und über FPLC (2.2.2.7) gereinigt. Diesem rekombinanten HTRA1-Protein mit einem Molekulargewicht von 37 kDa fehlt sowohl die N-terminale IGFBP/MAC25- als auch die Kazal Inhibitor-Domäne, was durch den Wegfall der inhibitorischen Domäne zu einer verstärkten Proteaseaktivität führt.

3.8.1 Nachweis der spezifischen Aktivität des aufgereinigten Proteins

Die Proteaseaktivität von humanem Δ mac25HTRA1 wurde durch den Verdau von β -Casein bestätigt. Dazu wurde humanes β -Casein ohne bzw. mit humanem Δ mac25HTRA1 für 30 min bis zu 3 h inkubiert. Um sicher zu stellen, dass der Verdau nicht durch eventuell mit aufgereinigte bakterielle Proteasen anstatt humanem Δ mac25HTRA1 vermittelt wurde, wurde humanes Δ mac25HTRA1 zur Kontrolle 20 min mit einem spezifischen HTRA1-Inhibitor (NVP-LEB748; Novartis) vorinkubiert. Erst dann wurde β -Casein hinzugefügt. Es zeigten sich keine Anzeichen einer proteolytischen Spaltung, wenn β -Casein alleine in Digestions-Puffer (2.1.1) inkubiert wurde (Abb. 3.40). Aber bereits 30 min nach Inkubation mit Δ mac25HTRA1 wurde β -Casein proteolytisch gespalten. Da sich kein proteolytischer Verdau von β -Casein zeigte, wenn Δ mac25HTRA1 zuvor mit dem spezifischen HTRA1-Inhibitor inkubiert wurde, ist davon auszugehen, dass der Verdau nicht durch eventuell mit aufgereinigte bakterielle Proteasen, sondern spezifisch durch Δ mac25HTRA1 vermittelt wurde.

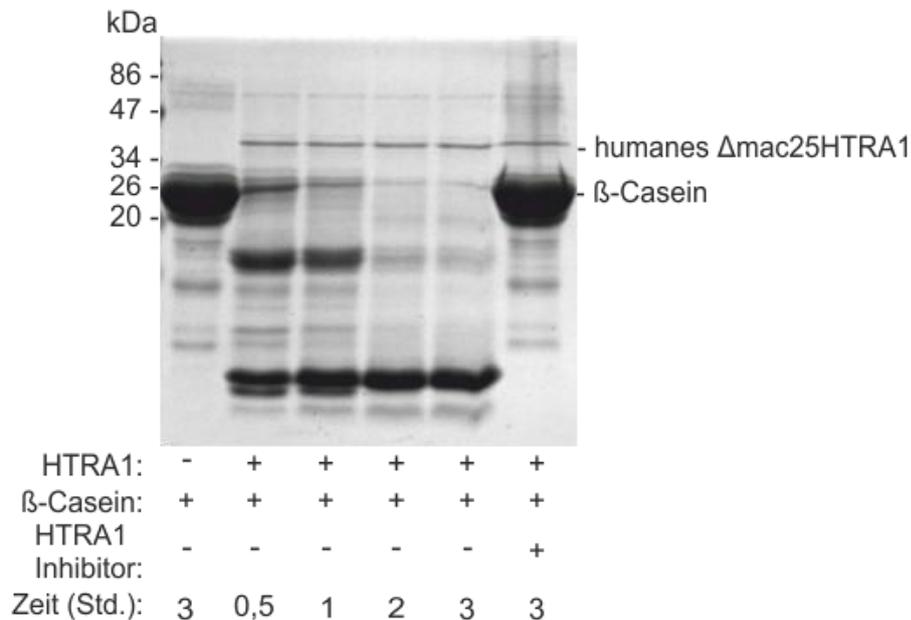


Abb. 3.40 Nachweis der spezifischen Proteaseaktivität von rekombinatem HTRA1. Coomassie-gefärbtes 12%iges SDS-Gel vom β-Casein-Verdau durch Δmac25HTRA1. HTRA1 baut β-Casein bereits nach 30 min ab; der HTRA1-Inhibitor verhindert einen Abbau von β-Casein durch HTRA1. kDa, Kilo-Dalton.

3.8.2 Untersuchung der Proteaseaktivität mit verschiedenen Substraten

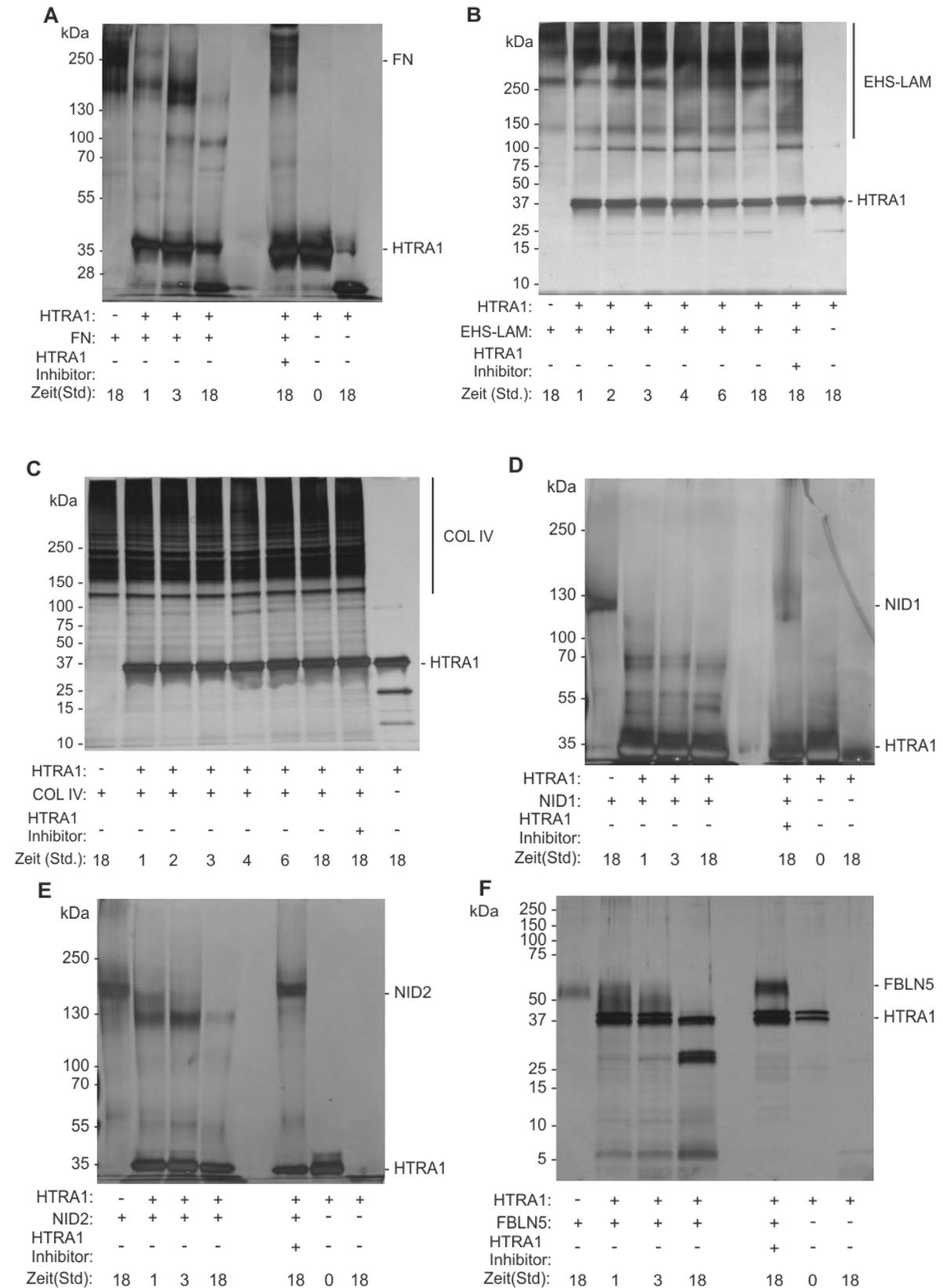
HTRA1 vermittelt die proteolytische Spaltung von EZM-Proteinen wie z.B. Fibronectin (Grau et al., 2006) und den Proteoglykanen Biglykan und Decorin (Tsuchiya et al., 2005). Um zu untersuchen, ob HTRA1 *in vitro* zusätzlich andere EZM-Proteine wie Laminin-1, Kollagen IV, Nidogen-1 und -2 sowie Fibulin-5 und Elastin proteolytisch spaltet, wurde die Proteaseaktivität von Δmac25HTRA1 auf diese Substrate untersucht.

Abbildung 3.41 stellt die Silber-gefärbten SDS-Gele für die Proteaseaktivität von Δmac25HTRA1 auf humanem Fibronectin, Laminin-1, Kollagen IV (alle Sigma-Aldrich), rekombinatem Nidogen-1(R&D Systems), Nidogen-2 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Eva Moritz, Universität zu Köln, Institut für Biochemie II, AG Koch), Fibulin-5 (R&D Systems) und Elastin (Sigma-Aldrich) als Substrate dar.

Wie bei Grau et al. (2006) beschrieben, ist Fibronectin ein Substrat von HTRA1 und wurde bei Inkubation mit selbigem proteolytisch gespalten (Abb. 3.41 A). EHS-Laminin und Kollagen IV hingegen zeigten keine Anzeichen eines Verdau (Abb. 3.41 B und C). Sowohl Nidogen-1 und -2 als auch Fibulin-5 wiederum wurden von Δmac25HTRA1 *in vitro* proteolytisch gespalten (Abb. 3.41 D, E und F). Es zeigten sich jedoch keine Fragmente beim Verdau mit Elastin aus der Haut (Abb. 3.41 G). Nach 18 Stunden Inkubation ohne Substrat konnte in allen Abbildungen ein Verlust von Δmac25HTRA1, der durch den eigenen

3. Ergebnisse

proteolytischen Abbau des Enzyms zu Stande kommen kann (An et al., 2010), beobachtet werden.



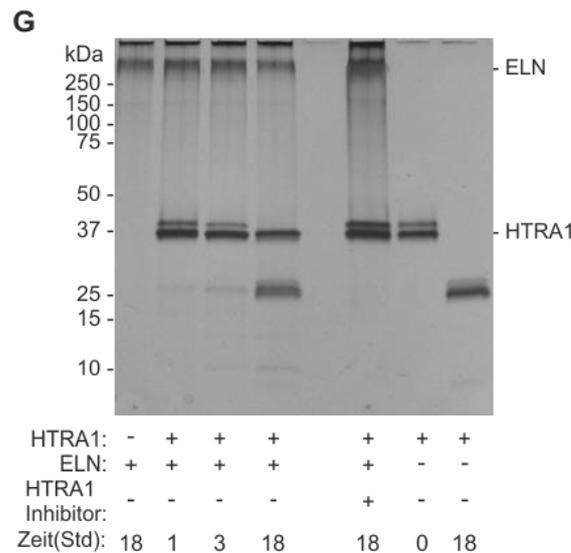


Abb. 3.41 Untersuchung der Proteaseaktivität von HTRA1 mit verschiedenen Substraten. Abbau von EZM-Komponenten durch rekombinantes Δ mac25HTRA1 *in vitro*. Silber-gefärbtes 4-12%iges SDS-Gel vom (A) Fibronectin-Verdau; (B) EHS-Laminin-Verdau; (C) Kollagen IV-Verdau; (D) Nidogen-1-Verdau; (E) Nidogen-2-Verdau; (F) Fibulin-5-Verdau; (G) Elastin-Verdau. Rekombinantes HTRA1 spaltete Fibronectin, Nidogen-1, Nidogen-2 und Fibulin-5 *in vitro*. COL IV, Kollagen IV; EHS-LAM, Engelbreth-Holm-Swarm-Laminin; ELN, Elastin; FBLN5, Fibulin-5; HTRA1, hier Δ mac25HTRA1; kDa, Kilo-Dalton; NID1, Nidogen-1; NID2, Nidogen-2; +, Protein/Inhibitor hinzugefügt; -, Protein/Inhibitor nicht hinzugefügt.

3.9 Expression von HTRA1 im Zellkulturmodell

Um die Auswirkungen einer HTRA1-Überexpression auf die Zelladhäsion und Zytokinexpression genauer zu untersuchen, wurde HTRA1 in humanen Nierenzellen der HEK-293-EBNA-Zelllinie und humanen RPE-Zellen der ARPE-19-Zellenlinie überexprimiert. Beide Zelltypen synthetisieren EZM-Proteine. Die Hypothese war, dass eine Überexpression von HTRA1 zur Degradation von EZM-Proteinen führt und so die Adhäsion der Zellen an die EZM stören könnte. Eine Schädigung der EZM kann außerdem zu einer erhöhten Freisetzung von Zytokinen wie z. B. VEGF führen (Detmar et al., 1997), die Einfluss auf die CNV-Entwicklung haben.

3.9.1 Herstellung des pCEP-Pu-*Htra1*-Konstrukts

Um HTRA1 in 293-HEK-EBNA- und ARPE-19-Zellen episomal zu exprimieren, wurde die *Htra1*-cDNA in den pCEP-Pu-Vektor (Kohfeldt et al., 1997) kloniert. Dafür lag ein *Kollagen IX*-Konstrukt (pCEP-Pu-*CollIX*) vor (freundlicherweise von PD Dr. Frank Zaucke, Universität zu Köln, Institut für Biochemie II zur Verfügung gestellt), bei dem die *Kollagen IX*-cDNA mit den Restriktionsenzymen NheI und NotI aus dem Vektorgerüst ausgeschnitten wurde. Nach der Dephosphorylierung mit SAP wurde der Restriktionsansatz auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 3.42), das Vektorgerüst ausgeschnitten und gereinigt.

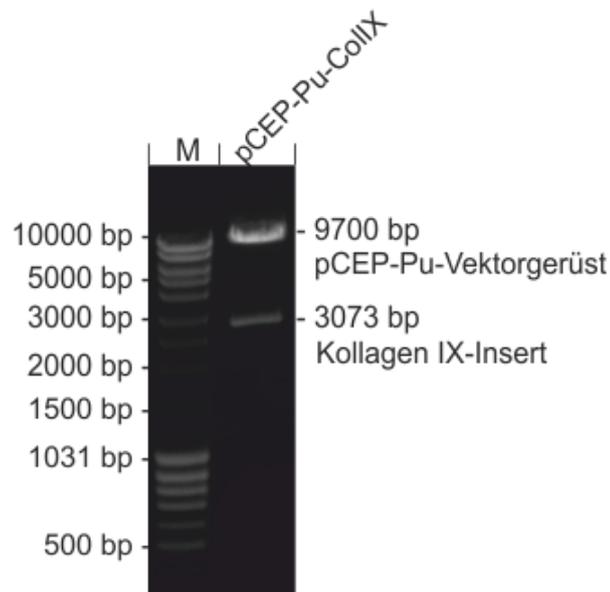


Abb. 3.42 Gelelektrophoretische Auftrennung des pCEP-Pu-CollIX-Restriktionsverdau. Der Restriktionsverdau mit *NheI* und *NotI* wurde auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Nach der Gelelektrophorese ist die pCEP-Pu-Vektorbande bei 9700 bp und das *CollIX-Insert* bei 3073 bp erkennbar. bp, Basenpaare; M, Marker.

Da die *Htra1*-cDNA (IRAVp968A0129D, ImaGenes) an Position 953 eine *NheI*-Restriktionsstelle besitzt, wurde an Position 953 ein G>A Basenaustausch durchgeführt (2.2.1.10). Anschließend wurde die *Htra1*-cDNA mittels PCR amplifiziert (Abb. 3.43 A). Dabei wurden die *NheI*- und *NotI*-Schnittstellen durch die Oligonukleotide (2.1.2) an die amplifizierte cDNA angefügt. Nach dem Restriktionsverdau der *Htra1*-cDNA mit *NheI* und *NotI* erfolgte die Ligation des pCEP-Pu-Vektors mit der *Htra1*-cDNA über die T4-Ligase (Abb. 3.43 B).

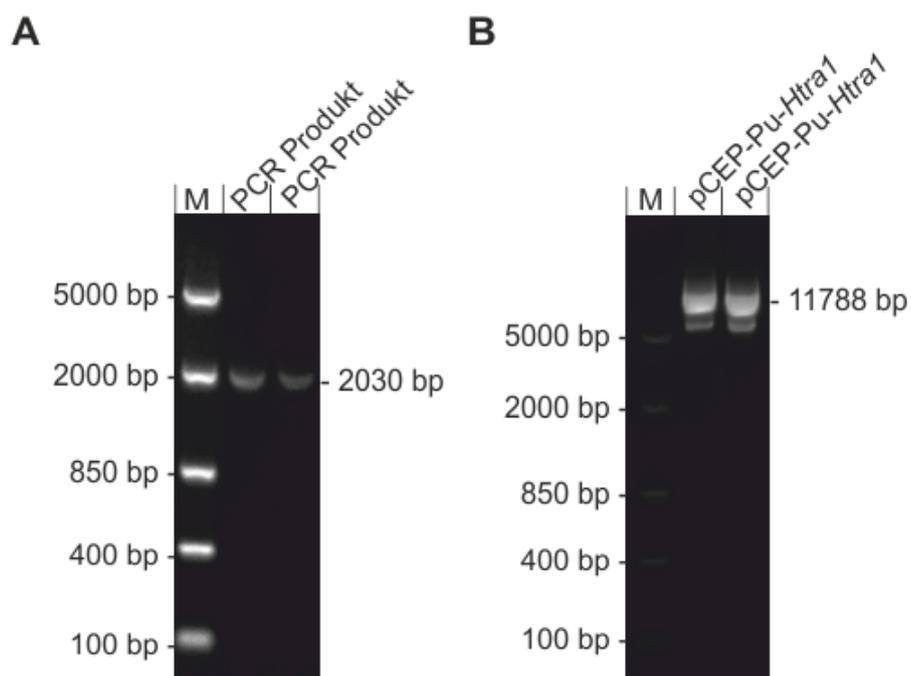


Abb. 3.43 Gelelektrophoretische Auftrennung der *Htra1*-PCR und des pCEP-Pu-*Htra1*-Plasmids. (A) Das PCR-Produkt nach Mutagenese mit den NheI- und NotI-Schnittstellen (2030 bp). (B) Das pCEP-Pu-*Htra1*-Plasmid (11788 bp) nach Ligation mit der T4-Ligase. Beides wurde auf einem 1%igem Agarosegel aufgetragen. bp, Basenpaare; M, Marker.

Nach Transformation in *E. coli*-Zellen (JM109) und Präparation des Konstrukts (Abb. 3.44) in kleinem Maßstab wurden die korrekte Insertion und die Nukleotidsequenz des PCEP-Pu-*Htra1*-Konstrukts durch bidirektionale Sequenzierung überprüft. Die erhaltene Sequenz wurde mit Hilfe der Vector NTI-Software (Invitrogen) mit der Referenzsequenz verglichen und zeigte 100%ige Übereinstimmung.

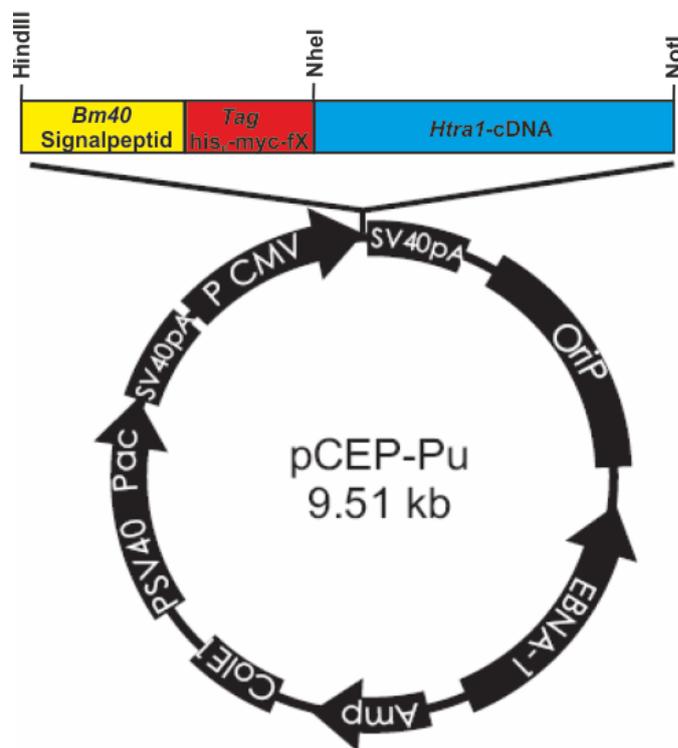


Abb. 3.44 Das pCEP-Pu-*Htra1*-Konstrukt (11730bp); Der pCEP-Pu-Vektor besitzt sowohl ein *EBNA-1* (*Epstein-Barr nuclear antigen*)-Gen und eine *OriP*-Replikationsstelle für eine hohe extrachromosomale Replikation, als auch ein *BM40*-Signalpeptid zur Sekretion des Proteins und einen *Tag* (*his₆-myc-fX*) zur Aufreinigung und Identifizierung des Proteins. kb, Kilo-Basen.

Zur Kontrolle wurde der pCEP-Pu-Vektor ohne *Insert* verwendet. Dafür wurde das *Insert* (hier: *Kollagen IX*-cDNA) ebenfalls mit NheI und NotI ausgeschnitten und die überhängenden 5'-Enden vor der Religation des Vektors aufgefüllt (Abb. 3.45).

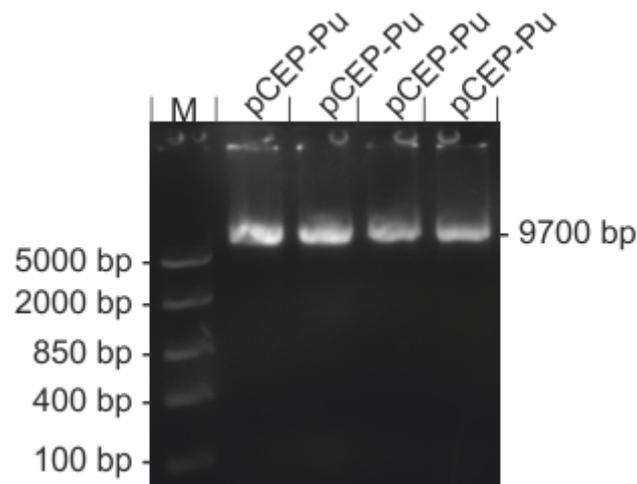


Abb. 3.45 Gelelektrophoretische Auftrennung des pCEP-Pu-Fill-In und des Restriktionsverdau. Der leere Vektor wurde nach Restriktionsverdau mit NheI und NotI und dem Fill-In auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Die Vektorbande hat eine Größe von 9700 bp. bp, Basenpaare, M, Marker.

