

Aus der Augenklinik und Poliklinik

der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Jost Hillenkamp



Altersabhängige Makuladegeneration

-

Regeneration des retinalen Pigmentepithels durch Anregung zur Proliferation durch den Transkriptionsfaktor E2F2

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Lukas Willmann

aus Osnabrück

Würzburg, 2022

Referent: Prof. Dr. Jost Hillenkamp

Korreferent bzw. Korreferentin: Priv.-Doz. Dr. Agmal Scherzad

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 18.10.2022

Der Promovend ist Arzt

Für meine Eltern, Geschwister und Jule.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|----------|
| 1 | EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 | ALTERSABHÄNGIGE MAKULADEGENERATION (AMD) | 1 |
| 1.1.1 | <i>Klassifikation und klinisches Erscheinungsbild</i> | 1 |
| 1.2 | PATHOLOGISCHE GRUNDLAGEN DER AMD | 2 |
| 1.2.1 | <i>Physiologie und Funktion des retinalen Pigmentepithels</i> | 2 |
| 1.2.2 | <i>Circulus vitiosus des RPE-Zellverlusts</i> | 3 |
| 1.3 | THERAPIE DER TROCKENEN AMD DURCH RPE-REGENERATION | 4 |
| 1.3.1 | <i>Chirurgische Makula-Translokation</i> | 4 |
| 1.3.2 | <i>Autologe und allogene zelluläre RPE-Regeneration</i> | 4 |
| 1.4 | NEUE STRATEGIE: RPE-REGENERATION IN SITU | 6 |
| 1.4.1 | <i>Der Zellzyklus</i> | 6 |
| 1.4.2 | <i>E2F2 abhängige Regulation des Zellzyklus</i> | 7 |
| 1.4.3 | <i>RPE-Regeneration durch Induktion zur Proliferation durch E2F2 Überexpression</i> | 8 |
| 1.5 | ZIELE DIESER ARBEIT | 8 |
| 2 | MATERIAL UND METHODEN | 9 |
| 2.1 | GERÄTE | 9 |
| 2.2 | MATERIALIEN | 11 |
| 2.2.1 | <i>Verbrauchsmaterialien</i> | 11 |
| 2.3 | CHEMIKALIEN | 12 |
| 2.4 | MEDIEN, ZUSATZLÖSUNGEN UND PUFFER | 14 |
| 2.4.1 | <i>Medien / Zusatzlösungen für Zellkultur</i> | 14 |
| 2.4.2 | <i>Zusatzlösungen für Immunfärbung</i> | 15 |
| 2.4.3 | <i>Zusatzlösungen und Puffer für Westernblot und Immunfärbung</i> | 15 |
| 2.4.4 | <i>Agarosegel-Elektrophorese</i> | 16 |
| 2.5 | ANTIKÖRPER UND FARBSTOFFE | 17 |
| 2.5.1 | <i>Primärantikörper und Farbstoffe</i> | 17 |
| 2.5.2 | <i>Sekundärantikörper</i> | 17 |
| 2.6 | ZELL-LINIE: ARPE-19 | 18 |
| 2.7 | PLASMIDE | 18 |
| 2.8 | ZELLKULTUR DER ARPE-19 ZELLEN | 18 |
| 2.8.1 | <i>Passagieren der Zellen</i> | 19 |
| 2.8.2 | <i>Aussaat der Zellen in Well-Platten</i> | 19 |
| 2.8.3 | <i>Bestimmung der Zellzahl</i> | 20 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 2.8.4 | <i>Einfrieren der Zellen</i> | 20 |
| 2.8.5 | <i>Auftauen der Zellen</i> | 21 |
| 2.9 | E2F2 TRANSFEKTION MITTELS POLYETHYLENIMIN (PEI) | 21 |
| 2.10 | SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (PAGE)..... | 22 |
| 2.10.1 | <i>Grundlagen</i> | 22 |
| 2.10.2 | <i>Materialvorbereitung</i> | 22 |
| 2.10.3 | <i>Probenvorbereitung</i> | 22 |
| 2.10.4 | <i>Elektrophorese</i> | 23 |
| 2.10.5 | <i>Immunoblot</i> | 23 |
| 2.11 | IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG (IHC) | 24 |
| 2.12 | DAPI-FÄRBUNG..... | 24 |
| 2.12.1 | <i>Durchführung</i> | 24 |
| 2.13 | PROLIFERATIONSMARKER | 25 |
| 2.13.1 | <i>Intranukläres Ki67</i> | 25 |
| 2.13.2 | <i>Bromodeoxyuridin (BrdU) Markierung</i> | 25 |
| 2.14 | KITS | 26 |
| 2.14.1 | <i>Apoptose Testung : TUNEL Test</i> | 26 |
| 2.14.2 | <i>Viabilitätstest: XTT-Test</i> | 27 |
| 2.14.3 | <i>Permeabilitätstest: FITC-Dextran-Assay</i> | 28 |
| 2.15 | ZELLZAHLBESTIMMUNG | 29 |
| 2.16 | STATISTISCHE AUSWERTUNG | 29 |
| 3 | ERGEBNISSE | 30 |
| 3.1 | ETABLIERUNG EINES NICHT PROLIFERATIVEN RPE-ZELLMODELLS | 30 |
| 3.1.1 | <i>Spontaner Wachstumsarrest zwei Wochen nach Aussaat</i> | 30 |
| 3.1.2 | <i>Zunahme der ZO-1 Expression als Zeichen der Integrität der Zonulae occludentes</i> | 31 |
| 3.2 | E2F2 TRANSFEKTION FÜHRT ZUR PROLIFERATIONSSTEIGERUNG | 32 |
| 3.2.1 | <i>E2F2 Transfektion führt zur Erhöhung der E2F2-Expression</i> | 33 |
| 3.2.2 | <i>E2F2 Transfektion führt zur Überexpression des Proliferationsmarkers Cyclin D1</i> | 34 |
| 3.2.3 | <i>E2F2 Transfektion führt zu Überexpression des Proliferationsmarkers Ki67 und Anstieg der Gesamtzellzahl</i> | 35 |
| 3.2.4 | <i>E2F2 Transfektion führt zum Anstieg der intrazellulären BrdU Aufnahme</i> | 39 |
| 3.3 | DIE E2F2 TRANSFEKTION BEWIRKT EINE KURZFRISTIGE STEIGERUNG DER APOPTOSERATE..... | 41 |
| 3.4 | DIE E2F2 TRANSFEKTION FÜHRT ZUR PASSAGEREN VIABILITÄTSREDUKTION | 45 |
| 3.5 | DIE E2F2 TRANSFEKTION FÜHRT ZUR PASSAGEREN PERMEABILITÄTSSTEIGERUNG..... | 47 |
| 3.5.1 | <i>Permeabilität der nicht transfizierten Gruppen</i> | 48 |
| 3.5.2 | <i>Permeabilitätszunahme nach Transfektion</i> | 49 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.6 | E2F2 TRANSFEKTION INDUZIERT KEINE ÜBEREXPRESSION DER MARKER-PROTEINE FÜR EPITHELIAL-MESENCHYMALE TRANSITION (EMT)..... | 49 |
| 3.6.1 | <i>Epithelial-mesenchymale Transition</i> | 50 |
| 3.6.2 | <i>EMT Marker</i> | 50 |
| 3.6.3 | <i>Transforming Growth Factor (TGF)- β2 induziert die Überexpression der EMT Marker Kollagen IV und α-SMA</i> | 51 |
| 4 | DISKUSSION | 59 |
| 4.1 | EFFEKTE DER E2F2 TRANSFEKTION AUF ARPE-19 ZELLEN | 59 |
| 4.1.1 | <i>Proliferation: Steigerung durch E2F2 Überexpression</i> | 59 |
| 4.1.2 | <i>Apoptose: kein langfristiger Einfluss durch E2F2 Überexpression</i> | 61 |
| 4.1.3 | <i>Zell-Viabilität: Erhalt der Viabilität unter E2F2 Überexpression</i> | 62 |
| 4.1.4 | <i>Parazelluläre Permeabilität: Erhalt der Permeabilität unter E2F2 Überexpression</i> | 62 |
| 4.1.5 | <i>Epithelial-mesenchymale Transition (EMT): E2F2 Transfektion führt nicht zur Zell-Dedifferenzierung durch EMT</i> | 63 |
| 4.2 | ARPE-19 ZELLEN ALS MODELL FÜR ADULTE RPE ZELLEN | 64 |
| 4.3 | CHANCEN UND RISIKEN DER AUTOLOGEN RPE-REGENERATION MITTELS E2F2 | 66 |
| 4.3.1 | <i>Chirurgische Translokation vs in situ-RPE-Regeneration durch Vektor-E2F2</i> | 66 |
| 4.3.2 | <i>Autologe RPE-Regeneration vs allogene Transplantation</i> | 66 |
| 4.3.3 | <i>Therapieausblick des E2F2 Gentransfers in situ: Risiken, Gentransfektion, Regulation und Therapiezeitpunkt</i> | 67 |
| 4.4 | AUSBLICK..... | 70 |
| 5 | ZUSAMMENFASSUNG | 71 |
| 6 | LITERATURVERZEICHNIS | 73 |
| 7 | APPENDIX | 83 |
| 7.1 | ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | 83 |
| 7.2 | ABBILDUNGSVERZEICHNIS | 86 |
| 7.3 | TABELLENVERZEICHNIS | 88 |
| 7.4 | DANKSAGUNG..... | 89 |
| 7.5 | EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN UND KONGRESSTEILNAHME..... | 90 |

