

*AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR MUND-, KIEFER- UND GESICHTSCHIRURGIE  
PROF. DR. DR. REICHERT  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG*

*DIE WIRKUNG DES KOMPLEMENTREGULATOR PROPERDIN AUF  
GESTRESSTE RETINALE PIGMENTEPITHELZELLEN*

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
*der Zahnmedizin (Dr. med. dent.)*

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
*Maria Theresa Reichenthaler*

2020



*AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR MUND-, KIEFER- UND GESICHTSCHIRURGIE  
PROF. DR. DR. REICHERT  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG*

*DIE WIRKUNG DES KOMPLEMENTREGULATOR PROPERDIN AUF  
GESTRESSTE RETINALE PIGMENTEPITHELZELLEN*

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
*der Zahnmedizin (Dr. med. dent.)*

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
*Maria Theresa Reichenthaler*

2020

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter: PD Dr. Richard Bauer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Marina Kreutz

Tag der mündlichen Prüfung: 20.11.2020

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung</b> .....	<b>6</b>
1.1. Kurzbeschreibung .....	6
1.2. Grafische Zusammenfassung .....	8
1.3. <i>Abstract (engl.)</i> .....	8
<b>2. Einleitung</b> .....	<b>10</b>
2.1. Das retinale Pigmentepithel .....	10
2.2. Das RPE als Zellkulturmodell.....	10
2.3. Oxidativer Stress schädigt das RPE.....	11
2.4. Oxidativer Stress beeinflusst das Komplementsystem.....	12
2.4.1. Der Komplementaktivator Properdin.....	14
<b>3. Zielsetzung</b> .....	<b>15</b>
<b>4. Material</b> .....	<b>16</b>
4.1. Zelllinie .....	16
4.2. Zellkulturmedien.....	16
4.3. Antikörper .....	17
4.4. Primer .....	18
4.5. Puffer .....	19
4.6. Chemikalien .....	21
4.7. Proteine .....	22
4.8. Zusammensetzung der Gele für den Western Blot .....	22
4.9. Kit-Systeme.....	23
4.10. Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	23
4.11. Software .....	24
<b>5. Methoden</b> .....	<b>25</b>
5.1. Zellkultur .....	25
5.1.1. Aussaat der Zellen.....	25
5.1.2. Kultivierung der ARPE-19-Zellen.....	26
5.1.3. Behandlung.....	27
5.1.4. Zellernte.....	28

<b>5.2.</b>	<b>Immunfärbungen .....</b>	<b>28</b>
<b>5.3.</b>	<b>Analyse der mRNA Expression .....</b>	<b>29</b>
<b>5.4.</b>	<b>Analyse der zellulären Proteine .....</b>	<b>30</b>
5.4.1.	Polyacrylamidgel Elektrophorese (SDS-PAGE) .....	30
5.4.2.	Western Blot .....	31
<b>5.5.</b>	<b>Analyse der Proteine im apikalen Überstand .....</b>	<b>32</b>
5.5.1.	Sandwich-ELISA (engl.: <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> ) .....	32
5.5.2.	Multiplex-ELISA .....	33
<b>5.6.</b>	<b>Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes und der Membranfläche .....</b>	<b>33</b>
<b>5.7.</b>	<b>Statistische Analysen .....</b>	<b>34</b>
<b>5.8.</b>	<b>Software .....</b>	<b>34</b>
<b>6.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>35</b>
<b>6.1.</b>	<b>ARPE-19 Zellkultivierung ist physiologischer unter KM1-Bedingungen .....</b>	<b>35</b>
6.1.1.	KM1 führt zu physiologischem Zellwachstum .....	35
6.1.2.	mRNA-Transkription weist auf unterschiedliche Zellstadien von KM1 und KM2 hin .....	36
<b>6.2.</b>	<b>Exogenes Properdin stimuliert eine Rückkopplungsschleife zur Selbstregulation von Properdin .....</b>	<b>40</b>
6.2.1.	Properdin bindet an gestresste Zellen .....	40
6.2.2.	Exogenes Properdin verändert die Expression gestresster ARPE-19-Zellen .....	42
6.2.3.	Exogenes Properdin erhöht die apikale Properdinsekretion .....	44
<b>6.3.</b>	<b>Apikale Sekretion und CFI-Akkumulation von ARPE-19 Zellen unterliegen dem Einfluss von Properdin .....</b>	<b>45</b>
6.3.1.	Exogenes Properdin reguliert die Sekretion von Komplementfaktoren .....	45
6.3.2.	Exogenes Properdin führt zur Steigerung des zellassoziierten CFI .....	47
<b>6.4.</b>	<b>Bestandteile von Properdin-depletiertem Serum haben Auswirkung auf Expression und Sekretion von gestressten ARPE-19 Zellen .....</b>	<b>48</b>
6.4.1.	Behandlung mit Serum verändert die Expression, zusätzliches Properdin hat keinen Einfluss .....	48
6.4.2.	Gesteigerte apikale Properdin-Sekretion nach Properdin-Behandlung wird durch Serumbestandteile verringert .....	50
<b>7.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>52</b>
<b>7.1.</b>	<b>Unterschiedliche ARPE-19 Zellkultivierungsmethoden resultieren in verschiedenen Zellphänotypen und Expressionsmustern unter Stress .....</b>	<b>52</b>
<b>7.2.</b>	<b>Exogenes Properdin beeinflusst das Zellgleichgewicht gestresster ARPE-19 Zellen und initiiert eine Selbstregulation .....</b>	<b>55</b>
<b>7.3.</b>	<b>Expression und Sekretion gestresster ARPE-19 Zellen unterliegt einer Modulation durch Bestandteile von Properdin<sup>dpl</sup> Serum .....</b>	<b>58</b>

<b>8. Schlussfolgerung und Ausblick.....</b>	<b>61</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>I</b>
<b>Glossar .....</b>	<b>VI</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>VIII</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>IX</b>
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>X</b>
<b>Erklärung an Eides statt.....</b>	<b>XVI</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>XVII</b>

# 1. Zusammenfassung

## 1.1. Kurzbeschreibung

Der Lichteinfall im Auge, der uns die visuelle Wahrnehmung unserer Umgebung ermöglicht, führt in der Retina zu einer Belastung der Zellen mit oxidativem Stress. Als Reaktion darauf kommt es zur Aktivierung des Komplementsystems, welches eine bedeutende Rolle in der Pathogenese verschiedener Augenerkrankungen spielt.

In der vorliegenden Dissertation werden Forschungen zur Funktion des Komplementstabilisierenden Modulators Properdin an ARPE-19 Zellen, einer humanen retinalen Pigmentepithel (RPE) -Zelllinie, unter oxidativem Stress angestellt. Zunächst wurde eine RPE-Kultivierungsmethode herausgearbeitet, durch die die zellmorphologischen Merkmale von ARPE-19 Zellen *in vitro* deutlicher realisiert werden konnten, als durch die bisher in der Arbeitsgruppe etablierte Kultivierungsmethode. Durch eine ZO1-Färbung konnte für die pigmentierten Zellen eine markantere Ausbildung der RPE-typischen „Pflasterstein-Form“ und der Zell-Zell-Kontakte, die zur Ausbildung einer epithelialen Einzelzellschicht führen, sichtbar gemacht werden. Auch in Hinsicht auf die Werte für den transepithelialen Widerstand und die Membranfläche waren die Zellen der neuen Kultivierungsmethode überlegen. Nichtsdestotrotz konnte im Vergleich der Zellen beider Kultivierungsmethoden unter oxidativen Stressbedingungen eine korrelierende Expressionsänderung der Komplementfaktoren *ctsl*, *il-1 $\beta$* , *c5aR* und *nlrp3* mittels qPCR festgestellt werden.

ARPE-19 Zellen, anhand der neuen Methode kultiviert und weiterhin oxidativem Stress ausgesetzt, wurden daraufhin mit exogenem Properdin behandelt. Dabei wurde durch Immunfärbungen und Western Blot ersichtlich, dass exogenes Properdin an die gestressten Zellen bindet. Auf mRNA-Ebene induzierte das exogene Properdin nach 4 h eine Steigerung der Expression für die Komplementfaktoren *il-18*, *ctsl* und *cfp*, sowie eine Verringerung für *nlrp3*. Durch einen Sandwich-ELISA wurde im apikalen Überstand vermehrt Properdin, das von der Zelle selbst gebildet wurde, detektiert. So konnte geschlussfolgert werden, dass Properdin sich selbst in einer Rückkopplungsschleife reguliert, indem es an die Zellen bindet, deren Expression beeinflusst und die apikale Sekretion von Properdin steigert, welches wiederum an die Zelle bindet. Zusätzlich konnte in Hinsicht auf die apikale Sekretion der ARPE-19 Zellen ein steigernder Effekt des exogenen Properdins auf die Ausschüttung der

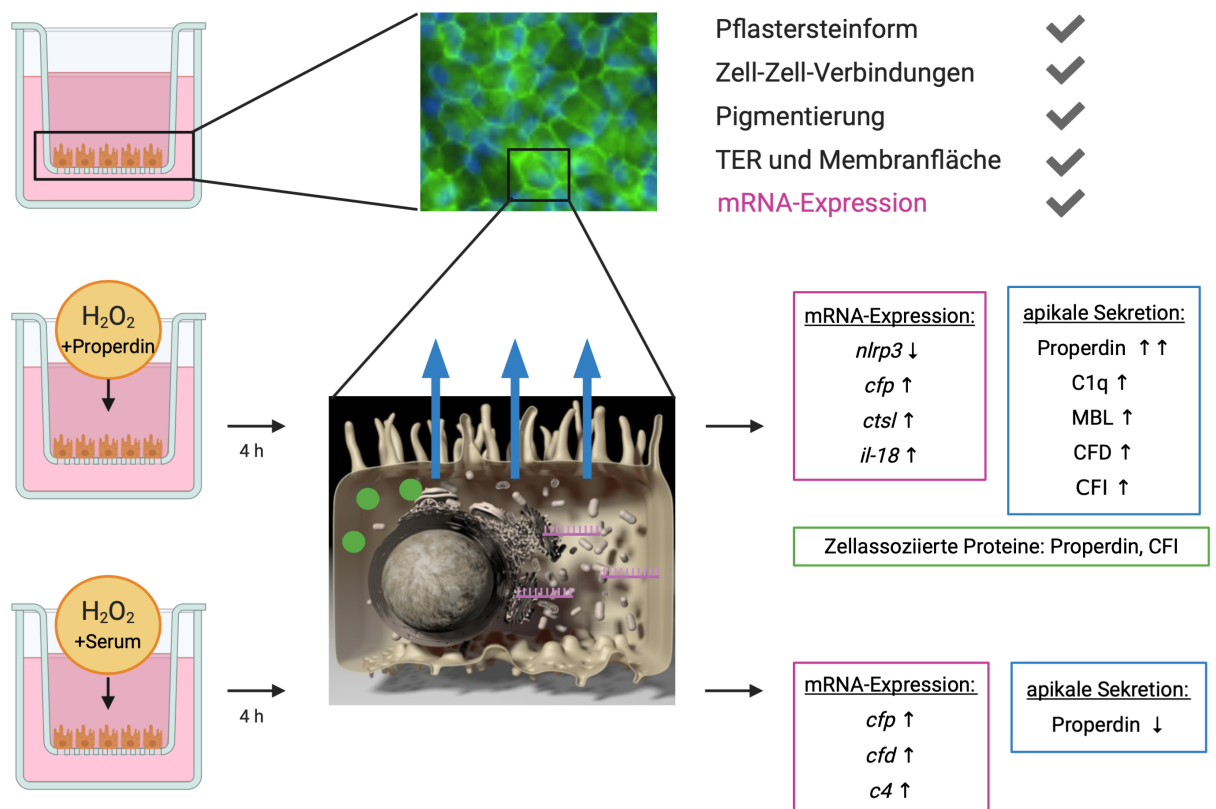


Komplementfaktoren C1q, MBL, CFD und CFI mittels Multiplex-ELISA beobachtet werden.

Im nächsten Schritt wurden die ARPE-19 Zellen mit Serum behandelt, welches alle Bestandteile, außer Properdin, enthielt. Dies führte zu einer zeitabhängigen Erhöhung der Expression von *cfp*, *efd* und *c4* nach 4 h im Vergleich zu lediglich gestressten Zellen. Die Komplettierung des Serums durch Properdin hatte auf dieses Ergebnis keine signifikanten Auswirkungen. Jedoch wurde die durch exogenes Properdin deutlich gesteigerte Sekretion von Properdin durch die Beteiligung der anderen Faktoren aus dem Serum abgeschwächt. Der Selbstregulationszyklus von Properdin wird also in Anwesenheit der Gänze von Komplementfaktoren durch andere Effekte überlagert.

In der Gesamtheit konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der singuläre Komplementregulator Properdin die Zellphysiologie von gestressten RPE-Zellen regulieren kann, diese Wirkung aber im Zusammenspiel aller Serumproteine gegenreguliert wird um ein homöostatisches Gleichgewicht zu gewährleisten.

## 1.2. Grafische Zusammenfassung



**Abbildung 1: Grafische Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Arbeit**

Die Genexpression und Proteinsekretion von *in vivo*-ähnlichen ARPE-19 Zellen wurde untersucht.  $H_2O_2$ -gestresste Zellen wurden dabei mit  $H_2O_2$ - und Properdin-behandelten Zellen bzw.  $H_2O_2$ - und Serum-behandelten Zellen gegenübergestellt. Software: BioRender

## 1.3. Abstract (engl.)

*For the perception of the environment our eyes are exposed to light, resulting in oxidative stress for the retinal cells. They react with an activation of the complement system, which is relevant for the pathogenesis of various eye diseases.*

*In this thesis the role of the complement stabilizing regulator properdin was investigated on ARPE-19 cells, a human RPE-cell line, under oxidative stress conditions. First, a cultivation method was developed, which revealed the cell morphological characteristics of ARPE-19 cells in vitro better than the former*

*cultivation method in the working group. The typical „cobblestone appearance“ and tight junctions, resulting in an epithelial monolayer, could be achieved in pigmented cells, as shown by ZO1-staining. The cells of the new cultivation method showed increased transepithelial resistance and the membrane capacity as well. Nevertheless, the cells of both cultivation methods showed correlative changes in expression for the complement factors *ctsl*, *il-1 β*, *c5aR* and *nlrp3*, when exposed to oxidative stress. This was detected via qPCR.*

*ARPE-19 cells, cultivated by the new method and still exposed to oxidative stress, were thereupon treated with exogenous properdin. It appeared in immunostainings and western blot, that exogenous properdin binds to the stressed cells. After 4 h the exogenous properdin induced an increase of expression on mRNA-level for *il-18*, *ctsl* and *cfp*, as well as a decrease for *nlrp3*. Via sandwich-ELISA more properdin, produced by the cell, could be detected in the apical supernatant. The conclusion was drawn that properdin regulates itself in a feedback loop, by binding to the cells, influencing their expression and increasing their apical secretion of properdin, which will bind to the cells again. Additionally the exogenous properdin also had an increasing effect on the apical secretion of *C1q*, *MBL*, *CFD* and *CFI* of the ARPE-19 cells, as shown by Multiplex-ELISA.*

*In the next step ARPE-19 cells were treated with properdin-depleted serum. This resulted in a time-dependent increase in mRNA expression after 4 h of *cfp*, *cfD* and *c4* in comparison to stressed cells. Completing the serum with properdin had no significant effect on that. However, the increased secretion of properdin, triggered by treatment with exogenous properdin, was reduced by the other factors in the serum. Thus, the feedback loop of properdin is overlapped by other effects if all complement components interact.*

*In summary this thesis shows that the singular complement regulator properdin can regulate the cell physiology of stressed RPE-cells, but also that all serum proteins together go against this effect to ensure a homeostatic balance.*

## 2. Einleitung

### 2.1. Das retinale Pigmentepithel

Das retinale Pigmentepithel (RPE) stellt im anatomischen Sinn die äußerste Schicht der Retina dar. Es handelt sich dabei um eine einzellige Barrierschicht, die einen essentiellen Beitrag zur Aufrechterhaltung des Sehvermögens leistet. Bereits in der embryologischen Entwicklung des menschlichen Auges besteht eine Wechselwirkung zwischen der neuronalen Retina und dem RPE (1). Physiologisch interagiert jede Pigmentepithelzelle mit mehr als 20 Photorezeptoren in der Fovea centralis (1). Die wichtigsten Aufgaben des RPEs bestehen in der Absorption von Streulicht, dem transepithelialen Austausch von Wasser und Nährstoffen, dem Recycling der Photorezeptoraußensegmente, sowie der Ausschüttung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen (2).

### 2.2. Das RPE als Zellkulturmodell

Zur Erforschung dieser Epithelschicht in Zellkultur werden verschiedene *in vitro*-Modelle bemüht. Dabei am häufigsten eingesetzt werden primäre humane RPE-Zellen, beispielsweise fötales humanes RPE, und Zelllinien, wie ARPE-19 Zellen (3), welche auch für diese Arbeit verwendet wurden. Die primären Zellen, entnommen aus gespendetem Netzhaut-Gewebe, haben den Vorteil hinsichtlich Pigmentierung, Größe, Form und Werten für den transepithelialen Widerstand der Situation *in vivo* am nächsten zu kommen (3). Außerdem wurde eine große Ähnlichkeit zu nativen RPE-Zellen hinsichtlich Genom- und Proteinstruktur beschrieben (4). Allerdings ist die Nutzung der primären humanen Zellen zu Forschungszwecken mit einem erschwerten Aufwand und eingeschränkter Verfügbarkeit verbunden. Dieses Problem der limitierten Zugänglichkeit kann durch die Verwendung etablierter Zelllinien umgangen werden. Die am besten erforschte RPE-Zelllinie ist die ARPE-19 Zelllinie, welche aus dem Auge eines 19-jährigen männlichen Spenders mit normaler Karyologie stammt (5). Weitere Vorteile dieser Zelllinie sind der weitreichende Forschungsstand und die bisherige Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die Situation *in vivo*.

Allerdings wird beschrieben, dass ARPE-19 Zellen eher die Situation in gealtertem RPE widerspiegeln (3). Außerdem fehlen, im Vergleich zu primären Zellen, wichtige Hormone und Enzyme während der Zellkultivierung, was zu einer unvollständigen Differenzierung führt. Zudem verlieren die ARPE-19 Zellen mit zunehmender Passage-Zahl ihren Phänotyp, weswegen Zellen mit einer Passage >30 nicht mehr für die RPE-Forschung verwendet werden sollten (3).

Eine weitere Alternative zur Erforschung des RPE ist die Nutzung von humanen Stammzellen. Die Stammzellen können durch selektionierende Kultivierungsbedingungen und dem Einfluss von speziellen Faktoren der embryologischen RPE-Entwicklung, wie Nicotinamid, zur Differenzierung in RPE-Zellen stimuliert werden (6). Allerdings handelt es sich dabei um einen diffizilen, störungsanfälligen und langwierigen Vorgang.

Zusätzlich zu humanen Zellen stehen für die grundlegende Erforschung der Vorgänge im RPE auch Maus-Modelle zur Verfügung. Hier besteht die Möglichkeit auf die RPE-Zellen, bevor sie entnommen werden, je nach Forschungsfrage, *in vivo* einzuwirken. Allerdings können Ergebnisse in einem Maus-Modell nur bedingt auf den menschlichen Organismus übertragen werden.

Aufgrund dieser Abwägungen der verschiedenen RPE-Zellkulturmodelle wurde für die vorliegende Arbeit auf die ARPE-19 Zelllinie zurückgegriffen (wohlweislich der bekannten Vor- und Nachteile).

### 2.3. Oxidativer Stress schädigt das RPE

Aufgrund der hohen Lichtexposition, dem enormen Sauerstoffverbrauch und dem großen Anteil an ungesättigten Fettsäuren in der Netzhaut, ist das RPE sehr oft dem Risiko von oxidativem Stress ausgesetzt. Die phagozytotische Aktivität des RPEs verstärkt dies zusätzlich (2). Chemisch gesehen meint "oxidativer Stress" das Vorhandensein von reaktiven Sauerstoffverbindungen, wie sie durch körpereigene Stoffwechselfvorgänge auf zellulärer Ebene entstehen - In einem Zustand der Balance zwischen Oxidantien und Antioxidantien ist die Aktivierung von Sauerstoff zur Reaktion mit anderen biologischen Molekülen demnach ein physiologischer Vorgang (7). Demzufolge trägt auch das Fehlen von Antioxidantien zu den Bedingungen für "oxidativen Stress" bei (7). Speziell im Auge sind photodynamische Prozesse die

Ursache von oxidativem Stress. Die akute oder chronische Einwirkung von weißem Licht führt zu gesteigertem Verbrauch der Disci in den äußeren Segmenten der Photorezeptoren (ÄSP) (8). Dabei werden mehrfach ungesättigte Fettsäuren in den ÄSP peroxidiert (9), die durch das RPE anschließend recycelt werden. In den RPE-Zellen werden im Rahmen des Recyclings der ÄSP-Disci Lipofuscin-Granula angereichert, die eine große Menge des fluoreszierenden Pigmentes A2-E beinhalten (10). Dieses A2-E schafft eine reaktive Sauerstoffspezies im Auge und ist damit entscheidend für oxidativen Stress (11).

Im gesamten Körper ist der oxidative Stress Ausgangspunkt für viele Erkrankungen. Speziell im Auge können die Netzhautischämie, die diabetische Retinopathie, das Glaukom und die altersbedingte Makuladegeneration (AMD) in Verbindung mit oxidativem Stress gebracht werden (7,12).

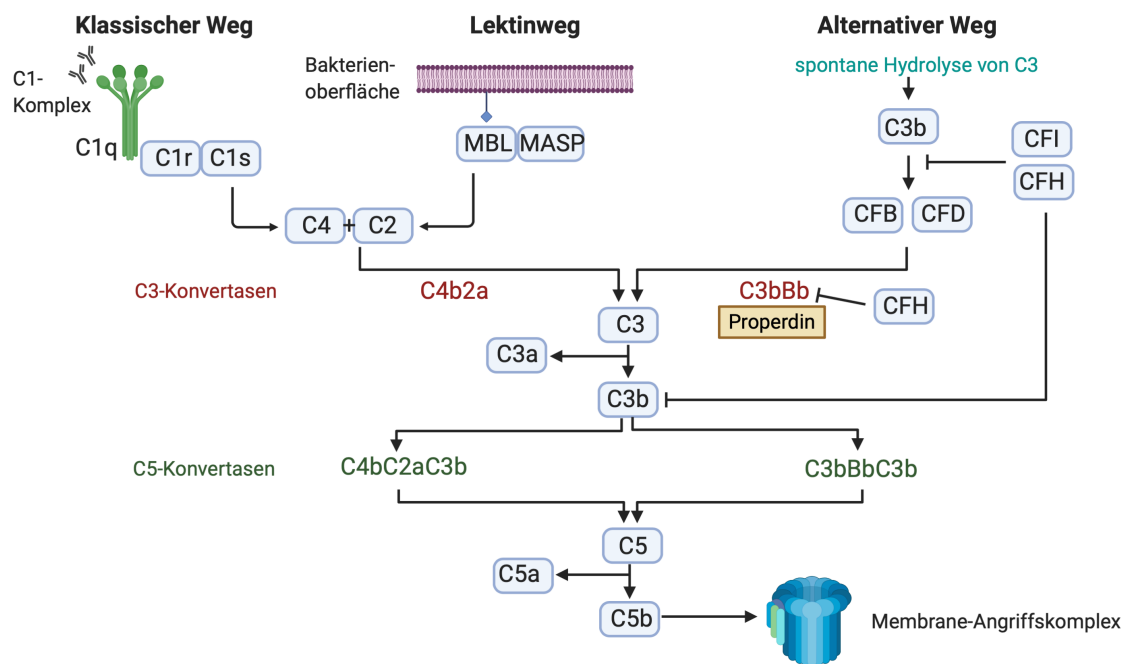
Verbreitete Methoden zur Initiierung von oxidativem Stress in RPE-Zellkultur sind Behandlungen mit Zigarettenrauch, weißem Licht oder Natrium-Iodat (10). Die jedoch meist verwendete Verbindung ist Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), die auch in dieser Arbeit genutzt wurde.