3.9.2 Transfektion und Überexpression des pCEP-Pu-*Htra1*-Konstrukts

Für eine episodale Expression wurde das *Htra1*-Konstrukt im großen Maßstab aufgereinigt und mit Hilfe des Transfektionsreagens FuGENE 6 (Roche) in die HEK-293-EBNA-Zellen eingebracht. Das in den Vektor integrierte *EBNA-1* (*Epstein-Barr nuclear antigen*) -Gen kodiert für ein DNA-bindendes Protein (*nuclear antigen-1*), das an die Epstein-Barr-Virus-Replikationsstelle (*OriP*) bindet und somit eine hohe extrachromosomale Replikation gewährleistet. Da das Konstrukt durch die Puromycin-Resistenz in eukaryotischen Zellen selektionierbar ist, wurde einen Tag nach der Transfektion das Medium gegen Puromycin-haltiges Medium ausgetauscht und die überlebenden Zellen wurden weiter gezüchtet.

3.9.3 Expressionsanalyse der rekombinanten Proteine

Nach der Transfektion und Selektion wurden die Überstände der Zellen abgenommen und mittels SDS-PAGE (2.2.2.1) und Western Blot-Verfahren (2.2.2.4) auf Expression der rekombinanten Proteine überprüft. Dazu wurde ein c-myc-Antikörper verwendet, der den *myc-tag* der rekombinanten Proteine erkennt. In den Überständen der untransfizierten Zellen war mit dem c-myc-Antikörper keine Expression von HTRA1 oder einem anderen Protein erkennbar. Die Zellüberstände der mit dem *Htra1*-Konstrukt transfizierten Zellen dagegen zeigten bei über 47 kDa eine deutliche Bande, die auf das transgene HTRA1 mit dem *myc-tag* schließen lässt (Abb. 3.46). Vor allem die HEK-293-EBNA-Zellen zeigten hier eine starke Expression. In den Überständen der HEK-293-EBNA-Zellen, die mit dem *Kollagen IX*-Konstrukt und dem leeren Vektor transfiziert wurden, konnten transgenes *Kollagen IX* und der transgene *Tag* ausgemacht werden.

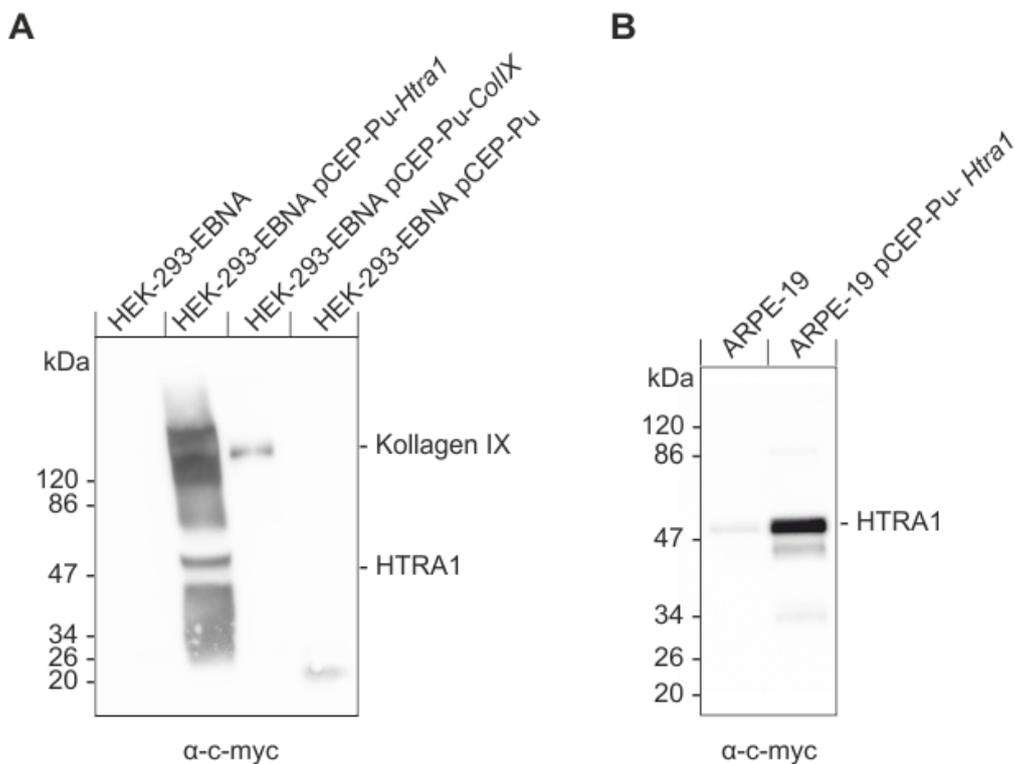


Abb. 3.46 Untersuchung der Zellkulturüberstände auf Transgen-Expression. (A) Die Überstände der HEK-293-EBNA-Zellen wurden mit c-myc- (α -c-myc) Antikörper detektiert. (B) Die Überstände der ARPE-19-Zellen wurden ebenfalls mit c-myc- (α -c-myc) Antikörper detektiert. Die untransfizierte Probe zeigte keine Bande nach c-myc-Detektion. Die Überstände transfizierter Zellen zeigten deutliche Banden für das entsprechende Transgen. kDa, Kilo-Dalton.

3.9.4 Untersuchung der Konzentration von Wachstumsfaktoren in Zellkulturüberständen

Wie bereits erwähnt, kann es durch Schädigungen der EZM zu einer vermehrten Freisetzung von Wachstumsfaktoren kommen (Detmar et al., 1997). Da HTRA1 EZM-Komponenten abbaut und Wachstumsfaktoren durch den Abbau von TGF- β und die Erhöhung der IGF-1-Konzentration regulieren kann, sollte die Expression von Wachstumsfaktoren in Zellkulturüberständen von HEK-293-EBNA-Zellen mittels der Luminex xMAP-Technologie ermittelt werden. Vor allem Angiogenesefaktoren wie VEGF wurden wegen ihrer Rolle bei der CNV-Entwicklung untersucht. Dabei konnte eine geringere VEGF-Konzentration in transfizierten HEK-293-Zellen beobachtet werden (Abb. 3.47 A). Es fiel auf, dass die Kontrollen ebenfalls eine viel geringere Konzentration von VEGF zeigten. Bei der Angiopoietin-1-Konzentration war das Bild genau umgekehrt (Abb. 3.47 C). Hier zeigten die nicht transfizierten Zellen die geringste Angiopoietin-1-Konzentration, während die transfizierten Zellen eine höhere Konzentration aufwiesen. Dabei war die Angiopoietin-1-Konzentration in pCEP-Pu-*Htra1*-transfizierten Zellen am höchsten. Bei der Angiogenin-

3. Ergebnisse

Konzentration wiederum zeigten die mit pCEP-Pu transfizierten Zellen keinen Unterschied zu nicht transfizierten Zellen (Abb. 3.47 B). Die pCEP-Pu-*ColIX*-transfizierten Zellen wiesen sogar eine gesteigerte Konzentration von Angiogenin auf, während die pCEP-Pu-*Htra1*-Zellen eine verminderte Konzentration zeigten. Bei Endostatin konnte man beobachten, dass die Konzentration in nicht transfizierten Zellen ebenfalls keinen großen Unterschied zu der Konzentration in pCEP-Pu-transfizierten Zellen zeigte (Abb. 3.47 D). Dagegen war die Endostatin-Konzentration in pCEP-Pu-*ColIX*- und pCEP-Pu-*Htra1*-Zellen erniedrigt.

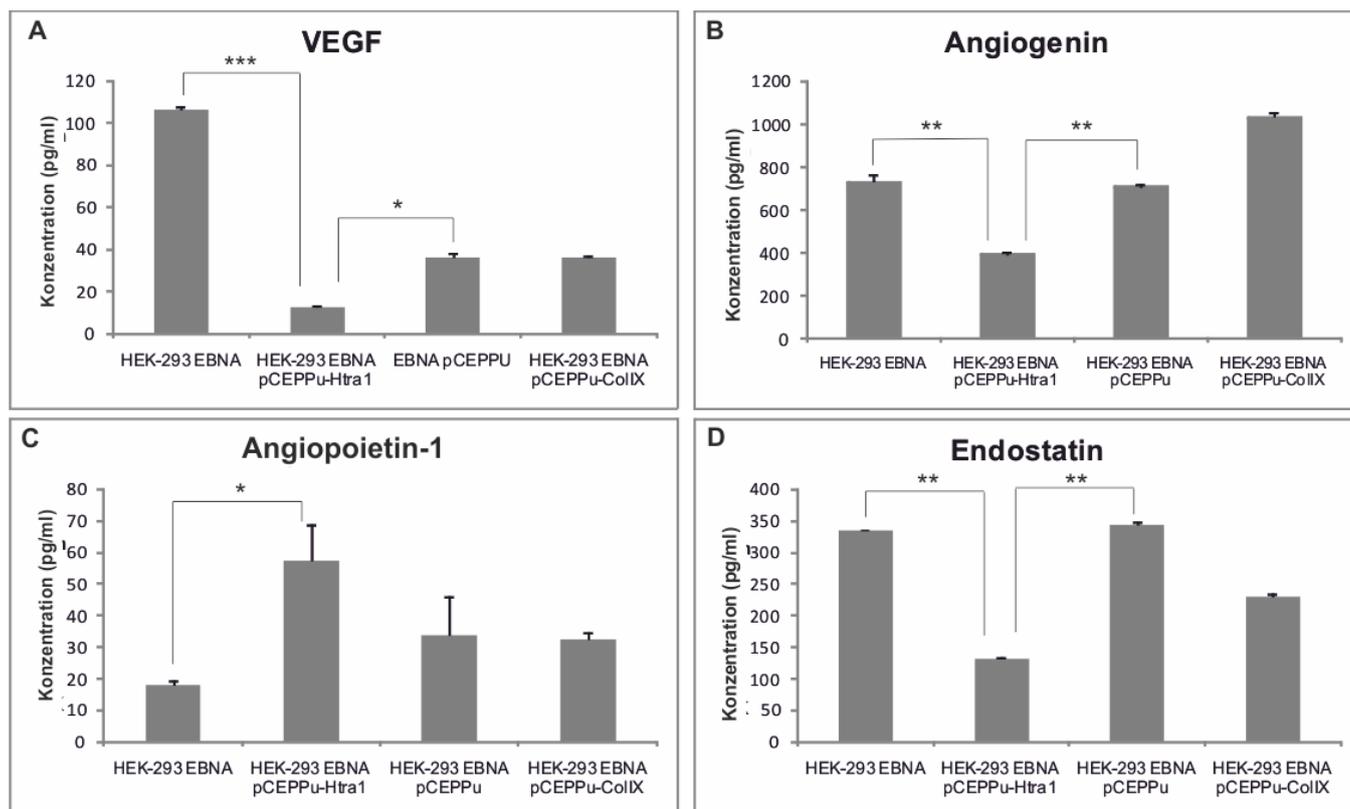


Abb. 3.47 Messung der Wachstumsfaktorkonzentration in Zellkulturüberständen. Die Mittelwerte der Messungen sind in Form eines Säulendiagramms dargestellt; die Standardabweichungen sind als Balken angegeben. (A) Es zeigte sich eine signifikant verminderte VEGF-Konzentration in Zellkulturüberständen der Htra1-transfizierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollen. (B) Es zeigte sich eine signifikant verminderte Angiogenin-Konzentration in Zellkulturüberständen der Htra1-transfizierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollen. (C) Die Angiopoietin-1-Konzentration in Zellkulturüberständen der Htra1-transfizierten Zellen war signifikant erhöht im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen. (D) Die Endostatin-Konzentration in Zellkulturüberständen der Htra1-transfizierten Zellen war signifikant erniedrigt im Vergleich zu den Kontrollen. p-Werte: *, 0,05; **, 0,01; ***, 0,001.

3.9.5 Untersuchung zur Adhäsion der transfizierten Zellen

Zuletzt sollten die Adhäsionseigenschaften von HEK-293-EBNA-pCEP-Pu-*Htra1*-Zellen im Vergleich zu Wildtyp-HEK-293-EBNA-Zellen getestet werden. Wie zuvor gezeigt, kann rekombinantes HTRA1 Fibronectin proteolytisch spalten. Zudem ließ sich in RPE-/BrM-/Choroidea-Lysaten eine Erhöhung der Fibronectin- und Fibronectin-Fragment-

3. Ergebnisse

Expression nachweisen. Um zu testen, ob Zellen mit einer erhöhten HTRA1-Expression auch eine veränderte Adhäsion zu Fibronectin aufweisen, wurde ein Zelladhäsionsassay (2.2.3.6.) durchgeführt.

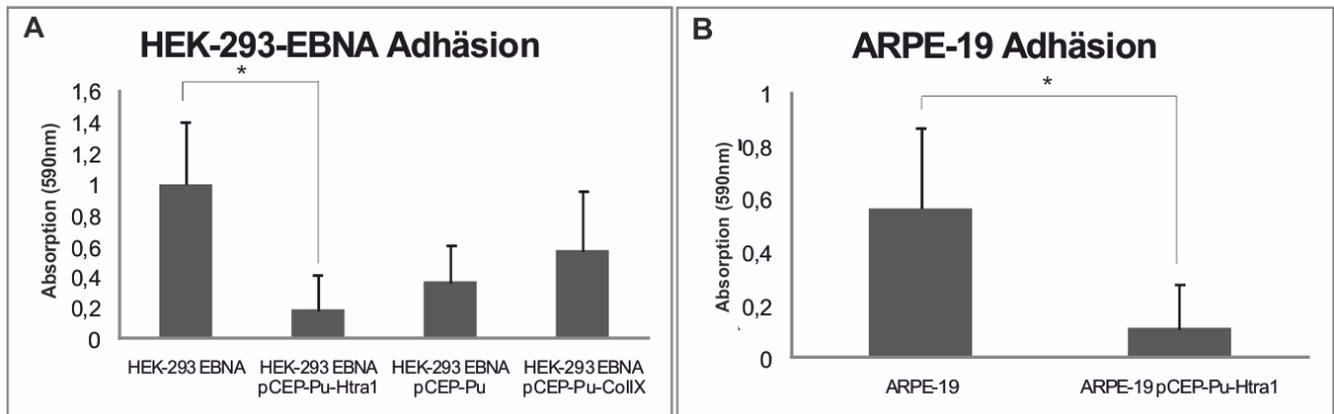


Abb. 3.48 Statistische Auswertungen der Adhäsion. (A) Das Säulendiagramm für die Mittelwerte der Absorption von HEK-293-EBNA-Zellen und (B) für die Mittelwerte der Absorption von ARPE-19-Zellen. Es zeigte sich eine verminderte Adhäsion der transfizierten Zellen an Fibronectin, wobei nur die verminderte Adhäsion der pCEP-Pu-Htra1-transfizierten Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen signifikant reduziert war. Aufgetragen ist die Absorption der Kristallviolett-gefärbten Zellen bei 590 nm. Die Standardabweichungen sind als Balken angegeben. p-Werte: *, 0,05.

Nach der Transfektion der HEK-293-EBNA-Zellen mit den jeweiligen pCEP-Pu-Vektoren, zeigte sich im Adhäsionstest eine Veränderung der Adhäsion sowohl in den Kontrollen als auch in den *Htra1*-transfizierten Zellen im Vergleich zu den nicht transfizierten Zellen (Abb. 3.48 A). Der Unterschied der Adhäsion zwischen den nicht transfizierten und den pCEP-Pu-*Htra1*-transfizierten Zellen war statistisch signifikant. Obwohl die Zellen mit dem *Htra1*-Transgen auch eine verminderte Adhäsion im Vergleich zu den Kontrollzellen mit dem leeren Vektor zeigten, war der Unterschied hier mehr signifikant.

Die ARPE-19-Zellen zeigten bei gleicher Zellzahl eine verminderte Adhäsion an Fibronectin im Vergleich zu den HEK-293-EBNA-Zellen. Da in den ARPE-19-Zellen nur eine Transfektion mit dem *Htra1*-Konstrukt gelungen war, konnte nur der Einfluss dieser Zellen auf die Adhäsion getestet werden. Die transfizierten ARPE-19-Zellen zeigten eine deutlich verminderte Adhäsion mit statistischer Signifikanz (Abb. 3.48 B). Man muss jedoch davon ausgehen, dass auch hier eine verminderte Adhäsion schon auf Grund der Transfektion vorliegt.

4. Diskussion

Mit rund 14 Millionen Betroffenen weltweit ist die Altersbedingte Makuladegeneration (AMD) einer der häufigsten Gründe für unheilbare Blindheit (Resnikoff et al., 2004). Dabei steigt die Prävalenz mit dem Alter an. Auf Grund der längeren Lebenserwartung von Menschen in der westlichen Welt nimmt man an, dass auch die Zahl der Betroffenen in den nächsten Jahren steigen wird (Friedman et al., 2004). Die AMD ist eine multifaktorielle Störung, die durch genetische und umweltbedingte Einflüsse hervorgerufen wird. Der als am beständigsten identifizierte umweltbedingte Risikofaktor ist das Rauchen. Familiäre und Zwillings-Studien haben gezeigt, dass AMD auch eine starke genetische Komponente hat (Seddon et al., 1997, Seddon et al., 2005). Ein großer Durchbruch im Feld der AMD-Ursachenforschung war die Identifikation eines Polymorphismus (Y402H) des Komplementfaktor H (*CFH*)-Gens, der stark mit der AMD assoziiert wird. Die Identifikation von Varianten im *CFH*-Gen hat die Aufmerksamkeit auch auf andere Komponenten des Komplementsystems gelenkt. Außer dem Komplementsystem scheinen aber auch noch andere Signalwege mit AMD assoziiert zu sein. Polymorphismen von *high temperature requirement protein A1 (HTRA1)* und *age-related maculopathy susceptibility protein 2 (ARMS2)* auf Chromosom 10q26 sind stark mit der AMD assoziiert. Jedoch gibt es widersprüchliche Daten hinsichtlich der Beteiligung dieser Gene an der AMD-Pathogenese (Yang et al., 2006, Dewan et al., 2006, Kanda et al., 2007, Fritsche et al., 2008). Inzwischen spricht einiges dafür, dass beide Gene mit der AMD assoziiert sind. Ein häufiger AMD-Haplotyp führt gleichzeitig zu einem Verlust von *ARMS2* und zu einer Hochregulierung von *HTRA1* (Yang et al., 2010). Unklar bleibt dennoch, inwiefern eine erhöhte *HTRA1*-Expression zu AMD führen kann. Eine Beteiligung von *HTRA1* an der Pathogenese von AMD konnte bisher nicht durch funktionelle Studien belegt werden. Um die Folgen einer *HTRA1*-Überexpression in der Retina *in vivo* zu untersuchen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein transgenes Mausmodell etabliert.

4.1 Generierung der *Htra1*-transgenen Maus

Mäuse besitzen im Gegensatz zum Menschen keine Makula. Zudem ähnelt die murine Retina der menschlichen Retina strukturell nur in der Peripherie. Dennoch ist die Maus der beliebteste Modellorganismus zur Studie retinaler Degenerationen. Das liegt wohl zum einen daran, dass das Mausgenom gut charakterisiert ist und hohe Ähnlichkeit zum menschlichen Genom aufweist (Waterston et al., 2002). Zum anderen sind klinische und pathologische Merkmale der AMD, wie z. B. die Akkumulation von Lipofuszin sowie von basalen Ablagerungen, retinalem Pigmentepithel (RPE)- sowie Photorezeptor-Degenerationen und die choroidale Neovaskularisation (CNV) in retinalen Läsionen von Mäusen zu finden (Rakoczy et al., 2006). Außerdem präsentieren Mäuse altersbedingte Veränderungen auf

Grund ihrer kurzen Lebensdauer früher als Modellorganismen mit einer Makula. So zeigen Primaten typische Symptome der AMD erst in ihrem zweiten Lebensabschnitt. Hinzu kommen auch die ethischen und technischen Aspekte, die transgene Primaten zu einem weniger attraktiven Modellorganismus machen. Die Maus als Modellorganismus bietet weiterhin den Vorteil, dass sie eine kurze Generationszeit sowie eine hohe Zahl an Nachkommen aufweist.