1 Einleitung

1.1 Altersabhängige Makuladegeneration (AMD)

Die altersabhängige Makuladegeneration ist weltweit der häufigste Grund für die irreversible Erblindung ab dem 65. Lebensjahr. Es wird davon ausgegangen, dass weltweit zwischen 30 und 50 Millionen Personen an einer AMD erkrankt sind [1]. In einer repräsentativen Population in Europa liegt die Prävalenz der frühen AMD zwischen dem 55 und 59 Lebensjahr bei 3,5% (95% Konfidenzintervall [KI] 2.1% - 5.0%) und erhöht sich im Alter über 85 Jahren auf 17.6% (95% KI 13.6 - 21.5%), wobei für die späten Formen der AMD die Kennzahlen bei 0.1% (95% KI 0.04 - 0.3%) und 9.8% (95% KI 6.3% - 13.3%) liegen [2]. Aufgrund der demographischen Entwicklung mit Zunahme des durchschnittlichen Lebensalters kommt es voraussichtlich zwischen den Jahren 2013 bis 2040 zu einer Verdopplung der Prävalenz der späten Formen der AMD und somit zu einer deutlichen Zunahme von schweren Sehstörungen und Erblindung [2, 3].

Für die neovaskuläre Form der AMD (nAMD) besteht mit der intravitrealen anti-VEGF Therapie ein etabliertes Therapieregime mit nachgewiesenem Nutzen [4]. Für den Großteil des Patientenkollektivs der AMD Patienten – also mit nicht neovaskulärer AMD (>92% aller AMD Patienten) - besteht aktuell weder eine kurative oder präventive Therapie [1].

1.1.1 Klassifikation und klinisches Erscheinungsbild

Das klinisch pathognomonische Kennzeichen der AMD in der Funduskopie ist das Erscheinen von Drusen im Bereich der zentralen Netzhaut. Dies sind Ablagerungen zwischen basalem Retinalen Pigmentepithel (RPE) und der Bruch'schen Membran [5].

Die frühe altersbedingte Makuladegeneration ist charakterisiert durch eine geringe Anzahl (<20) von mittelgroßen Drusen (>63, aber <125 µm, scharf begrenzt) und Hyper- oder Hypopigmentierungen des RPEs. Der intermediäre Typ wird charakterisiert durch mindestens eine große Druse (> 125µm), viele mittelgroße Drusen oder eine nicht-foveale geographischer Atrophie. Die späte Form der AMD teilt sich in zwei Gruppen: 1. die nicht neovaskuläre / trockene und 2. die neovaskuläre/ feuchte Form. Die nicht neovaskuläre späte Form führt zur fovealen geographischen Atrophie, einer Atrophie des retinalen Pigmentepithels und einer konsekutiven Atrophie der darüberliegenden

Photorezeptoren. Die neovaskuläre Form charakterisiert sich durch choroidale Neovaskularisationen (CNV) bzw. retinale angiomatöse Proliferationen (RAP) und deren Folgen [6-9]. Es kommt zur Leckage aus den irregulären Gefäßen und zur intra-, subretinalen oder sub-RPE Ablagerung von Lipiden, Blut oder Blutserum [5].

1.2 Pathologische Grundlagen der AMD

Grundlage aller Formen der AMD ist die Apoptose und der konsekutive Funktionsverlust des RPEs [10].

1.2.1 Physiologie und Funktion des retinalen Pigmentepithels

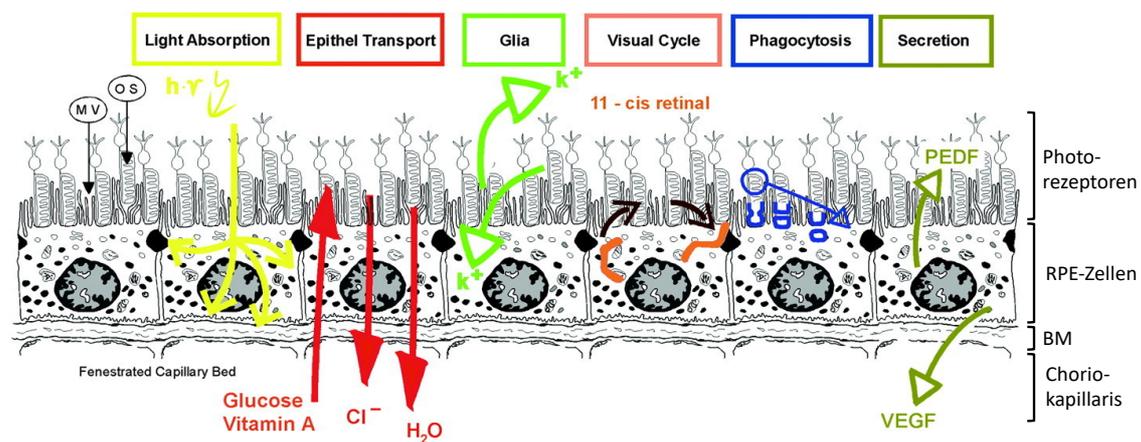


Abbildung 1: Funktionen des retinalen Pigmentepithels (aus dem Englischen nach von Strauss 2005 [10])