## 2.4. Oxidativer Stress beeinflusst das Komplementsystem

Wirkt oxidativer Stress auf RPE-Zellen, kann dies in einer Immunreaktion durch die Aktivierung des Komplementsystems resultieren, worin ein Pathogenitätsmechanismus verschiedener Augenerkrankungen, wie beispielsweise der AMD, begründet liegen kann (13). Die AMD ist weltweit ein Hauptgrund für Erblindungen. Sie ist eine multifaktorielle Erkrankung, bei der u.a. Einzelnukleotidpolymorphismen in Genen des Komplementsystems und oxidativer Stress zusammenspielen und einen pathologischen Prozess in Gang bringen (14). Die genauen Abläufe dabei sind im Moment noch Gegenstand der Forschung.

Das Komplementsystem (**Abbildung 2**) ist Teil des angeborenen Immunsystems und besteht aus mehr als 40 verschiedenen Plasmaproteinen, die hauptsächlich in der Leber und von Immunzellen gebildet werden (15,16). Wie in Abbildung 2 dargestellt, kann dieses System auf drei verschiedenen Wegen aktiviert werden: dem klassischen Weg, dem Lektin-Weg und dem alternativen Weg (17). In Folge darauf läuft das System in einer Kettenreaktion, ähnlich der Blutgerinnung, ab und endet in einer

gemeinsamen Endstrecke aller drei Wege, beginnend mit der Bildung der C3-Konvertasen (**Abbildung 2**). Am Ende steht die Bildung des Membran-Angriffskomplexes, der zum Zelltod der Zielzelle führt, indem er in deren Zellmembran eine Pore bildet (15). Damit trägt das Komplementsystem zur Bekämpfung körperfremder Zellen bei.



**Abbildung 2: Übersicht Komplementkaskade**

Die Komplementkaskade wird über drei verschiedene Wege aktiviert, die in der Formation der C3- und C5-spaltenden Enzymkomplexe resultieren. Properdin (gelb) stabilisiert dabei die C3-Konvertase des alternativen Weges. Die biologisch aktiven Endprodukte sind dabei die Anaphylatoxine (C3a, C5a) und der Membran-Angriffskomplex. Software: BioRender

Neueste Forschungsergebnisse zeigen, dass die Komplementfaktoren auch lokal im Auge, im RPE und anderen Zellen der Retina gebildet werden (8). Dabei ist eine dauerhaft geringe Komplementaktivierung im Auge physiologisch, die durch lokale regulatorische Faktoren unter Kontrolle gehalten wird (18). In zahlreichen Studien wurde bereits untersucht, inwieweit sich oxidativer Stress auf das retinale Komplementsystem auswirkt. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> die protektive Komplementregulation auf der Oberfläche von RPE-Zellen reduziert und eine sublytische Komplementaktivierung initiiert (20). Außerdem führt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu einer

gesteigerten Expression von Komplementrezeptoren und dazu, dass sich Komplementproteine in den RPE-Zellen anreichern (21).

Dem gegenüber steht, dass durch das Recycling der ÄSP-Disci oxidative Stressepitope entstehen, die durch den Komplementfaktor H (CFH) erkannt werden, woraufhin die Aktivierung des alternativen Weges gehemmt wird (19). CFH stellt, wie zahlreiche andere Komplementfaktoren, einen Modulator der Komplementkaskade dar (**Abbildung 2**). Zu den wichtigsten Regulatoren des Komplementsystems zählen zusätzlich der Inhibitor Komplementfaktor I (CFI) und der Aktivator Properdin.

Ein interessanter und bisher unerforschter Aspekt in diesem Zusammenhang ist, wie Modulatoren der Komplementkaskade auf die Stressreaktionen des RPEs Einfluss nehmen können. Es wurde zwar eine Wirkung von Serum, als Gesamtheit aller Komplementfaktoren, auf gestresste RPE-Zellen beschrieben (20), doch bleibt die Funktion einzelner Komplementmodulatoren dabei unklar.

#### 2.4.1. Der Komplementaktivator Properdin

Ein dabei besonders wichtiger Modulator ist Properdin. Dieses Molekül stabilisiert die C3-Konvertase C3bBb (**Abbildung 2**), wodurch es sich als Positivregulator des alternativen Weges auszeichnet und somit als Gegenspieler von CFH (22) auftritt. Physiologisch liegt Properdin als Dimer oder als Multimer in Humanplasma vor (23,24). Es ist bekannt, dass Properdin an nekrotische und tote Zellen, sowie an Zellen in maligner Transformation bindet (25). In diesem Sinne ist Properdin an zahlreichen Krankheiten beteiligt, darunter verschiedene Infektionskrankheiten, Erkrankungen der Nieren, Kardiovaskuläre Krankheiten und entzündlichen Erkrankungen wie die AMD (22).

Da die lokale Beeinflussung des Komplementsystems am RPE durch oxidativen Stress als Risikofaktor für die Entstehung von Netzhautdegenerationen bekannt ist, ist es im Rahmen dieser Arbeit von besonderem Interesse, welche Funktion dabei der Stabilisator des Komplementsystems, Properdin, übernimmt.



### 3. Zielsetzung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit den Auswirkungen, die Properdin auf ARPE-19 Zellen hat, die mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gestresst wurden.

- Dabei sollte zunächst eine Kultivierungsweise von ARPE-19 Zellen etabliert werden, die ein *in vitro* RPE-Zellkulturmodell mit voll ausdifferenzierten, physiologischen Charakteristika hervorbringt.
- Anhand dieser Zellen sollte erforscht werden, inwieweit isolierte Properdin-Moleküle eine Bindung zu gestressten RPE-Zellen eingehen und sich auf deren Expressions- und Sekretionsmuster auswirken.  
(Ohne den summierten Einfluss aller 40 Komplementproteine zu beachten)
- Außerdem sollte in einer gegenteiligen experimentellen Umgebung, in der die gestressten RPE-Zellen dem Einfluss aller Komplementkomponenten, außer Properdin, unterliegen, das RPE-Expressionsmuster untersucht werden.
- Eine anschließende Zugabe von Properdin sollte die möglichen gemeinsamen Auswirkungen von Serum mit Properdin auf RPE-Zellen auf mRNA-Ebene analysieren.

Zusammenfassend sollte herausgearbeitet werden, ob Properdin einen Einfluss auf das RPE-Zellgleichgewicht ausüben kann.

## 4. Material

### 4.1. Zelllinie

Tabelle 1: Verwendete Zelllinie

Zelllinie	Spezies	Ursprungszelltyp	Referenz
ARPE-19	Homo sapiens	Retinale Pigmentepithelzellen	American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA

### 4.2. Zellkulturmedien

Tabelle 2: Zusammensetzung Zellkulturmedium KM1

Name	Referenz	Bestellnr.	Menge
Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose (=DMEM)	(Gibco) Life Technologies, Darmstadt, Deutschland	D5796-500ml	500 ml
Fötale Kälberserum (FCS)	(Gibco) Life Technologies, Darmstadt, Deutschland	10270-106	5 ml
Penicillin-Streptomycin	(Gibco) Life Technologies, Darmstadt, Deutschland	15140-122	5 ml
Na-Pyruvate	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	P5280-25G	500 µl

Tabelle 3: Zusammensetzung Zellkulturmedium KM2

Name	Referenz	Bestellnr	Menge
Dulbecco's Modified Eagle's Medium F12 Ham	(Gibco) Life Technologies, Darmstadt, Deutschland	D8062-500ml	500 ml
Fötale Kälberserum (FCS)	(Gibco) Life Technologies, Darmstadt, Deutschland	10270-106	50 ml
Penicillin-Streptomycin	(Gibco) Life Technologies, Darmstadt, Deutschland	15140-122	5 ml

## 4.3. Antikörper

Tabelle 4: Verwendete Primärantikörper

Antikörper	Klonalität	Spezies	Gebrauch	Referenz	Bestellnr.	LOT-Nr.
Anti-ZO1 IgG	pAk	Kaninchen	Immunfärbung	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	61-7300	RF232767
Anti- Properdin IgG	pAk	Ziege	Immunfärbung	Complement Technology, Tyler, TX, USA	A239	4b
Anti- Properdin IgG	mAk	Maus	ELISA	Quidel Corporation, San Diego, CA, USA	A233	112453
Anti- Properdin IgG	pAk	Ziege	Western Blot	Complement Technology, Tyler, TX, USA	-	-
Anti-GAPDH IgG	pAk	Kaninchen	Western Blot	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA	3683s	4
Anti-CFI IgG	pAk	Ziege	Western Blot	Quidel Corporation, San Diego, CA, USA	A313	910260

Tabelle 5: Verwendete Sekundärreagenzien

Reagenz	Spezies	Gebrauch	Referenz	Bestellnr.
Anti- Kaninchen- Alexa Fluor 488	Esel	Immunfärbung	Jackson ImmunoResearch, Cambridge, UK	711 - 545 - 152
HOECHST 33342	-	Immunfärbung	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	H1399
Anti-Ziege-Cy3	Kaninchen	Immunfärbung	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	C2821
Anti- Properdin- biotin	Maus	ELISA	Eigenarbeit der AG (biotinyliert)	-

Streptavidin- Peroxidase (SA-POD)	-	ELISA / Western Blot	Jackson ImmunoResearch, Cambridge, UK	016-030-084
---	---	-------------------------	--	-------------

## 4.4. Primer

Tabelle 6: Verwendete Primer

Primer	Sequenz	Firma	Katalognummer	LOT- Nummer
gapdh	unbekannt	Qiagen, Venlo, Niederlande	QT00079247	257436479
nlrp3	unbekannt	Qiagen, Venlo, Niederlande	QT00029771	216403028
foxp3	unbekannt	Qiagen, Venlo, Niederlande	QT00048286	211478679
cfp	unbekannt	Qiagen, Venlo, Niederlande	QT00010514	278812297
ctsl	unbekannt	Qiagen, Venlo, Niederlande	QT01664978	211479710
ctsb	unbekannt	Qiagen, Venlo, Niederlande	QT00088641	217550298
serping	unbekannt	Qiagen, Venlo, Niederlande	QT00053963	217550295
c5aR2	unbekannt	Qiagen, Venlo, Niederlande	QT00243971	219450997
cd46	unbekannt	Qiagen, Venlo, Niederlande	QT00073689	193676837
cd59	unbekannt	Qiagen, Venlo, Niederlande	QT00035952	193676836
tgfβ	F CATAGCTGACTTCAAGATGTG GT R CCTAGTGAGACTTTGAACCGT	Metabion, Steinkirchen, Deutschland		
il-1	F CTCGCCAGTGAAATGATGGCT R GTCGGAGATTCGTAGCTGGAT	Metabion, Steinkirchen, Deutschland		
il-18	F ACTGTAGAGATAATGCACCCC G R AGTTACAGCCATACCTCTAGG C	Metabion, Steinkirchen, Deutschland		
cfi	unbekannt	Qiagen, Venlo, Niederlande	QT00213794	216403027
cfb	unbekannt	Qiagen, Venlo, Niederlande	QT00212191	217550299
mbl2	unbekannt	Qiagen, Venlo, Niederlande	QT01004227	193676843

c4a	unbekannt	Qiagen, Venlo, Niederlande	QT00237160	216403026
c4b	unbekannt	Qiagen, Venlo, Niederlande	QT00237167	274261599

## 4.5. Puffer

Tabelle 7: Verwendete Puffer

Name	Gebrauch	Zusammensetzung	Menge	Referenz	Bestellnr.
Waschpuffer	ELISA	Wash Buffer	1:10	Euroimmun, Lübeck, Deutschland	E180124BQ
		A.dest			
Blockadepuffer	ELISA	Magermilchpulver	1 g	AppliChem, Darstadt, Deutschland	4S008807
		Waschpuffer	in 50 ml		
HCl-Lösung	ELISA	Rauchende Salzsäure	83 ml	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	X942.1
		A.dest.	in 1 L		
Trenngelpuffer (pH=8,8)	Western Blot	Tris-HCL	1,5 M	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	9090.3
		SDS	0,4%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	2326.2
		A.dest	Ad 200 ml		
Sammelgelpuffer (pH=6,8)	Western Blot	Tris-HCl	0,5 M	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	9090.3
		SDS	0,4 %	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	2326.2
		A.dest.	Ad 200 ml		

Probenpuffer	Western Blot	Roti-Load 1 - reduzierend	4 × konz.	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	K929.1
		Roti-Load 2 – nicht reduzierend	4 × konz.	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	K930.1
Laufpuffer	Western Blot	Tris	250 mM	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	9090.3
		Glycin	1,92 M	Merck Chemicals, Schwalbach, Deutschland	
		SDS	1%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	2326.2
		A.dest	Ad 5 L		
Transferpuffer	Western Blot	Tris	25 mM	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	9090.3
		Glycin	192mM	Merck Chemicals, Schwalbach, Deutschland	
		SDS	0,1 %	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	2326.2
		Methanol	20 %	Merck Chemicals, Schwalbach, Deutschland	1.0600.2500
Blockadepuffer	Western Blot	BSA	3%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	8076.4
		TBST-Puffer			
TBST-Puffer	Western Blot	NaCl	150 mM	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	9265.1

		Tris	100 mM	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	9090.3
		Tween 20	1 ml auf 1 L	AppliChem, Darstadt, Deutschland	A4974,0100
RIPA-Puffer	Proteinisolation			Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA	R0278

## 4.6. Chemikalien

Tabelle 8: Verwendete Chemikalien

Name	Referenz	Bestellnr.
Acrylamide-Solution 30 %	AppliChem, Darstadt, Deutschland	A3626,1000
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	9592.3
Dako Fluorescence Mounting Medium	Dako North America, Carpinteria, CA, USA	S3023
Lumi-Light Western Blotting Substrate	Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz	12015200001
Maus-Laminin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	L2020
Methanol	Merck Chemicals, Schwalbach, Deutschland	1.06007.2500
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	0335.3
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	D8537-500ml
Tetramethylbenzidin (TMB)	Seramun, Heidesee, Deutschland	77411175
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	2367.3
Tris-HCl	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	9090.3

Trypsin-EDTA-Solution	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	T4174
Tween 20	AppliChem, Darstadt, Deutschland	A4974,0100
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Merck Chemicals, Schwalbach, Deutschland	107209
Proteaseinhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	P8340
Phosphataseinhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	P5726

## 4.7. Proteine

*Tabelle 9: Verwendete Proteine*

<b>Protein</b>	<b>Referenz</b>	<b>Bestellnr.</b>
Properdin	Quidel Corporation, San Diego, CA, USA	A412
Properdin-depletiertes Serum	Complement Technology, Tyler, TX, USA	A339
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	8076.4
Ziegenserum	PAA Laboratories, Pasching, Österreich	B15-035
Mausserum	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland	14010
PeqGOLD Protein Marker IV	VWR International, Radnor, PA, USA	27-2110

## 4.8. Zusammensetzung der Gele für den Western Blot

*Tabelle 10: Gele für den Western Blot*

Trenngel	2,5 ml Trenngelpuffer 3,5 ml H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 4,0 ml PAA 25 µl APS 25 µl TEMED
Sammelgel	2,5 ml Sammelgelpuffer 6,1 ml H <sub>2</sub> O 1,3 ml PAA 25 µl APS 25 µl TEMED



## 4.9. Kit-Systeme

Tabelle 11: Verwendete Kit-Systeme

System	Referenz	Bestellnr.	LOT-Nr.
Milliplex MAP Human Complement Magnetic Bead Panel 1	Merck Millipore, Burlington, MA, USA	HCMP1MAG-19K	2989467
Milliplex MAP Human Complement Magnetic Bead Panel 2	Merck Millipore, Burlington, MA, USA	HCMP2MAG-19K	2974409
Nucleospin RNA/Protein Kit	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland	740955250	1711/005
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande	205313	160043873
Rotor Gene Sybr green Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande	204074	163010780

## 4.10. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 12: Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien

Name	Referenz
12-Kavitäten-Kultivierungsplatten	Costar, Washington DC, USA
Blotgerät	BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA
Brutschrank (Hera cell 150)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Deckgläser 24×40 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Feinwaage	Kern, Balingen, Deutschland
Filterpapiere	Whatman, Maidstone, Großbritannien
Gelelektrophoresekamm	BioStep, Burkhardtsdorf, Deutschland
Gelelektrophoreseapparatur Mini-Protean	BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA
Gelkammer	BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA
Inkubator "Hera cell 150"	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Kultivierungsflaschen T25	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Nunc-Immuno MaxiSorp 96-Kavitäten-Platten	VWR International, Radnor, PA, USA
Objektträger 76×26 mm	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Photometer (Varioskan Flash)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
PVDF Membran	Merck Chemicals, Schwalbach, Deutschland
Rotor Gene Q PCR cycler	Qiagen, Venlo, Niederlande

SDS-PAGE-Platten	BioStep, Burkhardtsdorf, Deutschland
Skalpell	Feather Safety, Osaka, Japan
Sterilbank "Hera safe"	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Sterilfilter	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge (Megafuge 1.0)	Heraeus, Harnau, Deutschland

## 4.11. Software

*Tabelle 13: Verwendete Software*

<b>Name</b>	<b>Referenz</b>
Adobe Photoshop CS6	Adobe Systems, München, Deutschland
BioRender 2020	BioRender, Toronto, Kanada
Google Drive	Google LLC, Mountain View, CA, USA
GraphPad Prism 6	Dr. Harvey Motulsky, La Jolla, CA, USA
Microsoft Office 15 (2013)	Microsoft, Redmond, WA, USA
Paperpile	Paperpile LLC, Cambridge, MA, USA

## 5. Methoden

### 5.1. Zellkultur

Die Zellen, die für diese Arbeit untersucht wurden, entstammen der humanen RPE-Zelllinie ARPE-19. Es handelt sich dabei um adhärenente Zellen, die aus dem Auge eines 19-jährigen männlichen Spenders stammen (5).

Sie wurden zunächst auf zwei unterschiedliche Weisen kultiviert. Die erste Gruppe von Zellen befand sich in Passage 27 und wird in dieser Arbeit mit der Abkürzung "KM1" (= Kultivierungsmethode 1) versehen. Die zweite Gruppe von Zellen befand sich in Passage 37 und wird zur Unterscheidung mit "KM2" (= Kultivierungsmethode 2) kenntlich gemacht.

Die Daten zu den Zellen KM2 wurden freundlicherweise von Herrn Timon Trakkides zu vergleichenden Zwecken zur Verfügung gestellt. Sie finden sich in der Veröffentlichung Trakkides et al. 2019 wieder.

Alle Arbeiten mit den Zellen erfolgten unter sterilen Bedingungen. Die Zellen wurden unter konstanten Bedingungen (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre) in einem Feuchtinkubator kultiviert. Die Langzeitlagerung erfolgte bei -80 °C.

Als Standardmedium diente Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose (DMEM).

#### 5.1.1. Aussaat der Zellen

Die Zellen wurden zunächst im Kulturmedium (**Tabelle 2**) aufgetaut und in Kultivierungsflaschen überführt. Das Medium wurde an jedem zweiten Tag gewechselt bis der Flaschenboden zu 80-90% bewachsen war und die Zellen eine kubische Form zeigten. Zur Passagierung wurden die Zellen mit Trypsin (1:10 verdünnt in sterilem PBS) abgelöst (4 min, 37 °C) und abzentrifugiert (1 min, 4500 × rcf). Das gewonnene Zellpellet wurde in 7 ml DMEM gelöst.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet.

Tabelle 14: Bedingungen Zellaussaat

Laminin-Beschichtung			
Fläche / well	Laminin / well	Volumen / well	Konzentration
1,12 cm <sup>2</sup>	5,6 µg	350 µl	0,016 mg/ml
ARPE19-Aussaat			
Fläche / well	Volumen / well	Zellen / well	Zellen / ml
1,12 cm <sup>2</sup>	0,5 ml	1,8 × 10 <sup>5</sup>	3,5 × 10 <sup>5</sup>

Für die experimentelle Behandlung wurden die Zellen auf Zellkultureinsätzen (Transwells) kultiviert, die eine apikale und eine basale Versorgung mit Medium gewährleisten. Die Transwells von 12-Kavitäten-Kultivierungsplatten wurden zuvor mit Maus-Laminin (5 µg/cm<sup>2</sup> in DMEM, 1 h, 37 °C) beschichtet (**Tabelle 14**). Danach folgte dreimaliges Waschen der Einsätze mit einem DMEM-Überschuss.

Anschließend wurden die Zellen in der Konzentration 1,56×10<sup>5</sup> Zellen/cm<sup>2</sup> auf die beschichteten Transwells ausgesät (**Tabelle 14**).

### 5.1.2. Kultivierung der ARPE-19-Zellen

Die Kultivierung erfolgte auf Transwells von 12-Kavitäten-Kultivierungsplatten. Das Nährmedium wurde an jedem zweiten Tag apikal und basal gewechselt, wobei das neue Medium zuvor im Wasserbad auf 37 °C erwärmt wurde. Die Kultivierungsdauer betrug 8 Wochen.

#### 5.1.2.1. Kultivierungsmethode 1

Das verwendete Medium wurde auf Basis von DMEM, durch Zugabe von Fötalem Kälberserum (1%), Penicillin-Streptomycin und Na-Pyruvat (**Tabelle 2**), angesetzt.

#### 5.1.2.2. Kultivierungsmethode 2

Das verwendete Medium wurde auf Basis von Dulbecco's Modified Eagle's Medium F12 Ham, durch Zugabe von Fötalem Kälberserum (10%) und Penicillin-Streptomycin (**Tabelle 3**) angesetzt.

### 5.1.3. Behandlung

#### 5.1.3.1. Stressen der Zellen

Die Zellen wurden oxidativem Stress ausgesetzt, indem sie mit Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ , 0.5 mM) für die Dauer von 4 h bzw 24 h behandelt wurden.

Zur Entwöhnung der Zellen KM1 wurde der FCS-Anteil im Medium zwei Tage vor der Behandlung auf 0,5% und am Tag vor der Behandlung auf 0% reduziert. Das  $H_2O_2$  (10 ml) wurde in 3 ml DMEM + 1% Penicillin-Streptomycin verdünnt und sterilfiltriert. Es wurden jeweils 5,1  $\mu$ l des verdünnten  $H_2O_2$  apikal in jedes Transwell gegeben (**Tabelle 15**) und die Zellen dann für 30 min bei 37 °C inkubiert. Daraufhin erfolgte die Behandlung der Zellen mit Properdin bzw Properdin-depletiertem Serum.