Hier wurde das Transgen durch Mikroinjektion in die Mäuse eingebracht. Dabei ist sowohl der Integrationsort als auch die Zahl der integrierten Kopien des Transgens unbekannt. Durch die Mikroinjektion konnte aber die Expression des Transgens durch Verwendung des *Rpe65*-Promotors auf das RPE beschränkt werden. Die erhöhte Expression von HTRA1 in RPE-Zellen von AMD-Patienten war zuvor beschrieben worden (Yang et al., 2006). Zudem war bekannt, dass HTRA1 in die extrazelluläre Matrix (EZM) sekretiert wird und dort eine Rolle bei der Qualitätskontrolle von EZM-Proteinen spielt. Als Basalmembran ist die Bruchsche Membran (BrM) für ihre EZM-Komponenten auf das anliegende RPE und die Choroidea angewiesen (van Soest et al., 2007). In dieser Arbeit ließ sich die Sekretion von HTRA1 aus dem RPE der *Htra1*-transgenen Mäuse anhand muriner, primärer RPE-Zellen nachweisen. Auch konnte HTRA1 in der Basalmembran des RPE von humanen Bulbi detektiert werden (Thier, 2011). Mittels einer transgen-spezifischen PCR konnten acht Mäuse der F0-Generation als transgen identifiziert werden und die Integration des Transgens in das Genom konnte durch das Southern Blot-Verfahren gezeigt werden. Bei den Verpaarungen der F0-Generation mit C57BL/6N-Mäusen stellte sich heraus, dass Maus 63 nur transgen-negative Nachkommen zeugte. Meistens kommt es bei der Mikroinjektion bereits im Einzellstadium zur stabilen Integration des Transgens in das Genom, wodurch genetische Mosaik-Effekte ausbleiben. Bei Maus 63 erfolgte die Integration des Transgens also offenbar erst im Mehrzellstadium. Somit entstand ein genetisches Mosaik und das Transgen gelangte nicht in die Keimbahn. Zum Nachweis und zur Quantifizierung der Expression des Transgens im RPE wurde eine quantitative Echtzeit-PCR entwickelt. Die präparierte mRNA schien, wie die spezifische β -Aktin-Echtzeit-PCR zeigte, von guter Qualität zu sein und keine inhibitorischen Elemente zu besitzen. Da die Amplifikationskurven der spezifischen *Htra1*-Echtzeit-PCR jedoch recht flach verliefen, konnten Primer-Dimer-Artefakte nicht ausgeschlossen werden. Auch muss die mRNA-Menge eines Organismus nicht mit der Proteinmenge übereinstimmen, weswegen die HTRA1-Protein-Expression mittels Western Blot-Analyse untersucht wurde. Mäuse der Linie 60 wiesen im Vergleich zum Wildtypen eine 2,8-fach höhere *Htra1*-mRNA-Expression und eine 2,7-fach höhere HTRA1-Protein-Expression im RPE auf, die in der spezifischen funktionellen Aktivität des Transgens begründet war. Wegen der Verwendung des *Rpe65*-Promotors und des β -Globin-Introns in der transgenen Sequenz wurde jedoch eine vielfach höhere Expression erwartet. So konnte

eine 15-fach höhere β -Galaktosidase (β -Gal) Aktivität in transgenen Mäusen gefunden werden, wenn der *Rpe65*-Promotor vor das *LacZ*-Gen geschaltet wurde (Boulanger et al., 2000). Zusätzlich zeigten Versuche mit Introns in transgenen Konstrukten eine 10- bis 100-fach höhere mRNA-Expression als mit Konstrukten ohne Introns (Brinster et al., 1988, Palmiter et al., 1991). Warum in *Htra1*-transgenen Mäusen keine höhere Expression von mRNA und Protein zu erreichen war, bleibt weiterhin zu klären. Bisher wurden die transgenen Linien heterozygot gehalten und durch die Züchtung homozygoter Tiere könnte die HTRA1-Expression im RPE erhöht werden. Allerdings spiegelt die gefundene Überexpression die zwei- bis dreifache Überexpression von *Htra1*-mRNA und HTRA1-Protein in AMD-Patienten wider (Yang et al., 2006, An et al., 2010). Die hier generierten Mäuse könnten also eine höhere Aussagekraft im Bezug auf die AMD-Pathogenese haben, als wenn die HTRA1-Expression um ein vielfaches höher wäre.

4.2 Phänotyp der *Htra1*-transgenen Maus

Der BrM wird schon lange eine wichtige Rolle bei der AMD-Entwicklung und besonders bei der CNV-Entstehung zugeschrieben (Zarbin, 1998). Im CNV-Modell konnten in dieser Hinsicht keine Aussagen getroffen werden, da die BrM durch die Laserkoagulation zerstört wurde. Die BrM liegt zwischen dem RPE und der Choroidea und besteht aus fünf Schichten. Innen liegt die Basalmembran des RPE, gefolgt von der inneren kollagenen Schicht (ICL), der elastischen Schicht (EL), der äußeren kollagenen Schicht (OCL) und schließlich der Basalmembran der Choroidea (Hogan, 1961).

Die mikroskopischen Untersuchungen der Retinae zeigten in HE-gefärbten Paraffinschnitten morphologisch keine Unterschiede zwischen transgenen und Wildtyp-Mäusen. Der Bereich des RPE als auch der umliegenden Schichten, wie apikal die äußeren Segmente der Photorezeptoren und basal die BrM blieben intakt und zeigten keine Veränderungen in Aufbau und Struktur. Allerdings konnten die einzelnen Schichten der BrM im Lichtmikroskop wegen ihrer geringen Dicke (etwa 1-2 μ m) nicht beurteilt werden.

Durch die HTRA1-Überexpression könnte es zum vermehrten proteolytischen Abbau von EZM-Komponenten kommen, wodurch das Gleichgewicht von Abbau und Aufbau von Komponenten in der EZM empfindlich gestört wird und es zur weiteren strukturellen Schädigung der BrM und zur Fehlregulation von Zytokinen kommt. Um diese Hypothese zu überprüfen wurden Immunfluoreszenzfärbungen der Retina mit polyklonalen Maus-Antikörpern gegen EZM-Proteine wie Laminin, Kollagen IV, Nidogen-1 und Nidogen-2 durchgeführt. Laminin und Kollagen IV sind Hauptbestandteile von Basalmembranen (Timpl et al., 1979a, Timpl et al., 1979b) und bilden dort Netzwerke durch Polymerisation. Verbunden werden diese Netzwerke durch andere EZM-Proteine wie Nidogen,

Proteoglykane und Fibulin (Timpl and Brown, 1996). Der hier verwendete Engelbreth-Holm-Swarm (EHS)-Laminin-Antikörper detektiert Laminin-1 ($\alpha 1\beta 1\gamma 1$). Laminin bindet an Integrin (Aumailley and Smyth, 1998) und vermittelt somit die Adhäsion der Basalmembran an Epithel- bzw. Endothelzellen. Es zeigten sich jedoch keine Veränderungen in der Verteilung oder Farbintensität dieser EZM-Proteine bei den transgenen Mäusen. Kollagen IV-Antikörper wurde dabei spezifisch für die Färbung von Endothelzellen in der Choroidea eingesetzt. Auch dort waren keine Unterschiede im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen bemerkbar. So konnte rekombinantes HTRA1 weder Kollagen IV noch Laminin abbauen. Nidogen-1 und -2 dagegen wurden von rekombinantem HTRA1-Protein schon nach kurzer Zeit proteolytisch gespalten. Trotzdem wurden in der Immunfluoreszenz keine Unterschiede in den Färbungen transgener Mäuse festgestellt. Wie bereits erwähnt, binden Nidogen-1 und -2 an Laminin und Kollagen sowie an Proteoglykane der EZM. Sie nehmen daher eine wichtige Rolle bei der Verknüpfung der beiden Netzwerke ein. Da Nidogen-1 mehrere Schnittstellen für Proteasen besitzt (Mayer et al., 1993), ist es generell sehr sensitiv gegenüber proteolytischem Abbau. *In vitro* konnte jedoch auch gezeigt werden, dass Nidogen-1 durch die Bindung an Laminin-1 stabilisiert wird und es dadurch zu einer verminderten Spaltung des Proteins kommt (Mayer and Timpl, 1994). Obwohl Nidogen-1 und -2 *in vitro* durch rekombinantes HTRA1 gespalten wurden, könnten Nidogen-1 und -2 *in vivo* also durch ihre Bindung an Laminin-1 stabilisiert werden. Auch ist das rekombinante HTRA1-Protein proteolytisch aktiver als endogenes HTRA1, da es N-Terminal keine Inhibitor-Domäne besitzt. So könnte erklärt werden, warum die Verteilung und Farbintensität der Nidogen-1 und -2 Färbung an Paraffinschnitten von transgenen Mäusen keinen Unterschied zu der Färbung an Paraffinschnitten von Wildtyp-Mäusen zeigte. Zusätzlich konnte auch kein Expressionsunterschied von Nidogen-1 in RPE-/BrM-/Choroidea-Lysaten von transgenen zu Wildtyp-Mäusen ausgemacht werden. Insgesamt ließen die Ergebnisse darauf schließen, dass es in den *Htra1*-transgenen Mäusen nicht durch die Spaltung oder den Abbau dieser EZM-Proteine zu Veränderungen in der BrM oder der Choroidea kam.

4.2.1 Die HTRA1-Überexpression im RPE führt zu einer erhöhten Expression von Fibronektin und Fibronektin-Fragmenten

Jedoch zeigte die Western Blot-Analyse mit Fibronektin-Antikörper, dass die Expression von Fibronektin und Fibronektin-Fragmenten in *Htra1*-transgenen Mäusen erhöht war. Vor allem in gealtertem Gewebe und bei Entzündungsprozessen wurden erhöhte Fibronektin-Expressionen beschrieben. Beispielsweise wurde in AMD-Patienten die zwei- bis dreifache Menge an Fibronektin aus RPE-Zellen sekretiert (An et al., 2006) und eine Akkumulation von Fibronektin ist in basal linearen Drusen nachgewiesen worden (Loffler and Lee, 1986). Wie

bei Grau et al. (2006) wurde auch in dieser Arbeit ein Verdau von Fibronectin nach Zugabe von rekombinantem HTRA1 gezeigt. Zur Untersuchung der Adhäsion wurde HTRA1 in humanen Nierenepithelzellen (HEK-293-EBNA) und humanen RPE-Zellen (ARPE-19) transgen exprimiert. Im Vordergrund stand zunächst die Analyse der Sekretion. Dabei konnte festgestellt werden, dass HTRA1 sowohl in HEK-293-EBNA- als auch in ARPE-19-Überständen erfolgreich detektiert wurde. Leider konnte in ARPE-19-Zellen keine erfolgreiche Transfektion der Kontrollen durchgeführt werden. Auch konnten die Konstrukte nicht in murinen RPE-Zellen (B6-RPE07) (Chen et al., 2008) stabil transfiziert werden. Dieser Versuch wurde auf Grund der Verwendung von muriner *Htra1*-cDNA im Transgen unternommen. Da HTRA1 aber stark konserviert ist (Clausen et al., 2002), ließen sich auch in humanen Zellen, die murines HTRA1 exprimierten, Rückschlüsse auf die HTRA1-Funktion ziehen. Die Zelladhäsions-Experimente mit HTRA1-überexprimierenden Zellen wiesen entsprechend der Proteolyse von Fibronectin durch HTRA1 eine wesentlich verminderte Adhäsion dieser Zellen an Fibronectin auf. Die Kontrollen zeigten allerdings ebenfalls eine verminderte Adhäsion. Das lässt darauf schließen, dass die Adhäsion schon allein durch die Transfektion reduziert wurde. Dennoch war die Adhäsion der HTRA1-überexprimierenden Zellen signifikant niedriger im Vergleich zu den Kontrollen. Daraus können neue Erkenntnisse über die AMD-Pathogenese gewonnen werden. So kann eine verminderte Adhäsion von RPE-Zellen an die BrM zu Anoikis, einem Absterben von Zellen durch gestörte Adhäsion führen (Gilmore, 2005). Der Hauptrezeptor für Fibronectin an RPE-Zellen ist $\alpha 5\beta 1$ -Integrin (Mousa et al., 1999). Integrine sind die primären EZM-Rezeptoren, die die Umgestaltung der EZM durch Signale an die Zelle steuern können. In gealterten Fibroblasten wurde eine reduzierte Proliferation im Zusammenhang mit einer erhöhten Fibronectin-Expression und einer gestörten $\alpha 5\beta 1$ -Integrin-Funktion beschrieben (Hu et al., 1996). Da Fibronectin durch eine Überexpression von HTRA1 in transgenen Mäusen hochreguliert wurde, könnte die verminderte Adhäsion also auch an einer gestörten Affinität von Fibronectin zu $\alpha 5\beta 1$ -Integrin zustande kommen. Andererseits ist gezeigt worden, dass eine erhöhte Expression von Fibronectin-Fragmenten wiederum die Synthese von Fibronectin erhöht (Labat-Robert, 2002). EZM-Komponenten können durch ihre Bindung an Integrin auch die Angiogenese stimulieren oder inhibieren. Beispielsweise zeigten kultivierte RPE-Zellen, die mit Thrombospondin-1 (TSP-1) inkubiert wurden, eine erhöhte Sekretion vom vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) und dem Fibroblasten-Wachstumsfaktor-2 (FGF-2) in das umliegende Medium (Mousa et al., 1999). TSP-1 bindet an Integrin und scheint eine veränderte Signalwirkung von Integrin an RPE-Zellen hervorzurufen. VEGF kann ebenfalls an Integrin binden und dadurch die Zellmigration von Endothelzellen begünstigen. Dieser Effekt wird aber nur durch die gleichzeitige Bindung von VEGF an den VEGF-Rezeptor (VEGFR2) und Fibronectin an $\alpha 5\beta 1$ -Integrin vermittelt (Wijelath et al., 2006).

Die EZM hat also eine wichtige Funktion in der Präsentation von Wachstumsfaktoren. Fibronectin-Fragmente fördern ebenfalls die Migration retinaler Endothelzellen durch die Aktivierung des $\alpha 5\beta 1$ -Integrin-Signalwegs (Wilson et al., 2003). Zusätzlich stimulieren Fibronectin-Fragmente die Freisetzung von Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und Zytokinen von RPE-Zellen und können damit die Homöostase der EZM in der BrM durch den Abbau weiterer EZM-Komponenten empfindlich stören (Austin et al., 2009). Erhöhte Mengen an Fibronectin-Fragmenten werden häufig in Gelenkflüssigkeiten von Gelenkrheumatismus-Patienten beobachtet und daher mit Entzündungsprozessen assoziiert (Carsons et al., 1981). Außerdem vermitteln Fibronectin-Fragmente die Bindung von Basalmembranen an Zellen durch die Interaktion mit Kollagen schlechter als Fibronectin und destabilisieren so die EZM zusätzlich. So könnten also Veränderungen in der EZM der BrM durch ihre Umstrukturierung zu einer erhöhten Absonderung von Zytokinen und zur veränderten Genexpression im RPE über die Zeit hinweg führen und die Ausbildung einer CNV begünstigen. Dafür spricht auch, dass CNV-Membranen ähnliche Zytokin- und MMP-Profile, wie sie in Wundheilungs-Prozessen gefunden werden, aufzeigten (Kent and Sheridan, 2003).

4.2.2 Die HTRA1-Überexpression im RPE führt zu einer gestörten Elastogenese in der BrM

Da an den HE-gefärbten Paraffinschnitten nicht die einzelnen Schichten der BrM beurteilt werden konnten, wurde durch Semi- und Ultradünnschnitte die morphologische Beurteilung der BrM verbessert. In der Toluidinblau-Färbung von Semidünnschnitten ließen sich keine Veränderungen in der BrM von transgenen Mäusen erkennen. Allerdings war auch hier die Auflösung der BrM noch nicht hoch genug, um die einzelnen Schichten auszumachen. Die Färbung gab jedoch eine gute Übersicht über das Gewebe. Schließlich konnte anhand von Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) an kontrastierten Ultradünnschnitten gezeigt werden, dass eine Überexpression von HTRA1 im RPE eine Fragmentierung der elastischen Schicht (EL) in der BrM zufolge hat. Das deutet auf eine veränderte Elastogenese in der BrM dieser Mäuse hin. Lysyl-Oxidase-ähnlich-1 (LOXL-1) und Fibulin-5 sind beide am Prozess der Elastogenese beteiligt und interagieren miteinander (Liu et al., 2004). In LOXL-1-defizienten Mäusen wurde bereits eine Fragmentierung der BrM beschrieben (Yu et al., 2008). Fibulin-5-defiziente Mäuse zeigten mit der Ausbildung verschlungener Gefäße und verminderter Elastizität des Bindehautgewebes Anzeichen einer veränderten Elastogenese (Nakamura et al., 2002). Fibulin-5 bindet sowohl an LOXL-1 als auch an Tropoelastin (TE) (Zheng et al., 2007, Nonaka et al., 2009). Dabei positioniert es den Komplex durch Bindung an Mikrofibrillen (Yanagisawa et al., 2002) und Integrine (Nakamura et al., 2002). Zusätzlich

Abb. 4.1 Modell der Elastogenese. Links, normale Elastogenese mit Koazervierung, Vernetzung, Deposition und Organisation von elastischen Fasern. TE wird von Zellen sekretiert und es kommt in Anwesenheit von LOXL-1 (rot) zur Koazervierung. Fibulin-5 (grün) reguliert diesen Prozess. Fibronectin-Fibrillen (gelb) sind an die Zellen gebunden und dienen als Gerüst für Mikrofibrillen (blau), die wiederum als Gerüst für die Deposition von TE dienen. Es kommt zur LOXL-1-vermittelten Vernetzung; rechts, Hypothetische Bedingungen ohne Fibulin-5. Ohne Fibulin-5 kommt es zu ungeordneter Koazervierung und TE und LOXL-1 werden nicht an Mikrofibrillen gebunden. Dadurch kommt es zur Ausbildung von TE-Aggregaten und zur Reduktion reifer elastischer Fasern (grau). (verändert übernommen von Yanagisawa and Davis, 2010)

In AMD-Patienten wurden Variationen des Fibulin-5-Gens gefunden (Stone et al., 2004), die eine reduzierte Sekretion von Fibulin-5 bedingen (Lotery et al., 2006). Mittels Western Blot-Analysen konnte hier in den *Htra1*-transgenen Mäusen eine reduzierte Expression sowohl von Fibulin-5 als auch von TE nachgewiesen werden. Andere an der Elastogenese beteiligte Proteine wie Fibulin-4, LOXL-1 und Elastin Mikrofibrillen Interfacier-1-lokalisiertes Protein (Emilin-1) zeigten keine veränderte Expression. Demnach kam es in *Htra1*-transgenen Mäusen ausschließlich durch die verminderte Expression von Fibulin-5 und TE zu einer gestörten Elastogenese, was zur Fragmentierung der EL führte. Dieses Ergebnis wurde zusätzlich von den *in vitro*-Experimenten mit rekombinantem HTRA1-Protein bestätigt. Hier zeigte sich ein proteolytischer Abbau von Fibulin-5 durch HTRA1. Es wurde nachgewiesen, dass Fibulin-5 im Alter vermehrt von einer bisher unbekanntem Serinprotease am N-Terminus gespalten wird (Hirai et al., 2007b). Durch die Spaltung am N-Terminus kann Fibulin-5 nicht mehr an Integrin und an Mikrofibrillen binden und verliert so die Fähigkeit die Polymerisation und Deposition von Elastin voranzutreiben. Im Serum von AMD-Patienten wurden erhöhte Konzentrationen an Elastin-Peptiden gefunden (Sivaprasad et al., 2005), die ebenfalls auf eine gestörte Elastogenese und Deposition von TE-Aggregaten hindeuten. Bisher ist noch nicht untersucht worden, welchen Genotyp diese AMD-Patienten aufweisen und ob es eine Verbindung zur HTRA1-Variante bzw. den Fibulin-5-Varianten dieser Patienten gibt. Auch ist nicht geklärt, ob AMD-Patienten mit den Fibulin-5-Varianten eine fragmentierte EL aufweisen. Die Polymorphismen im Fibulin-5-Gen sind vor allem mit der Ausbildung von Drusen assoziiert, die bei *Htra1*-transgenen Mäusen nicht zu beobachten waren. Durch die Überexpression von HTRA1 kann es jedoch zu vermehrtem Abbau von Drusenbestandteilen wie z.B. Amyloid-beta (A β)-Peptiden kommen. So konnte gezeigt werden, dass HTRA1 A β -Peptide *in vitro* abbaut (Grau et al., 2005). Auch konnte ein verminderter Abbau von A β -Peptiden in HTRA1-KO-Mäusen, die mit Mäusen eines Alzheimer (AD)-Modells gekreuzt wurden, beobachtet werden (Tennstaedt, 2009).

Die Reduktion von TE in RPE-/BrM-/Choroidea-Lysaten von *Htra1*-transgenen Mäusen ließe sich wiederum durch die mit der Reduktion von Fibulin-5 einhergehende Deposition von TE erklären. In dieser Arbeit konnte im *in vitro*-Experiment Elastin aus menschlicher Haut nicht von rekombinantem HTRA1 gespalten werden. Elastin ist jedoch hoch polymerisiert und nur schwer zugänglich für Serinproteasen. So wurde gezeigt, dass HTRA1 das nicht

polymerisierte TE proteolytisch abbauen kann (Jones et al., 2011). Andererseits könnte die Expression von TE aber zusätzlich auch durch Fibulin-5 reguliert werden. In Zellkulturstudien konnte gezeigt werden, dass ein *Knockdown* von Fibulin-4 zu einer verminderten Expression an TE-mRNA führt (Chen et al., 2009). Fibulin-5 weist zum Teil ähnliche Funktionsweisen wie Fibulin-4 auf und könnte womöglich ebenso die Expression von TE steuern.

4.2.3 Die HTRA1-Überexpression im RPE führt nicht zur Ausbildung einer CNV

Die gefundene physiologische Überexpression von HTRA1 soll die Ausbildung einer CNV bei AMD-Patienten begünstigen (Dewan et al., 2006). Der Hypothese nach könnte HTRA1 dies entweder durch Veränderungen in der BrM und/oder durch eine Modulation der Angiogenesefaktoren in der Choroidea hervorrufen. Da *Htra1*-transgene Mäuse die Veränderungen der BrM schon im Alter von drei Monaten zeigten und auch im fortgeschrittenen Alter keine spontane CNV entwickelten, scheint die herabgesetzte Elastizität nicht Grund genug für die Ausbildung einer CNV zu sein. Wahrscheinlich müssen noch andere Faktoren wie z. B. eine erhöhte Expression von VEGF oder Entzündungsreaktionen in der BrM hinzukommen. So konnte auch gezeigt werden, dass Elastin-Fragmente die Migration, aber nicht die Proliferation von Endothelzellen in die BrM begünstigen (Skeie and Mullins, 2008). Das könnte auch die multifaktorielle Entwicklung einer AMD erklären. Andererseits werden Mäuse unter Umständen einfach nicht alt genug, um das volle Krankheitsbild zu entwickeln. So zeigten Mausmodelle der diabetischen Retinopathie auch im Alter keine retinalen Neovaskularisationen oder Ödeme, die mit der fortgeschrittenen proliferativen Retinopathie beim Menschen beschrieben sind (Kern and Mohr, 2007). Vor allem die kurze Dauer der Diabeteserkrankung und die kurze Lebenserwartung von Mäusen wurden hier als Gründe beschrieben. Das Gleiche könnte also auch für *Htra1*-transgene Mäusen gelten.