MV, Mikrovilli; OS, outer segments / äußere Segmente der Photorezeptoren; BM, Bruch'sche Membran; PEDF, pigment epithelium-derived growth factor; VEGF, vascular epithelium growth factor; Copyright © 2005 the American Physiological Society; DOI: (10.1152/physrev.00021.2004)

Das einschichtige pigmentierte retinale Pigmentepithel liegt auf der Bruch'schen Membran zwischen den Photorezeptoraußensegmenten (apikale Richtung) und der fenestrierten Choriokapillaris (basale Richtung) [11]. Auf der apikalen Seite verfügen die Zellen zur Vergrößerung der Zellmembran und somit der Interaktionsfläche mit den Photorezeptoraußensegmenten über lange Mikrovilli. [10]. Makulär weisen die Zellen eine hexagonale Struktur mit einer Höhe von 12µm und einem Durchmesser von 14µm sowie die höchste Dichte innerhalb der Retina auf [12]. Die Polarisation des Epithels wird durch die Zell-Zell-Verbindungen bestehend aus Desmosomen (adherens junctions),

Nexus (Gap junctions) und Zonula occludens (tight junctions) gewährleistet, wobei letztere als äußere Blut-Retina Schranke fungieren [10].

RPE, Bruch'sche Membran und die Photorezeptoren bilden eine funktionelle Einheit. Im physiologischen Zustand übernimmt das RPE folgenden wichtigen Funktionen: das melaninhaltige Epithel absorbiert (durch das darin enthaltene Pigment) das durch die lichtbrechenden Medien auf der Retina fokussierte Licht [13]. Die Polarisation des Epithels ermöglicht den transzellulären Transport von u.a. Elektrolyten, Wasser, metabolischen Endprodukten, Glukose und Fettsäure zwischen Choriokapillaris und Photorezeptoren durch das RPE [10, 14]. Neben der Phagozytose der Photorezeptoraußensegmente [15] übernimmt das RPE das Recycling der Retinoide im Rahmen der Phototransduktion und stellt so das für die visuelle Signaltransduktion essentielle 11-cis-Retinal für die Photorezeptoren zur Verfügung [16]. Um die strukturelle Integrität der Einheit aus Photorezeptoren – RPE – Bruch'scher Membran – Choriokapillaris aufrecht zu erhalten, sekretiert das RPE Wachstumsfaktoren (bspw. pigment epithelium-derived growth factor; vascular endothelial growth factor) und Zytokine zur Immunregulation [17]. Für den Funktionserhalt der Retina und der Sehleistung muss eine ausreichende Funktion, Anzahl und Qualität der RPE-Zellen vorliegen [5].

1.2.2 Circulus vitiosus des RPE-Zellverlusts

Die Phagozytoserate pro RPE-Zelle beträgt in der Makula täglich bis zu 4000 Photorezeptoraußensegmente im adulten Individuum. Aufgrund dessen kommt es mit steigendem Alter vor allem im makulären Bereich zu erhöhtem oxidativen Stress und konsekutivem Verlust und Funktionsreduktion des RPEs [5, 18, 19]. Die differenzierten und amitotischen RPE-Zellen sind nicht in der Lage, die Zellapoptose durch Proliferation zu kompensieren. Bei abnehmender Anzahl der RPE-Zellen kommt es kompensatorisch zur Vergrößerung der verbleibenden, intakten RPE-Zellen [20].

Die resultierende metabolische Mehrbelastung der verbleibenden RPE-Zellen führt zu einer weiteren Erhöhung des oxidativen Stresses, diese zur weiteren Reduktion der RPE-Zellzahl, Akkumulation von toxischen Endprodukten und Lipofuszein unterhalb des RPEs und letztendlich zur weiteren Apoptose der RPE-Zellen bis hin zur Atrophie des RPEs und sekundären Verlust der Photorezeptoren. Diese Veränderungen zeigen sich im

Rahmen einer trockenen AMD. Die akkumulierte Lipofuszingranula imponieren bei ausreichender Größe funduskopisch als Drusen [20, 21]. Durch Verlust der immunsuppressiven Wirkung des RPEs kommt es zur Aktivierung des Komplementsystems. Dies führt zur weiteren Apoptose des RPEs und zur Einsprossung irregulärer undichter Kapillaren durch die Bruch'sche Membran (sub-RPE) oder das RPE (sub-retinal). Die entstandenen choroidalen Neovaskularisationen (CNV) führen durch Leckage von Blut und Proteinen zu sub- und intraretinaler Flüssigkeit (neovaskuläre, feuchte AMD) [6].

1.3 Therapie der trockenen AMD durch RPE-Regeneration

Aufgrund der essentiellen Notwendigkeit eines funktionstüchtigen RPEs für die Homöostase der retinalen Strukturen und somit der Sehleistung stellt die RPE-Regeneration seit Jahrzehnten einen zentralen Ansatz zur Therapie von Erkrankungen mit RPE Defekten (u.a. trockene AMD) dar [11].

1.3.1 Chirurgische Makula-Translokation

Die chirurgische Makula-Translokation ist ein Verfahren, bei dem ein gesundes RPE aus der peripheren Netzhaut an den hinteren Pol der Retina des selben Auges verschoben wird [22]. Postoperativ zeigt sich, dass es bei einem Teil der operierten Patienten zur Verbesserung der zentralen Sehleistung und Erhalt der Photorezeptoren der Makula kommt. Durch die Notwendigkeit einer Vitrektomie, 360° Retinektomie und Eingabe einer Silikonöltamponade ergibt sich für diese Therapie ein deutliches interventionelles Risiko für u.a. eine Netzhautablösung und ist somit keine etablierte Standardtherapie [23, 24]. Trotzdem stellt dieses Therapiekonzept die Grundlage der im Folgenden erläuterten zellulären Regeneration der RPE Zellen dar.

1.3.2 Autologe und allogene zelluläre RPE-Regeneration

Verschiedene Ansätze der zellulären Translokation zur RPE-Regeneration wurden untersucht.

Im Rahmen eines autologen Verfahrens wurde eine chirurgische Translokation von peripheren RPE Zellen samt Bruch'scher Membran und Choroidea unter die zentrale makuläre Retina durchgeführt [25]. Ein Teil der behandelten Augen zeigte bis zu drei

Jahre nach Therapie eine Verbesserung der zentralen Sehschärfe, weitere Untersuchungen identifizierten funktionstüchtige Photorezeptoren über dem revaskularisierten RPE-Choroid-Graft [26, 27]. Untersuchungen retinaler Degenerationen im Tiermodell zeigten, dass der Ersatz des defekten RPEs durch vitales RPE geschwächte Photorezeptoren erhalten, Photorezeptorapoptose verhindern und den Visus verbessern kann [28]. Die hier genutzten peripheren RPE Zellen desselben Auges besitzen jedoch das identische genetische Material und Alter der zentral defekten RPE und sind daher als Quelle für vitale RPE Zellen nur eingeschränkt verwendbar [28].