#### 5.1.3.2. Behandlung mit Properdin und Properdin-depletiertem (Properdin<sup>dpl</sup>) Serum

Die gestressten Zellen wurden mit apikalem Properdin (Endkonzentration 20  $\mu$ g/ml) bei 37 °C inkubiert, wobei immer eine unbehandelte und eine nur gestresste Kontrolle mitgeführt wurde (**Tabelle 15**).

Für die Behandlung mit Properdin<sup>dpl</sup> Serum (Endkonzentration 1,1  $\mu$ g/ $\mu$ l) wurde simultan verfahren. Zur Komplettierung des Properdin<sup>dpl</sup> Serum wurde für jene Behandlungsweise Properdin (Endkonzentration 20  $\mu$ g/ml) zugesetzt.

*Tabelle 15: Schema der Behandlungsstrategien*

	gestresste Zellen	gestresste Zellen + Properdin	gestresste Zellen + Properdin <sup>dpl</sup> Serum	gestresste Zellen + Properdin + Properdin <sup>dpl</sup> Serum
Medium	312 $\mu$ l	306 $\mu$ l	306 $\mu$ l	300 $\mu$ l
$H_2O_2$	5,1 $\mu$ l	5,1 $\mu$ l	5,1 $\mu$ l	5,1 $\mu$ l
Properdin		6 $\mu$ l		6 $\mu$ l
Serum			6 $\mu$ l	6 $\mu$ l

#### 5.1.4. Zellernte

Alle Schritte der Zellernte erfolgten auf Eis. Die gewonnenen Proben wurden zu Transportzwecken auf Trockeneis gelagert und umgehend bei -80 °C eingefroren.

Zunächst wurden nach 4 h und 24 h die apikalen Überstände für weitere Untersuchungen abgenommen.

Zur RNA-Isolation wurde ein Lysepuffer aus 3500 µl RA1-Lysepuffer aus dem Nucleospin RNA / Protein Kit der Firma Macherey-Nagel (**Tabelle 11**) und 35 µl β-Mercaptoethanol hergestellt.

Nach Entfernung des Mediums wurde das Transwell mit PBS gewaschen (0,5 ml/well). Die RNA wurde daraufhin mit Hilfe des Lysepuffers (apikal 350 µl pro well), der in ausreichendem Maße auf dem Transwell resuspendiert wurde, isoliert.

Zur Proteinisolation wurden die Transwells zunächst dreimal mit eiskaltem PBS (0,5 ml/well) gespült. Dann wurden 6 µl Proteaseinhibitor und 6 µl Phosphataseinhibitor in 600 µl RIPA-Puffer verdünnt. Es wurden von dieser Verdünnung je 100 µl pro well pipettiert und mit der Pipettenspitze der Transwellfilter apikal abgekratzt. Nach einer 15-minütigen Inkubationszeit wurde resuspendiert und für weitere 10 min zentrifugiert (8000 xg, 4 °C). Die nun im Überstand gelösten Proteine wurden, sowie alle anderen gewonnenen Proben, umgehend bei -80 °C eingefroren.

## 5.2. Immunfärbungen

Die Färbung erfolgte an Zellen, die sich zu diesem Zeitpunkt auf der Membran einer 12-Kavitäten Kultivierungsplatte befanden. Die Waschschriffe erfolgten mit PBS im Überschuss.

Als erster Schritt wurde die Oberseite der Membran dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen mit 4% PFA-Lösung fixiert (15 min, RT, 300 µl/well). Der folgende Waschschriffe mit PBS erfolgte bei RT und wurde zweimal wiederholt. Zur Permeabilisierung der Zellmembran wurden die auf dem Filter fixierten Zellen in 0,2% PBS/Tween inkubiert (45 min, RT).

Im nächsten Schritt wurden mit 3% BSA/PBS unspezifische Bindungsstellen blockiert (1 h, RT). Der jeweilige Primärantikörper (**Tabelle 4**) wurde 1:300 verdünnt in 3%

BSA/PBS von apikal auf die Zellen gegeben und über Nacht inkubiert (4 °C). Darauf folgte erneut dreimaliges Waschen mit PBS (RT).

Das jeweilige Sekundärreagenz (**Tabelle 5**) wurde 1:500 verdünnt in 3% BSA/PBS, bei der ZO1-Färbung gemeinsam mit dem Fluoreszenz-Farbstoff HOECHST (Verdünnung 1:1000) um die Zellkerne kenntlich zu machen, auf die Zellen gegeben (45 min, RT, lichtgeschützt).

Nach fünfmaligem Waschen mit PBS (RT) wurde die Membran mittels eines Skalpell ausgetrennt und mit Dako Fluorescence Mounting Medium auf einem Objektträger eingedeckt.

Das Präparat wurde im Abzug getrocknet (RT, 3 h).

*Tabelle 16: Übersicht der Antikörper für die Immunfärbungen*

<b>Färbung</b>	<b>Primär-Antikörper</b>	<b>Sekundär-Reagenz</b>
ZO1	Anti-ZO1 IgG	Anti-Kaninchen-Alexa Fluor 488 + HOECHST 33342
Properdin	Anti-Properdin IgG	Anti-Ziege-cy3

Für die Negativkontrolle der Properdin-Färbung wurde mit den Zellen wie oben beschrieben verfahren, allerdings wurde anstatt des Primärantikörpers Ziegenserum und anstatt des Sekundärantikörpers Mausserum eingesetzt.

### 5.3. Analyse der mRNA Expression

Die RNA-Isolation aus den behandelten Zellen wurde mittels dem *Nucleospin* RNA/Protein Kit (Macherey-Nagel) getätigt.

Die so gewonnene mRNA wurde revers in cDNA umgeschrieben. Zu diesem Zweck wurde der *QuantiTect* Reverse Transcription Kit (Qiagen) verwendet (**Tabelle 11**).

Bei beiden Schritten wurde exakt nach Firmenprotokoll vorgegangen.

Die quantitative Echtzeit-PCR (engl.: *real-time quantitative PCR*) wurde mittels einem Rotor-Gene Q PCR cycler ausgeführt. Dafür wurden humane gen-spezifische Primerpaare (**Tabelle 6**) und der Rotor Gene Sybr green PCR Kit (Qiagen)

entsprechend Firmenprotokoll verwendet. Pro Reaktionsansatz wurden 20 ng cDNA eingesetzt (**Tabelle 17**).

Tabelle 17: Reaktions-Ansatz qPCR

Komponente	Endkonzentration
2x Rotor-Gene SYBR Green PCR Master Mix	1 ×
Primer [forward]	1 µM
Primer [reverse]	1 µM
cDNA-Matrize	20 ng/Reaktion
RNAse-freies Wasser	-

Tabelle 18: Bedingungen für die qPCR

95 °C für 5 min
40 Durchgänge mit 95 °C für jew. 5 sek
60 °C für 10 sek

Die Transkriptänderung wurde gegen *gapdh* als housekeeper mittels der  $\Delta CT$ -Methode relativ quantifiziert:

$$\Delta CT = C_{T \text{ untersuchtes Gen}} - C_{T \text{ gapdh}}$$

Die Vielfache Expression wurde auf den Logarithmus zur Basis 2 berechnet:

$$\text{fold change} = 2^{-(\Delta CT_{\text{behandelt}} - \Delta CT_{\text{unbehandelt}})}$$

und zur Nivellierung ein Vergleich der behandelten mit den unbehandelten Proben vorgenommen.

## 5.4. Analyse der zellulären Proteine

### 5.4.1. Polyacrylamidgel Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteine wurden durch eine Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) mit Natriumdodecylsulfat (SDS) nach ihrer Größe aufgetrennt.

Die 12%igen, denaturierenden SDS-Gele wurden mit einer Stärke von 1,5 mm zwischen zwei SDS-PAGE-Platten gegossen. Zuerst wurde die Gelkammer zu zwei Dritteln mit Trenngelpuffer (**Tabelle 7**) befüllt, mit destilliertem Wasser überschichtet



und zur Polymerisation etwa 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Wasser entfernt, die Gelkammer mit Sammelgelpuffer (**Tabelle 7**) aufgefüllt und ein Gelelektrophoresekamm für 15 Probenfächer eingebracht. Nach vollständiger Polymerisation (30 min) wurde der Kamm entfernt. Die Gele wurden dann in die Gelelektrophoreseapparatur eingespannt und diese mit Laufpuffer (**Tabelle 7**) aufgefüllt. Die Probenfächer wurden mit Laufpuffer ausgespült. Jeweils 15 µl der Proben, die im Rahmen der Zellernte gewonnen wurden (**Kapitel 5.1.4.**), wurden mit 5 µl Probenpuffer (**Tabelle 7**) versetzt, jeweils einmal reduziert und einmal nicht-reduziert, und im Anschluss für 5 min bei 95 °C inkubiert, um dann umgehend auf Eis gestellt zu werden. Vor dem Auftragen wurde das Volumen kurz zentrifugiert um verdampfte Anteile wiederzugewinnen. In jede zweite Gelfächer wurden 15 µl einer Probe pipettiert, dazwischen jeweils 7 µl Probenpuffer. Die Elektrophorese wurde bei konstantem Strom (25 mA pro Gel) für 90 min durchgeführt. Als Molekularmassen-Standard wurden jeweils 5 µl peqGOLD Protein Marker IV aufgetragen. Die Gele wurden im Weiteren für den Western Blot verwendet.

#### 5.4.2. Western Blot

Die mittels SDS-PAGE in Polyacrylamidgelen aufgetrennten Proteine wurden durch ein elektrisches Feld, welches senkrecht zum Gel verlief, auf eine proteinbindende PVDF-Membran transferiert. Für diesen, im Semi-Dry-Verfahren vollzogenen Schritt, wurde die Gelelektrophoreseapparatur Mini-Protean verwendet. Die Membran wurde zur Aktivierung zuerst 20 sek in Methanol geschwenkt und dann in Transferpuffer äquilibriert. Das Gel, in dem die Proteine unmittelbar zuvor die SDS-PAGE durchlaufen hatten, wurde mit der Membran zusammen zwischen zwei Filterpapieren eingelegt. Dieser Aufbau wurde zwischen die Elektroden des Blotgerätes eingespannt. Der Transfer erfolgte bei 100 mA/Gel für 150 min auf Eis.

Daraufhin wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen 1 h in Blockade-Puffer (**Tabelle 7**) geschwenkt. Die Inkubation der Membran mit primärem Antikörper (**Tabelle 4**) erfolgte über Nacht bei 4 °C unter kontinuierlichem Schwenken. Darauf folgten drei Waschschriffe, jeweils für 10 min, mit TBST. Die Inkubation mit Sekundärreagenz (SA-POD) erfolgte eine Stunde lang bei RT, ebenfalls unter

kontinuierlichem Schwenken. Darauf folgten erneut drei Waschschrirte, jeweils für 10 min, mit TBST.

Die Detektion der Proteine erfolgte über eine Chemilumineszenz-Reaktion, nachdem die Membran 5 min lichtgeschützt in Lumi-Light Western Blotting Substrate eingelegt wurde.

## 5.5. Analyse der Proteine im apikalen Überstand

### 5.5.1. Sandwich-ELISA (engl.: *enzyme-linked immunosorbent assay*)

Nunc-Immuno MaxiSorp 96-Kavitäten-Platten wurden mit anti-Properdin-Antikörper (1 mg/ml, **Tabelle 4**) in PBS (1:1000 verdünnt, 50 µl/Kavität) über Nacht bei 4 °C beschichtet.

Alle weiteren Schritte erfolgten bei Raumtemperatur.

Die Waschschrirte wurden jeweils mit dem ELISA-Waschpuffer (**Tabelle 7**) durchgeführt.

Nach zweimaligem Waschen mit 200 µl/Kavität wurde 1 h mit 200 µl/Kavität ELISA-Blockadepuffer (**Tabelle 7**) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzublocken. Erneut wurde zweimal gewaschen und die Platte im Anschluss mit Proben der zu untersuchenden Überstände (**Kapitel 5.1.4.**) versehen (50 µl/Kavität, 1 h).

Daraufhin wurde die Platte dreimal gewaschen um alle nicht-bindenden Bestandteile abzuwaschen.

Der biotinylierte Detektions-Antikörper (**Tabelle 5**) wurde 1:200 verdünnt in Blockade-Puffer aufgetragen (50 µl/Kavität, 1 h). Nach dreimaligem Waschen wurde mit Streptavidin-Peroxidase (SA-POD), 1:2500 verdünnt in Blockade-Puffer, inkubiert (50 µl/Kavität, 30 min). Danach wurde die Platte sechsmal gewaschen.

Die Inkubation mit TMB-Substratlösung zur Entwicklung erfolgte 30 min lang. Danach wurde die Enzymaktivität durch Zugabe von 50 µl/Kavität HCL gestoppt und die Extinktion bei 450 nm mit Hilfe eines Photometers bestimmt.

### 5.5.2. Multiplex-ELISA

Der Multiplex-ELISA wurde durchgeführt mit dem Kitsystem Milliplex MAP Human Complement Magnetic Panel 1 und Panel 2 der Firma Merck Millipore (**Tabelle 11**).

Die Anleitung des Herstellers wurde dahingehend abgeändert, dass zu den 25 µl der jeweiligen Probe 0,5 µl Beads pro Kavität (ad 25 µl pro Kavität Assaypuffer) gegeben wurden. Für den Immunassay wurden sowohl auf Panel 1, als auch auf Panel 2, alle vorhandenen Bead-Sorten verwendet. Es konnte beobachtet werden, dass das Properdin unspezifisch mit dem C3a/C3b-System reagiert, weswegen diese Daten als nicht valide angesehen und somit nicht für diese Arbeit verwendet wurden.

Nach dreimaligem Waschen wurden lediglich 25 µl Detektionsantikörper aus dem Kit, was der Hälfte des im Firmenprotokoll vorgeschriebenen Volumens entspricht, verwendet.

Alle folgenden Schritte und Mengenangaben erfolgten analog dem vorgegebenen Protokoll des Herstellers.

Die Mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) der apikalen Sekretion wurde gemessen.

### 5.6. Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes und der Membranfläche

Die Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (engl. *transepithelial electric resistance*, TER) und der Membranfläche (engl. *capacity*, C) wurde durchgeführt von Florian Urban (Institut für Analytische Chemie, Universität Regensburg) und freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Es wurde die Endohm-Kammerbestimmung genutzt, welche die TER verschiedener Zellschichten auf porösen Filtern simultan mit der Zeit messen kann und gleichzeitig die Membrankapazität bestimmt (26). Durch Messung des Spannungsabfalls über der Zellschicht mit dem cellZscope-Gerät (nanoAnalytics, Münster, Deutschland) wird bei bekanntem elektrischem Strom dabei der Widerstand laut dem Ohm'schen Gesetz abgeleitet. Der Widerstand des Filters ohne Zellen wurde bestimmt und miteinbezogen.

## 5.7. Statistische Analysen

Zur Ermittlung statistischer Unterschiede zwischen zwei unabhängigen Gruppen (4 h vs. 24 h) wurde der Mann-Whitney-Test verwendet. Zum Vergleich mehrerer unabhängiger Gruppen untereinander wurde der Kruskal-Wallis-Test mit mehrfachem Vergleichstest nach Dunn verwendet (GraphPad Prism 7).

## 5.8. Software

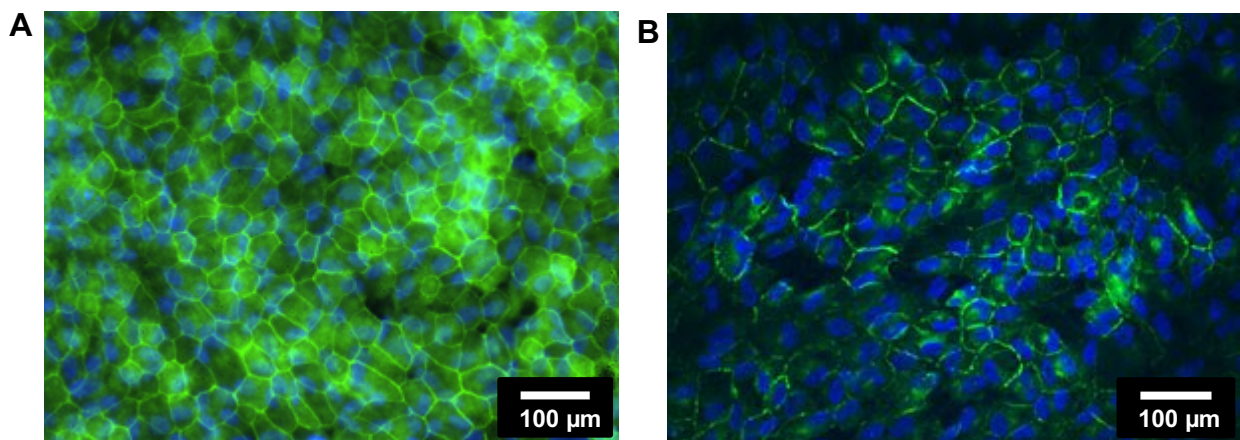
Die Verfassung dieser Dissertation erfolgte hauptsächlich mittels der Google Drive-eigenen Programme, einschließlich Paperpile zur Literaturverwaltung. Die finale Formatierung wurde mittels Microsoft Office 15 bewerkstelligt. Sämtliche Graphen wurden in Graph Pad Prism 6 erstellt. Die Auswertung der Immunfärbungen gelang mittels Adobe Photoshop CS6. Für die grafische Darstellung der Zusammenfassung und der Komplementkaskade wurde die Website BioRender genutzt („*Student Plan Promo*“-Account). (**Tabelle 13**)

## 6. Ergebnisse

### 6.1. ARPE-19 Zellkultivierung ist physiologischer unter KM1-Bedingungen

#### 6.1.1. KM1 führt zu physiologischem Zellwachstum

Die optimale *in vitro* Kultivierung von ARPE-19 Zellen ist eine unabdingbare Voraussetzung, um signifikante Forschungsergebnisse zu erzielen, die die Situation im humanen RPE *in vivo* zuverlässig widerspiegeln. Zu Beginn dieser Arbeit waren zwei unterschiedliche ARPE-19 Kultivierungsmethoden in der Arbeitsgruppe etabliert (**Kapitel 5.1.2.**). Deshalb sollte zunächst ein möglichst *in vivo*-ähnliches Kultivierungsprotokoll für ARPE-19 Zellen herausgearbeitet werden. Als Parameter dafür wurden die Hauptmerkmale von RPE-Zellen genutzt: die Barrierefähigkeit und die Zellmorphologie (5). Die Daten zu den Zellen KM2 wurden freundlicher Weise von Herrn Trakkides zur Verfügung gestellt (Trakkides et al. 2019).

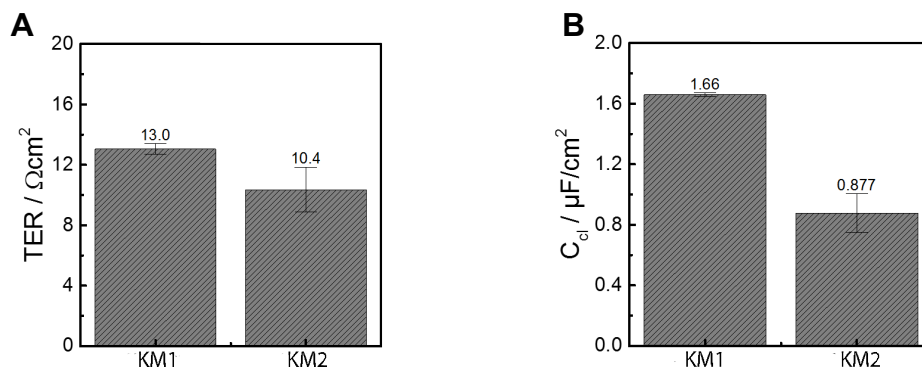


**Abbildung 3: Anti-ZO1 immunhistologische Färbung zum Vergleich von KM1 und KM2**

ARPE-19 Zellen wurden 8 Wochen lang mit zwei verschiedenen Kultivierungsmethoden (**A** entspricht KM1, **B** entspricht KM2) kultiviert. Die zonula occludens 1 und die Zellkerne wurden immunhistologisch angefärbt. Die Zellen KM1 spiegelten einen physiologischeren Zustand wieder. Vergrößerung 20fach.

Die ARPE-19 Zellen KM1 wurden für acht Wochen kultiviert (**Kapitel 5.1.2.1.**). Eine enge, pflastersteinartige Aneinanderreihung der Zellen, sowie gut ausgeprägte Zell-Zell-Verbindungen, dargestellt durch die Anfärbung der *zonula occludens 1* (ZO1), sind ein Hinweis auf stressfreies, *in vivo*-ähnliches Wachstum (**Abbildung 3A**). In Kombination mit der Darstellung der Zellkerne durch DNA-Anfärbung mittels HOECHST wurde ein durchgängiger Zellrasen in Form einer epithelialen

Einzelzellschicht ersichtlich. Auch dies lässt auf geeignete Kultivierungsmethodik schließen, ebenso wie die deutliche Pigmentierung (nicht gezeigt) (5). Im Vergleich wiesen ARPE-19 Zellen nach achtwöchiger KM2 ein weniger physiologisches Zellwachstum auf (**Abbildung 3B**). So zeigten die Zellen zum Großteil eine Fibroblasten-artige Form und die Zellgrenzen waren weniger definiert. Bei den Zellen KM2 konnte keine Pigmentierung beobachtet werden. Zum weiteren Vergleich wurden TER und Membranfläche gemessen. Diese Daten wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Florian Urban (Institut für Analytische Chemie, UR).