Für eine veränderte Angiogenese durch HTRA1 könnte sprechen, dass HTRA1 den transformierenden Wachstumsfaktor-beta (TGF- β) durch proteolytische Spaltung reduzieren kann (Shiga et al., 2011) und die Expression des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktors-1 (IGF-1) (Zumbrunn and Trueb, 1996) erhöht. Das wiederum könnte zu einer Erhöhung vom VEGF führen. Eine erhöhte VEGF Expression geht bei AMD-Patienten meist mit der Ausbildung einer CNV einher. Da *Htra1*-transgene Mäuse aber wie bereits erwähnt auch nach 18 Monaten keine spontane Entwicklung einer CNV zeigten, wurde die CNV mittels Laserkoagulation in die Retina induziert. Es sollte nun untersucht werden, ob das Areal der austretenden serösen Flüssigkeiten in transgenen Tieren größer ist als in Wildtyp-Tieren. Wie die FAG nach Laserkoagulation zeigte, war die Leckage weder retinal noch choroidal in der Früh- bzw. Spätphase an den Tagen 1, 7 und 14 in den transgenen und Wildtyp-Mäusen

unterschiedlich. Auch die SD-OCT-Untersuchungen zeigten keine Unterschiede in den Retinadicken oder im Grad der Zerstörung der einzelnen Schichten durch die Laserkoagulation. Die SD-OCT-Abbildungen von Tag 1, 7 und 14 nach Laserkoagulation waren jedoch gut mit den histologischen Abbildungen von Paraffinschnitten vergleichbar. So zeigten sich auch in den HE-Färbungen die größten Veränderungen im Bereich des RPE und der äußeren Körnerschicht (ONL). Zusätzlich konnte in der Histologie noch die Zerstörung der BrM beobachtet werden. Alle drei Methoden gaben auch Auskunft über den Verlauf der CNV zu den verschiedenen Zeitpunkten. So war das Ausmaß der Leckage bzw. der Veränderungen der retinalen Schichten an Tag 7 nach Laserbehandlung sowohl in transgenen als auch Wildtyp-Mäusen am höchsten. An Tag 14 dagegen war eine deutliche Reduktion der Laser-induzierten Veränderungen zu beobachten. Ebenso war die Gefäßbildung, wie an Fluoreszenzfärbungen der RPE-/Choroidea-*flatmounts* zu sehen, an Tag 14 rückläufig. An Tag 7 hingegen war die Gefäßbildung choroidaler Gefäße am deutlichsten ausgeprägt. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass die CNV nach Laserkoagulation in Mäusen an Tag 5 das größte Ausmaß besitzt und schon an Tag 7 eine Reduktion der CNV bemerkbar ist (Giani et al., 2011). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die bisherige Praktik, Laser-induzierte CNV im Tiermodell erst an Tag 14 zu untersuchen, überdacht werden sollte. Da nun die BrM durch die Laserkoagulation zerstört wurde, können Unterschiede in der CNV nur durch eine veränderte Angiogenese zustande kommen. Allerdings wurden in RPE-/BrM-/Choroidea-Lysaten transgener Mäuse keine veränderten Proteinmengen der TGF- β -Isoformen sowie von dem Insulin-ähnlichem Wachstumsfaktor-1 (IGF-1) und VEGF beobachtet. Die Hypothese, dass HTRA1 die Angiogenese im Bereich der Choroidea über die Bindung an TGF- β oder IGF-1 moduliert, konnte in dem hier generierten Mausmodell nicht bestätigt werden. Somit ist auch nachzuvollziehen, warum die *Htra1*-transgenen Mäuse im CNV-Modell keine signifikant erhöhte Leckage zeigten. Wie bereits erwähnt, war in dieser Arbeit die HTRA1-Expression auf das RPE beschränkt. Auch war die Überexpression im RPE nicht hoch genug, um Veränderungen im Bereich der Choroidea zu beobachten. Es lässt sich daher nur darüber spekulieren, ob eine Überexpression von HTRA1 in Endothelzellen Auswirkungen auf die Entwicklung einer CNV hätte. Die Expression von HTRA1 in Endothelzellen wurde schon zuvor beschrieben (De Luca et al., 2003). In AMD-Patienten mit der Risikovariante im Promotor des Gens ist davon auszugehen, dass die Überexpression auch in anderen Zellen außer dem RPE auftritt. So zeigten Färbungen an Paraffinschnitten von humanem Gewebe eine Lokalisation von HTRA1 in der Basalmembran des RPE und in der Choroidea (Thier, 2011). Wenn die HTRA1-Überexpression in diesem Gewebe ebenfalls zu einer reduzierten Expression von TE und Fibulin-5 führt, kann die Elastizität der Basalmembran der Endothelzellen empfindlich gestört werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Expression von Fibulin-5 durch

TGF- β in Endothelzellen induziert wird (Schiemann et al., 2002) und dass Fibulin-5 als Antagonist von VEGF und somit als Inhibitor der Angiogenese fungiert (Albig and Schiemann, 2004). So führt das Fehlen von Fibulin-5 in Endothelzellen zu einer erhöhten Gefäßproliferation und -sprossung mit einhergehender Erhöhung von VEGF und Angiopoietin-1 (Sullivan et al., 2007). In AMD-Patienten mit der Risikovariante des HTRA1-Gens könnte somit eine verminderte Barrierefunktion der BrM mit einer erhöhten Gefäßproliferation durch erhöhte VEGF-Level zusammenhängen, was schließlich zur Ausbildung einer CNV führt.

Jedoch spricht in dieser Arbeit in Zellkulturüberständen *Htra1*-transfizierter HEK-293-EBNA-Zellen alles gegen eine erhöhte Expression von angiogenen Wachstumsfaktoren. Zwar war die Expression des anti-angiogenen Faktors Endostatin in diesen Zellen gegenüber Wildtyp-Zellen erniedrigt, aber das Gleiche galt auch für VEGF und Angiogenin. Endostatin entsteht durch Spaltung von Kollagen XVIII (O'Reilly et al., 1997) und stört den Signalweg von VEGF (Yamaguchi et al., 1999). Mutationen im *COL18A1* (Kollagen XVIII)-Gen führen schon in jungen Jahren zur Netzhautablösung und Erblindung (Sertie et al., 2000) und *Col18a1*-defiziente Mäuse zeigen AMD-ähnliche Merkmale (Utraiainen et al., 2004). In diesen Mäusen konnte die Zugabe von Endostatin die CNV nach Laserkoagulation inhibieren. Endostatin ist also ein wichtiger Modulator der Angiogenese und eine reduzierte Konzentration könnte zur CNV-Ausbildung beitragen. Dagegen war Angiopoietin-1 in *Htra1*-transfizierten Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen erhöht. Jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant gegenüber der Kontrolle. Angiopoietin-1 wird vor allem in der aktiven Phase der CNV-Bildung von RPE-Zellen exprimiert (Otani et al., 1999) und die Überexpression von Angiopoietin-1 inhibiert die CNV im Auge als Gegenspieler von VEGF (Nambu et al., 2004, Nambu et al., 2005). Eine erhöhte VEGF-Expression wird sowohl mit einer beginnenden als auch mit einer aktiven CNV in Verbindung gebracht (Lopez et al., 1996). Die VEGF-Konzentration in den Zellkulturüberständen der *Htra1*-transfizierten HEK-293-EBNA-Zellen war jedoch ebenfalls reduziert. Und auch Angiogenin, das mit AMD und der Angiogenese assoziiert ist (Skeie et al., 2011), zeigte in *Htra1*-transfizierten HEK-293-EBNA-Zellen eine geringere Konzentration als in nicht-transfizierten Zellen. Dieses Ergebnis spricht also gegen eine erhöhte VEGF- oder Angiogenin-Expression durch HTRA1. Dabei muss bedacht werden, dass die Überexpression von HTRA1 in Nierenepithelzellen andere Auswirkungen haben könnte als in RPE-Zellen. So zeigte eine Überexpression von Angiopoietin-1 in der Haut den umgekehrten Effekt im Vergleich zum Auge (Suri et al., 1998). Auch sind Studien der Zytokin-Expressionen in Zellen schwer zu deuten, da Sie über komplexe Interaktionen mit der EZM reguliert werden und daher gewebspezifisch anders reguliert werden könnten als in Kultur (Nathan and Sporn, 1991).

Kurz nach der Veröffentlichung von Teilen dieser Arbeit wurde eine Studie veröffentlicht, in der humanes HTRA1 in RPE-Zellen von Mäusen überexprimiert wurde (Jones et al., 2011). Die Überexpression war etwa 5,3-fach und resultierte in der Sekretion von HTRA1 in die BrM und die Choroidea. Die Überexpression in der Choroidea führte dabei zu einer Verdünnung der Gefäßwände durch den Verlust der elastischen Schichten. Dadurch zeigten 59% der Mäuse die Ausbildung einer polypoidalen choroidalen Vaskulopathie (PCV). Die PCV ist eine Form der CNV, die primär in der Choroidea lokalisiert ist und dort zu hämorrhagischen Läsionen führt. Die Überexpression von HTRA1 in der BrM dieser Mäuse führte ebenfalls zu einer Schädigung der EL, wodurch es in einem Teil der Mäuse auch zur Entwicklung einer okkulten CNV kam. Dies ging mit einer erhöhten VEGF-Expression im RPE-/BrM-/Choroidea-Gewebe einher. Leider wurde nicht untersucht, ob die VEGF-Erhöhung durch HTRA1 direkt oder durch einen indirekten Mechanismus, wie z. B. durch eine Reduktion von Fibulin-5, zu Stande kam. Die Veränderungen in der EL wiederum konnten mit dem Abbau von TE durch HTRA1 begründet werden. Der war allerdings 30-fach geringer als der Abbau von TE durch Elastase und konnte nur mit der 20-fachen Menge an HTRA1-Protein erreicht werden. Die Expressionslevel anderer Faktoren der Elastogenese wurden nicht untersucht. Es zeigte sich also, dass gerade Veränderungen in der Choroidea zusätzlich zu den Veränderungen der EL in der BrM notwendig für die Ausbildung der CNV sind und dass eine Überexpression von HTRA1 in Endothelzellen, wie vermutet, ebenfalls zu Schäden in den elastischen Schichten der Basalmembran von Gefäßen führt. In diesen Untersuchungen war die Überexpression von HTRA1 etwa doppelt so hoch wie in den in dieser Arbeit generierten *Htra1*-transgenen Mäusen. Da die Überexpression in *Htra1*-transgenen Mäusen aber durch die 2,7-fache Überexpression von murinem HTRA1 physiologisch eine höhere Aussagekraft besitzt, scheint das Fehlen einer spontanen CNV-Entwicklung vor allem in der kurzen Lebensdauer von Mäusen und damit der kurzen Expositionszeit der HTRA1-Überexpression begründet zu sein. Allerdings muss dabei bedacht werden, dass es unter physiologischen Umständen wahrscheinlich, wie erwähnt, auch zur Überexpression von HTRA1 in Endothelzellen kommt.

Die EZM dient nicht nur als strukturelles Gerüst und Ort der Zelladhäsion, sondern kann auch das Angebot an Zytokinen regulieren und so einen Einfluss auf das Zellverhalten wie Wachstum, Differenzierung und Migration haben. Die Interaktionen zwischen der EZM und Zytokinen können mannigfaltig sein und unterliegen komplexen Mechanismen (Nathan and Sporn, 1991, Hynes, 2009). Wenn es zu Veränderungen in der Homöostase dieser Interaktionen kommt kann das zur Ausbildung von Krankheiten beitragen (Marastoni et al., 2008). Ein Beispiel dafür ist die komplexe Regulation von TGF- β in der EZM. Von der Zelle produziertes Pro-TGF- β wird durch die Endoprotease Furin zu TGF- β und dem Latenz-

assoziiertem Protein (LAP) gespalten. Diese beiden Untereinheiten bilden durch nicht-kovalente Bindungen den kleinen Latenz-Komplex (SLC), in dem sie inaktiv vorliegen. LAP wiederum bindet an latente TGF- β -bindende Proteine (LTBPs), wodurch es zur Bildung des großen Latenz-Komplexes (LLC) kommt. Der LLC bindet über LTBP an Fibronectin und Fibrillin (Hynes, 2009). Zur Aktivierung von TGF- β kommt es durch die Proteolyse von Fibrillin und LTBP oder durch die Spaltung von LAP (Annes et al., 2003). Ein Beispiel für die Fehlregulation von TGF- β durch Fibrillin-1 ist das Marfan-Syndrom (MFS). Das MFS ist eine Krankheit, die das Bindegewebe betrifft und mit Mutationen im Fibrillin-1 (*FBN-1*)-Gen assoziiert ist (Ramirez and Dietz, 2007). Patienten, die unter dem MFS leiden, versterben zumeist an einer Aortendissektion, wobei es zu einem Riss in der Aortenwand kommt. Die Aorten dieser Patienten wiesen durch den Verlust an Mikrofibrillen eine Fragmentierung der elastischen Schichten in der Aortenwand auf. Zunächst wurde daher angenommen, dass diese Fragmentierung von Elastin zur Ausbildung der Aortendissektion führte. Am Mausmodell für MFS konnte jedoch gezeigt werden, dass es zu einer erhöhten Expression von TGF- β kam und Fibrillin-1 somit die Verfügbarkeit von TGF- β regulierte (Neptune et al., 2003). Interessanterweise zeigten *Fibulin-5-Knockout* (KO)-Mäuse auch eine Fragmentierung der elastischen Schichten in der Aorta, aber es kam nicht zur Ausbildung einer Aortendissektion (Nakamura et al., 2002). Im Gegensatz dazu bildeten Mäuse mit einer Reduktion von Fibulin-4 Gefäßerweiterungen und Aortendissektionen im Zusammenhang mit einer erhöhten Aktivierung des TGF- β -Signalwegs aus (Hanada et al., 2007). Ein anderes Protein, das eine Rolle in der Elastogenese spielt, und ebenfalls ein wichtiger Regulator von TGF- β ist, ist Emilin-1. Emilin-1 kann in der Aorta die Verfügbarkeit von TGF- β regulieren, indem es TGF- β vor der Spaltung durch Furin schützt (Zacchigna et al., 2006). In Mäusen führte der Verlust von Emilin-1 so zu einer erhöhten Expression an aktivem TGF- β und somit zu einer erhöhten Aktivität des TGF- β -Signalwegs. Dadurch kam es zu einem reduzierten Durchmesser des arteriellen Lumens und darin resultierendem Bluthochdruck. Auch LTBPs, die den LLC an Fibrillin verankern können und so mit Mikrofibrillen assoziiert werden (Saharinen and Keski-Oja, 2000, Isogai et al., 2003) sind für die Elastogenese und die TGF- β -Regulation von Bedeutung. So bindet LTBP2 an Fibulin-5 und kann die Deposition von Fibulin-5 an Mikrofibrillen regulieren (Hirai et al., 2007a). *Ltbp3* und *Ltbp4*-defiziente Mäuse hatten zudem Phänotypen, die sowohl eine gestörte Elastogenese als auch eine verminderte TGF- β -Aktivität zeigten (Dabovic et al., 2002, Sterner-Kock et al., 2002). So scheinen Störungen in der EZM und besonders bei der Elastogenese eng mit der Fehlregulation von TGF- β verbunden zu sein. Interessanterweise reguliert auch HTRA1 sowohl die Verfügbarkeit von TGF- β als auch, wie in dieser Arbeit das erste Mal beschrieben, die Elastogenese indirekt über die Reduktion von Fibulin-5 und TE, wobei es zumindest Fibulin-5 proteolytisch spaltet. Eine Reduktion der HTRA1-Proteaseaktivität in Patienten der

zerebralen autosomal rezessiven Arteriopathie mit subkortikalen Infarkten und Leukoenzephalopathie (CARASIL) führt zu einer Erhöhung von TGF- β und zu Aneurysmen der kleinen Arterien im Gehirn (Hara et al., 2009). Es wurde nachgewiesen, dass HTRA1 durch die intrazelluläre Spaltung von Pro-TGF- β im endoplasmatischen Retikulum (ER) den ER-assoziierten Abbau von TGF- β erzeugt und dadurch die Verfügbarkeit von TGF- β reguliert (Shiga et al., 2011). Bei einer Überexpression von HTRA1 könnte es so zu einer Reduktion von TGF- β kommen. Ob diese im Auge direkt über HTRA1 oder indirekt durch die gestörte Elastogenese gesteuert würde, bleibt zu klären. Zwar konnte in dieser Arbeit durch Expressionsstudien keine Reduktion von TGF- β in RPE-/BrM-/Choroidea-Lysaten *Htra1*-transgener Mäuse gefunden werden, aber ist zu bedenken, dass die allgemeine Konzentration an TGF- β in diesen Geweben sehr gering (liegt im Pikogramm-Bereich) ist und so schon kleinste Veränderungen Auswirkungen auf die Homöostase der EZM haben könnten. Es ist auch zu beachten, dass diese Veränderungen wahrscheinlich viel Zeit bräuchten, um einen Effekt zu entwickeln. So zeigen CARASIL-Patienten nicht von Geburt an Symptome der Krankheit, sondern im Durchschnitt kommt es erst mit 32 Jahren zu den ersten Anzeichen (Fukutake, 1999). Wenn man bedenkt, dass die AMD erst mit 55 Jahren oder älter eintritt, scheinen hier die pathologischen Veränderungen in der EZM sogar noch länger zu brauchen, bis ihre Auswirkungen in Erscheinung treten.

Wenn Mäuse des MFS-Modells mit TGF- β -Antikörper behandelt wurden, konnten die typischen Symptome des MFS gemildert werden und auch der Antagonist des Angiotensin I-Rezeptors (Losartan, Merck) zeigte ähnliche schützende Effekte (Habashi et al., 2006). Wie der Antagonist des Angiotensin I-Rezeptors den TGF- β -Signalweg hemmt ist bisher noch unklar. Man nimmt an, dass es mit der Aktivierung von TSP-1 im Angiotensin II-Signalweg zusammenhängt (Zhou et al., 2006). TSP-1 aktiviert TGF- β , indem es an LAP bindet und die nicht-kovalenten Bindungen zwischen LAP und TGF- β stört (Crawford et al., 1998). Man kann nun eine interessante Verbindung zur AMD herstellen. Angiotensin II induziert die Aortendissektion in alten C57BL/6J-Mäusen durch die Erhöhung von Chemokin (C-C-Motiv) Liganden-2 (CCL2), dem CCL2-Rezeptor (CCR2) und Interleukin-6 (IL-6) (Tieu et al., 2009). Dabei kam es zur Akkumulation von CCR2⁺-Makrophagen am Ort der Dissektion. *Ccr2*-KO-Mäuse zeigten dementsprechend eine reduzierte CCL2- und IL-6-Expression und eine verringerte Akkumulation an Makrophagen. Interessant ist hier, dass *Ccr2/Ccl2*-defiziente Mäuse ein Mausmodell der AMD sind. Auf Grund der CCR2/CCL2-Defizienz konnten keine Makrophagen zum RPE und der BrM rekrutiert werden, wodurch es zur Akkumulation von Komplementfaktor C5a und von IgG kam. Das führte wiederum zur Erhöhung von VEGF und etwa 25% dieser Mäuse bildeten im fortgeschrittenen Alter eine CNV aus (Ambati et al., 2003). Es ist auch bekannt, dass TGF- β die CCL2- und damit indirekt die IL-6-Expression in Zellen erhöht (Lee et al., 2009, Seong et al., 2009). Die TGF- β -Defizienz kann zu Defekten in

Immunzellen führen und *Tgf-β*-defiziente Mäuse zeigen eine gestörte Immunantwort mit einer massiven Entzündungsrate (Bottinger et al., 1997). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass geringe extrazelluläre TGF-β-Konzentrationen die Proliferation von neuen Gefäßen in der Angiogenese begünstigt (Lebrin et al., 2004). Man kann nun darüber spekulieren, dass HTRA1 durch die Reduktion von TGF-β in RPE-Zellen bzw. der BrM zu einem ähnlichen, wenn wahrscheinlich auch abgemilderten Phänotyp wie in *Ccr2/Ccl2*-defizienten Mäusen führen könnte. Auch könnte so ein Zusammenhang zwischen dem HTRA1-Signalweg und dem Komplementsystem hergestellt werden. Die *CFH*-Variante Y402H des *CFH*-Gens hat eine starke Assoziation mit AMD und *CFH* ist ein Faktor, der die Aktivierung des Komplementsystems inhibiert. Man nimmt an, dass die *CFH*-Variante Y402H durch eine geringere Affinität an Proteoglykane auf Zelloberflächen den alternativen Komplementsignalweg nicht mehr ausreichend inhibieren kann und so zur AMD-Pathogenese beiträgt (Charbel Issa et al., 2011). Im Serum von AMD-Patienten konnte man erhöhte C5a-Mengen finden (Scholl et al., 2008). Zudem wurde festgestellt, dass C5a sowie C3a in Drusen akkumulieren und die Ausbildung einer CNV fördern (Nozaki et al., 2006). HTRA1 könnte nun sowohl die C5a-Konzentration über TGF-β regulieren als auch die *CFH*-Konzentration an Zelloberflächen durch den Abbau von Proteoglykanen. Zusätzlich wurden Interaktionen von HTRA1 mit Komponenten der Komplementsystems wie z. B. Clusterin, Vitronectin und Fibromodulin gefunden (An et al., 2010). Ebenfalls wird Pro-Komplementfaktor D (CFD) von HTRA1 gespalten und so in seine aktive Form gebracht (Stanton et al., 2011). CFD trägt zur Aktivierung des Komplementsystems bei. Die Überexpression von HTRA1 könnte also den alternativen Signalweg des Komplementsystems vermehrt aktivieren.

Ob es im Auge durch eine Überexpression von HTRA1 überhaupt zu einer veränderten Expression von TGF-β kommt, und ob diese dann direkt über HTRA1 oder indirekt durch die gestörte Elastogenese gesteuert würde, bleibt allerdings noch zu klären.