Daher erfolgte die Untersuchung autologer und allogener Stammzellen zur Therapie von RPE-Defekten.

Als Quelle gesunder und nicht vorgeschädigter RPE Zellen erfolgte im ersten Schritt die Differenzierung allogener pluripotenter embryonaler Stammzellen (ESC) in RPE-ähnliche Zellen (ESC-RPE) [29, 30]. Nach Transplantation dieser ESC-RPE Zellen in den subretinalen Raum in Form einer Zellsuspension zeigte sich im Tiermodell eine Verbesserung des Sehens und der Rückgang des Photorezeptorunterganges bei retinaler Degeneration (proof-of-concept im Tiermodell) [31, 32]. Für Patienten mit AMD erfolgte in einer klinischen Phase I/IIa Studie die Injektion einer humanen ESC-RPE (hESC-RPE) Suspension subretinal. Im follow-up ergaben sich nach 2 Jahren keine Hinweise auf schwerwiegende Nebenwirkungen wie beispielsweise die Bildung von intraokulären Neoplasien [33-35]. Aktuell ist jedoch unklar, ob die als Zell-Suspension injizierten hESC-RPE Zellen spontan einen für die Funktion essentiellen epithelialen und polarisierten Monolayer bilden. Untersuchungen ergaben, dass die als Zell-Suspension injizierten hESC-RPE Zellen eine deutlich geringere Überlebensrate als die als Monolayer eingebrachten hESC-RPE Zellen haben [36]. Aktuelle Studien beschreiben daher den Versuch, vorgefertigte hESC-RPE-Monolayer-Patches subretinal zu transplantieren. Zwei wie beschrieben behandelte Augen zeigten (ohne adäquate Kontrollgruppe) einen Visusanstieg [35].

Als alternative Quelle gesunder RPE Zellen erfolgte die Untersuchung von autologen induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC) [37, 38]. Nach Differenzierung wiesen die iPSC-RPE Zellen eine ähnliche Morphologie und Proteincharakteristika wie native RPE Zellen auf [39]. Im Gegensatz zu allogenen ESC haben die iPSC theoretisch den Vorteil, keine Immunreaktion zu induzieren und so ohne lebenslange Immunsuppression des

Wirtes auszukommen [37]. Im Tiermodell mit retinaler Degeneration konnte nach subretinaler Eingabe der iPSC-RPE Zellsuspension ein protektiver Effekt auf die Photorezeptoren und eine Verbesserung der Sehstärke in den behandelten Tieren nachgewiesen werden [40, 41].

1.4 Neue Strategie: RPE-Regeneration in situ

Unter physiologischen Bedingungen sind die Zellen des Retinalen Pigmentepithels amitotisch und kontaktinhibiert [20]. Untersuchungen zeigten jedoch, dass innerhalb der gesunden Retina vor allem peripher gelegene einzelne RPE Zellen das Potential zur Zellteilung und zum Durchlaufen eines vollen Zellzyklus besitzen [42]. Es besteht demnach ein natürliches Potential zur Proliferation und somit zu Regeneration des RPEs. Bisher existieren keine Möglichkeiten, dieses intrinsische regenerative Potential therapeutisch zu nutzen. In der vorliegenden Arbeit versuchen wir, den Zellzyklus dahingehend zu beeinflussen, dass eine Zellteilung der RPE-Zellen stattfindet, um so das RPE zu regenerieren.

1.4.1 Der Zellzyklus

Der Zellzyklus besteht aus vier spezifischen Phasen: Gap-1-, Synthese-, Gap-2- und Mitose-Phase (G1-, S-, G2- und M-Phase). Die M-Phase besteht aus Mitose (Zellkernteilung mit Teilung des genetischen Materials) und Zytokinese (Zytoplasmateilung) und stellt somit die eigentliche Zellteilung dar. Vorbereitend auf die Zellteilung verläuft die Interphase, bestehend aus G1-, S- und G2-Phase. In der G1 Phase erfolgt die Vorbereitung zur DNA-Replikation, Zellorganellbiosynthese und Zellwachstum. In der sich anschließenden S-Phase kommt es zur DNA-Replikation. Als letzten Schritt der Interphase erfolgt in der G2 Phase eine Überprüfung der Integrität der duplizierten DNA. Anschließend findet die Mitose statt [43].

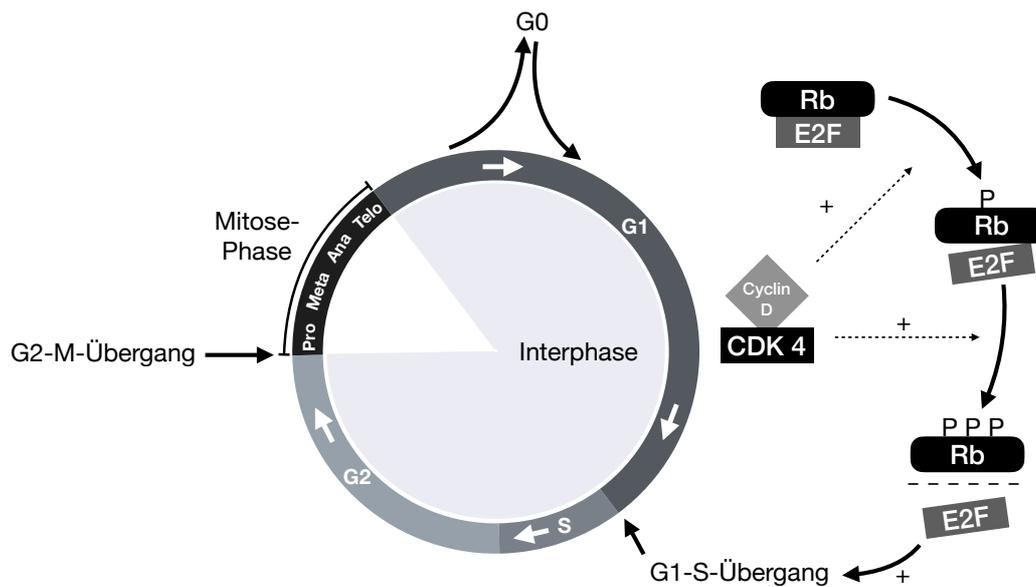


Abbildung 2: Zellzyklus der eukaryoten Zelle mit vereinfachter Darstellung der Regulation des G1-S-Überganges
 Der Zellzyklus besteht aus Gap 1 Phase (G1), DNA-Synthese Phase (S), Gap 2 Phase (G2) und Mitose. Die Mitose setzt sich aus Prophase (Pro), Metaphase (Meta), Anaphase (Ana) und Telophase (Telo) zusammen. Cycline D1 und Cyclin abhängige Kinasen 4 (CDK4) regulieren über Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins die Aktivität des E2F-Transkriptionsfaktor und so den G1-S-Übergang. Gap Phase 0 (G0) beschreibt eine Ruhearrest, ein Übertritt in G1 ist nach mitotischer Stimulation oder nach Stimulation durch Wachstumsfaktoren möglich. Rb: Retinoblastom- Protein (P entspricht der Ausprägung der Phosphorylierung), CDK 4: cyclin dependent kinase 4,