**Abbildung 4: Vergleich von KM1 und KM2 durch Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes und der Membranfläche**

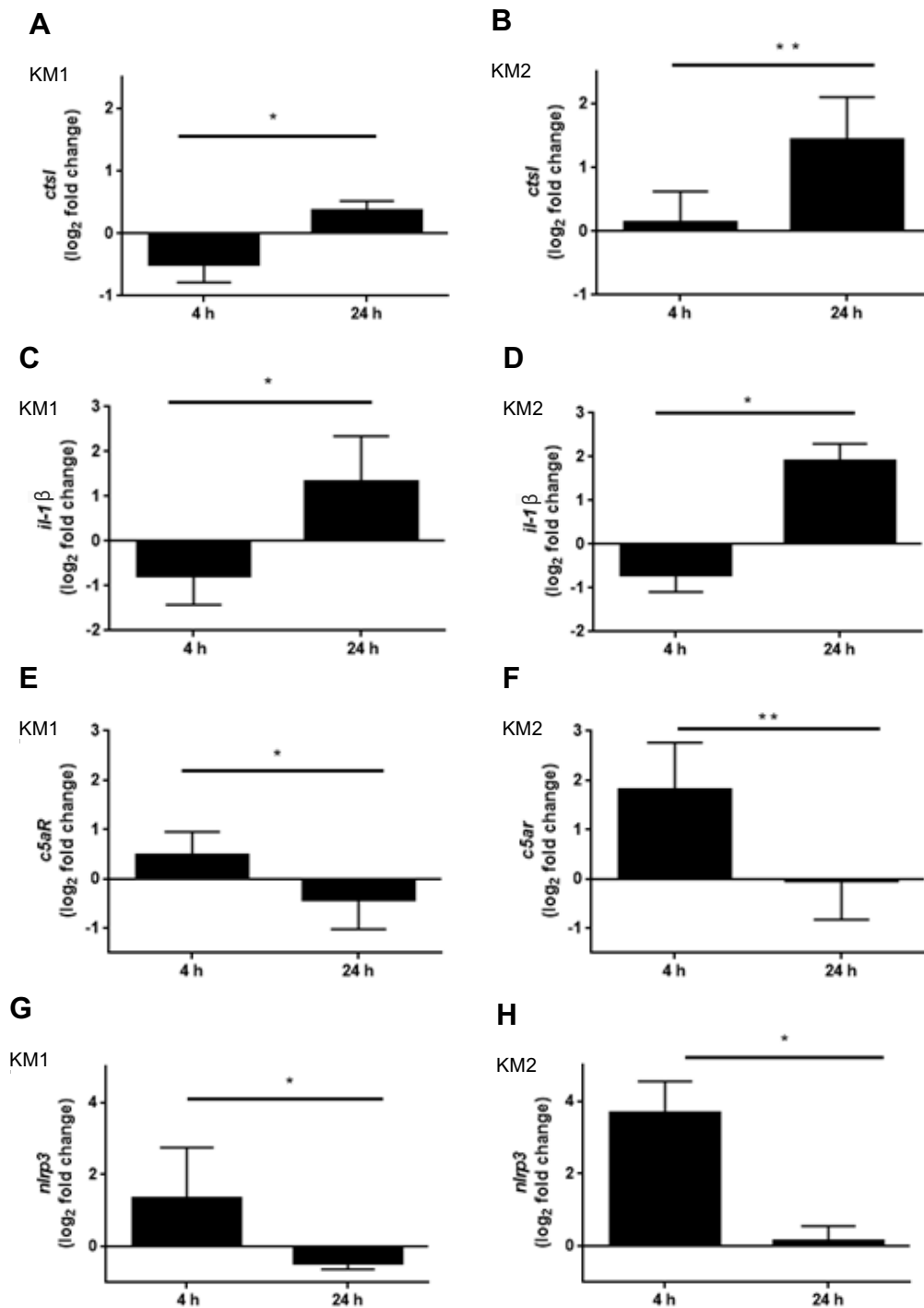
TER (**A**) und Membranfläche (**B**) von ARPE-19 Zellen wurden mit dem cellZscope-Gerät gemessen. Die Parameter deuteten auf physiologischeres Wachstum der Zellen KM1 hin.

Die Bestimmung der TER ergab einen höheren Widerstand für die Zellen KM1 als für die Zellen KM2 (**Abbildung 4A**). Dies deutet auf eine bessere Ausbildung der Zell-Zell-Verbindungen und eine höhere apikal-basale Polarität hin. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Zellen KM1 im Vergleich zu den Zellen KM2 eine weitaus höhere Membranfläche besitzen (**Abbildung 4B**), was für eine gute Ausbildung der apikalen Mikrovilli und damit für einen physiologischen Zustand dieser Zellen spricht (5).

### 6.1.2. mRNA-Transkription weist auf unterschiedliche Zellstadien von KM1 und KM2 hin

Die Unterschiede in der Histologie unter KM1- und KM2-Bedingungen (**Kapitel 6.1.1.**) erforderten einen weiterführenden Vergleich der mRNA-Transkription der KM1- und KM2-Zellen unter oxidativem Stress. KM1-kultivierte Zellen wurden dafür jeweils 4 h

und 24 h mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt und Expressionsdaten wurden mit zuvor in der Arbeitsgruppe erhobenen KM2-Datensätzen verglichen (**Abbildung 5**) (21).



**Abbildung 5: Korrelierende Expression von Komplementfaktoren unter KM1 und KM2 nach Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Die mRNA-Isolation erfolgte aus ARPE-19 Zellen, die mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt wurden. Die Expressionsänderung, die mittels qPCR untersucht wurde, wurde gegen *gapdh* relativ quantifiziert. Gegenübergestellt werden Ergebnisse von KM1 (**A, C, E, G**) und KM2 (**B, D, F, H**). Die KM2-Datensätze entsprechen (21). Die vielfache Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle wurde auf den Logarithmus zur Basis 2 berechnet.

\*p < 0.05, \*\*p < 0,01 (Mann-Whitney-Test).

Für die folgenden Faktoren wurde bei den Zellen unter KM1 und KM2 dieselbe Expressionsänderung zwischen 4 h und 24 h auf oxidativen Stress festgestellt:

Die Transkription von Cathepsin L (*ctsl*), einer intrazellulären Protease, die für die Antigenverarbeitung und den lysosomalen Proteinabbau verantwortlich ist (27), war in diesem Zeitraum angestiegen (**Abbildung 5A, B**).

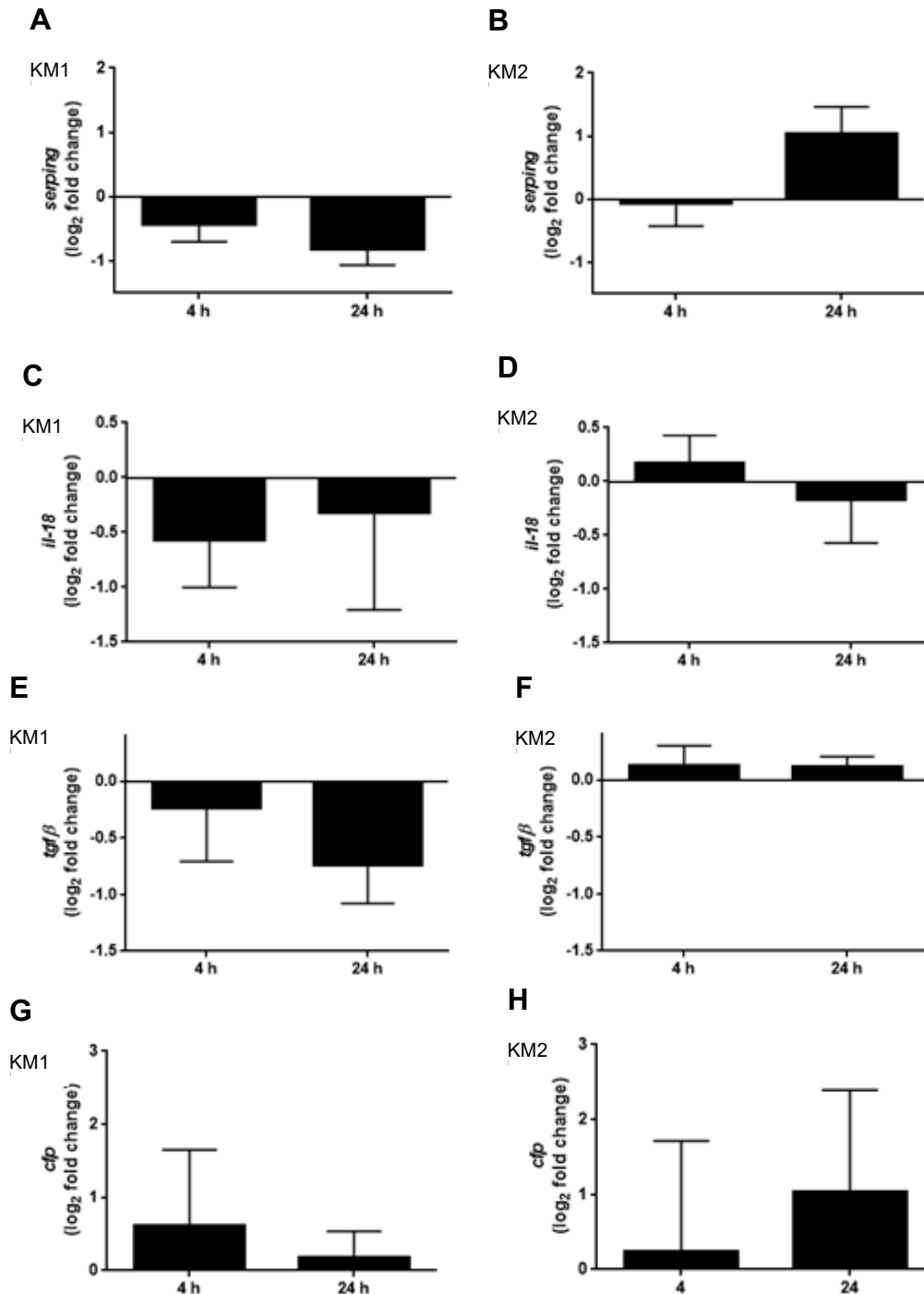
Ebenso konnte bei allen Zellen ein Anstieg der Transkription von Interleukin 1 $\beta$  (*il-1 $\beta$* ) beobachtet werden (**Abbildung 5C, D**). Das IL-1 $\beta$  ist ein Zytokin, das als Entzündungsmediator und Regulator des Immunsystems dient. Eine vermehrte Sekretion von IL-1 $\beta$  kann unter anderem durch eine Aktivierung des Inflammasomes NLRP3 bedingt sein. Die Transkription von *nlrp3* unter oxidativem Stress war nach 24 h jedoch bei allen Zellen verringert, im Vergleich zur Transkription nach 4 h (**Abbildung 5G, H**). Derselbe Effekt war bei der Transkription des Komplementrezeptors *c5aR* zu beobachten (**Abbildung 5E, F**). Dieser G-Proteingekoppelte Rezeptor stellt die Bindestelle für C5a dar, das ein Marker für die Komplementaktivierung ist und als Anaphylatoxin wirkt (28).

Entgegengesetzte Tendenzen in der Transkription zeigten die Zellen KM1 und KM2 unter oxidativem Stress nach 4 h im Vergleich zu 24 h für die Faktoren *serping*, Interleukin 18 (*il-18*), *transforming growth factor*  $\beta$  (engl., *tgf $\beta$* ) und Properdin (*cfp*).

Die Expression von *serping*, dem Gen, das den C1-Esterase-Inhibitor kodiert (29), war bei den Zellen KM1 in diesem Zeitraum unter oxidativem Stressesstimulus verringert. Im Vergleich dazu war die Transkription bei den Zellen KM2 angestiegen (**Abbildung 6A, B**). Ebenso ließ sich ein leichter Anstieg der Transkription zwischen 4 h und 24 h bei den Zellen KM1 für *il-18* feststellen. Bei IL-18 handelt es sich um ein Zytokin, das der IL-1-Familie zugerechnet werden kann (30). Auch hier war die Tendenz der Transkriptionsänderung in diesem Zeitraum konträr für die Zellen KM2 (**Abbildung 6C, D**).

Die Zellen KM1 zeigten eine Verringerung der Transkription im Zeitraum zwischen 4 h und 24 h für *tgf $\beta$* , was für die Zellen KM2 hingegen nicht aufgezeigt werden konnte (**Abbildung 6E, F**). Beim TGF- $\beta$  handelt es sich um ein antiinflammatorisches Zytokin, das mit der Regulation des Komplementsystems assoziiert ist (31).





**Abbildung 6: Divergierende Expression von Komplementfaktoren unter KM1 und KM2 nach Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Die mRNA-Isolation erfolgte aus ARPE-19 Zellen, die mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt wurden. Die Expressionsänderung, die mittels qPCR untersucht wurde, wurde gegen *gapdh* relativ quantifiziert. Gegenübergestellt werden Ergebnisse von KM1 (A, C, E, G) und KM2 (B, D, F, H). Die KM2-Datensätze entsprechen (21). Die vielfache Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle wurde auf den Logarithmus zur Basis 2 berechnet.

Die Transkriptionsänderung von *cfp* stellte sich in diesem Zeitraum als Verringerung bei den Zellen KM1 dar, während ein Anstieg bei den Zellen KM2 erfolgte

(**Abbildung 6G, H**). Bei den Zellen KM2 wurde des Weiteren eine Verringerung der Transkription nach 48 h beobachtet (nicht gezeigt) (21), wie sie bei den Zellen KM1 bereits nach 24 h zu sehen war.

Die differenzierte Transkriptionsregulation der Zellen KM1 und KM2 unter oxidativem Stress wies auf unterschiedliche zellphysiologische Stadien der ARPE-19 Zellen unter KM1 und KM2 hin.

Aufgrund der Entwicklung der Zellen unter KM1, die hinsichtlich Form, klarer Zellgrenzen, Pigmentierung und erhöhter Barrierefähigkeit auf ein physiologischeres Zellwachstum als unter KM2 schließen lässt, wurden die Zellen KM1 für weitere Untersuchungen herangezogen.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde KM1 als Standardkultivierungsmethode verwendet.

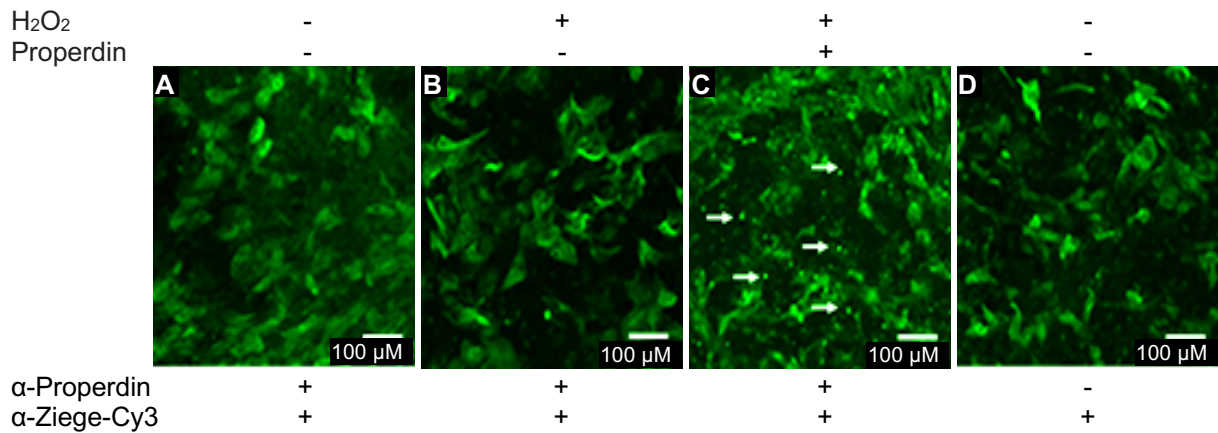
## 6.2. Exogenes Properdin stimuliert eine Rückkopplungsschleife zur Selbstregulation von Properdin

### 6.2.1. Properdin bindet an gestresste Zellen

In seiner Funktion als Stabilisator der C3-Konverase (32) ist Properdin ein wichtiger Regulator der komplementvermittelten Reaktion von RPE-Zellen auf oxidativen Stress. Nun sollte die Wirkung von Properdin auf gestresste ARPE-19 Zellen untersucht werden.

Zu diesem Zweck wurden die Zellen für 8 h mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gestresst (**Abbildung 7B**) und ein Teil der Zellen zusätzlich mit Properdin behandelt (**Abbildung 7C**). Im Anschluss wurde eine Immunfärbung gegen Properdin durchgeführt.

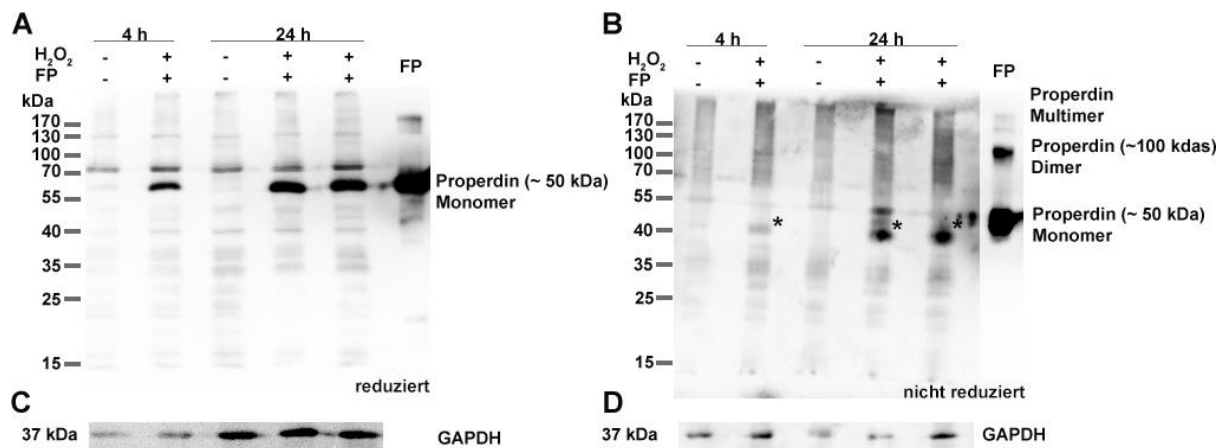
Durch ein erhöhtes, punktförmiges Färbesignal wurde deutlich, dass das exogen zugegebene Properdin an die gestressten Zellen bindet und spezifisch angefärbt wurde (**Abbildung 7C**). Im Vergleich dazu konnte kein Properdinsignal für die Zellen ohne Properdin-Behandlung, weder bei den gestressten noch bei den ungestressten Zellen, detektiert werden (**Abbildung 7A, B**). Zur Sicherstellung der Spezifität der Färbung wurde eine Negativkontrolle angefertigt (**Abbildung 7D**).

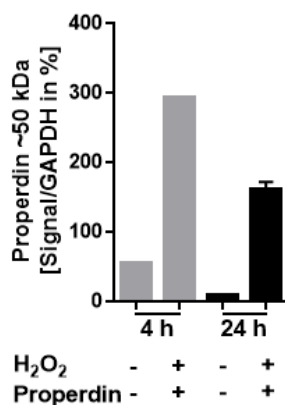


**Abbildung 7: Anti-Properdin immunologische Färbung**

Zell-assoziiertes Properdin an/in ARPE-19 Zellen wurden nach 8 Wochen langer Kultivierung und 8 h Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bzw. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Properdin immunhistologisch nachgewiesen (**A-C**). Negativkontrolle mit Ziegenserum anstelle des Primär-Antikörpers (**D**). Vergrößerung 20fach.

Zur weiteren Untersuchung des zellassoziierten Properdins wurde ein Western Blot unter reduzierenden (**Abbildung 8A, C**) und nicht reduzierenden (**Abbildung 8B, D**) Bedingungen durchgeführt. Das dafür verwendete Zelllysate stammte aus gewaschenen ARPE-19 Zellen, die für 4 h und 24 h mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Properdin behandelt wurden, sowie, zum Vergleich, aus unbehandelten nicht gestressten Zellen. Für den Western Blot wurde ein biotinylierter anti-Properdin Antikörper aus der Ziege (**Tabelle 4**) verwendet und mit SA-POD umgesetzt.



**E**

**Abbildung 8: Nachweis von zellassoziertem Properdin im Western Blot und densitometrische Auswertung**

Darstellung des zellassozierten Properdins im Zelllysat behandelter ARPE-19 Zellen unter reduzierenden (**A, C**) und nicht reduzierenden (**B, D**) Bedingungen. GAPDH wurde als *housekeeper* eingesetzt. Eine deutliche Erhöhung des zellassozierten Properdins konnte bei denjenigen Proben nachgewiesen werden, die mit exogenem Properdin behandelt wurden.

Das Properdin-Signal, das im Western-Blot unter reduzierenden Bedingungen (**A, C**) sichtbar wurde, wurde densitometrisch ausgewertet (**E**).

Unter reduzierenden Bedingungen konnte eine Bande auf Höhe von etwa 50 kDa detektiert werden, was der Proteingröße des Properdin-Monomers entspricht (23) (**Abbildung 8A**).

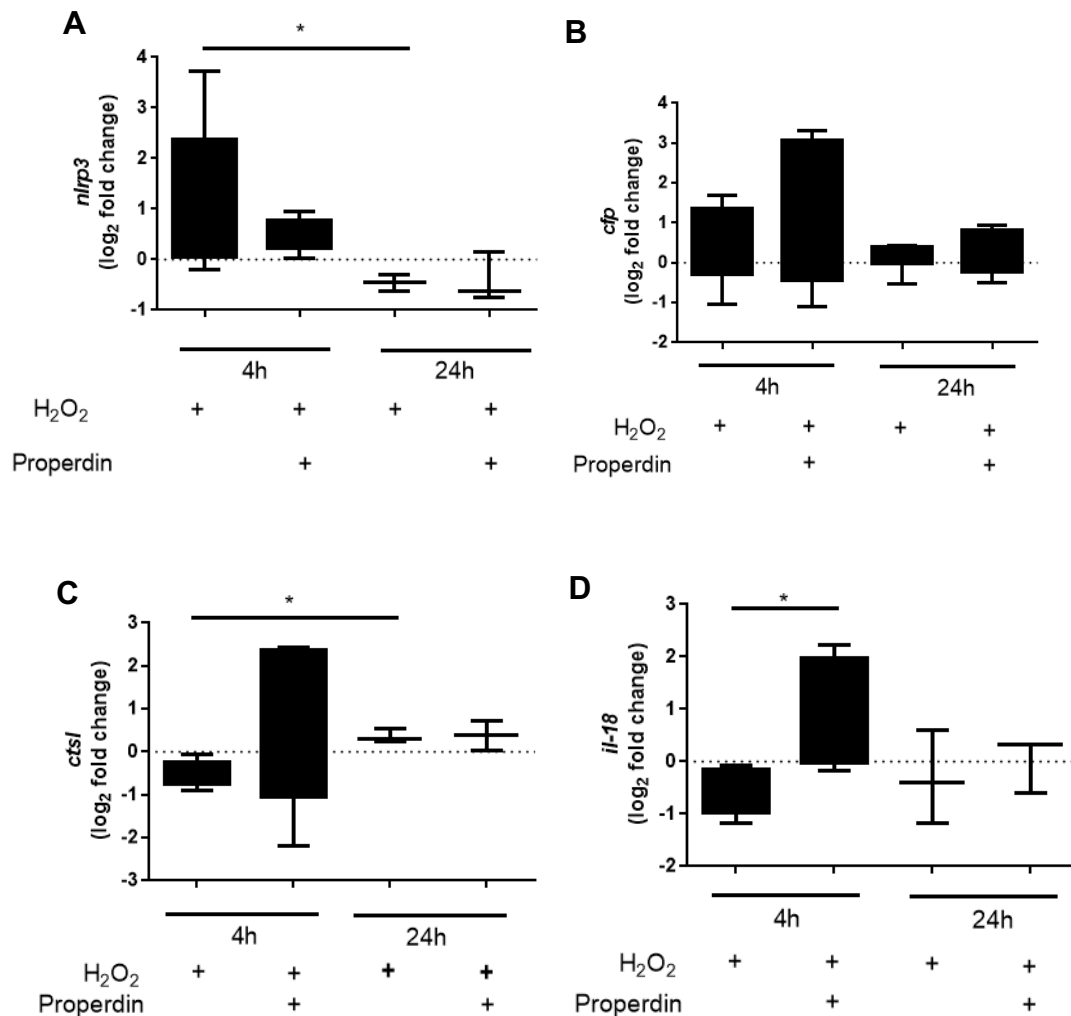
Unter nicht reduzierenden Bedingungen wurde zusätzlich eine Bande auf Höhe von etwa 100 kDa sichtbar, die als Properdin-Dimer interpretiert wurde.