4.3 HTRA1 kann mit anderen AMD-Risikogenen in Verbindung gebracht werden

Wenn man die Assoziation von den Varianten der *MMP-9*, *TIMP-3* (Gewebeinhibitor von Metalloproteinase-3)- und *FBLN* (Fibulin) -3-, -5- und -6-Gene mit retinaler Degeneration und die Ergebnisse der HTRA1-Überexpression in murinen Augen berücksichtigt, deutet alles auf eine Beteiligung von EZM-Proteinen an der Pathogenese retinaler Krankheiten hin (Abb. 4.2). Der Abbau und Aufbau von EZM-Komponenten wird durch MMPs und TIMPs reguliert und diese Prozesse wiederum werden durch Zytokine, die an die EZM gebunden sind, kontrolliert (*feedback loop*) (Frantz et al., 2010). Es ist daher nicht verwunderlich, dass

Varianten in den *MMP-9*- und *TIMP-3*-Genen mit Veränderungen in der BrM und der Entstehung retinaler Krankheiten assoziiert sind. So resultieren vermehrte Wiederholungen von Cytosin-Adenin (CA)-Sequenzen im *MMP-9*-Promotor in einer erhöhten transkriptionellen Aktivität des Gens (Fiotti et al., 2005) und die *MMP-9* ist im Plasma von AMD-Patienten erhöht (Chau et al., 2008). Eine Erhöhung von *MMP-9* in der BrM konnte mit exsudativer AMD assoziiert werden. Punktmutationen im *TIMP-3*-Gen hingegen führen zu Sorsby-Fundus-Dystrophie (SFD) (Weber et al., 1994). SFD ist eine seltene, erbliche, degenerative Erkrankung der Retina, die erst spät im Leben auftritt und zur Erblindung führt (Sorsby and Mason, 1949). Gewebe von Patienten mit SFD zeigten extrazelluläre Ablagerungen und eine Verdickung der BrM, die zu einer Atrophie des RPE und zu einer CNV führen. Die *FBLN-3*-, *-5*- und *-6*-Gene sind ebenfalls mit der AMD assoziiert und Patienten mit Varianten dieser Gene zeigten vor allem die Ausbildung von Drusen (Stone et al., 1999, Stone et al., 2004). Interessant ist auch, dass Fibulin-3 und *TIMP-3* über ihre C-Termini aneinander binden und so miteinander interagieren können (Klenotic et al., 2004). Der *LOXL-1*-KO in Mäusen führt ebenfalls zu einer Fragmentierung der EL in der BrM, jedoch zeigten diese Mäuse im CNV-Modell auch eine höhere CNV-Aktivität als Wildtyp-Mäuse. Außerdem konnte eine direkte Interaktionen von *ARMS2* mit Fibulin-6 nachgewiesen werden (Kortvely et al., 2010). Auch wenn bisher nicht viel über die Funktion von *ARMS2* und seiner möglichen Rolle bei der AMD-Entstehung bekannt ist, verbindet dieses Ergebnis *ARMS2* mit der AMD-Pathogenese. Währenddessen könnte die Interaktion von *ARMS2* mit Emilin-2, auch wenn bisher keine Funktion von Emilin-2 in der Elastogenese beschrieben wurde, eine Rolle von *ARMS2* in der Regulation der Elastogenese andeuten. In dieser Arbeit konnte für *HTRA1* eine Interaktion mit Fibronectin, Nidogen-1 und -2 sowie Fibulin-5 durch die proteolytische Spaltung gefunden werden. Die Reduktion von Fibulin-5 und TE führte hier zu einer gestörten Elastogenese und wie Abbildung 4.2 zeigt sind gerade Proteine, die direkt oder indirekt mit der Elastogenese assoziiert sind mit der Entstehung der AMD assoziiert. Durch die gestörte Elastogenese kommt es aller Wahrscheinlichkeit nach auch zu Veränderungen der Zytokin-Regulation in der EZM, was wiederum das Zellverhalten von RPE- oder Endothelzellen modulieren und die Entstehung von Drusen oder einer CNV begünstigen kann.

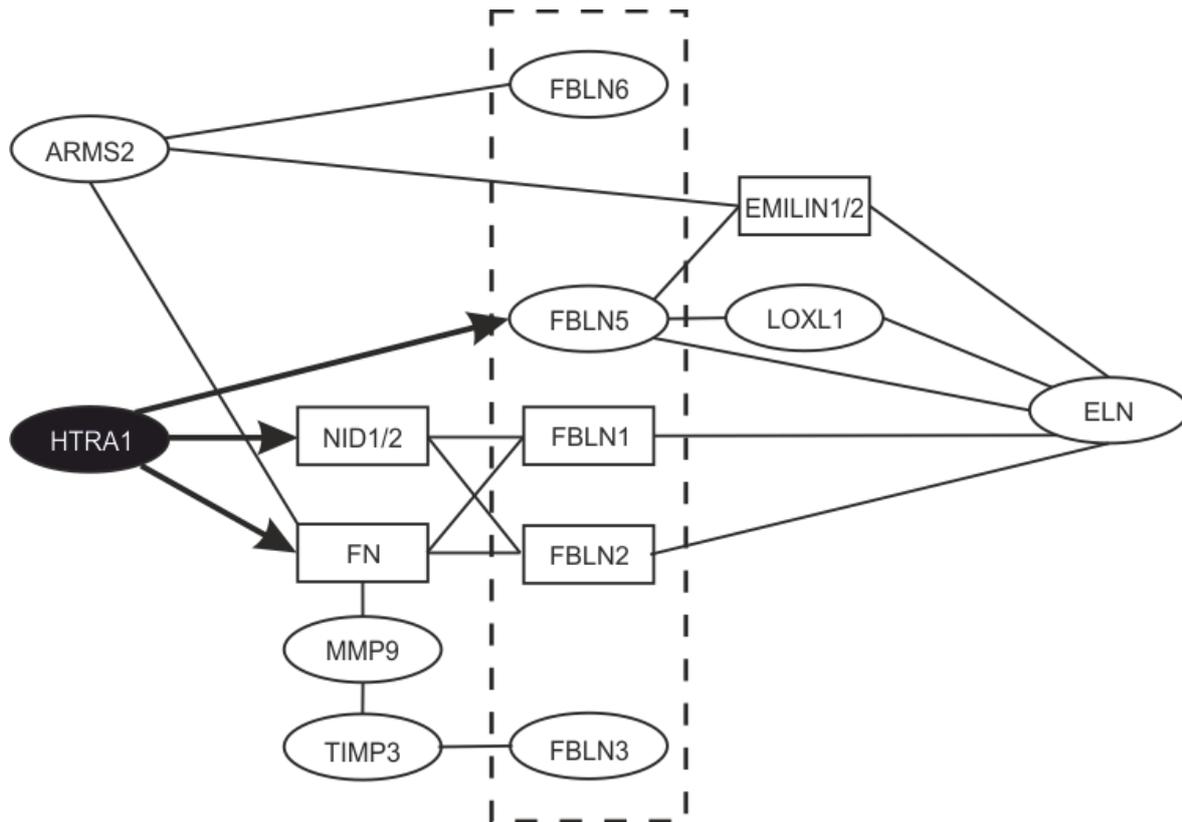


Abb. 4.2 HTRA1 interagiert mit EZM-Proteinen. Die schwarzen Pfeile zeigen die Spaltung der Proteine durch HTRA1. Proteine, die durch AMD-Risikogene codiert werden, sind mit einem Kreis umrahmt. Fibuline sind durch einen gestrichelten Rahmen begrenzt. Drei der fünf Fibulin-Gene sind mit AMD assoziiert und Fibulin-5 interagiert direkt mit HTRA1. ARMS2, age-related macular susceptibility 2; ELN, Elastin; EMILIN, elastin microfibril interface-located protein; FBLN, Fibulin; FN, Fibronektin; HTRA1, high-temperature requirement protein A1; LOXL1, Lysyl-Oxidase-ähnlich-1; MMP9, Matrixmetalloproteinase-9; NID, Nidogen; TIMP3, Gewebeinhibitor von Metalloproteinase-3.

4.4 Ausblick

Eine Überexpression von HTRA1 könnte also auf mehreren Wegen an der Entstehung einer AMD beteiligt sein. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass HTRA1 die Elastogenese über die Reduktion von Fibulin-5 und TE stören kann. Diese Störung führte hier zu einer Fragmentierung der BrM. Ebenfalls wurden erhöhte Expressionen von Fibronektin und Fibronektin-Fragmenten in *Htra1*-transgenen Mäusen nachgewiesen, die die Stabilität der BrM, die Adhäsion der RPE-Zellen und damit die Zytokin-Expression zusätzlich stören könnten. Jedoch entwickelten die Mäuse auch im fortgeschrittenen Alter weder Drusen noch eine spontane CNV im Auge. Um zu untersuchen, ob der Effekt der HTRA1-Überexpression im RPE verstärkt werden kann oder früher zur Ausbildung kommt, sollen zukünftig *Senescence accelerated mice* (SAM)-Mäuse mit *Htra1*-transgenen Mäusen gekreuzt werden. SAM-Mäuse wurden durch selektive Züchtung von AKR/J-Mäusen (Takeda et al., 1994) generiert. Zurzeit gibt es neun Linien (SAMP1-9), die besonders anfällig für einen beschleunigten Alterungsprozess sind. Sie zeigen stärkere Alterungseffekte und sind sehr

kurzlebig. Mäuse der SAMP8 Linie haben AMD-Merkmale mit altersbedingten Veränderungen im RPE und der BrM. Dabei kommt es zu einer schweren RPE-Degeneration im Alter von zwölf Monaten sowie zur Fragmentierung zwischen der EL und der äußeren kollagenen Schicht (OCL) in der BrM (Majji et al., 2000). Zusätzlich kann in 40% der Mäuse, die älter als elf Monate sind eine CNV beobachtet werden. Die Kreuzung der SAMP8-Mäuse mit *Htra1*-transgenen Mäusen könnte als gutes Modell dienen, um die HTRA1-Überexpression im RPE unter altersbedingten Veränderungen zu untersuchen.

Zusätzlich könnte die Überexpression von HTRA1 zur Fehlregulation des Komplementsystems führen und somit eine Aktivierung der angeborenen Immunantwort begünstigen. Daher sollen *CFH*-KO-Mäuse mit den *Htra1*-transgenen Mäusen verpaart werden, um den Effekt beider Risikovarianten auf die AMD-Pathogenese zu beobachten. Die Y402H Variante des *CFH*-Gens ist stark mit der trockenen Form der AMD assoziiert und macht zusammen mit der *HTRA1*-Variante etwa 50% des Risikos für AMD aus (Maller et al., 2006). Durch die *CFH*-Defizienz kommt es zu einer Überaktivierung des alternativen Signalwegs des Komplementsystems. Zusätzlich zeigen die *cfh*^{-/-}-Mäuse zwar eine dünnere BrM und weniger Drusen, aber dafür eine Unordnung von äußeren Photorezeptorsegmenten (OS) und von Organellen im RPE (Coffey et al., 2007). Neuere Studien (An et al., 2010, Stanton et al., 2011) haben HTRA1 als Interaktionspartner für mehrere Proteine des Komplementsystems identifiziert. Eine Fehlregulation des Komplementsystems durch HTRA1 ließe sich an diesem Modell ebenfalls untersuchen.

Um zu zeigen, dass die in der *Htra1*-transgenen Maus beobachteten Effekte auch in AMD-Patienten mit dem entsprechenden Genotyp zu finden sind, wurden bereits Spenderaugen genotypisiert und auf entsprechende Merkmale untersucht (Thier, 2011). Unter 51 Augen waren jedoch nur ein Auge homozygot und 18 Augen heterozygot für die *HTRA1*-Risikovariante. Dennoch konnte eine entsprechende Überexpression für HTRA1 und eine Fragmentierung der EL in der BrM im homozygoten Spenderauge gefunden werden. Der Umfang der Proben muss allerdings um ein Vielfaches ausgebaut werden, um wirkliche Aussagen über die Expression von HTRA1 und den Zustand der BrM in Augen mit der *HTRA1*-Risikovariante machen zu können. Daher sollen weiterhin Spenderaugen der Hornhautbank gesammelt und untersucht werden.

Von einer anderen Arbeitsgruppe wurde bei einer höheren Überexpression von humanem HTRA1 in Mäusen das Fehlen der elastischen Schichten in den Basalmembranen der Blutgefäße beobachtet (Jones et al., 2011). Einige dieser Mäuse zeigten sowohl die Ausbildung einer PVC als auch einer CNV und eine erhöhte VEGF-Expression. Fraglich ist, ob die Fragmentierung der elastischen Schichten ausreichend für diesen Phänotyp ist. Sicherlich trägt die Fragmentierung der EL in der BrM zu der AMD-Pathogenese bei. Die Entstehung einer CNV könnte dagegen auch durch die Reduktion von TGF- β durch HTRA1

zustande kommen. Die Pathogenese könnte dabei Ähnlichkeiten zur Pathogenese in *Ccr2/Ccl2*-defizienten Mäusen zeigen. Um diese Hypothese genauer zu untersuchen, sollten histologische Schnitte der Retina von den in dieser Arbeit generierten *Htra1*-transgenen Mäusen immunhistochemisch auf die TGF- β -Expression sowie den Gehalt an Makrophagen, Monozyten und Gliazellen untersucht werden. Auch sollte die Expression von TGF- β und VEGF in HTRA1-überexprimierenden ARPE-19-Zellen analysiert werden. Wenn hier eine veränderte Expression dieser Wachstumsfaktoren festgestellt werden kann, sollte es Ziel weiterer Untersuchungen sein zu klären, ob diese Expressionen direkt über HTRA1 reguliert werden oder ob ein indirekter Mechanismus verantwortlich ist. So könnte es durch die gestörte Elastogenese zu einer veränderten Aktivierung TGF- β -regulatorischer Proteine kommen. Andererseits könnte auch der Abbau TGF- β -bindender EZM-Komponenten durch HTRA1, wie z. B. Dekorin (Tsuchiya et al., 2005), eine Rolle spielen.

Um festzustellen, ob die verminderte Adhäsion HTRA1-transfizierter Zellen allein durch den Abbau von Fibronectin zu Stande kam, sollte zuletzt noch die Menge an $\alpha 5\beta 1$ -Integrin an diesen Zellen im Vergleich zu nicht-transfizierten Zellen durch Immunfluoreszenz-Färbung untersucht werden. Da Fibronectin-Fragmente auch die Migration retinaler Endothelzellen durch die Aktivierung des Integrin-Signalwegs erhöhen können (Wilson et al., 2003), sollte zusätzlich auch die Aktivität des Integrin-Signalwegs durch Western Blot-Analysen von nachgeschalteten Proteinen der Signalkaskade analysiert werden.

Literaturverzeichnis

- Aisenbrey, S., Zhang, M., Bacher, D., Yee, J., Brunken, W. J. & Hunter, D. D. 2006. Retinal pigment epithelial cells synthesize laminins, including laminin 5, and adhere to them through alpha3- and alpha6-containing integrins. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47, 5537-44.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J. 1994. *Molecular Biology of the Cell*, New York, Garland Publishing.
- Albig, A. R. & Schieman, W. P. 2004. Fibulin-5 antagonizes vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling and angiogenic sprouting by endothelial cells. *DNA Cell Biol*, 23, 367-79.
- Allikmets, R. & Dean, M. 2008. Bringing age-related macular degeneration into focus. *Nat Genet*, 40, 820-1.
- Ambati, J., Anand, A., Fernandez, S., Sakurai, E., Lynn, B. C., Kuziel, W. A., Rollins, B. J. & Ambati, B. K. 2003. An animal model of age-related macular degeneration in senescent Ccl-2- or Ccr-2-deficient mice. *Nat Med*, 9, 1390-7.
- An, E., Lu, X., Flippin, J., Devaney, J. M., Halligan, B., Hoffman, E. P., Strunnikova, N., Csaky, K. & Hathout, Y. 2006. Secreted proteome profiling in human RPE cell cultures derived from donors with age related macular degeneration and age matched healthy donors. *J Proteome Res*, 5, 2599-610.
- An, E., Sen, S., Park, S. K., Gordish-Dressman, H. & Hathout, Y. 2010. Identification of novel substrates for the serine protease HTRA1 in the human RPE secretome. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51, 3379-86.
- Anderson, D. H., Fisher, S. K. & Steinberg, R. H. 1978. Mammalian cones: disc shedding, phagocytosis, and renewal. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 17, 117-33.
- Anderson, D. H., Radeke, M. J., Gallo, N. B., Chapin, E. A., Johnson, P. T., Curletti, C. R., Hancox, L. S., Hu, J., Ebricht, J. N., Malek, G., Hauser, M. A., Rickman, C. B., Bok, D., Hageman, G. S. & Johnson, L. V. 2010. The pivotal role of the complement system in aging and age-related macular degeneration: hypothesis re-visited. *Prog Retin Eye Res*, 29, 95-112.
- Annes, J. P., Munger, J. S. & Rifkin, D. B. 2003. Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci*, 116, 217-24.
- AREDS 2001. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report no. 8. *Arch Ophthalmol*, 119, 1417-36.
- Aumailley, M. & Smyth, N. 1998. The role of laminins in basement membrane function. *J Anat*, 193 (Pt 1), 1-21.
- Austin, B. A., Liu, B., Li, Z. & Nussenblatt, R. B. 2009. Biologically active fibronectin fragments stimulate release of MCP-1 and catabolic cytokines from murine retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50, 2896-902.
- Baehr, W., Wu, S. M., Bird, A. C. & Palczewski, K. 2003. The retinoid cycle and retina disease. *Vision Res*, 43, 2957-8.
- Baird, P. N., Richardson, A. J., Robman, L. D., Dimitrov, P. N., Tikellis, G., Mccarty, C. A. & Guymer, R. H. 2006. Apolipoprotein (APOE) gene is associated with progression of age-related macular degeneration (AMD). *Hum Mutat*, 27, 337-42.
- Baldi, A., De Luca, A., Morini, M., Battista, T., Felsani, A., Baldi, F., Catricala, C., Amantea, A., Noonan, D. M., Albin, A., Natali, P. G., Lombardi, D. & Paggi, M. G. 2002. The HtrA1 serine protease is down-regulated during human melanoma progression and represses growth of metastatic melanoma cells. *Oncogene*, 21, 6684-8.
- Bando, H., Shadrach, K. G., Rayborn, M. E., Crabb, J. W. & Hollyfield, J. G. 2007. Clathrin and adaptin accumulation in drusen, Bruch's membrane and choroid in AMD and non-AMD donor eyes. *Exp Eye Res*, 84, 135-42.
- Bok, D. 1993. The retinal pigment epithelium: a versatile partner in vision. *J Cell Sci Suppl*, 17, 189-95.
- Bonilha, V. L. 2008. Age and disease-related structural changes in the retinal pigment epithelium. *Clin Ophthalmol*, 2, 413-24.
- Booij, J. C., BAAS, D. C., BEISEKEEVA, J., GORGELS, T. G. & BERGEN, A. A. 2010. The dynamic nature of Bruch's membrane. *Prog Retin Eye Res*, 29, 1-18.
- Borwein, B., Borwein, D., Medeiros, J. & MCGOWAN, J. W. 1980. The ultrastructure of monkey foveal photoreceptors, with special reference to the structure, shape, size, and spacing of the foveal cones. *Am J Anat*, 159, 125-46.
- Bost, L. M., Aotaki-Keen, A. E. & Hjelmeland, L. M. 1994. Cellular adhesion regulates bFGF gene expression in human retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res*, 58, 545-52.

- Bottinger, E. P., Letterio, J. J. & Roberts, A. B. 1997. Biology of TGF-beta in knockout and transgenic mouse models. *Kidney Int*, 51, 1355-60.
- Boulanger, A., Liu, S., Henningsgaard, A. A., Yu, S. & Redmond, T. M. 2000. The upstream region of the Rpe65 gene confers retinal pigment epithelium-specific expression in vivo and in vitro and contains critical octamer and E-box binding sites. *J Biol Chem*, 275, 31274-82.
- Boulton, M., Moriarty, P., Jarvis-Evans, J. & Marcyniuk, B. 1994. Regional variation and age-related changes of lysosomal enzymes in the human retinal pigment epithelium. *Br J Ophthalmol*, 78, 125-9.
- Brinster, R. L., Allen, J. M., Behringer, R. R., Gelinas, R. E. & Palmiter, R. D. 1988. Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 836-40.
- Cameron, D. J., Yang, Z., Gibbs, D., Chen, H., Kaminoh, Y., Jorgensen, A., Zeng, J., Luo, L., Brinton, E., Brinton, G., Brand, J. M., Bernstein, P. S., Zabriskie, N. A., Tang, S., Constantine, R., Tong, Z. & Zhang, K. 2007. HTRA1 variant confers similar risks to geographic atrophy and neovascular age-related macular degeneration. *Cell Cycle*, 6, 1122-5.
- Campochiaro, P. A., Hackett, S. F., Vineros, S. A., Freund, J., Csaky, C., Larochelle, W., Henderer, J., Johnson, M., Rodriguez, I. R., Friedman, Z. & et al. 1994. Platelet-derived growth factor is an autocrine growth stimulator in retinal pigmented epithelial cells. *J Cell Sci*, 107 (Pt 9), 2459-69.
- Campochiaro, P. A., Jerdon, J. A. & Glaser, B. M. 1986. The extracellular matrix of human retinal pigment epithelial cells in vivo and its synthesis in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 27, 1615-21.
- Carsons, S., Mosesson, M. W. & Diamond, H. S. 1981. Detection and quantitation of fibronectin in synovial fluid from patients with rheumatic disease. *Arthritis Rheum*, 24, 1261-7.
- Chamberland, A., Wang, E., Jones, A. R., Collins-Racie, L. A., Lavallie, E. R., Huang, Y., Liu, L., Morris, E. A., Flannery, C. R. & Yang, Z. 2009. Identification of a novel HtrA1-susceptible cleavage site in human aggrecan: evidence for the involvement of HtrA1 in aggrecan proteolysis in vivo. *J Biol Chem*, 284, 27352-9.
- Charbel Issa, P., Chong, N. V. & Scholl, H. P. 2011. The significance of the complement system for the pathogenesis of age-related macular degeneration - current evidence and translation into clinical application. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 249, 163-74.
- Chau, K. Y., Sivaprasad, S., Patel, N., Donaldson, T. A., Luthert, P. J. & Chong, N. V. 2008. Plasma levels of matrix metalloproteinase-2 and -9 (MMP-2 and MMP-9) in age-related macular degeneration. *Eye (Lond)*, 22, 855-9.
- Chen, C., Wu, L., Jiang, F., Liang, J. & Wu, D. Z. 2003. Scotopic sensitivity of central retina in early age-related macular degeneration. *Yan Ke Xue Bao*, 19, 15-9.
- Chen, M., Muckersie, E., Robertson, M., Fraczek, M., Forrester, J. V. & Xu, H. 2008. Characterization of a spontaneous mouse retinal pigment epithelial cell line B6-RPE07. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 49, 3699-706.
- Chen, Q., Zhang, T., Roshetsky, J. F., Ouyang, Z., Essers, J., Fan, C., Wang, Q., Hinek, A., Plow, E. F. & Dicorleto, P. E. 2009. Fibulin-4 regulates expression of the tropoelastin gene and consequent elastic-fibre formation by human fibroblasts. *Biochem J*, 423, 79-89.
- Chen, W., Stambolian, D., Edwards, A. O., Branham, K. E., Othman, M., Jakobsdottir, J., et al. 2010. Genetic variants near TIMP3 and high-density lipoprotein-associated loci influence susceptibility to age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 7401-6.
- Chiang, A. & Regillo, C. D. 2011. Preferred therapies for neovascular age-related macular degeneration. *Curr Opin Ophthalmol*, 22, 199-204.
- Chien, J., Ota, T., Aletti, G., Shridhar, R., Boccellino, M., Quagliuolo, L., Baldi, A. & Shridhar, V. 2009. Serine protease HtrA1 associates with microtubules and inhibits cell migration. *Mol Cell Biol*, 29, 4177-87.
- Chien, J., Staub, J., Hu, S. I., Erickson-Johnson, M. R., Couch, F. J., Smith, D. I., Crowl, R. M., Kaufmann, S. H. & Shridhar, V. 2004. A candidate tumor suppressor HtrA1 is downregulated in ovarian cancer. *Oncogene*, 23, 1636-44.
- Choi, T., Huang, M., Gorman, C. & Jaenisch, R. 1991. A generic intron increases gene expression in transgenic mice. *Mol Cell Biol*, 11, 3070-4.
- Chong, N. H., Keonin, J., Luthert, P. J., Frennesson, C. I., Weingeist, D. M., Wolf, R. L., Mullins, R. F. & Hageman, G. S. 2005. Decreased thickness and integrity of the macular elastic layer of Bruch's membrane correspond to the distribution of lesions associated with age-related macular degeneration. *Am J Pathol*, 166, 241-51.
- Clark, S. J., Keenan, T. D., Fielder, H. L., Collinson, L. J., Holley, R. J., Merry, C. L., Van Kuppevelt, T. H., Day, A. J. & Bishop, P. N. 2011. Mapping the differential distribution of glycosaminoglycans in the adult human retina, choroid and sclera. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.