1.4.2 E2F2 abhängige Regulation des Zellzyklus

Die Gruppe der E2F Transkriptionsfaktoren steuert im Wechselspiel mit dem Retinoblastom-Tumorsuppressor (Rb) Genprodukt den Checkpoint am Übergang zwischen G1- und S-Phase. Für die Interaktion mit dem Rb-Protein und somit für die Regulation des G1/S- Übergang sind die E2F-Subklassen E2F1, E2F2 und E2F3 von Relevanz [44]. In nicht proliferierenden Zellen werden die E2F Subklassen 1 bis 3 durch das hypophosphorylierte Rb-Protein gebunden und inaktiviert. Nach mitotischer Stimulation wird Cyclin D gebildet und aggregiert mit der Cyclin-abhängigen-Kinase 4 (CDK4) [45]. Dieser Komplex phosphoryliert nun das Rb-Protein, löst somit die Bindung von Rb-Protein und der E2F-Klassen auf, führt so zur Aktivitätszunahme der E2F-Transkriptionsfaktoren und somit zur Progression in die S-Phase [46]. Das Rb-Protein und die Transkriptionsfaktoren-Subklassen E2F2 und E2F3 können als Gegenspieler bei der Regulation des G1/S -Überganges betrachtet werden: das Rb-Protein ist ein Inhibitor

der E2F Faktoren und bremst den G1/S-Phasen-Übergang und somit die Proliferation der Zellen [47]. E2F1 induziert keine Proliferation, sondern Apoptosen [48].

Die zellzyklusregulierenden Subklassen E2F2 und E2F3 steuern durch Interaktion mit Promotern die Proteintranskription von Schlüsselproteinen der DNA-Synthese (u.a. Polymerase α , Dihydrofolatreduktase) und bedingen den Übergang von der G1- in die S-Phase [49-52].

Daher verwendeten wir für unser *in vitro* Gentherapiemodell den Transkriptionsfaktor E2F2.

1.4.3 RPE-Regeneration durch Induktion zur Proliferation durch E2F2 Überexpression

Der hier untersuchte neue Therapieansatz versucht, das natürlich vorliegende Potential des RPEs zur Proliferation und Regeneration zu nutzen. Durch Gentransfer soll die Überexpression des natürlichen Transkriptionsfaktor E2F2 induziert, der Zellzyklus aktiviert und so die RPE-Zellen zur Proliferation angeregt werden.

1.5 Ziele dieser Arbeit

Folgende Fragen galt es im ARPE-19 *in vitro* Modell zu beantworten:

- Lässt sich mit ARPE-19-Zellen ein nicht-proliferatives RPE-Zellmodell etablieren?
- Erhöht E2F2-Überexpression die Proliferationsrate?
- Führt die E2F2-Transfektion zur Steigerung der Apoptoserate?
- Beeinträchtigt die E2F2-Transfektion die Zell-Viabilität?
- Führt die E2F2-Transfektion zur Zunahme der parazellulären Permeabilität?
- Induziert die E2F2 Transfektion eine epitheliale mesenchymale Transformation?

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Tabelle 1 - verwendete Geräte

| <i>Gerät</i> | <i>Typ</i> | <i>Hersteller</i> |
|-------------------------|-------------------------------|--|
| Autoklav | Laboklav | SHP Steriltechnik AG, Detzel Schloss/Satuelle, Deutschland |
| Brutschrank | Heracell 240 | Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland |
| Eismaschine | Brucheismaschine | Intercontinentale Ziegra Eismaschinen Beteiligungs-GmbH, Isernhagen, Deutschland |
| Elektrophorese-Kammer | Mini PROTEAN System | Tetra Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA |
| Gefrierschrank | Öko Super GS 788 | LIEBHERR International AG, Biberach a.d. Riß, Deutschland |
| | ProfiLine ECU 5085-5 (-80° C) | National Lab, Mölln, Deutschland |
| Heizblock | Digital Heatblock | VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Kühlschrank | Premium frost-free | LIEBHERR International AG, Biberach a.d. Riß, Deutschland |
| MacBook Pro | MacBookPro13,2 | Apple Inc., Cupertino, USA |
| Mechanischer Zellzähler | | VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Mehrfachdispenser | Handystep | Brand GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland |

| | | |
|--|--|---|
| Mikroplatten Lesegerät | FLUOstar OPTIMA | BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Deutschland |
| Mikroskop | Axio Scope.A1 Axiovert 25 | Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Deutschland |
| Netzteil für Elektrophorese-Kammer und Transfer-Tank | Power Pac Basic | Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA |
| Neubauer-Zählkammer | Neubauer Zählkammer; Tiefe: 0,100 mm; Fläche: 0,0025 mm ² | W. Schreck, Hofheim, Deutschland |
| Objektträger | SuperFrost® Plus | R. Lagenbrinck, Emmendingen, Deutschland |
| Pipettierhelfer | Accu-jet® pro | Brand GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland |
| Reagenzglaschüttler | Vortex-Genie 2 | Scientific Industries New York, USA |
| Schüttler | PMR-30 | Grant-bio, Schwerte, Deutschland |
| sterile Arbeitsbank | Herasafe | Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland |
| Timer, Stoppuhr | SKT338N | VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Transfer-Tank | Mini Trans-Blot | Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA |
| Vakuumpumpe | M2k3 | SCHEGO Schemel & Goetz GmbH & Co KG Offenbach, Deutschland |
| Waage | SBC33 Tara, Sauter | SCALTEC Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern |

| | | |
|------------|-----------------|---|
| | | Deutschland |
| Wasserbad | | Memmert GmbH + Co KG, Schwabach, Deutschland |
| Zentrifuge | Multifuge 1 L-R | Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland |
| Zentrifuge | Z 206 A | HERMLE Labortechnik GmbH Wehingen, Deutschland |

2.2 Materialien

2.2.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2 - Verbrauchsmaterialien und Hersteller

| <i>Verbrauchsmaterial</i> | <i>Typ</i> | <i>Hersteller</i> |
|---------------------------|---|---|
| Blottingpapier | 330 g/m ² ; GB33 | Whatman GmbH, Dassel, Deutschland |
| Deckgläser | divers | Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA |
| Gewebekulturflaschen | 250 ml, 75 cm ² 250 ml, 75 cm ² cell+ | Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland |
| Gewebekulturplatten | 6-Well cellstar 96-Well cellstar 24-Well Mutiwell 12- Well Multiwell | Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland Falcon, New York, USA |
| Kryoröhrchen | CryoTubes™, 1,8ml | Nunc™ Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA |
| Nitrozellulose-Membran | Westran® membranes (Polyvinylidene-Difluorid) | PVDF Whatman GmbH, Dassel, Deutschland |
| Pasteurpipetten | Ca. 230 mm | Brand GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland |
| Pipetten | 1000 µl Research 200 µl Research 100 µl Research | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |

| | | |
|----------------------------|--|---|
| | 20 µl Research 2,5 µl Research 1000 µl Transferpette® S 200 µl Transferpette® S 100 µl Transferpette® S 10 µl Transferpette® S 2,5 µl Transferpette® S | Brand GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland |
| Pipettenspitzen | 1000 µl 200 µl 20 µl | Brand GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland |
| Pipettenspitzen mit Filter | 10 µl SurPhob® 100 µl SurPhob® 200 µl SurPhob® 1250 µl SurPhob® | Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland |
| Reaktionsgefäße | 3810X, 1,5 ml 15 ml Cellstar tubes 50 ml Cellstar tubes | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland |
| sterile Einmalpipetten | 5 ml Cell Star 10 ml Cell Star 25 ml Cell Star | Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland |
| Universalfilm | Amersham Hyperfilm™ ECL | GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK |
| Zellkultureinsätze | Transwell® für 12 Well- Platte | BD Falcon, Franklin Lakes, USA |
| Zellkulturschalen | 60 x 15mm 100 x 20 mm 145 x 20 mm | Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland |

2.3 Chemikalien

Tabelle 3 - Chemikalien und Hersteller

| <i>Chemikalie</i> | <i>Hersteller</i> |
|---------------------------------------|--|
| Acrylamid | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Ammoniumperoxodisulfat (APS) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| BenchMark™ Pre-stained Protein Ladder | Invitrogen™, Massachusetts, USA |
| Bovine Serum Albumin (BSA) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |

| | |
|--|--|
| BrdU (Pulver) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Bromphenolblau | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Chemolumineszenz-Lösung (ECL™ Western blotting detection reagents) | GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK |
| Desoxycholsäure | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Dextran-FITC 4kDa | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| Ethanol (96% vergällt) | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Ethanol absolut (unvergällt) | Chemsolute - Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland |
| Ethylendiamintetraacetat (EDTA) Lösung (0,5M), pH 8 | PAA Lab. GmbH, Cölbe, Deutschland |
| Glycerol | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Glycin | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Isopropylalkohol | Hauseigene Apotheke UKW, Würzburg, Deutschland |
| Kaliumchlorid (KCl) | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Mercaptoethanol | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Methanol | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Natriumazid | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| Natriumchlorid | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Natriumhydroxid (NaOH) | Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland |
| Natriumtetraborat | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Natriumzitat | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |

| | |
|---|---|
| Normal Goat Serum (NGS) | Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Cambridgeshire, UK |
| Paraformaldehyd (PFA) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Penicillin/Streptomycin (P/S) | Gibco® by life Technologies, Darmstadt, Deutschland |
| Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Pierce BCA-Reagenz | Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA |
| Polyethylenimin „MAX“(PEI) | Polysciences, Inc., Warrington, USA |
| Salzsäure 37% (HCl) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Tris (Trishydroxymethylaminomethan) | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Triton X100 | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Trypanblau (0,4%) | Gibco® by life Technologies, Darmstadt, Deutschland |
| Trypsin (10x) | Gibco® by life Technologies, Darmstadt, Deutschland |
| TWEEN®20 | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| VECTASHIELD® HardSet Antifade Mounting Medium with DAPI | Vector Laboratories, Burlingam, USA |

2.4 Medien, Zusatzlösungen und Puffer

2.4.1 Medien / Zusatzlösungen für Zellkultur

Tabelle 4 - Zellkulturmedien für ARPE 19 Zellen

| Zellkulturmedium der ARPE 19 Zellen: „DMEM 1-10% FCS“ | | |
|---|--|-----------|
| supplementiertes | Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) | |
| DMEM/F12 | Ham's F12 (1:1) | |
| | inkl. L-Glutamin (Sigma) | 200 mM |
| | + hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (FCS) | 1-10% |
| | Antibiotika bei Bedarf: | |
| | + Penicillin G | 100U/ml |
| | + Streptomycin | 100 µg/ml |

Tabelle 5 - Zusatzlösungen für Zellkultur

| | <i>Abkürzung</i> | <i>Hersteller</i> |
|--|------------------|---|
| Phosphate Buffered Saline ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , autoklaviert | PBS | PAA Lab. GmbH, Cölbe, Deutschland |
| Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺ 2,5 mM EDTA | Hank's EDTA | PAA Lab. GmbH, Cölbe, Deutschland |
| Ethylendiamintetraessigsäure 0,5 M, pH 7,7 | EDTA | |
| Trypsin/EDTA-Lösung: Trypsin 0,05 %; EDTA 0,02 %; in PBS ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺ | | |
| fetales Kälberserum 1%; 10% | FCS | Gibco [®] by life Technologies, Darmstadt, Deutschland |

2.4.2 Zusatzlösungen für Immunfärbung

Tabelle 6 - Zusatzlösungen für Immunfärbung

| | |
|---------------------------------|---|
| 2% Paraformaldehyd (PFA) | PFA 2 g PBS 100 ml bis 60°C erwärmen, dann 1,7 ml NaOH (1M) bis Lösung klar, dann HCl (1M) bis pH 7,4 |
| 0,2% TritonX100 in PBS | 10% TritonX100 1ml PBS 50ml |
| 2% NGS + 0,1% TritonX100 in PBS | NGS (normal goat serum) 1ml 10% TritonX100 500µl in PBS 50ml |

2.4.3 Zusatzlösungen und Puffer für Westernblot und Immunfärbung

Tabelle 7 - Zusatzlösungen und Puffer für Westernblot / Immunfärbung

| <i>Name</i> | <i>Verwendung</i> | <i>Inhalt</i> | <i>Konzentration</i> |
|-------------------|-------------------|---------------|----------------------|
| BSA (5%) | Blockpuffer | BSA PBS | 2,5 g in 50 ml |
| Lauf Puffer (10x) | | Tris | 25 mM (30,3g) |

| | | | |
|---|-------------------------------|-----------------------|------------------------|
| | | Glycin | 192 mM (144g) |
| | | SDS | 0,1% (10g) |
| | | A. bidest | in 1l |
| Lauf Puffer (1x) | | Lauf Puffer (10x) | 100 ml |
| | | A. bidest | 900 ml |
| Probepuffer (4x) | Ladepuffer | Tris | 0,1 M |
| | | Glycerol | 10% |
| | | SDS | 4% |
| | | Bromphenolblau | 0,01% |
| Proteaseinhibitor (PI) | | | Verhältnis 1:6 zu RIPA |
| RIPA | Lysepuffer | Tris | 50 mM |
| | | NaCl | 150 mM |
| | | TritonX100 | 1% |
| | | SDS | 2% |
| | | Desoxycholsäure | 1% |
| | | A. bidest | |
| TBS Puffer (Tris-buffered saline) | 10x Universalpuffer | Tris-HCl | 24g |
| | | Tris | 5,6g |
| | | NaCl | 88g |
| | | A. bidest. | 900 ml, pH 7,4 |
| TBST Puffer (Tris-buffered saline with Tween20) | 1x Universalpuffer Antikörper | TBS (10x) | 100 ml |
| | | A. bidest. | 900 ml |
| | | Tween 20 | 1 ml |
| Transfer Puffer (10x) | Transferpuffer | Tris | 25 mM (30,3g) |
| | | Glycin | 192 mM (144g) |
| | | A. bidest. | in 1 l |
| Transfer Puffer (1x) | | Transfer Buffer (10x) | 200 ml |
| | | | 400 ml |
| | | Methanol | 1400 ml |
| | | A. bidest | |