Außerdem ergaben sich Banden >100 kDa, die dem Properdin-Multimer entsprechen (**Abbildung 8B**) (23).

In denjenigen Proben, die mit exogenem Properdin behandelt wurden, konnte nach densitometrischer Auswertung etwa das sechsfache an zellassoziertem Properdin nachgewiesen werden, als in den unbehandelten Zellen (**Abbildung 8E**).

### 6.2.2. Exogenes Properdin verändert die Expression gestresster ARPE-19-Zellen

Sowohl die Immunfärbungen, als auch der Western Blot sprachen dafür, dass exogen zugegebenes Properdin an gestresste ARPE-19 Zellen bindet. Dieses Erkenntnis stellte die Frage in den Raum, ob das exogen zugegebene Properdin die Genexpression der gestressten Zellen ändert. Dem wurde durch weitere Untersuchungen der mRNA-Transkription nachgegangen, wofür gestresste ARPE-19 Zellen für 4 h und 24 h mit exogenem Properdin behandelt wurden (**Abbildung 9**). Für die Faktoren *nlrp3*, *cfp*, *ctsl* und *il-18* wurde eine Veränderung der Expression durch Properdinzugabe beobachtet. Ebenfalls untersucht wurden die Faktoren *foxp*, *ctsb*, *serping*, *cd46*, *cd59*, *tgfb*, *il-1*, *cfi*, *cfb*, *mbi*, *c4* und *c5aR*, bei denen aber keine veränderte Expression detektiert wurde (**Anhang Abbildung 1**).



**Abbildung 9: Expression von Komplementfaktoren in gestressten ARPE-19 Zellen nach Behandlung mit Properdin nach 4 h und 24 h**

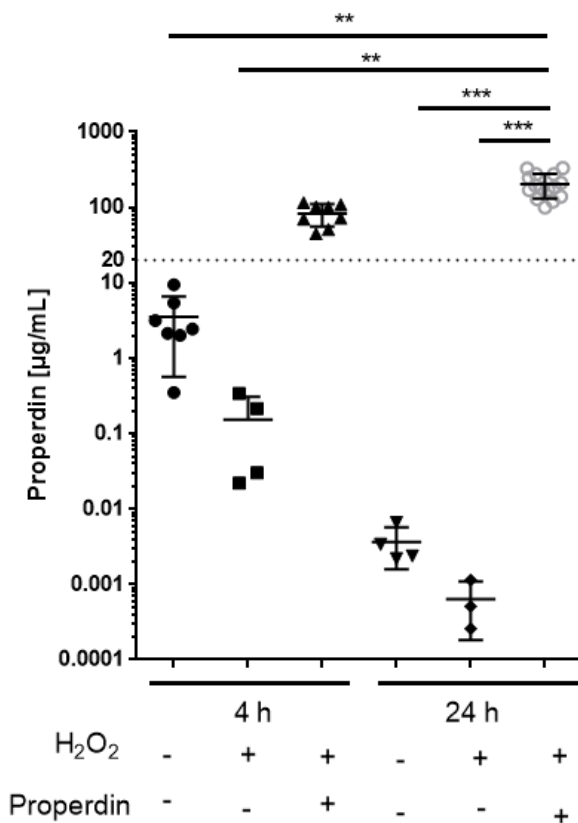
Die mRNA-Isolation erfolgte aus Zellen, die mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt wurden. Die Transkriptänderung, die mittels qPCR untersucht wurde, wurde gegen *gapdh* relativ quantifiziert. Die vielfache Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle wurde auf den Logarithmus zur Basis 2 berechnet.

\*  $p < 0,05$  (Mann-Whitney-Test)

Das exogen zugegebene Properdin verringerte die Expression des Entzündungsmediators *nlrp3* nach 4 h (**Abbildung 9A**). Außerdem konnte nach einer vierstündigen Behandlung mit Properdin mehr *cfp* und mehr *ctsl* nachgewiesen werden (**Abbildung 9B, C**). Auch die Expression von *il-18* war nach 4 h Properdin-Behandlung erhöht (**Abbildung 9D**). Diese Effekte waren nach 24 h größtenteils aufgehoben. Aufgrund der Variation der Messwerte waren im Allgemeinen geringe statistisch signifikante Änderungen beschreibbar, wobei eine Tendenz ersichtlich ist und zukünftig verifiziert werden sollte.

### 6.2.3. Exogenes Properdin erhöht die apikale Properdinsekretion

Neben der Auswirkung einer Behandlung mit exogenem Properdin auf die Transkription von Komplementfaktoren, stellte sich die Frage nach der Auswirkung auf die apikale Sekretion in das Medium. Von besonderem Interesse erschien in dieser Hinsicht die Veränderung der apikalen Properdinsekretion durch exogen zugegebenes Properdin vor dem Hintergrund einer möglichen Selbstregulierung.



**Abbildung 10: Apikale Ausschüttung von Properdin durch gestresste, behandelte ARPE-19 Zellen**

Die apikale Properdin-Sekretion nach Behandlung der ARPE-19 Zellen wurde mittels ELISA untersucht. Die eingesetzten 20 µl/ml Properdin wurden als gestrichelte Linie dargestellt. Gestresste ARPE-19 Zellen, die mit Properdin behandelt wurden, sekretieren signifikant mehr Properdin als die gestressten Zellen ohne Properdinaddition. \*\*\*\*p<0,0001 (Kruskal-Wallis-Test mit mehrfachem Vergleichstest nach Dunn)

Es konnte mittels ELISA festgestellt werden, dass exogenes Properdin eine signifikant erhöhte apikale Properdinsekretion induziert (**Abbildung 10**). Im zeitlichen Verlauf konnte dabei nach 4 h das 5-fache und nach 24 h das 6-fache der eingesetzten Properdinmenge nachgewiesen werden. Außerdem konnte nach 4 h festgestellt werden, dass oxidativer Stress eine verzögerte Properdinausschüttung zur Folge hat.

Auf Basis der dargestellten Ergebnisse kann festgehalten werden, dass (I) exogenes Properdin an gestresste Zellen bindet, (II) deren Expressionsmuster verändert und dass (III) das exogene Properdin die apikale Sekretion von Properdin erhöht, welches

im Fortgang wieder eine Bindung zur Zelle eingehen kann. Diese Ergebnisse ließen auf eine Rückkopplungsschleife zur Selbstregulation von Properdin schließen.

### 6.3. Apikale Sekretion und CFI-Akkumulation von ARPE-19 Zellen unterliegen dem Einfluss von Properdin

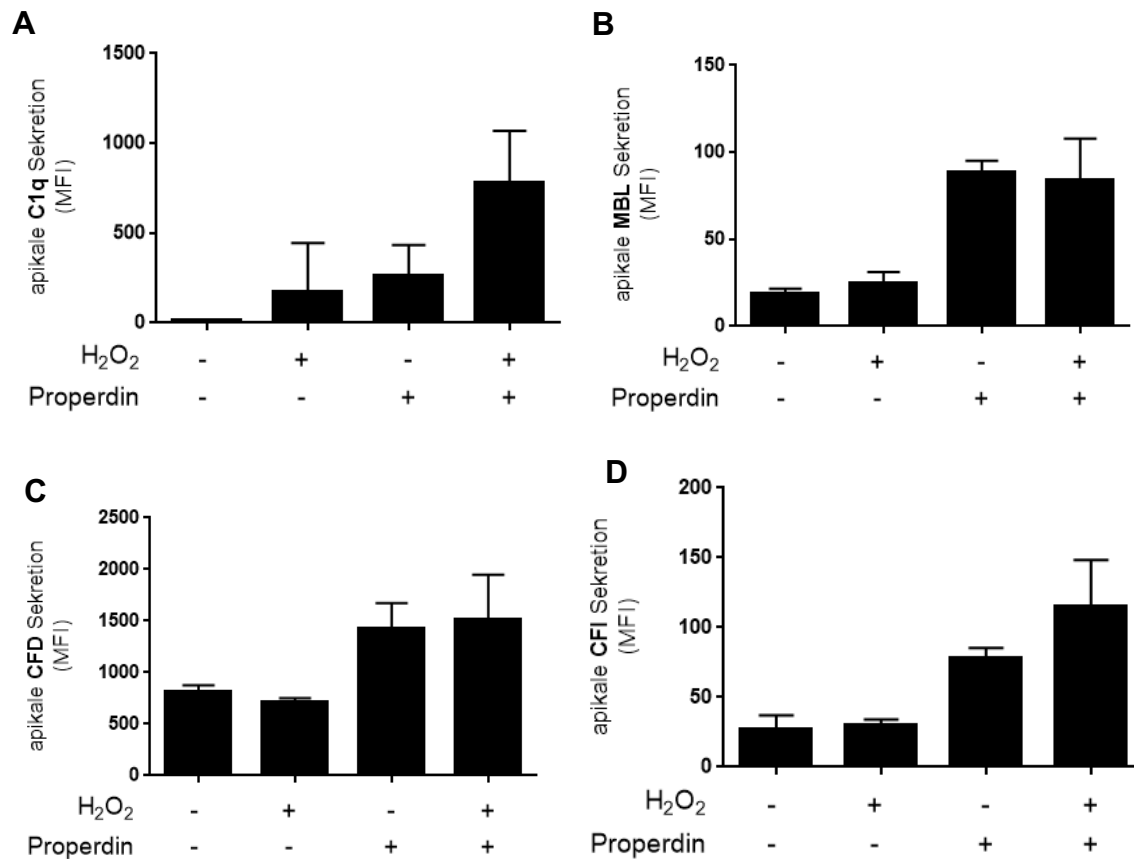
#### 6.3.1. Exogenes Properdin reguliert die Sekretion von Komplementfaktoren

Komplementkomponenten werden lokal im RPE und anderen Zellen der Retina gebildet (8), was schnelle Aktionen des Immunsystems trotz intakter Blut-Retina-Barriere möglich macht. Das RPE exprimiert aktivierende und inhibierende Komponenten aller drei Komplementaktivierungswege und der terminalen Kaskade (33). Es sollte untersucht werden, wie Properdin das apikale Komplementsekretionsmuster von ARPE-19 Zellen reguliert. Zu diesem Zweck wurden die gestressten und nicht gestressten Zellen 4 h mit exogenem Properdin behandelt und deren apikaler Überstand mittels Multiplex-ELISA untersucht (**Abbildung 11**).

Generell wurden die Komplementproteine C1q, MBL, CFD, CFI, C2, C4b, C5, C5a und C9 im Überstand der APRE-19 Zellen detektiert. Sie werden demzufolge von den ARPE-19 Zellen nach apikal sekretiert.

Bei dem Faktor C1q handelt es sich um den Teil des C1-Komplexes, der an IgG oder IgM binden kann, wodurch die Spaltung von C2/C4 und somit die Aktivierung des klassischen Komplementweges initiiert wird (**Abbildung 2**). Es konnte gezeigt werden, dass das Vorhandensein von exogenem Properdin dazu führt, dass gestresste ARPE-19 Zellen vermehrt C1q sekretieren (**Abbildung 11A**). Es handelt sich dabei um die Darstellung eines Trends, da für die apikale Sekretion von Komplementfaktoren keine statistisch signifikanten Veränderungen beschrieben werden konnten.

Die Behandlung mit exogenem Properdin führte sowohl in gestressten, als auch in nicht gestressten Zellen zu einer vermehrten apikalen Sekretion des Mannose-bindenden Lektins (MBL) (**Abbildung 11B**). Dieses Protein leitet den initialen Schritt des Lektin-Weges der Komplementkaskade ein (**Abbildung 2**), indem es die MBL-assoziierten Serinproteasen aktiviert (34).



**Abbildung 11: Apikale Sekretionsänderung unter dem Einfluss von exogenem Properdin**

Die apikale Sekretion der Komplementfaktoren **(A)** C1q, **(B)** MBL, **(C)** CFD und **(D)** CFI wurde mittels Multiplex-ELISA untersucht und deren Änderung nach eine 4-stündige Behandlung mit Properdin beobachtet. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der apikalen Sekretion (ein Maß für die Proteinquantität) wurde gemessen.

Auch der Komplementfaktor D (CFD), eine Plasmaprotease, die als Teil des alternativen Weges Faktor B in seine aktiven Bestandteile spaltet (**Abbildung 2**), wurde durch die Behandlung mit Properdin vermehrt aus gestressten und nicht gestressten Zellen freigesetzt (**Abbildung 11C**). Der Komplementfaktor I (CFI), auch C3b/C4b Inaktivator genannt, ist mit CFH der Hauptinhibitor des alternativen Weges der Komplementaktivierung (**Abbildung 2**), wobei vor allem CFH von RPE-Zellen sezerniert wird (33). CFI und CFH werden als direkte „Gegenspieler“ von Properdin in der Komplementkaskade beschrieben. Die apikale CFI-Sekretion von ARPE-19 Zellen wurde durch exogenes Properdin gesteigert. Vor allem bei den Zellen, die zuvor oxidativem Stress ausgesetzt waren, war dieser Effekt besonders deutlich (**Abbildung 11D**).



Die gesteigerten Sekretionslevel von MBL, CFD und CFI stehen im Kontrast zu unveränderten mRNA-Mengen in Properdin-behandelten gestressten RPE-Zellen (**Anhang Abbildung 1**).

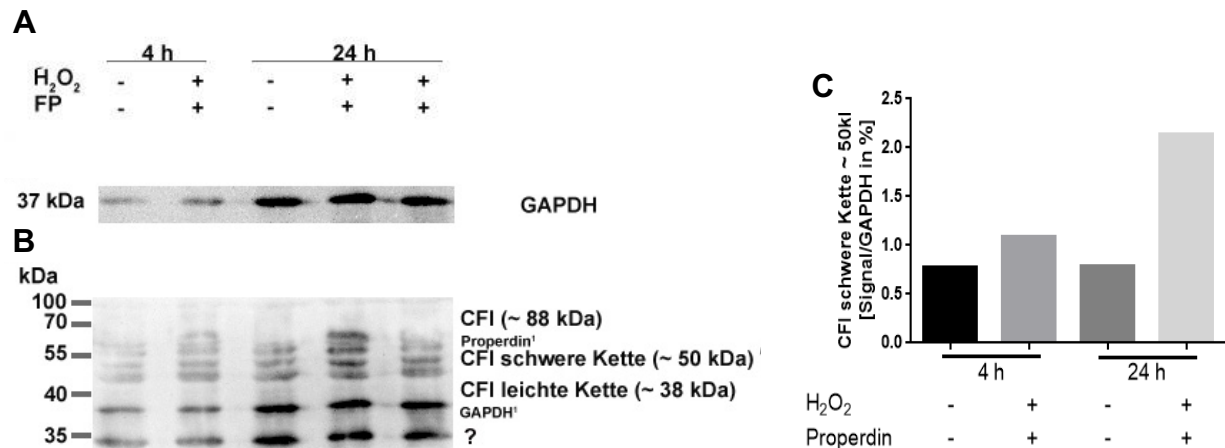
Die Multiplex-ELISA Analysen zeigten auch, dass die Komplementfaktoren C2, C4b, C5, C5a und C9 nicht durch Properdin reguliert wurden (**Anhang Abbildung 2**).

### 6.3.2. Exogenes Properdin führt zur Steigerung des zellassozierten CFI

Aufgrund der gegenläufigen Ergebnisse auf mRNA- und Proteinsekretions-Ebene und der besonderen Wichtigkeit von CFI (als Kofaktor von CFH und „Gegenspieler“ von Properdin) wurde zusätzlich die Auswirkung von Properdin auf das zellassozierte CFI exemplarisch untersucht. Dafür wurden ARPE-19 Zellen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gestresst und daraufhin für 4 h und 24 h mit exogenem Properdin behandelt. Die mittels Western Blot untersuchten gewaschenen Zellysate stammten aus diesen Zellen, sowie, zu Vergleichszwecken, aus unbehandelten ungestressten Zellen. Als Primärantikörper wurde ein anti-CFI Antikörper (**Tabelle 4**) aus der Ziege verwendet und mit SA-POD umgesetzt (**Abbildung 12**). Sowohl unter reduzierenden (**Abbildung 12A, B**), als auch unter nicht reduzierenden Bedingungen (nicht gezeigt) stellte sich eine Bande auf Höhe von 88 kDa dar, die als CFI-Molekül interpretiert wurde. Das gesamte Molekül ist aus zwei Ketten aufgebaut, einer schweren Kette mit 50 kDa und einer leichten Kette mit 38 kDa (35). Auch auf Höhe dieser Massenangaben konnten Banden detektiert werden. In den Proben, die aus gestressten Zellen nach Properdin-Behandlung stammen, konnte durch densitometrische Auswertung (**Abbildung 12C**) nach 24 h doppelt so viel CFI nachgewiesen werden, wie in den unbehandelten Proben.

Diese zeitabhängige Akkumulation von CFI in der gestressten Properdin-behandelten Zelle, unabhängig von einer erhöhten *cfi*-Transkription (**Anhang Abbildung 1H**), gab einen weiteren Hinweis auf eine Beteiligung des zellassozierten CFIs an der Stressreaktion von ARPE-19 Zellen. Eine hypothetische, zeitabhängige Regulation der Sekretion von CFI, auch nach 24 h, bzw. die *cfi*-Transkription zu anderen Zeitpunkten, sollte in Folgestudien untersucht werden um die aktuell bestehende

Diskrepanz zwischen Proteinsekretion und -akkumulation, sowie der mRNA-Menge für CFI aufzuklären.



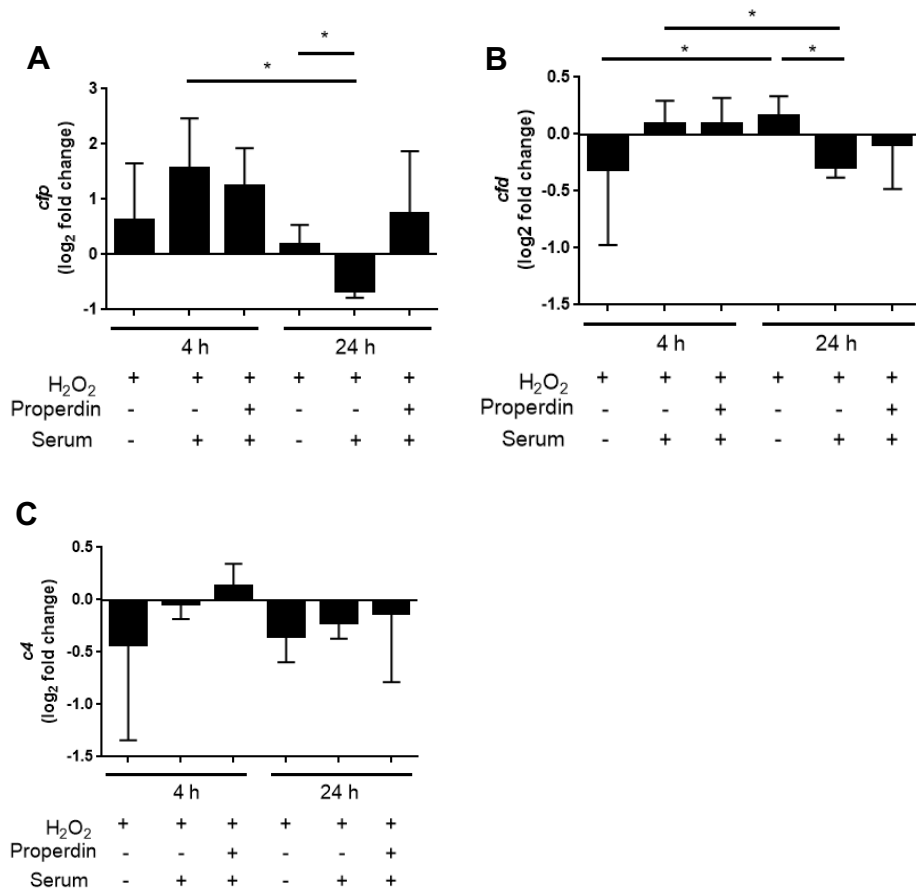
**Abbildung 12: Nachweis von zellassoziertem CFI im Western Blot und densitometrische Auswertung**

Darstellung des zellassozierten CFI im Zelllysate behandelte ARPE-19 Zellen unter reduzierenden (A, B) Bedingungen. GAPDH wurde als *housekeeper* eingesetzt. Es konnte eine deutliche Erhöhung des zellassozierten CFI für diejenigen Proben nachgewiesen werden, die mit Properdin behandelt wurden. Das Signal, das unter reduzierenden Bedingungen für die schwere Kette sichtbar wurde, wurde densitometrisch untersucht (C).

## 6.4. Bestandteile von Properdin-depletiertem Serum haben Auswirkung auf Expression und Sekretion von gestressten ARPE-19 Zellen

### 6.4.1. Behandlung mit Serum verändert die Expression, zusätzliches Properdin hat keinen Einfluss

Um weitere Erkenntnisse über die Wirkung von Properdin auf gestresste ARPE-19 Zellen zu erhalten, wurde ein Teil der Zellen mit Properdin-depletiertem (Properdin<sup>dpl</sup>) Serum behandelt. Des Weiteren wurde Properdin zum Properdin<sup>dpl</sup> Serum hinzugefügt, womit die Bandbreite der Serumproteine komplettiert wurde. Es wurde untersucht, inwieweit diese Behandlung die Expression der gestressten Zellen verändert (**Abbildung 13**).



**Abbildung 13: Expression von Komplementfaktoren in gestressten ARPE-19 Zellen nach Behandlung mit Properdin und Properdin<sup>dpl</sup> Serum nach 4 h und 24 h.**

Die mRNA-Isolation erfolgte aus Zellen, die mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Properdin<sup>dpl</sup> Serum bzw. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Properdin<sup>dpl</sup>Serum+ Properdin behandelt wurden. Die Transkriptänderung, die mittels qPCR untersucht wurde, wurde gegen *gapdh* relativ quantifiziert. Die vielfache Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle wurde auf den Logarithmus zur Basis 2 berechnet.

\*p < 0,05 (Mann-Whitney-Test)

Es wurde ersichtlich, dass das Properdin<sup>dpl</sup> Serum eine gesteigerte Expression von *cfp* nach 4 h bewirkte und dieser Effekt durch eine zusätzliche Properdin-Behandlung nicht verändert wurde. Im Vergleich zur 4 h-Situation wurde nach 24 h hingegen durch die Behandlung mit Serum eine signifikant verringerte *cfp*-Expression nachgewiesen. Zu diesem Zeitpunkt bewirkte eine zusätzliche Behandlung mit Properdin wiederum eine Steigerung der Expression (**Abbildung 13A**).

Es zeigte sich für *cfd*, dass Properdin<sup>dpl</sup> Serum auf die Expression von gestressten Zellen nach 4 h keine statistisch signifikante Auswirkung hat. Nach 24 h wurde die Expression signifikant verringert, sowohl im Vergleich zur äquivalenten Situation nach 4 h, als auch im Vergleich zu lediglich gestressten Zellen. Eine zusätzliche Zugabe von Properdin hob dies wieder auf (**Abbildung 13B**). Unabhängig von der Serum-Behandlung wurde ein signifikanter Anstieg der *cfd*-Expression durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zwischen

4 h und 24 h deutlich. Derselbe Trend wurde zuvor bereits detektiert, allerdings in geringerem Ausmaß (**Anhang Abbildung 1I**).