- Clarke, A. W., Arnspang, E. C., Mithieux, S. M., Korkmaz, E., Braet, F. & Weiss, A. S. 2006. Tropoelastin massively associates during coacervation to form quantized protein spheres. *Biochemistry*, 45, 9989-96.
- Clausen, T., Southan, C. & Ehrmann, M. 2002. The HtrA family of proteases: implications for protein composition and cell fate. *Mol Cell*, 10, 443-55.
- Coffey, P. J., Gias, C., Mcdermott, C. J., Lundh, P., Pickering, M. C., Sethi, C., Bird, A., Fitzke, F. W., Maass, A., Chen, L. L., Holder, G. E., Luthert, P. J., Salt, T. E., Moss, S. E. & Greenwood, J. 2007. Complement factor H deficiency in aged mice causes retinal abnormalities and visual dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 16651-6.
- Crabb, J. W., Miyagi, M., Gu, X., Shadrach, K., West, K. A., Sakaguchi, H., Kamei, M., Hasan, A., Yan, L., Rayborn, M. E., Salomon, R. G. & Hollyfield, J. G. 2002. Drusen proteome analysis: an approach to the etiology of age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 14682-7.
- Crawford, S. E., Stellmach, V., Murphy-Ullrich, J. E., Ribeiro, S. M., Lawler, J., Hynes, R. O., Boivin, G. P. & Bouck, N. 1998. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo. *Cell*, 93, 1159-70.
- Dabovic, B., Chen, Y., Colarossi, C., Obata, H., Zambuto, L., Perle, M. A. & Rifkin, D. B. 2002. Bone abnormalities in latent TGF-[beta] binding protein (Ltbp)-3-null mice indicate a role for Ltbp-3 in modulating TGF-[beta] bioavailability. *J Cell Biol*, 156, 227-32.
- De Jong, P. T. 2006. Age-related macular degeneration. *N Engl J Med*, 355, 1474-85.
- De Luca, A., De Falco, M., Fedele, V., Cobellis, L., Mastrogiacomo, A., Laforgia, V., Tuduca, I. L., Campioni, M., Giraldi, D., Paggi, M. G. & Baldi, A. 2004. The serine protease HtrA1 is upregulated in the human placenta during pregnancy. *J Histochem Cytochem*, 52, 885-92.
- De Luca, A., De Falco, M., Severino, A., Campioni, M., Santini, D., Baldi, F., Paggi, M. G. & Baldi, A. 2003. Distribution of the serine protease HtrA1 in normal human tissues. *J Histochem Cytochem*, 51, 1279-84.
- Del Priore, L. V. & Tezel, T. H. 1998. Reattachment rate of human retinal pigment epithelium to layers of human Bruch's membrane. *Arch Ophthalmol*, 116, 335-41.
- Detmar, M., Brown, L. F., Berse, B., Jackman, R. W., Elicker, B. M., Dvorak, H. F. & Claffey, K. P. 1997. Hypoxia regulates the expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) and its receptors in human skin. *J Invest Dermatol*, 108, 263-8.
- Dewan, A., Liu, M., Hartman, S., Zhang, S. S., Liu, D. T., Zhao, C., Tam, P. O., Chan, W. M., Lam, D. S., Snyder, M., Barnstable, C., Pang, C. P. & Hoh, J. 2006. HTRA1 promoter polymorphism in wet age-related macular degeneration. *Science*, 314, 989-92.
- Ding, X., Patel, M. & Chan, C. C. 2009. Molecular pathology of age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res*, 28, 1-18.
- Edwards, A. O., Ritter, R., 3rd, Abel, K. J., Manning, A., Panhuysen, C. & Farrer, L. A. 2005. Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science*, 308, 421-4.
- Fiotti, N., Pedio, M., Battaglia Parodi, M., Altamura, N., Uxa, L., Guarnieri, G., Giansante, C. & Ravalico, G. 2005. MMP-9 microsatellite polymorphism and susceptibility to exudative form of age-related macular degeneration. *Genet Med*, 7, 272-7.
- Fletcher, A. E., Bentham, G. C., Agnew, M., Young, I. S., Augood, C., Chakravarthy, U., De Jong, P. T., Rahu, M., Seland, J., Soubrane, G., Tomazzoli, L., Topouzis, F., Vingerling, J. R. & Vioque, J. 2008. Sunlight exposure, antioxidants, and age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol*, 126, 1396-403.
- Forsyth, C. B., Pulai, J. & Loeser, R. F. 2002. Fibronectin fragments and blocking antibodies to alpha2beta1 and alpha5beta1 integrins stimulate mitogen-activated protein kinase signaling and increase collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) production by human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum*, 46, 2368-76.
- Francis, P. J., Zhang, H., Dewan, A., Hoh, J. & Klein, M. L. 2008. Joint effects of polymorphisms in the HTRA1, LOC387715/ARMS2, and CFH genes on AMD in a Caucasian population. *Mol Vis*, 14, 1395-400.
- Frantz, C., Stewart, K. M. & Weaver, V. M. 2010. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci*, 123, 4195-200.
- Franze, K., Grosche, J., Skatchkov, S. N., Schinkinger, S., Foja, C., Schild, D., Uckermann, O., Travis, K., Reichenbach, A. & Guck, J. 2007. Muller cells are living optical fibers in the vertebrate retina. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 8287-92.
- Freeman, H. C., Hugill, A., Dear, N. T., Ashcroft, F. M. & Cox, R. D. 2006. Deletion of nicotinamide nucleotide transhydrogenase: a new quantitative trait locus accounting for glucose intolerance in C57BL/6J mice. *Diabetes*, 55, 2153-6.

- Friedman, D. S., O'colmain, B. J., Munoz, B., Tomany, S. C., Mccarty, C., De Jong, P. T., Nemesure, B., Mitchell, P. & Kempen, J. 2004. Prevalence of age-related macular degeneration in the United States. *Arch Ophthalmol*, 122, 564-72.
- Fritsche, L. G., Loenhardt, T., Janssen, A., Fisher, S. A., Rivera, A., Keilhauer, C. N. & Weber, B. H. 2008. Age-related macular degeneration is associated with an unstable ARMS2 (LOC387715) mRNA. *Nat Genet*, 40, 892-6.
- Fukutake, T. 1999. [Young-adult-onset hereditary subcortical vascular dementia: cerebral autosomal recessive arteriosclerosis with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CARASIL)]. *Rinsho Shinkeigaku*, 39, 50-2.
- Gehrs, K. M., Anderson, D. H., Johnson, L. V. & Hageman, G. S. 2006. Age-related macular degeneration--emerging pathogenetic and therapeutic concepts. *Ann Med*, 38, 450-71.
- Giani, A., Thanos, A., Roh, M. I., Connolly, E., Trichonas, G., Kim, I., Gragoudas, E., Vavvas, D. & Miller, J. W. 2011. In vivo evaluation of laser-induced choroidal neovascularization using spectral-domain optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52, 3880-7.
- Giannakis, E., Jokiranta, T. S., Male, D. A., Ranganathan, S., Ormsby, R. J., Fischetti, V. A., Mold, C. & Gordon, D. L. 2003. A common site within factor H SCR 7 responsible for binding heparin, C-reactive protein and streptococcal M protein. *Eur J Immunol*, 33, 962-9.
- Gilmore, A. P. 2005. Anoikis. *Cell Death Differ*, 12 Suppl 2, 1473-7.
- Glenn, J. V., Beattie, J. R., Barrett, L., Frizzell, N., Thorpe, S. R., Boulton, M. E., Mcgarvey, J. J. & Stitt, A. W. 2007. Confocal Raman microscopy can quantify advanced glycation end product (AGE) modifications in Bruch's membrane leading to accurate, nondestructive prediction of ocular aging. *FASEB J*, 21, 3542-52.
- Gold, B., Merriam, J. E., Zernant, J., Hancox, L. S., Taiber, A. J., Gehrs, K., Cramer, K., Neel, J., Bergeron, J., Barile, G. R., Smith, R. T., Hageman, G. S., Dean, M. & Allikmets, R. 2006. Variation in factor B (BF) and complement component 2 (C2) genes is associated with age-related macular degeneration. *Nat Genet*, 38, 458-62.
- Goldberg, J., Flowerdew, G., Smith, E., Brody, J. A. & Tso, M. O. 1988. Factors associated with age-related macular degeneration. An analysis of data from the first National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Epidemiol*, 128, 700-10.
- Goldberg, M. F. 1976. Editorial: Bruch's membrane and vascular growth. *Invest Ophthalmol*, 15, 443-6.
- Gong, J., Sagiv, O., Cai, H., Tsang, S. H. & Del Priore, L. V. 2008. Effects of extracellular matrix and neighboring cells on induction of human embryonic stem cells into retinal or retinal pigment epithelial progenitors. *Exp Eye Res*, 86, 957-65.
- Grau, S., Baldi, A., Bussani, R., Tian, X., Stefanescu, R., Przybylski, M., Richards, P., Jones, S. A., Shridhar, V., Clausen, T. & Ehrmann, M. 2005. Implications of the serine protease HtrA1 in amyloid precursor protein processing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 6021-6.
- Grau, S., Richards, P. J., Kerr, B., Hughes, C., Caterson, B., Williams, A. S., Junker, U., Jones, S. A., Clausen, T. & Ehrmann, M. 2006. The role of human HtrA1 in arthritic disease. *J Biol Chem*, 281, 6124-9.
- Green, W. R. 1999. Histopathology of age-related macular degeneration. *Mol Vis*, 5, 27.
- Habashi, J. P., Judge, D. P., Holm, T. M., Cohn, R. D., Loeys, B. L., Cooper, T. K., et al. 2006. Losartan, an AT1 antagonist, prevents aortic aneurysm in a mouse model of Marfan syndrome. *Science*, 312, 117-21.
- Hadfield, K. D., Rock, C. F., Inkson, C. A., Dallas, S. L., Sudre, L., Wallis, G. A., Boot-Handford, R. P. & Canfield, A. E. 2008. HtrA1 inhibits mineral deposition by osteoblasts: requirement for the protease and PDZ domains. *J Biol Chem*, 283, 5928-38.
- Hageman, G. S., Anderson, D. H., Johnson, L. V., Hancox, L. S., Taiber, A. J., Hardisty, L. I., et al. 2005. A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 7227-32.
- Hageman, G. S., Luthert, P. J., Victor Chong, N. H., Johnson, L. V., Anderson, D. H. & Mullins, R. F. 2001. An integrated hypothesis that considers drusen as biomarkers of immune-mediated processes at the RPE-Bruch's membrane interface in aging and age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res*, 20, 705-32.
- Haines, J. L., Hauser, M. A., Schmidt, S., Scott, W. K., Olson, L. M., Gallins, P., Spencer, K. L., Kwan, S. Y., Noureddine, M., Gilbert, J. R., Schnetz-Boutaud, N., Agarwal, A., Postel, E. A. & Pericak-Vance, M. A. 2005. Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science*, 308, 419-21.

- Hanada, K., Vermeij, M., Garinis, G. A., De Waard, M. C., Kunen, M. G., Myers, L., Maas, A., Duncker, D. J., Meijers, C., Dietz, H. C., Kanaar, R. & Essers, J. 2007. Perturbations of vascular homeostasis and aortic valve abnormalities in fibulin-4 deficient mice. *Circ Res*, 100, 738-46.
- Hara, K., Shiga, A., Fukutake, T., Nozaki, H., Miyashita, A., Yokoseki, A., et al. 2009. Association of HTRA1 mutations and familial ischemic cerebral small-vessel disease. *N Engl J Med*, 360, 1729-39.
- Hewitt, A. T., Nakazawa, K. & Newsome, D. A. 1989. Analysis of newly synthesized Bruch's membrane proteoglycans. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 30, 478-86.
- Hirai, M., Horiguchi, M., Ohbayashi, T., Kita, T., Chien, K. R. & Nakamura, T. 2007a. Latent TGF-beta-binding protein 2 binds to DANCE/fibulin-5 and regulates elastic fiber assembly. *EMBO J*, 26, 3283-95.
- Hirai, M., Ohbayashi, T., Horiguchi, M., Okawa, K., Hagiwara, A., Chien, K. R., Kita, T. & Nakamura, T. 2007b. Fibulin-5/DANCE has an elastogenic organizer activity that is abrogated by proteolytic cleavage in vivo. *J Cell Biol*, 176, 1061-71.
- Hogan, M. J. 1961. Ultrastructure of the choroid. Its role in the pathogenesis of chorioretinal disease. *Trans Pac Coast Otoophthalmol Soc Annu Meet*, 42, 61-87.
- Hogan, M. J. 1972. Role of the retinal pigment epithelium in macular disease. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol*, 76, 64-80.
- Holz, F. G., Sheraidah, G., Pauleikhoff, D. & Bird, A. C. 1994. Analysis of lipid deposits extracted from human macular and peripheral Bruch's membrane. *Arch Ophthalmol*, 112, 402-6.
- Hu, Q., Moerman, E. J. & Goldstein, S. 1996. Altered expression and regulation of the alpha 5beta1 integrin-fibronectin receptor lead to reduced amounts of functional alpha5beta1 heterodimer on the plasma membrane of senescent human diploid fibroblasts. *Exp Cell Res*, 224, 251-63.
- Hu, S. I., Carozza, M., Klein, M., Nantermet, P., Luk, D. & Crowl, R. M. 1998. Human HtrA, an evolutionarily conserved serine protease identified as a differentially expressed gene product in osteoarthritic cartilage. *J Biol Chem*, 273, 34406-12.
- Huang, T. T., Naeemuddin, M., Elchuri, S., Yamaguchi, M., Kozy, H. M., Carlson, E. J. & Epstein, C. J. 2006. Genetic modifiers of the phenotype of mice deficient in mitochondrial superoxide dismutase. *Hum Mol Genet*, 15, 1187-94.
- Hutchison, J. & Tay, W. 1875. Symmetrical central choroidoretinal disease occurring in senile persons. *R. Lond. Ophthal. Hosp. Rep*, 8, 231-244.
- Hynes, R. O. 2009. The Extracellular Matrix: Not Just Pretty Fibrils. *Science*, 326, 1216-9.
- Isogai, Z., Ono, R. N., Ushiro, S., Keene, D. R., Chen, Y., Mazzieri, R., Charbonneau, N. L., Reinhardt, D. P., Rifkin, D. B. & Sakai, L. Y. 2003. Latent transforming growth factor beta-binding protein 1 interacts with fibrillin and is a microfibril-associated protein. *J Biol Chem*, 278, 2750-7.
- Jakobsdottir, J., Conley, Y. P., Weeks, D. E., Mah, T. S., Ferrell, R. E. & Gorin, M. B. 2005. Susceptibility genes for age-related maculopathy on chromosome 10q26. *Am J Hum Genet*, 77, 389-407.
- Johnson, E. J. 2005. Obesity, lutein metabolism, and age-related macular degeneration: a web of connections. *Nutr Rev*, 63, 9-15.
- Johnson, L. V., Leitner, W. P., Rivest, A. J., Staples, M. K., Radeke, M. J. & Anderson, D. H. 2002. The Alzheimer's A beta -peptide is deposited at sites of complement activation in pathologic deposits associated with aging and age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 11830-5.
- Jones, A., Kumar, S., Zhang, N., Tong, Z., Yang, J. H., Watt, C., Anderson, J., Amrita, Fillerup, H., McCloskey, M., Luo, L., Yang, Z., Ambati, B., Marc, R., Oka, C., Zhang, K. & Fu, Y. 2011. Increased expression of multifunctional serine protease, HTRA1, in retinal pigment epithelium induces polypoidal choroidal vasculopathy in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Jozsi, M., Manuelian, T., Heinen, S., Oppermann, M. & Zipfel, P. F. 2004. Attachment of the soluble complement regulator factor H to cell and tissue surfaces: relevance for pathology. *Histol Histopathol*, 19, 251-8.
- Kanda, A., Chen, W., Othman, M., Branham, K. E., Brooks, M., Khanna, R., He, S., Lyons, R., Abecasis, G. R. & Swaroop, A. 2007. A variant of mitochondrial protein LOC387715/ARMS2, not HTRA1, is strongly associated with age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 16227-32.
- Kanda, A., Stambolian, D., Chen, W., Curcio, C. A., Abecasis, G. R. & Swaroop, A. 2010. Age-related macular degeneration-associated variants at chromosome 10q26 do not significantly alter ARMS2 and HTRA1 transcript levels in the human retina. *Mol Vis*, 16, 1317-23.
- Kellner, U. & Wachtlin, J. 2008. *Retina: Diagnostik und Therapie der Erkrankungen des hinteren Augenabschnitts*, Thieme Georg Verlag.

- Kent, D. & Sheridan, C. 2003. Choroidal neovascularization: a wound healing perspective. *Mol Vis*, 9, 747-55.
- Kern, T. S. & Mohr, S. 2007. Nonproliferative stages of diabetic retinopathy: animal models and pathogenesis. In: JOUSSEN, A. M., GARDNER, T. W., KIRCHHOF, B. & RYAN, S. J. (eds.) *Retinal Vascular Disease*. Springer.
- Klein, M. L., Schultz, D. W., Edwards, A., Matisse, T. C., Rust, K., Berselli, C. B., Trzuppek, K., Weleber, R. G., Ott, J., Wirtz, M. K. & Acott, T. S. 1998. Age-related macular degeneration. Clinical features in a large family and linkage to chromosome 1q. *Arch Ophthalmol*, 116, 1082-8.
- Klein, R. 2007. Overview of progress in the epidemiology of age-related macular degeneration. *Ophthalmic Epidemiol*, 14, 184-7.
- Klein, R., Klein, B. E., Tomany, S. C., Meuer, S. M. & Huang, G. H. 2002. Ten-year incidence and progression of age-related maculopathy: The Beaver Dam eye study. *Ophthalmology*, 109, 1767-79.
- Klein, R. J., Zeiss, C., Chew, E. Y., Tsai, J. Y., Sackler, R. S., Haynes, C., Henning, A. K., Sanguiovanni, J. P., Mane, S. M., Mayne, S. T., Bracken, M. B., Ferris, F. L., Ott, J., Barnstable, C. & Hoh, J. 2005. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science*, 308, 385-9.
- Klenotic, P. A., Munier, F. L., Marmorstein, L. Y. & Anand-Apte, B. 2004. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) is a binding partner of epithelial growth factor-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 (EFEMP1). Implications for macular degenerations. *J Biol Chem*, 279, 30469-73.
- Kohfeldt, E., Maurer, P., Vannahme, C. & Timpl, R. 1997. Properties of the extracellular calcium binding module of the proteoglycan testican. *FEBS Lett*, 414, 557-61.
- Kolb, H. 1995. Facts and Figures Concerning the Human Retina.
- Kortvely, E., Hauck, S. M., Duetsch, G., Gloeckner, C. J., Kremmer, E., Alge-Priglinger, C. S., Deeg, C. A. & Ueffing, M. 2010. ARMS2 is a constituent of the extracellular matrix providing a link between familial and sporadic age-related macular degenerations. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51, 79-88.
- Krojer, T., Garrido-Franco, M., Huber, R., Ehrmann, M. & Clausen, T. 2002. Crystal structure of DegP (HtrA) reveals a new protease-chaperone machine. *Nature*, 416, 455-9.
- Kuroki, M., Voest, E. E., Amano, S., Beerepoot, L. V., Takashima, S., Tolentino, M., Kim, R. Y., Rohan, R. M., Colby, K. A., Yeo, K. T. & Adamis, A. P. 1996. Reactive oxygen intermediates increase vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *J Clin Invest*, 98, 1667-75.
- Kwak, N., Okamoto, N., Wood, J. M. & Campochiaro, P. A. 2000. VEGF is major stimulator in model of choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41, 3158-64.
- Labat-Robert, J. 2002. Fibronectin in malignancy. *Semin Cancer Biol*, 12, 187-95.
- Lebrin, F., Goumans, M. J., Jonker, L., Carvalho, R. L., Valdimarsdottir, G., Thorikay, M., Mummery, C., Arthur, H. M. & Ten Dijke, P. 2004. Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction. *EMBO J*, 23, 4018-28.
- Lee, E. Y., Chung, C. H., Khoury, C. C., Yeo, T. K., Pyagay, P. E., Wang, A. & Chen, S. 2009. The monocyte chemoattractant protein-1/CCR2 loop, inducible by TGF-beta, increases podocyte motility and albumin permeability. *Am J Physiol Renal Physiol*, 297, F85-94.
- Lipinska, B., Sharma, S. & Georgopoulos, C. 1988. Sequence analysis and regulation of the htrA gene of Escherichia coli: a sigma 32-independent mechanism of heat-inducible transcription. *Nucleic Acids Res*, 16, 10053-67.
- Liu, X., Zhao, Y., Gao, J., Pawlyk, B., Starcher, B., Spence, J. A., Yanagisawa, H., Zuo, J. & Li, T. 2004. Elastic fiber homeostasis requires lysyl oxidase-like 1 protein. *Nat Genet*, 36, 178-82.
- Loffler, K. U. & Lee, W. R. 1986. Basal linear deposit in the human macula. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 224, 493-501.
- Lommatzsch, A., Hermans, P., Muller, K. D., Bornfeld, N., Bird, A. C. & Pauleikhoff, D. 2008. Are low inflammatory reactions involved in exudative age-related macular degeneration? Morphological and immunohistochemical analysis of AMD associated with basal deposits. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 246, 803-10.
- Lopez, P. F., Sippy, B. D., Lambert, H. M., Thach, A. B. & Hinton, D. R. 1996. Transdifferentiated retinal pigment epithelial cells are immunoreactive for vascular endothelial growth factor in surgically excised age-related macular degeneration-related choroidal neovascular membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 37, 855-68.
- Lotery, A. J., Baas, D., Ridley, C., Jones, R. P., Klaver, C. C., Stone, E., Nakamura, T., Luff, A., Griffiths, H., Wang, T., Bergen, A. A. & Trump, D. 2006. Reduced secretion of fibulin 5 in age-related macular degeneration and cutis laxa. *Hum Mutat*, 27, 568-74.