2.4.4 Agarosegel-Elektrophorese

Tabelle 8 - Zusammensetzung der Agarosegele für Elektrophorese

| Bestandteil | Sammelgel | Trennegel 10% |
|-------------------------------------|-----------|---------------|
| A. bidest. | 2,2 ml | 4ml |
| Upper Tris 4x (0,5M TRIS, 0,4% SDS) | 0,5 ml | - |
| Lower Tris 4x (1,5M TRIS, 0,4% SDS) | - | 2ml |
| Acrylamid | 0,8 ml | 2ml |

| | | |
|------------------------------|-------|------|
| Ammoniumperoxodisulfat (APS) | 20 µl | 32µl |
| TEMED | 4 µl | 4 µl |

2.5 Antikörper und Farbstoffe

2.5.1 Primärantikörper und Farbstoffe

Tabelle 9 - Primärantikörper; Wenn nicht anders erläutert handelt sich um anti-Mensch IgG Antikörper

| Zielstruktur/Name | Verdünnung | Isotyp | Hersteller | |
|-------------------|--|-----------|---------------------|---------|
| BrdU | 1:500 (IHC) | Maus | Sigma | |
| Coll IV | 1:500 (IHC) 1:1000 (Western Blot) | Maus | Sigma | 170 kDa |
| Cyclin D1 | 1:500 (Western Blot) | Kaninchen | Cell Signaling | 40 kDa |
| DAPI | 1:5000 (IHC) | - | Vector Laboratories | |
| E2F2 | 1:300-1000 (IHC) 1:500 (Western Blot) | Kaninchen | Santa Cruz | 55 kDa |
| Fibronectin | 1:1000 (Western Blot) | Kaninchen | abcom | 225 kDa |
| GAPDH | 1:1000 (Western Blot) | Maus | EMD Millipore | 37kDa |
| Ki67 | 1:300 (IHC) | Maus | Dako | |
| N-Cadherin | 1:500 (IHC) 1:1000 (Western Blot) | Maus | BD Trans.lab | |
| ZO – 1 | 1:100 (IHC) | Kaninchen | | |
| α-SMA | 1:500 (IHC) 1:1000 (Western Blot) | Maus | Sigma | 47 kDa |
| β-Caterin | 1:2000 (Western Blot) | Kaninchen | Cell Signaling | 92 kDa |

2.5.2 Sekundärantikörper

Tabelle 10 - Sekundärantikörper

| Name | Verdünnung | Isotyp | Hersteller |
|---|------------|--------|-------------------|
| Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) | 1:500 | Ziege | life technologies |
| Alexa Fluor® 568 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) | 1:300 | Ziege | Invitrogen™ |

| | | | |
|--|-------|-------|-------------------|
| Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Mouse IgG (H+L) | 1:300 | Ziege | Invitrogen™ |
| Alexa Fluor® 568 Goat Anti-Mouse IgG (H+L) | 1:300 | Ziege | life technologies |
| Anti-BrdU mouse monoclonal antibody PRB-1, Alexa Fluor® 488, TUNEL Assay | | Maus | Invitrogen™ |

2.6 Zell-Linie: ARPE-19

Die ARPE-19 (Adult Retinal Pigment Epithelial cell line-19) Zelllinie stammt von einem hirntoten 19-jährigen Mann, die initiale Gewinnung und Kultivierung erfolgte durch Mitarbeiter der *Lions Eye and Tissue Bank* in Sacramento USA im Jahr 1986.

ARPE-19 ist eine spontan immortalisierte Zelllinie. Phenotypisch handelt es sich um adhärenzte Zellen mit einem regulären Karyotyp. Nach Aussaat bildet sich eine polarisierte, konfluente einschichtige Zellschicht [53]. Untersuchungen zeigten, dass die Proteinexpressionen (z.B. RPE65), mRNA und miRNA sowie die funktionellen Eigenschaften spezifisch mit derer nativer humaner RPE Zellen übereinstimmen. Somit eignet sich diese Zelllinie als *in vitro* Zellmodell für Untersuchungen bezüglich des humanen RPE [54-56]. Verwendet wurden Zellen der Passage 12-19.

2.7 Plasmide

Das Plasmid pCMV-HA-E2F2 (6771 bp; Plasmid #24226; Addgene, Cambridge, UK; <https://www.addgene.org/24226/>) besteht aus dem CMV-Promoter und der vollständigen humanen cDNA des Transkriptionsfaktors E2F2 (1313 bp). Hierbei reguliert der ubiquitäre CMV-Promoter die Expression von E2F2 [57].

Als Kontrolle für die Effektivität der Transfektion diente das Plasmid pcDNA3-EGFP (6160 bp; Plasmid #13031; Addgene, Cambridge, UK; <https://www.addgene.org/13031/>). Hier ist das Transgen *enhanced green fluorescent protein* (*eGFP*, 713 bp) dem CMV-Promoter nachgeschaltet.

2.8 Zellkultur der ARPE-19 Zellen

Die Zellen wurden auf 145mm Zellkulturschalen im Brutschrank unter sterilen Bedingungen bei 37°C, einem Luft-CO₂ Gehalt von 5% und einer relativen

Luftfeuchtigkeit von 97% gehalten und kultiviert. Es erfolgte zwei Mal wöchentlich der Wechsel des Kulturmediums DMEM 10% bzw. 2% FCS + P/S und mikroskopische Kontrollen. Die Aussaat der subkonfluenten Zellkulturen erfolgte einmal pro Woche. Zur Induktion der Differenzierung der ARPE-19 Zellen erfolgte der Wechsel in das nährstoffärmere DMEM mit 2% FCS, um die Zellen von der Wachstumsphase in eine fast amitotische Ruhephase zu überführen. Alle Arbeitsschritte erfolgten mit sterilen und desinfizierten Materialien an einer sterilen Werkbank.

2.8.1 Passagieren der Zellen

Grundlage zum Passagieren war ein konfluenten Monolayer aus ARPE 19 Zellen. Das Medium der Kulturschalen wurde mit der Glaspipette abgesaugt ohne dabei jedoch die Zellschicht austrocknen zu lassen. Anschließend wurde 10 ml Hanks-Lösung mit 2,5 mM EDTA dazugegeben, erneut abgesaugt, frische Hanks-Lösung mit 2,5 mM EDTA Lösung hinzugegeben und 5 Minuten im Brutschrank inkubiert. Danach erfolgte die Kontrolle der nun gelösten Zell-Zell Verbindungen durch Mikroskopie, das Absaugen des Mediums, die Eingabe von 5ml Trypsin/EDTA-Lösung und eine erneute Inkubation im Zellkultur-Inkubator für eine Minute, zuletzt dann eine weitere mikroskopische Kontrolle der Lösung der Zelladhärenz zur Unterlage (Zellen erscheinen rundlich, kugelig). Die Lösung der Zellen konnte durch horizontales Stoßen der Kulturschale gefördert werden. 20ml DMEM 10% FCS wurde hinzugegeben, reichlich mittels Pipette gemischt und die Suspension bei 1000 rpm (Umdrehungen pro Minute) für 3 Minuten bei 25°C zentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde abgesaugt und verworfen, das Pallet wurde mit 3 ml DMEM 10% FCS resuspendiert und mit der Pipette (zunächst 200µl dann 1ml Pipettenspitze) gründlich durchmischt. Anschließend wurden 17ml DMEM 10% FCS hinzugegeben, die Zellsuspension durchmischt und diese zu je 10ml auf zwei neue Kulturschalen gegeben. Anschließend wurden pro Schale weitere 10ml DMEM 10% FCS pipettiert. Es erfolgt die Kultivierung und Lagerung im Brutschrank bei 37°C.