Es konnte für den Faktor C4, der Teil des klassischen und des Lektin-Weges der Komplementaktivierung ist (**Abbildung 2**), nach 4 h ein leichter Anstieg der mRNA durch die Behandlung mit Serum beschrieben werden, der allerdings keine statistische Signifikanz erzielte. Auch nach 24 h konnte nur die Tendenz eines Anstiegs der *c4* mRNA im Vergleich zu den lediglich gestressten Zellen, ausgelöst durch die Properdin<sup>dpl</sup> Serum-Behandlung, beobachtet werden. Auch hier hatte die zusätzliche Behandlung mit Properdin keine signifikanten Änderungen zur Folge (**Abbildung 13C**).

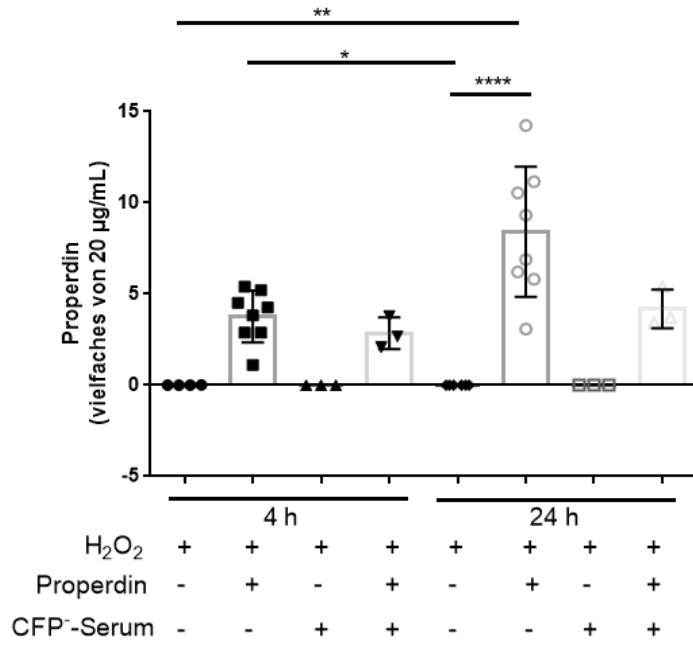
Zusätzlich wurde die Änderung der Expression von gestressten Zellen unter derselben Behandlung für *cfi* und *mbi* untersucht, wobei keine Tendenzen sichtbar wurden (**Anhang Abbildung 3**).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Bestandteile von Properdin<sup>dpl</sup> Serum die Expression gestresster ARPE-19 Zellen beeinflussen, jedoch zusätzliches Properdin in keinem untersuchten Fall eine signifikante Auswirkung bewirkt, obwohl sich vor allem nach 24 h Trends abzeichnen.

#### 6.4.2. Gesteigerte apikale Properdin-Sekretion nach Properdin-Behandlung wird durch Serumbestandteile verringert

Auch bei Betrachtung der apikalen Sekretion von gestressten ARPE-19 Zellen wird die Auswirkung von Serumbestandteilen deutlich (**Abbildung 14**).

Wie bereits besprochen, wurde die Properdin-Sekretion gestresster Zellen durch exogen zugegebenes Properdin deutlich gesteigert (**Abbildungen 10 und 14**). Die zusätzliche Behandlung mit Properdin<sup>dpl</sup> Serum verursachte sowohl nach 4 h als auch nach 24 h eine Verringerung derselben (**Abbildung 14**). Allerdings zeigten die Serumbestandteile in Hinblick auf die Properdin-Sekretion keine Auswirkung auf lediglich gestresste Zellen.



**Abbildung 14: Apikale Properdin-Sekretion von gestressten, behandelten ARPE-19 Zellen**

Die apikale Properdin-Sekretion nach 4 h bzw. 24 h Behandlung der ARPE-19 Zellen wurde mittels ELISA untersucht. Ein Vielfaches der eingesetzten 20 µl/ml Properdin wurde als Differenzierungsmarker angesetzt. Die Zugabe von Serum-Bestandteilen vermindert die Properdin-Ausschüttung von gestressten Zellen.  
 \*\*\*\*p<0,0001 (Kruskal-Wallis-Test mit mehrfachem Vergleichstest nach Dunn).

## 7. Diskussion

### 7.1. Unterschiedliche ARPE-19 Zellkultivierungsmethoden resultieren in verschiedenen Zellphänotypen und Expressionsmustern unter Stress

Das RPE ist eine einzellige Barrierschicht im Auge, die wichtige Funktionen zur Aufrechterhaltung des Sehvermögens übernimmt. Allerdings kann das RPE auch Ausgangspunkt verschiedener Augenerkrankungen, beispielsweise der AMD, sein. Die Grundlage dieses Krankheitsbildes ist eine gestörte Zellphysiologie der RPE-Zellen (14). Eine Anforderung an aussagekräftige Forschungsansätze, die *in vitro* RPE-Zellkulturmodelle nutzen, ist deshalb die Gewährleistung einer physiologischen, *in vivo*-ähnlichen Kultivierungsmethodik. Bei der in dieser Arbeit verwendeten RPE-Zelllinie, ARPE-19, sprechen Pigmentierung, eine polygonale Form, und suffiziente Zell-Zell-Verbindungen als zellmorphologische Merkmale für einen physiologischen, *in vivo*-ähnlichen Zustand der Zellen (5). Diese konnten durch die neue, in dieser Arbeit beschriebene KM1 deutlicher realisiert werden als durch die bisher angewendete KM2. Alle Zellen für diese Arbeit wurden auf Transwell-Filtern kultiviert, was die physiologische Situation des RPEs mit einer Retina-zugewandten Seite (apikal) und einer Aderhaut-zugewandten Seite (basal) nachahmt und den Zellen eine polarisierte Sekretion erlaubt (36–40). Die Kultivierungszeit von acht Wochen sollte für eine ausreichende *in vitro* Differenzierung nicht unterschritten werden (41), ist jedoch ausreichend für eine gute Konfluenz der Zellen (42).

Es wurde bei den Zellen KM1 ein Medium mit einem erhöhten Glukosegehalt und ohne Nährstoffzusatz verwendet (DMEM - high glucose) um auf diese Weise die Zellen zur vollen Ausdifferenzierung anzuregen. Standardmäßig wird für die Kultivierung von ARPE-19 Zellen ein Medium mit Nährstoffzusatz (DMEM - F12 Ham) verwendet (5,21,38), so auch bei KM2. Allerdings konnte beobachtet werden, dass die Zellen in dieser nährstoffreichen Umgebung (KM2) keine Pigmentierung ausbildeten und in einem undifferenzierten Stadium ihrer Entwicklung zurückblieben. Aus demselben Grund wurde dem KM1-Medium nur 1% FCS zugesetzt, nicht wie dem Medium für KM2 10% FCS. Dies brachte weiterhin den Vorteil, dass die Zellen weniger durch die im FCS enthaltenen bovinen Komplementfaktoren beeinflusst wurden. Außerdem kann es durch zu viel FCS dazu kommen, dass die Zellen sich gegenseitig

überwachsen und keine Einzelzellschicht entsteht (40). Das Absenken der FCS-Konzentration im Medium vor der Behandlung der Zellen beeinflusste weder deren Überleben, noch die Ausbildung einer suffizienten Einzelzellschicht (20,42) und hatte zum Zweck, die Zellen in einen Aktivierungszustand zu versetzen, in dem sie in ihren epithelialen Phänotyp differenzierten.

Ein weiterer Unterschied zwischen KM1 und KM2 war der Zusatz von Na-Pyruvat zum Medium, welches, ebenso wie der erhöhte Glukose-Gehalt, die Zellen zu einer dunkleren Pigmentierung animierte und Differenzierungsmarker begünstigte (43).

Auch die Passage der Zellen spielte bei diesem Vergleich eine Rolle, da sich die Zellen mit jeder Passagierung weiter vom Ursprungsgewebe entfernen. Die Zellen KM1 hatten Passage 27 und die Zellen KM2 Passage 37, obwohl ARPE-19 Zellen mit einer Passage >30 aus genanntem Grund nicht mehr für die RPE-Forschung verwendet werden sollten (3).

Positiv zeigte sich für die jüngeren KM1-Zellen eine hexagonale Wachstumsform. Im Gegensatz dazu zeichnete sich eine Fibroblasten-artigen Wachstumsform der KM2-Zellen ab. Dieses *in vitro*-Kultivierungsartefakt, das in der Literatur als "in vitro - Alterung" (44) oder "Transdifferenzierung" (45) bezeichnet wird, konnte unter KM1 verhindert werden. Bei dieser, nicht *in vivo*-ähnlichen Kultivierungsfolge nehmen die Zellen einen verstärkt mesenchymalen Charakter an (46) und können somit nicht mehr als Model für ausdifferenzierte RPE-Zellen angesehen werden. Die ARPE-19 Zellen unter KM2, die zuvor Standard im Labor war, unterlagen einer derartigen Umwandlung, was durch eine anti-ZO1 immunhistologische Färbung zu Beginn dieser Arbeit gezeigt wurde.

Auch die Barrierefähigkeit von RPE-Zellen gilt als ein Differenzierungskriterium bei der *in vitro* Kultivierung. Die Bestimmung des TER, der auf die Ausbildung einer intakten epithelialen Einzelzellschicht schließen lässt (26), zeigte im direkten Vergleich einen höheren Widerstand der ARPE-19 Einzelzellschicht unter KM1-Bedingungen als unter KM2-Bedingungen. Dies war ebenfalls Anzeichen für eine *in vivo*-ähnlichere Differenzierung der Zellen unter KM1. Im Zustand einer voll ausgebildeten, funktionalen Einzelzellschicht haben ARPE-19 Zellen allgemein einen geringeren TER-Wert (50-100  $\Omega\text{cm}^2$ ) als primäre RPE Zellen (>200  $\Omega\text{cm}^2$ ) (5,47). Die TER-Werte in dieser Arbeit wurden nach achtwöchiger KM1-Kultivierung (10 - 20  $\Omega\text{cm}^2$ ) unter den publizierten TER-Werten für ARPE-19 Zellen bei vergleichbaren

Kultivierungsbedingungen bestimmt (5,48). Dies kann durch unterschiedliche TER-Bestimmungsmethoden begründet werden. In dieser Arbeit wurde die kontinuierliche Endohm-Kammerbestimmung gewählt, da diese eine verlässliche Aussagekraft über die gesamte Zellfläche über einen längeren Zeitraum erlaubt (49). Die erhobene TER-Werte weichen deshalb von den in der Literatur beschriebenen Messwerten ab, da dort hauptsächlich mit der einmaligen Punktmessung durch Stäbchen-Elektroden gearbeitet wird (Bsp.: (48)), welche die Gefahr von potentiellen Inhomogenitäten im elektrischen Strom birgt (50). Die Endohm-Kammerbestimmung hatte den Vorteil, dass zusätzlich die Kapazität der ARPE-19 als Parameter bestimmt werden konnte. Dies bestätigte, dass unter KM1-Bedingungen eine höhere Membranfläche bei den ARPE-19 Zellen vorlag. Die Membranfläche wird durch die Ausbildung apikaler Mikrovilli und basolateraler Einziehungen beeinflusst (26) und bekräftigt eine ausdifferenzierte ARPE-19 Zellkultivierung.

Die KM1 lieferte *in vivo*-ähnlichere Ergebnisse hinsichtlich Pigmentierung, Barrierefähigkeit und Zellmorphologie und wurde deswegen für die Kultivierung der Zellen in dieser Arbeit genutzt. Der Vergleich mit den Zellen KM2 zeigt die Sensitivität von ARPE-19 Zellen hinsichtlich Kultivierungsbedingungen, die auch bereits in Analysen auf Expressionsebene beschrieben wurde (51,52).

In Übereinstimmung damit ließen sich auf mRNA-Niveau Unterschiede zwischen KM1 und KM2 feststellen. Die Zellen wurden zu diesem Zweck mit 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 4 h und 24 h gestresst, was zu Modulationen in der Genexpression führte. Eine Behandlung mit Wasserstoffperoxid ist ein häufig verwendetes Modell um die Auswirkungen von oxidativem Stress zu testen. Im Auge stellt oxidativer Stress einen Zusammenhang zwischen retinaler Degeneration, wie bei der AMD, und der Komplementaktivierung dar (20). Dabei modifiziert oxidativer Stress mehrfach ungesättigte Fettsäuren in den äußeren Segmenten der Photorezeptoren (9), deren Produkte von CFH erkannt werden, wodurch der alternative Komplementweg blockiert wird (19). Ebenso ist auch *in vitro* die Expression von Komplementfaktoren durch RPE-Zellen beeinträchtigt von zellulärem Stress (21,53).

Im Vergleich mit Trakkides et al. konnte in dieser Arbeit eine korrelierende Expressionsänderung für die Komplementfaktoren *ctsl*, *il-1 $\beta$* , *c5aR* und *nlrp3* unter den verschiedenen Kultivierungsbedingungen festgestellt werden. Entgegengesetzte Tendenzen in der Expressionsänderung wurden für die Faktoren *serping*, *il-18*, *tgf $\beta$*  und *cfp* beobachtet.



Die Unterschiede in der mRNA-Transkriptionsänderung durch oxidativen Stress zwischen den Zellen der unterschiedlichen Kultivierungsweisen lies darauf schließen, dass sich die Zellen in unterschiedlichen Stadien der Zellphysiologie befanden. Auch in der Literatur wurde gezeigt, dass die Kultivierungsbedingungen einen Einfluss auf den mRNA-Phänotyp von ARPE-19 Zellen haben (51). Außerdem ist die Genexpression nur bei adäquater Differenzierung der ARPE-19 Zellen vergleichbar mit nativen RPE-Zellen (41).

Allerdings wird  $H_2O_2$  schnell abgebaut, wenn es als Einzeldosis auf die Zellen gegeben wird (54). Möglicherweise hätte eine Behandlung durch anhaltende  $H_2O_2$ -Konzentration mehr Effekt auf die Zellen gehabt, da ARPE-19 Zellen es besser tolerieren für kurze Zeit einer hohen Dosis  $H_2O_2$  ausgesetzt zu sein, als niedrigen chronischen Dosen (54).

Andere Arbeiten, bei denen ARPE-19 Zellen mit  $H_2O_2$  behandelt wurden, konnten feststellen, dass dadurch die Komplementregulation auf der Oberfläche reduziert wurde (20), die Expression von Komplementrezeptoren anstieg und sich Komplementproteine in der Zelle anreicherten (21).

## 7.2. Exogenes Properdin beeinflusst das Zellgleichgewicht gestresster ARPE-19 Zellen und initiiert eine Selbstregulation

Auf Properdin, einem regulatorischen Protein des alternativen Weges der Komplementaktivierung, lag der Hauptfokus dieser Arbeit. Properdin zirkuliert als Multimer im menschlichen Blut und wirkt zusammen mit  $C3(H_2O)$  und  $C3b$  als Initiator der Komplementaktivierung (55,56). Um die Wirkungsweise von Properdin genauer zu untersuchen, wurden gestresste ARPE-19 Zellen mit exogenem Properdin behandelt. Es konnte dargestellt werden, dass das exogene Properdin an die gestressten Zellen bindet, deren Expression verändert und die apikale Sekretion von Properdin, das von Zellen des RPE selbst gebildet werden kann (33), erhöht.

Zunächst konnte in Immunfärbungen und Western Blot gezeigt werden, dass das exogene Properdin an die gestressten Zellen bindet. Allgemein ist bekannt, dass Properdin an apoptotische und nekrotische Zellen, an negative geladene Moleküle auf bestimmten Oberflächen und an Zellen bindet, die sich in maligner Transformation

befinden (25). Der oxidative Stress ist in diesem Sinne eine leichte Vorstufe des Zelltods, jedoch wurde berichtet, dass eine Konzentration bis zu 1,0 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nicht toxisch für die Zellen ist und auch die suffiziente Einzelzellschicht nicht schädigt (57). Auf dieser Grundlage sollen die Zellen für diese Arbeit lediglich in einen gestressten, nicht jedoch in einen Apoptose-nahen Zustand versetzt werden.

Die atomare Masse von Properdin beträgt 53 kDa (58). Für das Properdin-Monomer konnte im Western Blot eine deutliche Bande beobachtet werden, ebenso wie für das Dimer und das Multimer, welche als physiologische Form in Humanplasma vorkommen (23,24). Durch densitometrische Auswertung konnte gezeigt werden, dass die Proben, die mit exogenem Properdin behandelt wurden, bis zu sechsmal mehr zellassoziertes Properdin enthalten als die Proben ohne diese Behandlung. An dieser Stelle muss betont werden, dass nach der Behandlung mit exogenem Properdin, dieses sorgfältig abgewaschen wurde und es sich bei dem Properdin im Zelllysate somit nur um Properdin handelt, das an die Zellen gebunden hat oder um Properdin, das durch die Zellen gebildet wurde, aber nicht um in der Lösung befindliches Properdin.

Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass die Behandlung mit exogenem Properdin die Genexpression gestresster ARPE-19 Zellen verändert. Von 18 getesteten Transkripten konnte bei vier eine Veränderung der Expression durch Properdinbehandlung festgestellt werden.

Die Behandlung mit exogenem Properdin verursachte nach 4 h eine Verringerung in der Expression von *nlrp3* im Vergleich zu gestressten Zellen. Viele Studien deuten darauf hin, dass *nlrp3* durch oxidativen Stress in ARPE-19 Zellen hochreguliert wird (21,59,60). In Bezug darauf zeigen die Daten dieser Arbeit einen protektiven Effekt des Properdins gegenüber dem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Bei einer Entzündungsreaktion führt die Aktivierung des NLRP3-Inflammasomes zu vermehrter Sekretion von Interleukin 18 (61). Obwohl auf mRNA-Ebene die Expression von *nlrp3* durch Properdin-Behandlung verringert wurde, stieg die Expression von *il-18* unter denselben Bedingungen signifikant an. Dieser vermeintliche Widerspruch kann durch ein aufeinanderfolgendes Expressionsverhältnis dieser beiden Faktoren erklärt werden, was bisher jedoch aufgrund fehlender Zeitreihen so nicht beobachtet werden konnte.

Für *ctsl* wurde durch die Properdin-Behandlung nach 4 h eine erhöhte Expression beobachtet. Dass Cathepsin L vor allem in kranken Zellen exprimiert ist (27), geht einher mit der Belastung der Zellen durch oxidativen Stress. In anderen Arbeiten

konnte die Steigerung der *cts*-Expression durch oxidativen Stress erst nach 24 h beobachtet werden (21), was für eine Beschleunigung dieses Mechanismus durch Properdin spricht. Dieser Effekt kann erneut als protektive Wirkungsweise von Properdin interpretiert werden.

Im Gegensatz zu Takkides et al. konnte durch oxidativen Stress keine Hochregulation von *cfp* in der Zeitspanne zwischen 4 h und 24 h festgestellt werden. Dies kann durch die Unterschiede in KM1 und KM2 begründet werden. Nach 4 h wurde durch die zusätzliche Behandlung mit exogenem Properdin ein Trend zur Steigerung deutlich. Vor allem in Bezug auf die anderen Daten der vorliegenden Arbeit, die zeigen, dass durch exogenes Properdin die apikale Properdin-Sekretion signifikant erhöht wird, ist es von großer Wichtigkeit, dass dieselbe Behandlung nur geringfügige Änderungen in der *cfp*-Expression hervorruft. Diese Beobachtungen führen zu der Vermutung, dass ARPE-19 Zellen Properdin speichern und bei Aktivierung nach apikal sekretieren, von wo aus das Properdin in der Folge die *cts*-Expression beschleunigt und die *il-18*-Expression steigert um die Immunreaktion weiter voranzutreiben.

Obwohl zur Bekräftigung des folgenden Fazits eine Verlängerung des Analysezeitraumes geboten ist, wird geschlussfolgert, dass Properdin sich selbst reguliert. Es besteht eine Rückkopplungsschleife, bei der das apikal sekretierte Properdin wieder an die Zellen bindet, ihre Expression beeinflusst und erneut die apikale Properdinsekretion steigert.

Außerdem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass exogenes Properdin die apikale Sekretion verschiedener Komplementfaktoren reguliert. Allgemein konnten in diesem Teil der Arbeit keine signifikanten Unterschiede, sondern lediglich Tendenzen in der Sekretionsänderung herausgearbeitet werden.

Zunächst sollte festgehalten werden, dass die Komplementproteine C1q, MBL, CFD, CFI, C2, C4b, C5, C5a und C9 im Überstand von ARPE-19 Zellen gefunden wurden und demzufolge von diesen nach apikal sekretiert werden. Dieses Ergebnis wurde bisher noch nicht vergleichbar in der Literatur beschrieben.

Es wurde infolge der Properdin-Behandlung eine gesteigerte Sekretion von C1q beobachtet, das als Mustererkennungsmolekül des C1-Komplexes den klassischen Weg einleitet (62). Zu vergleichenden Zwecken wurden in diesem Teil der Arbeit auch nicht gestresste ARPE-19 Zellen behandelt, bei denen der beschriebene Effekt jedoch weniger ausgeprägt war. Es wurde beschrieben, dass C1q durch Immunhistochemie

von AMD-Netzhäuten vor allem subretinal gefunden wurde (63), allerdings wurde durch die lediglich gestressten RPE-Zellen in dieser Arbeit C1q auch nach apikal sekretiert. Auch das Mannose-bindende Lektin (MBL) stellt ein Mustererkennungsmolekül der Komplementkaskade dar (64), das allerdings am Anfang des Lektin-Weges steht. Dieser Faktor wird nach Properdin-Behandlung von gestressten ARPE-19 Zellen ebenfalls vermehrt sekretiert. Dieser Effekt ist auch für nicht gestresste ARPE-19 Zellen zu beobachten.

Auch für den Komplementfaktor CFD konnte eine gesteigerte Sekretion nach Properdin-Behandlung durch die gestressten Zellen beobachtet werden, wobei keine deutlichen Unterschiede zur Sekretionsänderung nicht gestresster Zellen festgestellt werden konnte. CFD ist ein regulatorisches Protein des alternativen Weges, dem eine Rolle in der AMD-Pathogenese zugeschrieben wird, da es erhöht im Plasma erkrankter Patienten gefunden wurde (65).

Eine ebenfalls gesteigerte apikale Sekretion bewirkte die Properdin-Behandlung für CFI, von dem angenommen wird, dass vor allem seine seltenen Varianten mit AMD assoziiert sind (66,67). Zudem konnte eine deutliche Erhöhung des zellassoziierten CFI durch die Behandlung mit exogenem Properdin beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die Zellen der Komplementaktivierung durch Properdin entgegenwirken, indem sie vermehrt CFI anreichern und sekretieren, welches das aktivierte C3b abbaut.

Es kann geschlussfolgert werden, dass exogenes Properdin die apikale Sekretion von gestressten ARPE-19 Zellen für genannte Komplementfaktoren reguliert und damit Einfluss auf den klassischen Weg (C1q), den Lektin-Weg (MBL) und den alternativen Weg der Komplementaktivierung (CFD, CFI) nimmt. Außerdem steht die Überlegung im Raum, dass sich diese Effekte des exogenen Properdins nicht nur auf gestresste ARPE-19 Zellen beziehen, sondern auch auf nicht gestresste Zellen.