- Majewski, J., Schultz, D. W., Weleber, R. G., Schain, M. B., Edwards, A. O., Matise, T. C., Acott, T. S., Ott, J. & Klein, M. L. 2003. Age-related macular degeneration--a genome scan in extended families. *Am J Hum Genet*, 73, 540-50.
- Majji, A. B., Cao, J., Chang, K. Y., Hayashi, A., Aggarwal, S., Grebe, R. R. & De Juan, E., Jr. 2000. Age-related retinal pigment epithelium and Bruch's membrane degeneration in senescence-accelerated mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41, 3936-42.
- Maller, J., George, S., Purcell, S., Fagerness, J., Altshuler, D., Daly, M. J. & Seddon, J. M. 2006. Common variation in three genes, including a noncoding variant in CFH, strongly influences risk of age-related macular degeneration. *Nat Genet*, 38, 1055-9.
- Marastoni, S., Ligresti, G., Lorenzon, E., Colombatti, A. & Mongiat, M. 2008. Extracellular matrix: a matter of life and death. *Connect Tissue Res*, 49, 203-6.
- Marshall, G. E., Konstas, A. G., Reid, G. G., Edwards, J. G. & Lee, W. R. 1994. Collagens in the aged human macula. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 232, 133-40.
- Mayer, U., Mann, K., Timpl, R. & Murphy, G. 1993. Sites of nidogen cleavage by proteases involved in tissue homeostasis and remodelling. *Eur J Biochem*, 217, 877-84.
- Mayer, U. & Timpl, R. 1994. *Nidogen: A Versatile Binding Protein of Basement Membranes. In Birk DE., and Mecham RP. (Eds.). Extracellular Matrix Assembly and Structure. Academic Press, San Diego :389-416.*
- Miyamoto, N., De Kozak, Y., Normand, N., Courtois, Y., Jeanny, J. C., Benezra, D. & Behar-Cohen, F. 2008. PIGF-1 and VEGFR-1 pathway regulation of the external epithelial hemato-ocular barrier. A model for retinal edema. *Ophthalmic Res*, 40, 203-7.
- Moore, D. J. & Clover, G. M. 2001. The effect of age on the macromolecular permeability of human Bruch's membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42, 2970-5.
- Mousa, S. A., Lorelli, W. & Campochiaro, P. A. 1999. Role of hypoxia and extracellular matrix-integrin binding in the modulation of angiogenic growth factors secretion by retinal pigmented epithelial cells. *J Cell Biochem*, 74, 135-43.
- Murwantoko, Yano, M., Ueta, Y., Murasaki, A., Kanda, H., Oka, C. & Kawaichi, M. 2004. Binding of proteins to the PDZ domain regulates proteolytic activity of HtrA1 serine protease. *Biochem J*, 381, 895-904.
- Nagineni, C. N., Samuel, W., Nagineni, S., Pardhasaradhi, K., Wiggert, B., Detrick, B. & Hooks, J. 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. *J Cell Physiol*, 197, 453-62.
- Nakamura, T., Lozano, P. R., Ikeda, Y., Iwanaga, Y., Hinek, A., Minamisawa, S., Cheng, C. F., Kobuke, K., Dalton, N., Takada, Y., Tashiro, K., Ross Jr, J., Honjo, T. & Chien, K. R. 2002. Fibulin-5/DANCE is essential for elastogenesis in vivo. *Nature*, 415, 171-5.
- Nakata, K., Crabb, J. W. & Hollyfield, J. G. 2005. Crystallin distribution in Bruch's membrane-choroid complex from AMD and age-matched donor eyes. *Exp Eye Res*, 80, 821-6.
- Nambu, H., Nambu, R., Oshima, Y., Hackett, S. F., Okoye, G., Wiegand, S., Yancopoulos, G., Zack, D. J. & Campochiaro, P. A. 2004. Angiopoietin 1 inhibits ocular neovascularization and breakdown of the blood-retinal barrier. *Gene Ther*, 11, 865-73.
- Nambu, H., Umeda, N., Kachi, S., Oshima, Y., Akiyama, H., Nambu, R. & Campochiaro, P. A. 2005. Angiopoietin 1 prevents retinal detachment in an aggressive model of proliferative retinopathy, but has no effect on established neovascularization. *J Cell Physiol*, 204, 227-35.
- Nathan, C. & Sporn, M. 1991. Cytokines In Context. *J Cell Biol*, 113, 981-6.
- Neptune, E. R., Frischmeyer, P. A., Arking, D. E., Myers, L., Bunton, T. E., Gayraud, B., Ramirez, F., Sakai, L. Y. & Dietz, H. C. 2003. Dysregulation of TGF-beta activation contributes to pathogenesis in Marfan syndrome. *Nat Genet*, 33, 407-11.
- Nonaka, R., Onoue, S., Wachi, H., Sato, F., Urban, Z., Starcher, B. C. & Seyama, Y. 2009. DANCE/fibulin-5 promotes elastic fiber formation in a tropoelastin isoform-dependent manner. *Clin Biochem*, 42, 713-21.
- Nozaki, M., Raisler, B. J., Sakurai, E., Sarma, J. V., Barnum, S. R., Lambris, J. D., Chen, Y., Zhang, K., Ambati, B. K., Baffi, J. Z. & Ambati, J. 2006. Drusen complement components C3a and C5a promote choroidal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 2328-33.
- O'reilly, M. S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W. S., Flynn, E., Birkhead, J. R., Olsen, B. R. & Folkman, J. 1997. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*, 88, 277-85.
- Ogata, N., Wada, M., Otsuji, T., Jo, N., Tombran-Tink, J. & Matsumura, M. 2002. Expression of pigment epithelium-derived factor in normal adult rat eye and experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43, 1168-75.

- Oka, C., Tsujimoto, R., Kajikawa, M., Koshiba-Takeuchi, K., Ina, J., Yano, M., Tsuchiya, A., Ueta, Y., Soma, A., Kanda, H., Matsumoto, M. & Kawaichi, M. 2004. HtrA1 serine protease inhibits signaling mediated by Tgfbeta family proteins. *Development*, 131, 1041-53.
- Otani, A., Takagi, H., Oh, H., Koyama, S., Matsumura, M. & Honda, Y. 1999. Expressions of angiopoietins and Tie2 in human choroidal neovascular membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 40, 1912-20.
- Palmiter, R. D., Sandgren, E. P., Avarbock, M. R., Allen, D. D. & Brinster, R. L. 1991. Heterologous introns can enhance expression of transgenes in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 478-82.
- Parry, D. A., Toomes, C., Bida, L., Danciger, M., Towns, K. V., Mckibbin, M., et al. 2009. Loss of the metalloprotease ADAM9 leads to cone-rod dystrophy in humans and retinal degeneration in mice. *Am J Hum Genet*, 84, 683-91.
- Pauleikhoff, D., Harper, C. A., Marshall, J. & Bird, A. C. 1990. Aging changes in Bruch's membrane. A histochemical and morphologic study. *Ophthalmology*, 97, 171-8.
- Pauleikhoff, D., Wojteki, S., Muller, D., Bornfeld, N. & Heiligenhaus, A. 2000. [Adhesive properties of basal membranes of Bruch's membrane. Immunohistochemical studies of age-dependent changes in adhesive molecules and lipid deposits]. *Ophthalmologie*, 97, 243-50.
- Pauleikhoff, D., Zuels, S., Sheridah, G. S., Marshall, J., Wessing, A. & Bird, A. C. 1992. Correlation between biochemical composition and fluorescein binding of deposits in Bruch's membrane. *Ophthalmology*, 99, 1548-53.
- Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29, e45.
- Polur, I., Lee, P. L., Servais, J. M., Xu, L. & Li, Y. 2010. Role of HTRA1, a serine protease, in the progression of articular cartilage degeneration. *Histol Histopathol*, 25, 599-608.
- Pons, M. & Marin-Castano, M. E. 2011a. Cigarette smoke-related hydroquinone dysregulates MCP-1, VEGF and PEDF expression in retinal pigment epithelium in vitro and in vivo. *PLoS One*, 6, e16722.
- Pons, M. & Marin-Castano, M. E. 2011b. Nicotine increases VEGF/PEDF ratio in retinal pigment epithelium: a possible mechanism for CNV in passive smokers with AMD. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.
- Punglia, R. S., Lu, M., Hsu, J., Kuroki, M., Tolentino, M. J., Keough, K., Levy, A. P., Levy, N. S., Goldberg, M. A., D'amato, R. J. & Adamis, A. P. 1997. Regulation of vascular endothelial growth factor expression by insulin-like growth factor I. *Diabetes*, 46, 1619-26.
- Rakoczy, E. P., Yu, M. J., Nusinowitz, S., Chang, B. & Heckenlively, J. R. 2006. Mouse models of age-related macular degeneration. *Exp Eye Res*, 82, 741-52.
- Ramirez, F. & Dietz, H. C. 2007. Marfan syndrome: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *Curr Opin Genet Dev*, 17, 252-8.
- Ramrattan, R. S., Van Der Schaft, T. L., Mooy, C. M., De Bruijn, W. C., Mulder, P. G. & De Jong, P. T. 1994. Morphometric analysis of Bruch's membrane, the choriocapillaris, and the choroid in aging. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 35, 2857-64.
- Rattner, A. & Nathans, J. 2006. Macular degeneration: recent advances and therapeutic opportunities. *Nat Rev Neurosci*, 7, 860-72.
- Rawlings, N. D., Tolle, D. P. & Barrett, A. J. 2004. Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem J*, 378, 705-16.
- Redmond, T. M., Yu, S., Lee, E., Bok, D., Hamasaki, D., Chen, N., Goletz, P., Ma, J. X., Crouch, R. K. & Pfeifer, K. 1998. Rpe65 is necessary for production of 11-cis-vitamin A in the retinal visual cycle. *Nat Genet*, 20, 344-51.
- Resnikoff, S., Pascolini, D., Etya'ale, D., Kocur, I., Pararajasegaram, R., Pokharel, G. P. & Mariotti, S. P. 2004. Global data on visual impairment in the year 2002. *Bull World Health Organ*, 82, 844-51.
- Rizzolo, L. J., Peng, S., Luo, Y. & Xiao, W. 2011. Integration of tight junctions and claudins with the barrier functions of the retinal pigment epithelium. *Prog Retin Eye Res*, 30, 296-323.
- Roberts, J. M. & Forrester, J. V. 1990. Factors affecting the migration and growth of endothelial cells from microvessels of bovine retina. *Exp Eye Res*, 50, 165-72.
- Roduit, R. & Schorderet, D. F. 2008. MAP kinase pathways in UV-induced apoptosis of retinal pigment epithelium ARPE19 cells. *Apoptosis*, 13, 343-53.
- Rosenthal, R., Wohlleben, H., Malek, G., Schlichting, L., Thieme, H., Bowes Rickman, C. & Strauss, O. 2004. Insulin-like growth factor-1 contributes to neovascularization in age-related macular degeneration. *Biochem Biophys Res Commun*, 323, 1203-8.
- Roth, F., Bindewald, A. & Holz, F. G. 2004. Key pathophysiologic pathways in age-related macular disease. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 42, 710-6.

- Rozanowska, M., Jarvis-Evans, J., Korytowski, W., Boulton, M. E., Burke, J. M. & Sarna, T. 1995. Blue light-induced reactivity of retinal age pigment. In vitro generation of oxygen-reactive species. *J Biol Chem*, 270, 18825-30.
- Rozanowska, M., Wessels, J., Boulton, M., Burke, J. M., Rodgers, M. A., Truscott, T. G. & Sarna, T. 1998. Blue light-induced singlet oxygen generation by retinal lipofuscin in non-polar media. *Free Radic Biol Med*, 24, 1107-12.
- Saharinen, J. & Keski-Oja, J. 2000. Specific sequence motif of 8-Cys repeats of TGF-beta binding proteins, LTBP, creates a hydrophobic interaction surface for binding of small latent TGF-beta. *Mol Biol Cell*, 11, 2691-704.
- Sarks, S., Cherepanoff, S., Killingsworth, M. & Sarks, J. 2007. Relationship of Basal laminar deposit and membranous debris to the clinical presentation of early age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48, 968-77.
- Sarks, S. H., Arnold, J. J., Killingsworth, M. C. & Sarks, J. P. 1999. Early drusen formation in the normal and aging eye and their relation to age related maculopathy: a clinicopathological study. *Br J Ophthalmol*, 83, 358-68.
- Schiemann, W. P., Blobe, G. C., Kalume, D. E., Pandey, A. & Lodish, H. F. 2002. Context-specific effects of fibulin-5 (DANCE/EVEC) on cell proliferation, motility, and invasion. Fibulin-5 is induced by transforming growth factor-beta and affects protein kinase cascades. *J Biol Chem*, 277, 27367-77.
- Schlingemann, R. O. 2004. Role of growth factors and the wound healing response in age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 242, 91-101.
- Scholl, H. P., Charbel Issa, P., Walier, M., Janzer, S., Pollok-Kopp, B., Borncke, F., Fritsche, L. G., Chong, N. V., Fimmers, R., Wienker, T., Holz, F. G., Weber, B. H. & Oppermann, M. 2008. Systemic complement activation in age-related macular degeneration. *PLoS One*, 3, e2593.
- Schwesinger, C., Yee, C., Rohan, R. M., Jousen, A. M., Fernandez, A., Meyer, T. N., Poulaki, V., Ma, J. J., Redmond, T. M., Liu, S., Adamis, A. P. & D'amato, R. J. 2001. Intrachoroidal neovascularization in transgenic mice overexpressing vascular endothelial growth factor in the retinal pigment epithelium. *Am J Pathol*, 158, 1161-72.
- Seddon, J. M., Ajani, U. A. & Mitchell, B. D. 1997. Familial aggregation of age-related maculopathy. *Am J Ophthalmol*, 123, 199-206.
- Seddon, J. M., Cote, J., Page, W. F., Aggen, S. H. & Neale, M. C. 2005. The US twin study of age-related macular degeneration: relative roles of genetic and environmental influences. *Arch Ophthalmol*, 123, 321-7.
- Seddon, J. M., Cote, J. & Rosner, B. 2003. Progression of age-related macular degeneration: association with dietary fat, transunsaturated fat, nuts, and fish intake. *Arch Ophthalmol*, 121, 1728-37.
- Semkova, I., Fauser, S., Lappas, A., Smyth, N., Kociok, N., Kirchhof, B., Paulsson, M., Poulaki, V. & Jousen, A. M. 2006. Overexpression of FasL in retinal pigment epithelial cells reduces choroidal neovascularization. *FASEB J*, 20, 1689-91.
- Seong, G. J., Hong, S., Jung, S. A., Lee, J. J., Lim, E., Kim, S. J. & Lee, J. H. 2009. TGF-beta-induced interleukin-6 participates in transdifferentiation of human Tenon's fibroblasts to myofibroblasts. *Mol Vis*, 15, 2123-8.
- Sertie, A. L., Sossi, V., Camargo, A. A., Zatz, M., Brahe, C. & Passos-Bueno, M. R. 2000. Collagen XVIII, containing an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth, plays a critical role in the maintenance of retinal structure and in neural tube closure (Knobloch syndrome). *Hum Mol Genet*, 9, 2051-8.
- Sheraidah, G., Steinmetz, R., Maguire, J., Pauleikhoff, D., Marshall, J. & Bird, A. C. 1993. Correlation between lipids extracted from Bruch's membrane and age. *Ophthalmology*, 100, 47-51.
- Shiga, A., Nozaki, H., Yokoseki, A., Nihonmatsu, M., Kawata, H., Kato, T., Koyama, A., Arima, K., Ikeda, M., Katada, S., Toyoshima, Y., Takahashi, H., Tanaka, A., Nakano, I., Ikeuchi, T., Nishizawa, M. & Onodera, O. 2011. Cerebral small-vessel disease protein HTRA1 controls the amount of TGF-beta1 via cleavage of proTGF-beta1. *Hum Mol Genet*, 20, 1800-10.
- Sivaprasad, S., Chong, N. V. & Bailey, T. A. 2005. Serum elastin-derived peptides in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46, 3046-51.
- Sjoberg, A. P., Trouw, L. A., Clark, S. J., Sjolander, J., Heinegard, D., Sim, R. B., Day, A. J. & Blom, A. M. 2007. The factor H variant associated with age-related macular degeneration (His-384) and the non-disease-associated form bind differentially to C-reactive protein, fibromodulin, DNA, and necrotic cells. *J Biol Chem*, 282, 10894-900.
- Skeie, J. M. & Mullins, R. F. 2008. Elastin-mediated choroidal endothelial cell migration: possible role in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 49, 5574-80.

- Skeie, J. M., Zeng, S., Faidley, E. A. & Mullins, R. F. 2011. Angiogenin in age-related macular degeneration. *Mol Vis*, 17, 576-82.
- Skerka, C., Lauer, N., Weinberger, A. A., Keilhauer, C. N., Suhnel, J., Smith, R., Schlotzer-Schrehardt, U., Fritsche, L., Heinen, S., Hartmann, A., Weber, B. H. & Zipfel, P. F. 2007. Defective complement control of factor H (Y402H) and FHL-1 in age-related macular degeneration. *Mol Immunol*, 44, 3398-406.
- Smith, W., Mitchell, P. & Leeder, S. R. 1996. Smoking and age-related maculopathy. The Blue Mountains Eye Study. *Arch Ophthalmol*, 114, 1518-23.
- Snellen, E. L., Verbeek, A. L., Van Den Hoogen, G. W., Cruysberg, J. R. & Hoyng, C. B. 2002. Neovascular age-related macular degeneration and its relationship to antioxidant intake. *Acta Ophthalmol Scand*, 80, 368-71.
- Sorsby, A. & Mason, M. E. 1949. A fundus dystrophy with unusual features. *Br J Ophthalmol*, 33, 67-97.
- Spraul, C. W., Lang, G. E., Grossniklaus, H. E. & Lang, G. K. 1999. Histologic and morphometric analysis of the choroid, Bruch's membrane, and retinal pigment epithelium in postmortem eyes with age-related macular degeneration and histologic examination of surgically excised choroidal neovascular membranes. *Surv Ophthalmol*, 44 Suppl 1, S10-32.
- Stanton, C. M., Kortvely, E., Chalmers, K. J., Hauck, S. M., Ueffing, M. & Wright, A. F. 2011. Evidence That the HTRA1 Interactome Influences Susceptibility to Age-Related Macular Degeneration. *ARVO Abstract*.
- Steinberg, R. H. 1985. Interactions between the retinal pigment epithelium and the neural retina. *Doc Ophthalmol*, 60, 327-46.
- Sterner-Kock, A., Thorey, I. S., Koli, K., Wempe, F., Otte, J., Bangsow, T., Kuhlmeier, K., Kirchner, T., Jin, S., Keski-Oja, J. & Von Melchner, H. 2002. Disruption of the gene encoding the latent transforming growth factor-beta binding protein 4 (LTBP-4) causes abnormal lung development, cardiomyopathy, and colorectal cancer. *Genes Dev*, 16, 2264-73.
- Stone, E. M., Braun, T. A., Russell, S. R., Kuehn, M. H., Lotery, A. J., Moore, P. A., Eastman, C. G., Casavant, T. L. & Sheffield, V. C. 2004. Missense variations in the fibulin 5 gene and age-related macular degeneration. *N Engl J Med*, 351, 346-53.
- Stone, E. M., Lotery, A. J., Munier, F. L., Heon, E., Piguet, B., Guymer, R. H., Vandenberg, K., Cousin, P., Nishimura, D., Swiderski, R. E., Silvestri, G., Mackey, D. A., Hageman, G. S., Bird, A. C., Sheffield, V. C. & Schorderet, D. F. 1999. A single EFEMP1 mutation associated with both Malattia Leventinese and Drayton honeycomb retinal dystrophy. *Nat Genet*, 22, 199-202.
- Strauch, K. L. & Beckwith, J. 1988. An Escherichia coli mutation preventing degradation of abnormal periplasmic proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 1576-80.
- Sullivan, K. M., Bissonnette, R., Yanagisawa, H., Hussain, S. N. & Davis, E. C. 2007. Fibulin-5 functions as an endogenous angiogenesis inhibitor. *Lab Invest*, 87, 818-27.
- Suri, C., McClain, J., Thurston, G., McDonald, D. M., Zhou, H., Oldmixon, E. H., Sato, T. N. & Yancopoulos, G. D. 1998. Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1. *Science*, 282, 468-71.
- Takeda, T., Hosokawa, M., Higuchi, K., Hosono, M., Akiguchi, I. & Katoh, H. 1994. A novel murine model of aging, Senescence-Accelerated Mouse (SAM). *Arch Gerontol Geriatr*, 19, 185-92.
- Tan, J. S., Wang, J. J., Flood, V. & Mitchell, P. 2009. Dietary fatty acids and the 10-year incidence of age-related macular degeneration: the Blue Mountains Eye Study. *Arch Ophthalmol*, 127, 656-65.
- Ten Dijke, P. & Arthur, H. M. 2007. Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 857-69.
- Tennstaedt, A. 2009. *Die protektive Rolle der konservierten Serinprotease Htra1 in der Alzheimerschen Krankheit*. Dissertation, Universität Duisburg-Essen.
- Thier, K. 2011. *Untersuchung des AMD-Kandidatengens Htra1 und dessen Auswirkungen auf die Elastogenese im Bereich der Bruchschen Membran anhand humaner Bulbi*. Bachelor, Universität zu Köln.
- Thornton, J., Edwards, R., Mitchell, P., Harrison, R. A., Buchan, I. & Kelly, S. P. 2005. Smoking and age-related macular degeneration: a review of association. *Eye (Lond)*, 19, 935-44.
- Tieu, B. C., Lee, C., Sun, H., Lejeune, W., Recinos, A., 3rd, Ju, X., Spratt, H., Guo, D. C., Milewicz, D., Tilton, R. G. & Brasier, A. R. 2009. An adventitial IL-6/MCP1 amplification loop accelerates macrophage-mediated vascular inflammation leading to aortic dissection in mice. *J Clin Invest*, 119, 3637-51.
- Timpl, R. & Brown, J. C. 1996. Supramolecular assembly of basement membranes. *Bioessays*, 18, 123-32.