### **7.3. Expression und Sekretion gestresster ARPE-19 Zellen unterliegt einer Modulation durch Bestandteile von Properdin<sup>dpl</sup> Serum**

In dieser Arbeit wurden zudem die Auswirkungen einer Behandlung mit Properdin<sup>dpl</sup> Serum als Quelle der Gesamtheit von Komplementfaktoren außer Properdin auf

gestresste ARPE-19 Zellen untersucht. Außerdem wurde eine Behandlung mit Properdin<sup>dpl</sup> Serum, komplettiert durch exogenes Properdin, gegenübergestellt, bei der somit alle Komplementfaktoren auf die Zellen Einfluss nahmen. Im Vergleich zu anderen Untersuchungen, die sich auf die Einflüsse des Serums während der Kultivierung als Bestandteil des Kultivierungsmediums beziehen (51), wurden hier die Folgen einer Behandlung mit Properdin<sup>dpl</sup> Serum für 4 h bzw 24 h an ausdifferenzierten ARPE-19 Zellen untersucht.

Für *cfp* mRNA konnte nach 4 h eine Steigerung der Expression durch die Serumbestandteile beobachtet werden, auf die zusätzliches Properdin keinen Einfluss hat. Dies steht in vermeintlichem Widerspruch zu den Erkenntnissen dieser Arbeit über die Selbstregulation von Properdin und der Erkenntnis, dass die Expression von *cfp* durch exogenes Properdin nach 4 h erhöht wird. Als mögliche Erklärung kann angeführt werden, dass andere Komplementfaktoren die *cfp*-Expression in stärkerem Maße direkt oder indirekt beeinflussen und dadurch die *cfp*-Expressionsregelung durch Properdin überschattet wird.

Außerdem konnte zwischen 4 h und 24 h eine signifikante Reduktion der Expression von *cfp* durch gestresste Zellen mit Serum-Behandlung gezeigt werden. In dieser Zeitspanne wurde die *cfp*-Expression an gestressten Zellen ohne Beteiligung anderer Faktoren signifikant erhöht, weswegen die Vermutung nahe liegt, dass einer oder mehrere der Komplementfaktoren im Serum die *cfp*-Expression in gestressten Zellen unterdrücken.

Properdin scheint an diesem Mechanismus, anders als an der apikalen Sekretion von CFD, nicht beteiligt zu sein.

Durch das Properdin<sup>dpl</sup> Serum war nach 4 h, sowie nach 24 h ein Trend zur Expressionssteigerung von *c4* im Vergleich zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-behandelten Zellen zu erkennen, worauf zusätzliches Properdin keinen Einfluss hatte.

Es wurde beschrieben, dass normales humanes Serum eine Aktivierung des Komplementsystems in Form der Ablagerung von C3-Fragmenten auf der Zelloberfläche von gestressten ARPE-19 Zellen fördert (20). Ebenfalls als Stimulation des Komplementsystems wird die Beobachtung interpretiert, dass die Behandlung mit Properdin<sup>dpl</sup> Serum nach 4 h zu einer gesteigerten Expression von *cfp*, *cfp* und *c4* in gestressten ARPE-19 Zellen führt. Dieser Effekt wird von Bestandteilen des Serums ausgelöst, eine Beteiligung von Properdin konnte allerdings nicht registriert werden.

In dieser Arbeit wurde keine TER-Messung nach Behandlung mit Properdin<sup>dpl</sup> Serum durchgeführt, allerdings wurde eine Reduktion des Widerstandes durch kombinierte Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und normalem humanem Serum in der Literatur beschrieben (20,69). Dies wird in Zusammenhang mit einem reduzierten Level von CD59 an der Oberfläche gestresster Zellen und der dadurch vermehrten Bildung des Membranangriffskomplexes (MAC) gebracht (20). Jedoch konnte auf mRNA-Ebene keine signifikante Expressionsänderung von *cd59* durch oxidativen Stress zwischen 4 h und 24 h gezeigt werden (Anhang Abbildung 1).

Wie bereits diskutiert, führt eine Behandlung mit exogenem Properdin bei gestressten ARPE-19 Zellen zu einer signifikant verstärkten apikalen Properdin-Sekretion. Es konnte gezeigt werden, dass Properdin<sup>dpl</sup> Serum diesen Effekt abschwächt, jedoch keine Auswirkungen auf die apikale Properdin-Sekretion von lediglich gestressten Zellen hat. An dieser Stelle kann festgehalten werden, dass der Selbstregulationszyklus von Properdin in Anwesenheit der Gänze von Komplementfaktoren durch andere Effekte überlagert wird.

Andere Bestandteile des Properdin<sup>dpl</sup> Serums lösten keine gesteigerte Sekretion von Properdin aus, was, ergänzend zu den bereits aufgeführten Beobachtungen, als Bestätigung dafür gewertet wird, dass Properdin sich selbst reguliert.

## 8. Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Arbeit konnte eine Kultivierungsmethode etabliert werden, die ARPE-19 Zellen in voll ausdifferenziertem, physiologischem Zustand hervorbringt.

Anhand dieser Zellen konnte gezeigt werden, dass Properdin an gestresste ARPE-19 Zellen bindet, deren Expression beeinflusst und die apikale Sekretion von Properdin und anderer Faktoren erhöht. In Bezug darauf wurde auf eine Rückkopplungsschleife zur Selbstregulation von Properdin geschlossen. Auch eine Steigerung des zellassoziierten CFI konnte als Folge der Behandlung mit exogenem Properdin beobachtet werden. Außerdem wurde gezeigt, dass die anderen Komplementkomponenten in humanem Serum sich ebenfalls auf Expression und Sekretion von gestressten ARPE-19 Zellen auswirken und dies in gewissen Maße die Properdin-bedingten Effekte überlagert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit können als Grundlage für weitere Forschungen zur Bedeutung von Properdin in RPE-Zellen, insbesondere vor dem Hintergrund der AMD, angesehen werden.

Allgemein sollte in Zukunft zur besseren Dosierung des oxidativen Stresses eine Apoptose-Färbung durchgeführt werden, um die Gefahr auszuschließen, auf diese Weise den Zelltod eines nicht unerheblichen Anteils der Zellen zu induzieren. Ebenso muss in Zukunft Wert daraufgelegt werden, dass auch nach einer längeren Behandlungsdauer die Dosis des oxidativen Stresses nicht abnimmt (Beispielsweise Abbau von  $H_2O_2$  durch die Zellen).

In ARPE-19 Zellen sollten die Auswirkungen der Properdin-Behandlung für weitere Komplementfaktoren, sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene, untersucht werden. Hinsichtlich der Literatur wären vor allem Faktoren interessant, die durch oxidativen Stress vermehrt exprimiert werden, wie CD11b (21) und Faktoren, die zusätzlich in Zusammenhang mit degenerativen Augenerkrankungen gebracht werden, wie VEGF und CFH (70). Außerdem könnte die durch Properdin ausgelöste Expressionssteigerung von *ctsl* und *il-18* als Basis dafür angesehen werden, die apikale Sekretion der äquivalenten Proteine mittels ELISA und deren Assoziation zur Zelle mittels Western Blot genauer zu untersuchen. Außerdem sollte das besonders interessante Ergebnis weiterverfolgt werden, dass exogenes Properdin eine

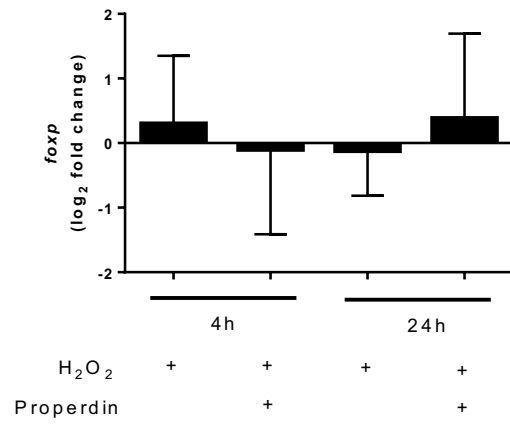
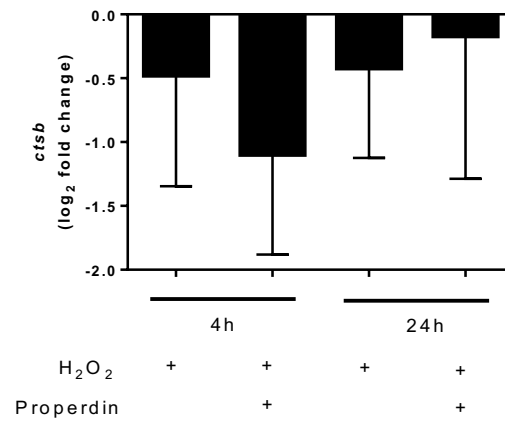
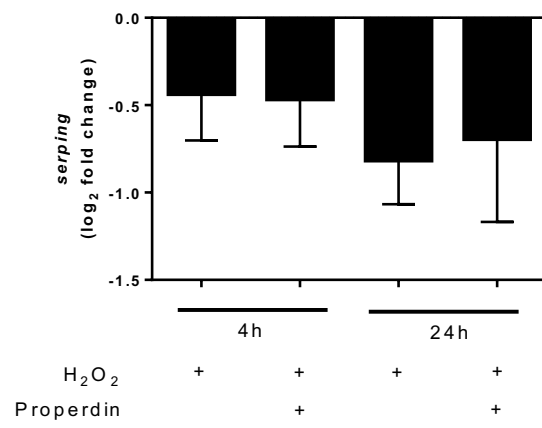
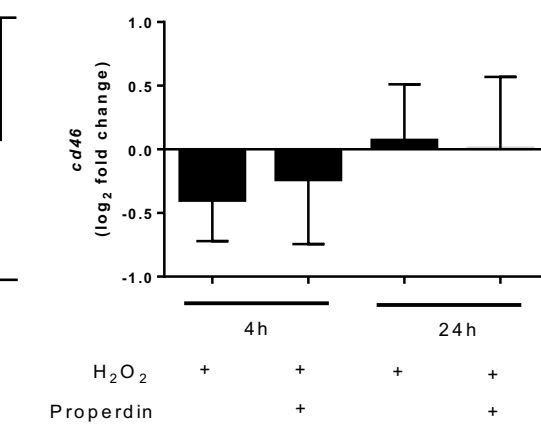
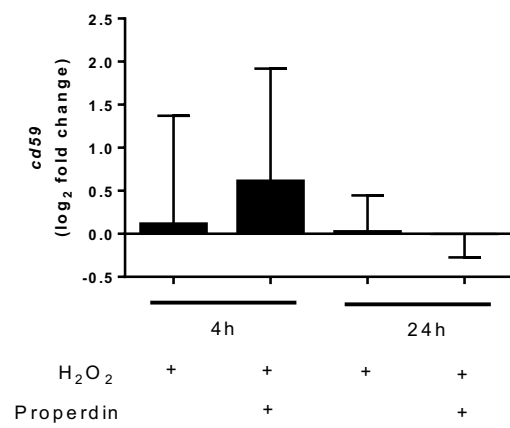
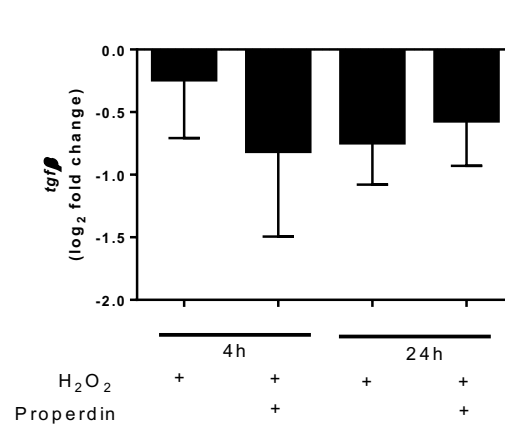
vermehrte apikale Sekretion von C1q und MBL bedingt. Die gegenseitige Beeinflussung von initialen Faktoren der drei Wege der Komplementaktivierung sollte auch durch einen Western Blot untersucht werden.

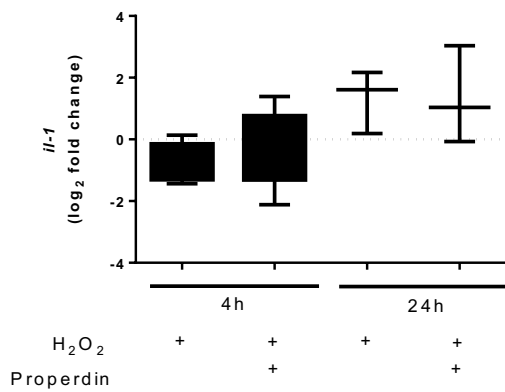
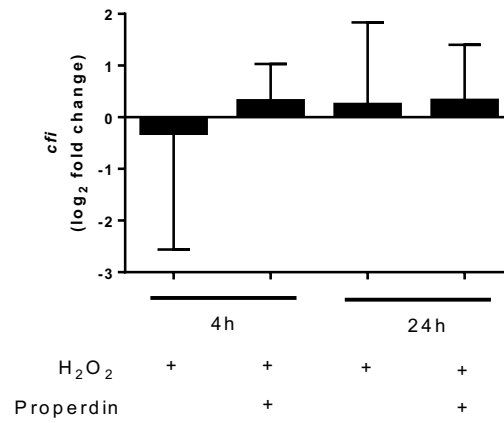
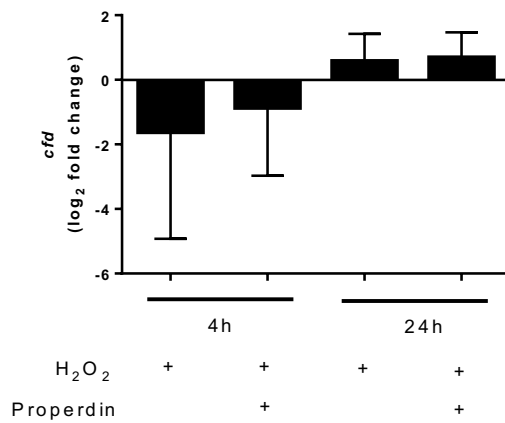
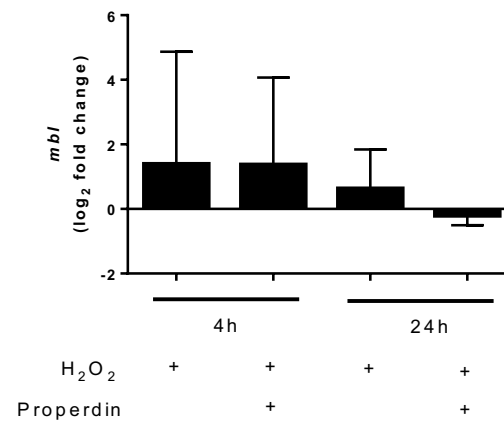
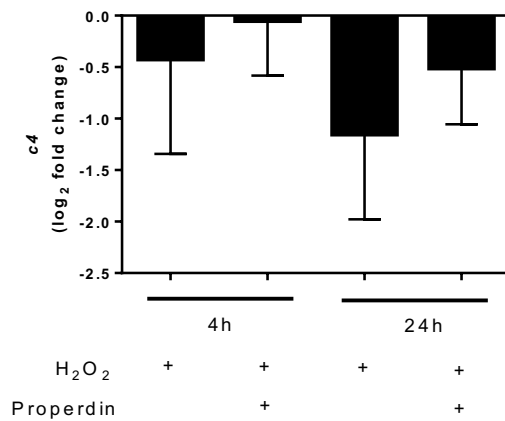
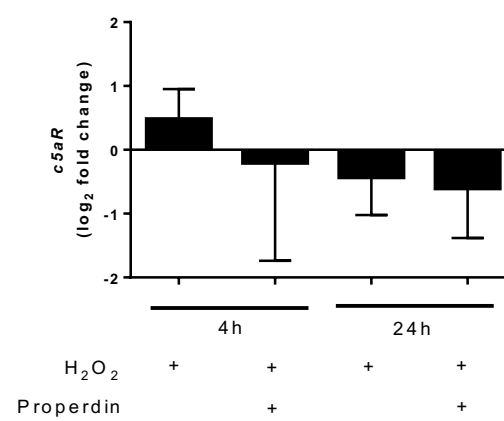


# Anhang

## Informationen im Anhang

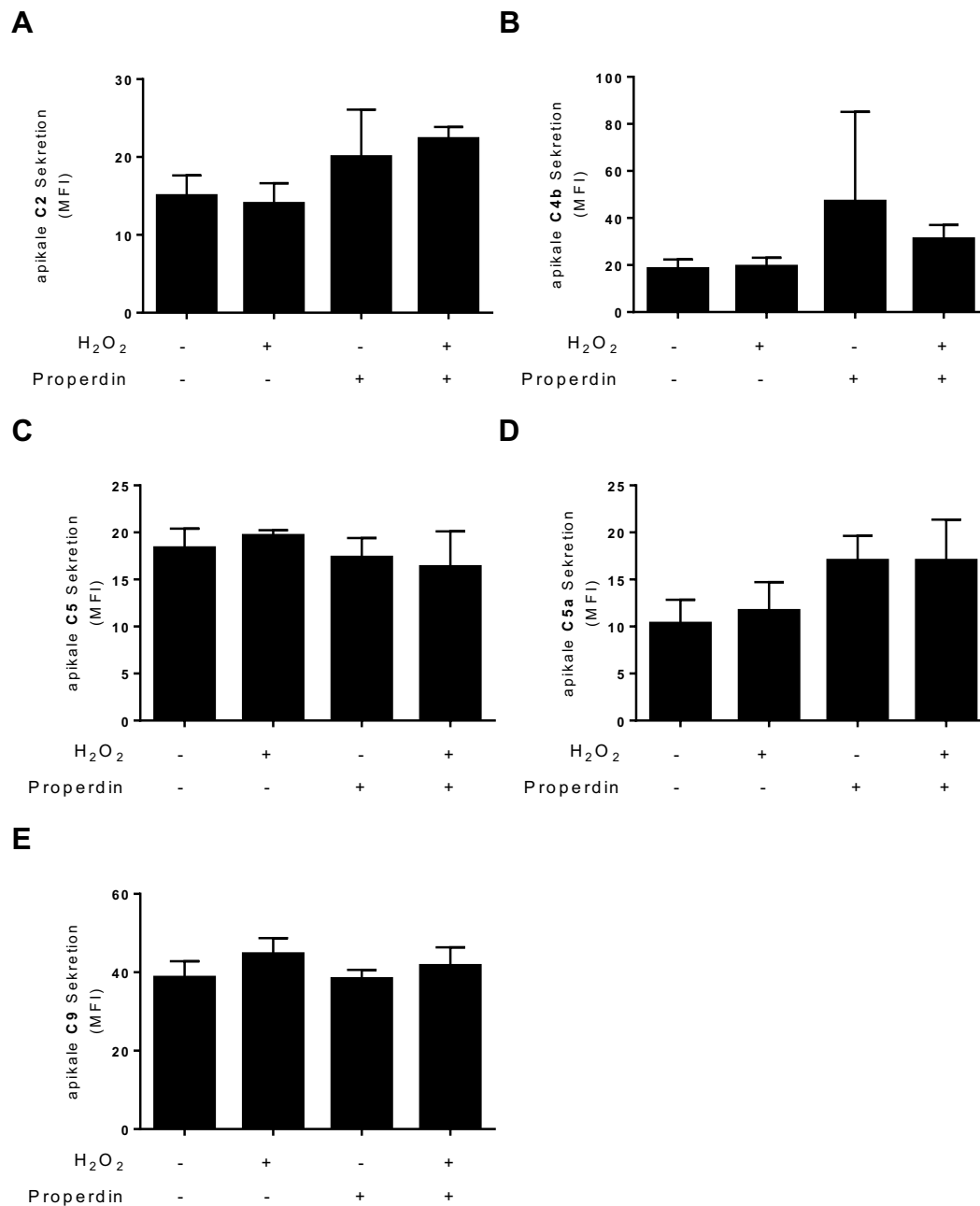
- Daten zur Expression der ARPE-19 Zellen **ohne Veränderungen** durch Behandlung mit Properdin (*Abbildung 1*)
- Daten zur apikalen Sekretion der ARPE-19 Zellen **ohne Veränderung** durch Behandlung mit Properdin (*Abbildung 2*)
- Daten zur Expression der ARPE-19 Zellen **ohne Veränderungen** durch Behandlung mit Properdin und Properdin<sup>dpl</sup> Serum (*Abbildung 3*)

**A****B****C****D****E****F**

**G****H****I****J****K****L**

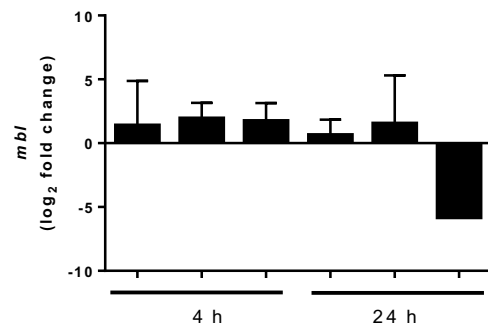
**Abbildung 1: Expression von Komplementfaktoren in gestressten ARPE-19 Zellen nach Behandlung mit Properdin nach 4 h und 24 h.**

Die mRNA-Isolation erfolgte aus Zellen, die mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt wurden. Die Transkriptänderung, die mittels qPCR untersucht wurde, wurde gegen *gapdh* relativ quantifiziert. Die Vielfache Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle wurde auf den Logarithmus zur Basis 2 berechnet. Es wurden die Faktoren aufgeführt, bei denen die Behandlung mit Properdin zu keiner signifikanten Änderung der Expression geführt hat.

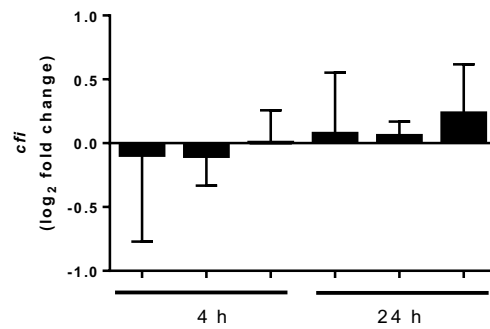


**Abbildung 2: Apikale Sekretionsänderung unter dem Einfluss von exogenem Properdin**

Die apikale Sekretion der Komplementfaktoren C2, C4b, C5, C5a und C9 wurden mittels Multiplex-ELISA untersucht. Es konnte durch eine 4 stündige Behandlung mit Properdin keine Änderung beobachtet werden. Die Mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) der apikalen Sekretion wurde gemessen.

**A**

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	+	+	+	+	+	+
Properdin	-	-	+	-	-	+
Serum	-	+	+	-	+	+

**B**

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	+	+	+	+	+	+
Properdin	-	-	+	-	-	+
Serum	-	+	+	-	+	+

**Abbildung 3: Expression von Komplementfaktoren in gestressten ARPE-19 Zellen nach Behandlung mit Properdin und Properdin<sup>dpl</sup> Serum nach 4 h und 24 h.**

Die mRNA-Isolation erfolgte aus Zellen, die mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Properdin<sup>dpl</sup> Serum bzw. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Properdin<sup>dpl</sup> Serum + Properdin behandelt wurden. Die Transkriptänderung, die mittels qPCR untersucht wurde, wurde gegen *gapdh* relativ quantifiziert. Die vielfache Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle wurde auf den Logarithmus zur Basis 2 berechnet.

# Glossar

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Ausgeschrieben
A.dest	Aqua destillata = destilliertes Wasser
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ÄSP	Äußere Segmente der Photorezeptoren
AG	Arbeitsgruppe
AMD	Altersbedingte Makuladegeneration
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Membrankapazität
C1q	Komplementkomponente 1q
C3	Komplementkomponente 3
C4	Komplementkomponente 4
C5aR	C5a-Rezeptor
CD46	<i>Engl.: cluster of differentiation 46</i>
CD59	<i>Engl.: cluster of differentiation 59</i>
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFD	Komplementfaktor D
CFH	Komplementfaktor H
CFI	Komplementfaktor I
CFP	Komplementfaktor P (= Properdin)
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CTSB	Cathepsin B
CTSL	Cathepsin L
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
dpl	depletiert
ELISA	<i>Engl.: enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FCS	Fötales Kälberserum
FoxP3	Forkhead-Box-Protein 3
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid

IgG	Immunglobulin G
IL-1	Interleukin 1
IL-18	Interleukin 18
KM1	Kultivierungsmethode 1
KM2	Kultivierungsmethode 2
konz	Konzentriert
mAk	Monoklonaler Antikörper
MBL	Mannose-bindendes Lektin
mRNA	<i>Engl.: messenger ribonucleic acid</i>
NLRP3	Nukleotid-bindende Oligomerisierungsdomäne mit Leukin-reichen Wiederholungen und Pyrin Domäne
Nr	Nummer
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
pAk	Polyklonaler Antikörper
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
qPCR	Quantitative Echtzeit-PCR
RPE	Retinales Pigmentepithel
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TER	Transepithelialer elektrischer Widerstand
TGF- $\beta$	<i>Engl.: Transforming Growth Factor <math>\beta</math></i>
TMB	Tetramethylbenzidin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UR	Universität Regensburg
ZO1	Zonula occludens-1

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Zelllinie.....	16
Tabelle 2: Zusammensetzung Zellkulturmedium KM1 .....	16
Tabelle 3: Zusammensetzung Zellkulturmedium KM2.....	16
Tabelle 4: Verwendete Primärantikörper.....	17
Tabelle 5: Verwendete Sekundärreagenzien .....	17
Tabelle 6: Verwendete Primer.....	18
Tabelle 7: Verwendete Puffer.....	19
Tabelle 8: Verwendete Chemikalien .....	21
Tabelle 9: Verwendete Proteine .....	22
Tabelle 10: Gele für den Western Blot.....	22
Tabelle 11: Verwendete Kit-Systeme.....	23
Tabelle 12: Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	23
Tabelle 13: Verwendete Software .....	24
Tabelle 14: Bedingungen Zellaussaat .....	26
Tabelle 15: Schema der Behandlungsstrategien .....	27
Tabelle 16: Übersicht der Antikörper für die Immunfärbungen.....	29
Tabelle 17: Reaktions-Ansatz qPCR .....	30
Tabelle 18: Bedingungen für die qPCR.....	30



## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Grafische Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Arbeit	S.8
Abbildung 2:	Übersicht Komplementkaskade	S.13
Abbildung 3:	Anti-ZO1 immunhistologische Färbung zum Vergleich von KM1 und KM2	S.35
Abbildung 4:	Vergleich von KM1 und KM2 durch Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes und der Membranfläche	S.36
Abbildung 5:	Korrelierende Expression von Komplementfaktoren unter KM1 und KM2 nach Behandlung mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	S.37
Abbildung 6:	Divergierende Expression von Komplementfaktoren unter KM1 und KM2 nach Behandlung mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	S.39
Abbildung 7:	Anti-Properdin immunologische Färbung	S.41
Abbildung 8:	Nachweis von zellassoziertem Properdin im Western Blot und densitometrische Auswertung	S.42
Abbildung 9:	Expression von Komplementfaktoren in gestressten ARPE-19 Zellen nach Behandlung mit Properdin nach 4 h und 24 h	S.43
Abbildung 10:	Apikale Ausschüttung von Properdin durch gestresste, behandelte ARPE-19 Zellen	S.44
Abbildung 11:	Apikale Sekretionsänderung unter dem Einfluss von exogenem Properdin	S.46
Abbildung 12:	Nachweis von zellassoziertem CFI im Western Blot und densitometrische Auswertung	S.48
Abbildung 13:	Expression von Komplementfaktoren in gestressten ARPE-19 Zellen nach Behandlung mit Properdin und Properdin <sup>dpl</sup> Serum nach 4 h und 24 h	S.49
Abbildung 14:	Apikale Properdin-Sekretion von gestressten, behandelten ARPE-19 Zellen	S.51

# Literaturverzeichnis

1. Strauß O. Das Retinale Pigmentepithel [Internet]. Vol. 106, *Der Ophthalmologe*. 2009. p. 297–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00347-008-1868-y>
2. Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev*. 2005 Jul;85(3):845–81.
3. Ablonczy Z, Dahrouj M, Tang PH, Liu Y, Sambamurti K, Marmorstein AD, et al. Human retinal pigment epithelium cells as functional models for the RPE in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011 Nov 4;52(12):8614–20.
4. Adijanto J, Philp NJ. Cultured primary human fetal retinal pigment epithelium (hfRPE) as a model for evaluating RPE metabolism. *Exp Eye Res*. 2014 Sep;126:77–84.
5. Dunn KC, Aotaki-Keen AE, Putkey FR, Hjelmeland LM. ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Exp Eye Res*. 1996 Feb;62(2):155–69.
6. Idelson M, Alper R, Obolensky A, Ben-Shushan E, Hemo I, Yachimovich-Cohen N, et al. Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional retinal pigment epithelium cells. *Cell Stem Cell*. 2009 Oct 2;5(4):396–408.
7. Augustin A. Was ist oxidativer Stress? [Internet]. Vol. 227, *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*. 2010. p. 90–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0029-1245125>
8. Schäfer N, Grosche A, Schmitt SI, Braunger BM, Pauly D. Complement Components Showed a Time-Dependent Local Expression Pattern in Constant and Acute White Light-Induced Photoreceptor Damage. *Front Mol Neurosci*. 2017 Jun 20;10:197.
9. Roehlecke C, Schumann U, Ader M, Brunssen C, Bramke S, Morawietz H, et al. Stress reaction in outer segments of photoreceptors after blue light irradiation. *PLoS One*. 2013 Sep 11;8(9):e71570.
10. Pujol-Lereis LM, Schäfer N, Kuhn LB, Rohrer B, Pauly D. Interrelation Between Oxidative Stress and Complement Activation in Models of Age-Related Macular Degeneration. *Adv Exp Med Biol*. 2016;854:87–93.
11. Schütt F, Davies S, Kopitz J, Holz FG, Boulton ME. Photodamage to human RPE cells by A2-E, a retinoid component of lipofuscin. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000 Jul;41(8):2303–8.
12. Nita M, Grzybowski A. The Role of the Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in the Pathomechanism of the Age-Related Ocular Diseases and Other Pathologies of the Anterior and Posterior Eye Segments in Adults. *Oxid Med Cell Longev*. 2016 Jan 10;2016:3164734.

13. Hollyfield JG, Bonilha VL, Rayborn ME, Yang X, Shadrach KG, Lu L, et al. Oxidative damage-induced inflammation initiates age-related macular degeneration. *Nat Med*. 2008 Feb;14(2):194–8.
14. Khandhadia S, Cipriani V, Yates JRW, Lotery AJ. Age-related macular degeneration and the complement system [Internet]. Vol. 217, *Immunobiology*. 2012. p. 127–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2011.07.019>
15. Merle NS, Church SE, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement System Part I - Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Front Immunol*. 2015 Jun 2;6:262.
16. Lubbers R, van Essen MF, van Kooten C, Trouw LA. Production of complement components by cells of the immune system [Internet]. Vol. 188, *Clinical & Experimental Immunology*. 2017. p. 183–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/cei.12952>
17. Gaggl M, Aigner C, Sunder-Plassmann G, Schmidt A. Thrombotische Mikroangiopathien [Internet]. Vol. 111, *Medizinische Klinik - Intensivmedizin und Notfallmedizin*. 2016. p. 434–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00063-016-0176-6>
18. Sohn JH, Kaplan HJ, Suk HJ, Bora PS, Bora NS. Chronic low level complement activation within the eye is controlled by intraocular complement regulatory proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000 Oct;41(11):3492–502.
19. Gu X, Meer SG, Miyagi M, Rayborn ME, Hollyfield JG, Crabb JW, et al. Carboxyethylpyrrole protein adducts and autoantibodies, biomarkers for age-related macular degeneration. *J Biol Chem*. 2003 Oct 24;278(43):42027–35.
20. Thurman JM, Renner B, Kunchithapautham K, Ferreira VP, Pangburn MK, Ablonczy Z, et al. Oxidative stress renders retinal pigment epithelial cells susceptible to complement-mediated injury. *J Biol Chem*. 2009 Jun 19;284(25):16939–47.
21. Trakkides T-O, Schäfer N, Reichenthaler M, Kühn K, Brandwijk RJMGE, Toonen EJM, et al. Oxidative Stress Increases Endogenous Complement-Dependent Inflammatory and Angiogenic Responses in Retinal Pigment Epithelial Cells Independently of Exogenous Complement Sources. *Antioxidants (Basel)* [Internet]. 2019 Nov 13;8(11). Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/antiox8110548>
22. Chen JY, Cortes C, Ferreira VP. Properdin: A multifaceted molecule involved in inflammation and diseases. *Mol Immunol*. 2018 Oct;102:58–72.
23. Pauly D, Nagel BM, Reinders J, Killian T, Wulf M, Ackermann S, et al. A novel antibody against human properdin inhibits the alternative complement system and specifically detects properdin from blood samples. *PLoS One*. 2014 May 5;9(5):e96371.
24. Pangburn MK. Analysis of the natural polymeric forms of human properdin and their functions in complement activation. *J Immunol*. 1989 Jan 1;142(1):202–7.

25. Alcorlo M, Tortajada A, Rodríguez de Córdoba S, Llorca O. Structural basis for the stabilization of the complement alternative pathway C3 convertase by properdin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Aug 13;110(33):13504–9.
26. Wegener J, Abrams D, Willenbrink W, Galla H-J, Janshoff A. Automated multi-well device to measure transepithelial electrical resistances under physiological conditions. *Biotechniques*. 2004 Oct;37(4):590, 592–4, 596–7.
27. Shen X, Zhao Y-F, Xu S-Q, Wang L, Cao H-M, Cao Y, et al. Cathepsin L induced PC-12 cell apoptosis via activation of B-Myb and regulation of cell cycle proteins. *Acta Pharmacol Sin*. 2019 Nov;40(11):1394–403.
28. Wang Y, Zhang H, He Y-W. The Complement Receptors C3aR and C5aR Are a New Class of Immune Checkpoint Receptor in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*. 2019 Jul 19;10:1574.
29. Schmaier AH. The hereditary angioedema syndromes. *J Clin Invest*. 2019 Jan 2;129(1):66–8.
30. Yasuda K, Nakanishi K, Tsutsui H. Interleukin-18 in Health and Disease. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019 Feb 2;20(3). Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20030649>
31. Fisher AJ, Cipolla E, Varre A, Gu H, Mickler EA, Vittal R. Potential Mechanisms Underlying TGF- $\beta$ -mediated Complement Activation in Lung Fibrosis. *Cell Mol Med Open Access* [Internet]. 2017 Nov 22;3(3). Available from: <http://dx.doi.org/10.21767/2573-5365.100037>
32. Fearon DT, Austen KF. Properdin: binding to C3b and stabilization of the C3b-dependent C3 convertase. *J Exp Med*. 1975 Oct 1;142(4):856–63.
33. Pauly D, Agarwal D, Dana N, Schäfer N, Biber J, Wunderlich KA, et al. Cell-Type-Specific Complement Expression in the Healthy and Diseased Retina. *Cell Rep*. 2019 Nov 26;29(9):2835–48.e4.
34. Garred P, Genster N, Pilely K, Bayarri-Olmos R, Rosbjerg A, Ma YJ, et al. A journey through the lectin pathway of complement-MBL and beyond. *Immunol Rev*. 2016 Nov;274(1):74–97.
35. Rodriguez E, Rallapalli PM, Osborne AJ, Perkins SJ. New functional and structural insights from updated mutational databases for complement factor H, Factor I, membrane cofactor protein and C3. *Biosci Rep* [Internet]. 2014 Oct 22;34(5). Available from: <http://dx.doi.org/10.1042/BSR20140117>
36. Holtkamp GM, Van Rossem M, de Vos AF, Willekens B, Peek R, Kijlstra A. Polarized secretion of IL-6 and IL-8 by human retinal pigment epithelial cells. *Clin Exp Immunol*. 1998 Apr;112(1):34–43.
37. Hu J, Bok D. A cell culture medium that supports the differentiation of human retinal pigment epithelium into functionally polarized monolayers. *Mol Vis*. 2001 Feb 7;7:14–9.

38. Dunn KC, Marmorstein AD, Bonilha VL, Rodriguez-Boulan E, Giordano F, Hjelmeland LM. Use of the ARPE-19 cell line as a model of RPE polarity: basolateral secretion of FGF5. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998 Dec;39(13):2744–9.
39. Pfeffer BA, Philp NJ. Cell culture of retinal pigment epithelium: Special Issue. *Exp Eye Res.* 2014 Sep;126:1–4.
40. Sonoda S, Spee C, Barron E, Ryan SJ, Kannan R, Hinton DR. A protocol for the culture and differentiation of highly polarized human retinal pigment epithelial cells. *Nat Protoc.* 2009;4(5):662–73.
41. Samuel W, Jaworski C, Postnikova OA, Kutty RK, Duncan T, Tan LX, et al. Appropriately differentiated ARPE-19 cells regain phenotype and gene expression profiles similar to those of native RPE cells. *Mol Vis.* 2017 Mar 5;23:60–89.
42. Ablonczy Z, Crosson CE. VEGF modulation of retinal pigment epithelium resistance. *Exp Eye Res.* 2007 Dec;85(6):762–71.
43. Ahmado A, Carr A-J, Vugler AA, Semo M 'ayan, Gias C, Lawrence JM, et al. Induction of differentiation by pyruvate and DMEM in the human retinal pigment epithelium cell line ARPE-19. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011 Sep 9;52(10):7148–59.
44. Flood MT, Gouras P. The organization of human retinal pigment epithelium in vitro. *Vision Res.* 1981;21(1):119–26.
45. Grisanti S, Guidry C. Transdifferentiation of retinal pigment epithelial cells from epithelial to mesenchymal phenotype. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995 Feb;36(2):391–405.
46. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009 Jun;119(6):1420–8.
47. Blenkinsop TA, Salero E, Stern JH, Temple S. The culture and maintenance of functional retinal pigment epithelial monolayers from adult human eye. *Methods Mol Biol.* 2013;945:45–65.
48. Luo Y, Zhuo Y, Fukuhara M, Rizzolo LJ. Effects of culture conditions on heterogeneity and the apical junctional complex of the ARPE-19 cell line. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006 Aug;47(8):3644–55.
49. Sheller RA, Cuevas ME, Todd MC. Comparison of transepithelial resistance measurement techniques: Chopsticks vs. Endohm. *Biol Proced Online.* 2017 May 10;19:4.
50. Jovov B, Wills NK, Lewis SA. A spectroscopic method for assessing confluence of epithelial cell cultures. *Am J Physiol.* 1991 Dec;261(6 Pt 1):C1196–203.
51. Tian J, Ishibashi K, Honda S, Boylan SA, Hjelmeland LM, Handa JT. The expression of native and cultured human retinal pigment epithelial cells grown in

- different culture conditions. *Br J Ophthalmol*. 2005 Nov;89(11):1510–7.
52. Sharma RK, Orr WE, Schmitt AD, Johnson DA. A functional profile of gene expression in ARPE-19 cells. *BMC Ophthalmol*. 2005 Nov 1;5:25.
  53. Wang AL, Lukas TJ, Yuan M, Du N, Handa JT, Neufeld AH. Changes in retinal pigment epithelium related to cigarette smoke: possible relevance to smoking as a risk factor for age-related macular degeneration. *PLoS One*. 2009 Apr 24;4(4):e5304.
  54. Kaczara P, Sarna T, Burke JM. Dynamics of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> availability to ARPE-19 cultures in models of oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2010 Apr 15;48(8):1064–70.
  55. Spitzer D, Mitchell LM, Atkinson JP, Hourcade DE. Properdin can initiate complement activation by binding specific target surfaces and providing a platform for de novo convertase assembly. *J Immunol*. 2007 Aug 15;179(4):2600–8.
  56. Pillemer L, Blum L, Lepow IH, Ross OA, Todd EW, Wardlaw AC. The properdin system and immunity. I. Demonstration and isolation of a new serum protein, properdin, and its role in immune phenomena. *Science*. 1954 Aug 20;120(3112):279–85.
  57. Bailey TA, Kanuga N, Romero IA, Greenwood J, Luthert PJ, Cheetham ME. Oxidative stress affects the junctional integrity of retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004 Feb;45(2):675–84.
  58. Kemper C, Atkinson JP, Hourcade DE. Properdin: emerging roles of a pattern-recognition molecule. *Annu Rev Immunol*. 2010;28:131–55.
  59. Wang Y, Hanus JW, Abu-Asab MS, Shen D, Ogilvy A, Ou J, et al. NLRP3 Upregulation in Retinal Pigment Epithelium in Age-Related Macular Degeneration. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2016 Jan 8;17(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms17010073>
  60. Kauppinen A, Niskanen H, Suuronen T, Kinnunen K, Salminen A, Kaarniranta K. Oxidative stress activates NLRP3 inflammasomes in ARPE-19 cells--implications for age-related macular degeneration (AMD). *Immunol Lett*. 2012 Sep;147(1-2):29–33.
  61. Laudisi F, Spreafico R, Evrard M, Hughes TR, Mandriani B, Kandasamy M, et al. Cutting edge: the NLRP3 inflammasome links complement-mediated inflammation and IL-1 $\beta$  release. *J Immunol*. 2013 Aug 1;191(3):1006–10.
  62. Anderson DH, Radeke MJ, Gallo NB, Chapin EA, Johnson PT, Curletti CR, et al. The pivotal role of the complement system in aging and age-related macular degeneration: hypothesis re-visited. *Prog Retin Eye Res*. 2010 Mar;29(2):95–112.
  63. Jiao H, Rutar M, Fernando N, Yednock T, Sankaranarayanan S, Aggio-Bruce R, et al. Subretinal macrophages produce classical complement activator C1q

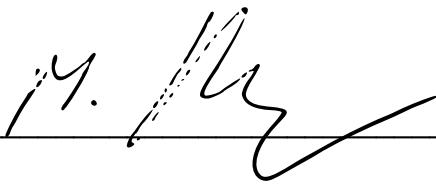
leading to the progression of focal retinal degeneration. *Mol Neurodegener.* 2018 Aug 20;13(1):45.

64. Beinrohr L, Dobó J, Závodszky P, Gál P. C1, MBL–MASPs and C1-inhibitor: novel approaches for targeting complement-mediated inflammation [Internet]. Vol. 14, *Trends in Molecular Medicine*. 2008. p. 511–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2008.09.009>
65. Stanton CM, Yates JRW, den Hollander AI, Seddon JM, Swaroop A, Stambolian D, et al. Complement factor D in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011 Nov 11;52(12):8828–34.
66. Tan PL, Garrett ME, Willer JR, Campochiaro PA, Campochiaro B, Zack DJ, et al. Systematic Functional Testing of Rare Variants: Contributions of CFI to Age-Related Macular Degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2017 Mar 1;58(3):1570–6.
67. Seddon JM, Yu Y, Miller EC, Reynolds R, Tan PL, Gowrisankar S, et al. Rare variants in CFI, C3 and C9 are associated with high risk of advanced age-related macular degeneration. *Nat Genet.* 2013 Nov;45(11):1366–70.
68. Sarma JV, Ward PA. The complement system. *Cell Tissue Res.* 2011 Jan;343(1):227–35.
69. Joseph K, Kulik L, Coughlin B, Kunchithapautham K, Bandyopadhyay M, Thiel S, et al. Oxidative stress sensitizes retinal pigmented epithelial (RPE) cells to complement-mediated injury in a natural antibody-, lectin pathway-, and phospholipid epitope-dependent manner. *J Biol Chem.* 2013 May 3;288(18):12753–65.
70. Marazita MC, Dugour A, Marquioni-Ramella MD, Figueroa JM, Suburo AM. Oxidative stress-induced premature senescence dysregulates VEGF and CFH expression in retinal pigment epithelial cells: Implications for Age-related Macular Degeneration. *Redox Biol.* 2016 Apr;7:78–87.

# Erklärung an Eides statt

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

Regensburg, 28.05.2020



A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized 'M.' followed by a large, flowing signature, is written over a horizontal line.

Erklärung:

Die Dissertation wurde von Herrn PD Dr. Richard Bauer zusammen mit Frau Dr. Diana Pauly angeregt und überwacht.



# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich während meines Studiums und meiner Promotion unterstützt haben:

Herrn PD Dr. Richard Bauer danke ich für die Betreuung meiner Promotion als Doktorvater und als Gutachter sowie für die Möglichkeit in seinem Arbeitskreis meine Doktorarbeit anfertigen zu dürfen.

Frau Prof. Dr. Kreutz danke ich für das Interesse an meiner Doktorarbeit, insofern sie sich bereit erklärte diese als Zweitgutachterin zu lesen und zu bewerten.

Frau Dr. Diana Pauly danke ich dafür, dass ich Teil ihrer Arbeitsgruppe sein durfte, für die Betreuung meiner Labor- und Schreibaarbeit, für alle Anregungen und fachlichen Diskussionen, für die Beantwortung zahlreicher Fragen und ihre unglaubliche Unterstützung bei meinem Staatsexamen.

Frau Anne-Kathrin Enzbrenner danke ich für die jahrelange Teamarbeit während Studium und Promotion und die daraus entstandene Freundschaft.

Frau Andrea Dannullis, Frau Elfriede Eckert und Frau Renate Föckler danke ich für die technische Hilfestellung.

Frau Hannah Wolf, Frau Nicole Schäfer und Herrn Yassin Jabri danke ich für die gute Zusammenarbeit und das positive Arbeitsklima.

Herrn Timon Trakkides und Herrn Florian Urban danke ich dafür, dass sie mir von Ihnen erhobene Daten zu Vergleichszwecken zur Verfügung stellten.

Herrn PD Dr. Klaus Stark danke ich für die gemeinsamen Überlegungen hinsichtlich der statistischen Auswertung meiner Daten.

Frau Ottavia Palazzo danke ich für die Einweisung und Hilfestellung am konfokalen Mikroskop.

Ganz besonders möchte ich mich abschließend bei meiner Familie bedanken: Bei meinen Eltern, Gaby und Ralf Reichenthaler, die immer meinen Bildungsweg unterstützt haben und jederzeit hinter mir standen, sowie bei meinem Lebenspartner, Michael Schied, dafür, dass er an mich glaubt wie kein anderer.