- Timpl, R., Glanville, R. W., Wick, G. & Martin, G. R. 1979a. Immunochemical study on basement membrane (type IV) collagens. *Immunology*, 38, 109-16.
- Timpl, R., Rohde, H., Robey, P. G., Rennard, S. I., Foidart, J. M. & Martin, G. R. 1979b. Laminin--a glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem*, 254, 9933-7.
- Toye, A. A., Lippiat, J. D., Proks, P., Shimomura, K., Bentley, L., Hugill, A., Mijat, V., Goldsworthy, M., Moir, L., Haynes, A., Quarterman, J., Freeman, H. C., Ashcroft, F. M. & Cox, R. D. 2005. A genetic and physiological study of impaired glucose homeostasis control in C57BL/6J mice. *Diabetologia*, 48, 675-86.
- Truebestein, L., Tennstaedt, A., Monig, T., Krojer, T., Canellas, F., Kaiser, M., Clausen, T. & Ehrmann, M. 2011. Substrate-induced remodeling of the active site regulates human HTRA1 activity. *Nat Struct Mol Biol*, 18, 386-8.
- Tsuchiya, A., Yano, M., Tocharus, J., Kojima, H., Fukumoto, M., Kawaichi, M. & Oka, C. 2005. Expression of mouse HtrA1 serine protease in normal bone and cartilage and its upregulation in joint cartilage damaged by experimental arthritis. *Bone*, 37, 323-36.
- Ugarte, M., Hussain, A. A. & Marshall, J. 2006. An experimental study of the elastic properties of the human Bruch's membrane-choroid complex: relevance to ageing. *Br J Ophthalmol*, 90, 621-6.
- Utriainen, A., Sormunen, R., Kettunen, M., Carvalhaes, L. S., Sajanti, E., Eklund, L., Kauppinen, R., Kitten, G. T. & Pihlajaniemi, T. 2004. Structurally altered basement membranes and hydrocephalus in a type XVIII collagen deficient mouse line. *Hum Mol Genet*, 13, 2089-99.
- Van Der Schaft, T. L., De Bruijn, W. C., Mooy, C. M. & De Jong, P. T. 1993. Basal laminar deposit in the aging peripheral human retina. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 231, 470-5.
- Van Soest, S. S., De Wit, G. M., Essing, A. H., Ten Brink, J. B., Kamphuis, W., De Jong, P. T. & Bergen, A. A. 2007. Comparison of human retinal pigment epithelium gene expression in macula and periphery highlights potential topographic differences in Bruch's membrane. *Mol Vis*, 13, 1608-17.
- Vandenlangenberg, G. M., Mares-Perlman, J. A., Klein, R., Klein, B. E., Brady, W. E. & Palta, M. 1998. Associations between antioxidant and zinc intake and the 5-year incidence of early age-related maculopathy in the Beaver Dam Eye Study. *Am J Epidemiol*, 148, 204-14.
- Vingerling, J. R., Hofman, A., Grobbee, D. E. & De Jong, P. T. 1996. Age-related macular degeneration and smoking. The Rotterdam Study. *Arch Ophthalmol*, 114, 1193-6.
- Vives-Bauza, C., Anand, M., Shirazi, A. K., Magrane, J., Gao, J., Vollmer-Snarr, H. R., Manfredi, G. & Finnemann, S. C. 2008. The age lipid A2E and mitochondrial dysfunction synergistically impair phagocytosis by retinal pigment epithelial cells. *J Biol Chem*, 283, 24770-80.
- Wachi, H., Nonaka, R., Sato, F., Shibata-Sato, K., Ishida, M., Iketani, S., Maeda, I., Okamoto, K., Urban, Z., Onoue, S. & Seyama, Y. 2008. Characterization of the molecular interaction between tropoelastin and DANCE/fibulin-5. *J Biochem*, 143, 633-9.
- Wadhwa, S., Embree, M., Ameye, L. & Young, M. F. 2005. Mice deficient in biglycan and fibromodulin as a model for temporomandibular joint osteoarthritis. *Cells Tissues Organs*, 181, 136-43.
- Waterston, R. H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J. F., Agarwal, P., et al. 2002. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, 420, 520-62.
- Weber, B. H., Vogt, G., Pruett, R. C., Stohr, H. & Felbor, U. 1994. Mutations in the tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3) in patients with Sorsby's fundus dystrophy. *Nat Genet*, 8, 352-6.
- Wijelath, E. S., Rahman, S., Namekata, M., Murray, J., Nishimura, T., Mostafavi-Pour, Z., Patel, Y., Suda, Y., Humphries, M. J. & Sobel, M. 2006. Heparin-II domain of fibronectin is a vascular endothelial growth factor-binding domain: enhancement of VEGF biological activity by a singular growth factor/matrix protein synergism. *Circ Res*, 99, 853-60.
- Wilson, S. H., Ljubimov, A. V., Morla, A. O., Caballero, S., Shaw, L. C., Spoerri, P. E., Tarnuzzer, R. W. & Grant, M. B. 2003. Fibronectin fragments promote human retinal endothelial cell adhesion and proliferation and ERK activation through alpha5beta1 integrin and PI 3-kinase. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44, 1704-15.
- Witmer, A. N., Vrensen, G. F., Van Noorden, C. J. & Schlingemann, R. O. 2003. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Prog Retin Eye Res*, 22, 1-29.
- Yamaguchi, N., Anand-Apte, B., Lee, M., Sasaki, T., Fukai, N., Shapiro, R., Que, I., Lowik, C., Timpl, R. & Olsen, B. R. 1999. Endostatin inhibits VEGF-induced endothelial cell migration and tumor growth independently of zinc binding. *EMBO J*, 18, 4414-23.
- Yanagisawa, H. & Davis, E. C. 2010. Unraveling the mechanism of elastic fiber assembly: The roles of short fibulins. *Int J Biochem Cell Biol*, 42, 1084-93.
- Yanagisawa, H., Davis, E. C., Starcher, B. C., Ouchi, T., Yanagisawa, M., Richardson, J. A. & Olson, E. N. 2002. Fibulin-5 is an elastin-binding protein essential for elastic fibre development in vivo. *Nature*, 415, 168-71.

- Yang, Z., Camp, N. J., Sun, H., Tong, Z., Gibbs, D., Cameron, D. J., Chen, H., Zhao, Y., Pearson, E., Li, X., Chien, J., Dewan, A., Harmon, J., Bernstein, P. S., Shridhar, V., Zabriskie, N. A., Hoh, J., Howes, K. & Zhang, K. 2006. A variant of the HTRA1 gene increases susceptibility to age-related macular degeneration. *Science*, 314, 992-3.
- Yang, Z., Tong, Z., Chen, Y., Zeng, J., Lu, F., Sun, X., Zhao, C., Wang, K., Davey, L., Chen, H., London, N., Muramatsu, D., Salasar, F., Carmona, R., Kasuga, D., Wang, X., Bedell, M., Dixie, M., Zhao, P., Yang, R., Gibbs, D., Liu, X., Li, Y., Li, C., Campochiaro, B., Constantine, R., Zack, D. J., Campochiaro, P., Fu, Y., Li, D. Y., Katsanis, N. & Zhang, K. 2010. Genetic and functional dissection of HTRA1 and LOC387715 in age-related macular degeneration. *PLoS Genet*, 6, e1000836.
- Young, R. W. 1988. Solar radiation and age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol*, 32, 252-69.
- Yu, H. G., Liu, X., Kiss, S., Connolly, E., Gragoudas, E. S., Michaud, N. A., Bulgakov, O. V., Adamian, M., Deangelis, M. M., Miller, J. W., Li, T. & Kim, I. K. 2008. Increased choroidal neovascularization following laser induction in mice lacking lysyl oxidase-like 1. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 49, 2599-605.
- Zacchigna, L., Vecchione, C., Notte, A., Cordenonsi, M., Dupont, S., Maretto, S., Cifelli, G., Ferrari, A., Maffei, A., Fabbro, C., Braghetta, P., Marino, G., Selvetella, G., Aretini, A., Colonnese, C., Bettarini, U., Russo, G., Soligo, S., Adorno, M., Bonaldo, P., Volpin, D., Piccolo, S., Lembo, G. & Bressan, G. M. 2006. Emilin1 links TGF-beta maturation to blood pressure homeostasis. *Cell*, 124, 929-42.
- Zarbin, M. A. 1998. Age-related macular degeneration: review of pathogenesis. *Eur J Ophthalmol*, 8, 199-206.
- Zarbin, M. A. 2004. Current concepts in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol*, 122, 598-614.
- Zheng, Q., Davis, E. C., Richardson, J. A., Starcher, B. C., Li, T., Gerard, R. D. & Yanagisawa, H. 2007. Molecular analysis of fibulin-5 function during de novo synthesis of elastic fibers. *Mol Cell Biol*, 27, 1083-95.
- Zhou, Y., Poczatek, M. H., Berecek, K. H. & Murphy-Ullrich, J. E. 2006. Thrombospondin 1 mediates angiotensin II induction of TGF-beta activation by cardiac and renal cells under both high and low glucose conditions. *Biochem Biophys Res Commun*, 339, 633-41.
- Zumbrunn, J. & Trueb, B. 1996. Primary structure of a putative serine protease specific for IGF-binding proteins. *FEBS Lett*, 398, 187-92.

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
%	Prozent
>	größer als
≥	größer/gleich
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
A	Adenin
A2E	N-Retinyl-N-Retinylidene Ethanolamin
Aβ	Amyloid-beta
Abb.	Abbildung
ACTB	β-Actin
AD	Morbus Alzheimer (<i>Alzheimer Disease</i>)
aff.	affinitätsgereinigt
AGE	Glykosylierungsendprodukte (<i>advanced glycosylation end products</i>)
AMD	Altersabhängige Makuladegeneration
AP	Alkalische Phosphatase
AP2α	<i>adaptor-related protein complex 2α</i>
APOE	Apolipoprotein E
APS	<i>Ammoniumperoxidsulfatlösung</i>
ARMS2	<i>age-related maculopathy susceptibility 2</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
bFGF	basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor (<i>basic fibroblast growth factor</i>)
Bis-Tris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
bp	Basenpaare
BrM	Bruchsche Membran
bp	Basenpaar(e)
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C2	Komplementfaktor 2
C3	Komplementfaktor 3
C5a	Komplementfaktor 5a
CARASIL	zerebrale autosomal rezessive Arteriopathie mit subkortikalen Infarkten und Leukoenzephalopathie
CC	Verbindungscilium (<i>connecting cilium</i>)
CFD	Komplementfaktor D
CFH	Komplementfaktor H
cm	Zentimeter
CNV	choroidale Neovaskularisation
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CR1	Komplement-Rezeptor-1
CRP	C-reaktives Protein
Ct	<i>cycle threshold</i>
D	Asparagin
DAF	abbaubeschleunigender Faktor
Dapi	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DDR2	Discoidin Domäne Rezeptor 2
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dsDNA	<i>double-strand</i> DNA
E	Effizienz
EBNA	<i>Epstein-Barr nuclear antigen</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBM	choroidale Endothelzell-Basalmembran
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHS	Engelbreth-Holm-Swarm (murines Sarkom)
EL	elastische Schicht (<i>elastic layer</i>)
ELM	äußere Grenzschiicht (<i>external limiting membrane</i>)
ELN	Elastin
Emilin	Elastin-Mikrofibrillen-Interface-lokalisiertes Protein (<i>elastin microfibril interface located protein</i>)
ER	endoplasmatisches Retikulum
et al.	<i>et altera</i> (und andere)
EZM	Extrazellulärmatrix
Fa.	Firma
FAM	Fluoreszein
FB	Faktor B
FBLN	Fibulin
FBN-1	Fibrillin-1
FCS	fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FGF-2	Fibroblasten-Wachstumsfaktor-2 (<i>fibroblast growth factor-2</i>)
Fovea	<i>Fovea centralis</i>
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
G	Guanin
g	Gramm
GA	geographische Atrophie
GAG	Glykosaminoglykane
GCL	Ganglienzellschicht (<i>ganglion cell layer</i>)
H oder His	Histidin
h	<i>hora</i> (Stunde(n))
H ₂ O	<i>hier</i> : destilliertes Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Chlorwasserstoff
HE	Hämatoxylin und Eosin
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
HMW	<i>high molecular weight</i>
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horse radish peroxidase</i>)
HSP	Hitzeschockprotein
HtrA1	<i>high temperature requirement protein A1</i>
ICL	innere kollagene Schicht (<i>inner collagenous layer</i>)
IGF-1	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor-1 (<i>insulin-like growth factor-1</i>)
IGFBP	IGF-bindendes Protein
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
ILM	innere Grenzschiicht (<i>inner limiting membrane</i>)
INL	innere Körnerschicht (<i>inner nuclear layer</i>)
IPL	innere plexiforme Schicht (<i>inner plexiform layer</i>)
IPTG	Isopropyl-β-D-thio-galactopyranosid
IS	innere Segmente der Photorezeptoren (<i>inner segments</i>)
kb	Kilo-Basen
kDa	Kilo-Dalton

Abkürzungen

KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KI	Kazal-Inhibitor
KO	<i>Knockout</i>
l	Liter
LAP	Latenz-assoziiertes Protein (<i>latency-associated protein</i>)
LB	Luria-Bertani
LD	<i>linkage disequilibrium</i>
LD-Block	<i>linkage disequilibrium</i> -Block
LLC	großer Latenz-Komplex (<i>large latency complex</i>)
LOXL-1	Lysyl-Oxidase-ähnlich-1 (<i>lysyl oxidase-like-1</i>)
LTBP	latentes TGF-β bindendes Protein (<i>Latent TGF-beta binding protein</i>)
M	Molar
mA	Milliampère
Makula	<i>Macula lutea</i>
MCP	Membran-Cofaktor-Protein
MEL	mittlere elastische Schicht
MFS	Marfan-Syndrom
mg	Milligramm
MGP	Matrix Gla Protein
min	Minute(n)
ml	Milliliter
MLF	Melanolipofuscin
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MMP	Matrixmetalloproteinase
MP	Melaninpigmente
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NBT/BCIP	<i>nitro-blue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate</i>
NFL	Nervenfaserschicht (<i>nerve fiber layer</i>)
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NNT	Nicotinamid-Nukleotid-Transhydrogenase
NS	Neuronenschicht
O ₂ -	Hyperoxid-Anion
OCL	äußere kollagene Schicht (<i>outer collagenous layer</i>)
OD	optische Dichte
ONL	äußere Körnerschicht (<i>outer nuclear layer</i>)
OPL	äußere plexiforme Schicht (<i>outer plexiform layer</i>)
OriP	<i>origin of plasmid replication of Epstein-Barr virus</i>
OS	äußere Segmente der Photorezeptoren (<i>outer segments</i>)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PASW	<i>Predictive Analytics Software</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PCV	polpoidale choroidale Vaskulopathie
PDGF	Blutplättchen-abgeleiteter Wachstumsfaktor (<i>platelet-derived growth factor</i>)
PDZ	Proteininteraktionsdomäne
PEDF	Pigmentepithel-abgeleiteter Wachstumsfaktor (<i>pigment epithelium-derived growth factor</i>)
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
PVDF	Polyvinylidenflourid
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay</i>

Abkürzungen

RNA	Ribonukleinsäure
RNase H	Ribonuklease H
RPE	retinales Pigmentepithel
RPEBM	RPE-Basalmembran
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
S	Serin
SAM	<i>senescence accelerated mice</i>
SAP	<i>Shrimp alkaline phosphatase</i>
SCR7	<i>short consensus repeat 7</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SFD	Sorsby-Fundus-Dystrophie
sek	Sekunde(n)
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
sog.	sogenannte
SRF	<i>serum response factor</i>
SV40	<i>Simian Virus 40</i>
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TBST	<i>tris-buffered saline with tween</i>
TCE	Trichlorethan
TE	Tropoelastin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
TGF- β	transformierender Wachstumsfaktor-beta (<i>transforming growth factor-beta</i>)
T _{hyb}	Hybridisierungstemperatur
TIMP3	Gewebeinhibitor von Metalloproteinasen-3 (<i>tissue inhibitor of metalloproteinases-3</i>)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSP-1	Thrombospondin-1
U	<i>unit</i>
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolett
V	Volt
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (<i>vascular endothelial growth factor</i>)
WT	Wildtyp
x g	Zentrifugalbeschleunigung als Vielfaches der Erdbeschleunigung
Y	Tyrosin
z. B.	zum Beispiel
ZBA	Zentrale Bioanalytik
ZMMK	Zentrum für Molekulare Medizin der Universität zu Köln

Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Fauser für die Möglichkeit der Erstellung dieser Arbeit bedanken und insbesondere für die Bereitschaft, über Ergebnisse, Probleme und deren Lösungsmöglichkeiten zu diskutieren.

Außerdem danke ich meinen Tutoren Herrn Prof. Dr. Paulsson und Herrn Dr. Wollnik für die kompetente Betreuung dieser Arbeit und die konstruktiven Gespräche.

Bei Herrn Dr. Mütter bedanke ich mich für die Hilfe in allen medizinischen Fragen sowie die Einführung in die Methodik des SD-OCT und der flatmounts.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Frank Lacina für seine tolle Unterstützung und seinen unermüdlichen Einsatz bei der Tierzucht. Danke auch für die aufbauenden Worte und Deine lockere Art, durch die mir das Arbeiten mit Dir immer viel Freude gemacht hat.

Bei Herrn Christian Hoffmann möchte ich mich für die Unterstützung und Hilfe bei der Elektronenmikroskopie bedanken.

Bei Bea, Martina, Sigrun und Bigi möchte ich mich für die immer angenehmen Mittagspausen sowie die ständige Hilfsbereitschaft, die großen und kleinen Probleme des Laboralltags zu meistern, bedanken. Bea, Dir gilt ein besonderer Dank für die vielen aufbauenden Gespräche und die Einarbeitung in mein Projekt. Martina, Dir danke ich zudem herzlich für die Unterstützung bei den histologischen Arbeiten.

Katharina, Rodica, Gaby, Robert, und Rafael danke ich für die freundliche Atmosphäre im Labor und die Hilfsbereitschaft in jeder Situation. Katharina, ein ganz lieber Dank geht an Dich für das Korrekturlesen dieser Arbeit und die schöne Zeit beim Sport.

Ein liebevoller Dank geht an meine Familie, meine Freunde und insbesondere an Ralph, der mich durch Höhen und Tiefen begleitet hat und immer für mich da war.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten, und Abbildungen - , die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn PD Dr. Fauser am Institut für Augenheilkunde der Uniklinik Köln betreut worden.

Teilpublikationen:

S. Vierkotten, P.S. Muether and S. Fauser. Overexpression of HTRA1 Leads to Ultrastructural Changes in the Elastic Layer of Bruch's Membrane via Cleavage of Extracellular Matrix Components. PLoS One. 2011; 6(8): e22959.

Ich versichere, dass ich alle Angaben wahrheitsgemäß nach bestem Wissen und Gewissen gemacht habe und verpflichte mich, jedmögliche, die obigen Angaben betreffenden Veränderungen, dem Promotionsausschuss unverzüglich mitzuteilen.

.....

Datum

.....

Unterschrift

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Sarah Vierkotten
Geburtsdatum	25.10.1979
Geburtsort	Bergisch Gladbach
Familienstand	ledig

Schulische Ausbildung

1986-1990	Grundschule am Broich, Bergisch Gladbach
1990-1999	Dietrich-Bonhoeffer-Gymnasium Bergisch Gladbach

Akademische Ausbildung

1999-2001	Colorado Mountain College, Steamboat Springs, Colorado (USA)
2001-2007	Biologiestudium an der Universität zu Köln

Diplomarbeit am Zentrum für Biochemie II der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln bei Prof. Dr. Mats Paulsson, Thema: "Charakterisierung der PACSIN2-Ionenkanal Interaktion"

2008-lfd.	Promotion an der medizinischen Fakultät der Universität zu Köln am Institut für Augenheilkunde bei Prof. Dr. Kirchhof
-----------	---

.....
Datum

.....
Unterschrift