2.8.2 Aussaat der Zellen in Well-Platten

Für die *in vitro* Untersuchungen wurden die ARPE-19 Zellen aus der 145mm Kulturschale mittels Hanks mit 2,5 mM EDTA und Trypsin/EDTA-Lösung gelöst,

zentrifugiert und in DMEM 10% FCS resuspendiert (siehe 2.8.1, Passagieren von Zellen) und zu je circa 2×10^5 in 1000 μ l DMEM 10% FCS in 24-Well Platten bzw. zu je 3×10^4 in 200 μ l in 96-Well Platten ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte der Wechsel des Mediums und DMEM 2% FCS wurde hinzugegeben. Zwei Wochen nach Aussaat zeigte sich mikroskopisch ein konfluierendes und einschichtiges Epithel.

2.8.3 Bestimmung der Zellzahl

In die gereinigte Zellkammer wurde 10 μ l der zu untersuchenden Zellsuspension pipettiert. Zuvor wurde der suffiziente Sitz des aufliegenden Deckglases durch die Überprüfung der Newtonschen Interferenzfarben geprüft. Die durch Kapillarkräfte in die Zellkammer gelangte Zellsuspension wurde unter mikroskopischer Kontrolle auf Homogenität innerhalb der Zellkammer überprüft, anschließend die Vergrößerung erhöht und die sich jeweils im Eck befindlichen Quadrate ausgezählt. Wichtig hierbei ist die Berücksichtigung nur derjenigen Zellen, die auf der linken und oberen Begrenzungslinie liegen. Mit nachfolgender Formel wurde die Konzentration auf Zellen pro Milliliter umgerechnet

$$\begin{aligned} \text{Zellzahl [mL}^{-1}\text{]} &= \text{gemittelte Zellzahl der vier Quadranten} \\ &\times \text{Verdünnungskonstante} \times 10^4 \text{Kammerkonstante} \end{aligned}$$

2.8.4 Einfrieren der Zellen

Die Zellkultur wurde zunächst mit Hanks mit 2,5mM EDTA und Trypsin behandelt und die Suspension mit DMEM 10% FCS aufgefüllt. Anschließend wurde zentrifugiert (1000 rpm, 3 min.), der Überstand verworfen und das Zellpellet mit Einfriermedium (FCS 10% Dimethylsulfoxid (DMSO)) resuspendiert. Pro Kryoröhrchen werden 1ml Suspension eingegeben und die Röhrchen in eine mit Isopropylalkohol (verzögertes Einfrieren mit circa 1°C/ min, reduziert die Kristallbildung) gefüllte Box gestellt und mindestens 4 Stunden in einem -80°C Gefrierschrank gelagert. Anschließend wurden die Kryoröhrchen in einen Stickstofftank eingelagert.

2.8.5 Auftauen der Zellen

Die Kryoröhrchen wurden aus dem Stickstofftank genommen und anschließend in ein Wasserbad mit 37°C Temperatur gegeben. Die aufgetaute Suspension wurde mit DMEM 10% FCS resuspendiert und ausgesät. Nach 4 Stunden (Ausbildung der Adhärenz der Zellen an Unterlage) erfolgte ein Mediumswechsel mit DMEM 10% FCS. Anschließend wurden die ARPE-19 Zellen im Zellkulturschrank kultiviert.

2.9 E2F2 Transfektion mittels Polyethylenimin (PEI)

Die transiente Transfektion des E2F2 Plasmids erfolgte mittels des kationischen Polymer Polyethylenimin (PEI). Dieses Verfahren zeigt trotz hoher Transfektions-Effizienz eine relativ geringe Zell-Toxizität [58, 59].

Zur Durchführung der Transfektion erfolgte wie unter 2.8.2 beschrieben zunächst die Aussaat in die Well-Platten, gefolgt von einer Kultivierung für 2 Wochen in DMEM 2% FCS. Eine Stunde vor Transfektion erfolgte ein Mediumswechsel mit DMEM 10% FCS. Zur Vorbereitung des Transfektionsreagenz wurde 0,1g PEI in 50ml Wasser gelöst (Endkonzentration 2µg/µl), mit Natriumhydroxid (1 M) bis zu einem pH von 7,2 titriert, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Beispielhaft werden für 24 Well-Platten je Well 2,0 µg E2F2 (E2F2 Stock: 1µg/µl) und 4 µg PEI (PEI Stock: 1µg/µl) benötigt (siehe Tabelle). Die nötigen Mengen an PEI und DNA wurden pipettiert, pro Well mit 100µl DMEM (ohne FCS, ohne P/S) mittels Pipette vorsichtig gemischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden je Well 100µl der Mixtur hinzugegeben und für 24 Stunden inkubiert. Es erfolgte ein erneuter Mediumswechsel in DMEM 2% FCS.

Tabelle 11 - Transfektionsreagenzien (Polyethylenimin und E2F2 Plasmid) mit Mengenangabe für Well-Platten

| <i>Wellplattengröße</i> | <i>Fläche je Well</i> | <i>E2F2-Plasmid</i> | <i>Polyethylenimin</i> |
|-------------------------|-----------------------|---------------------|------------------------|
| 96-well | 0.36 cm ² | 0.4 µg | 0.8 µg |
| 24-well | 2.0 cm ² | 2.0 µg | 4.0 µg |
| 12-well | 3.6 cm ² | 4.0 µg | 8.0 µg |

2.10 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

2.10.1 Grundlagen

Die Polyacrylamidelektrophorese hat als Ziel, zuvor isolierte und denaturierte Proteine elektrophoretisch aufzutrennen. Die durch Kopplung mit Natriumdodecylsulfat (= Sodium Dodecyl Sulfate SDS) negativ geladenen Proteine wandern im elektrischen Feld Richtung Anode. Bei äquivalenter Ladung, jedoch diversen Proteingrößen erfolgt bei konstanter Porengröße des Trenngels und konstantem Gleichstrom eine Aufspaltung nach der Proteingröße [60, 61].

2.10.2 Materialvorbereitung

Zur Durchführung der SDS-PAGE erfolgte zunächst die Anfertigung des SDS-Polyacrylamidgels, bestehend aus einem Sammel- und einem Trennungs-Gel (Acrylamid 8-12%) mit 10 bzw. 15 Kammern.

2.10.3 Probenvorbereitung

Vorausgehend erfolgte die Aussaat und Behandlung der ARPE-19 Zellen (z.B. mittels E2F2 -Transfektion). Exemplarisch wird hier die Proteinernte für die Arbeit in der 24 Well-Platte erklärt.

Alle Arbeitsschritte fanden gekühlt auf Eis statt. Für die Erntevorbereitung erfolgte das zweimalige Waschen mittels PBS. Es werden 100µl RIPA-Puffer und 16,6µl Proteaseinhibitor (Verhältnis 6:1) pro Well gemischt und jeweils hinzu pipettiert. Der Well-Boden wurde gründlich abgeschabt, die Suspension in ein Eppendorfgefäß gegeben, für 5 Minuten bei 4°C auf der Laborwippe gemischt und danach bei 15000 rpm für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß gegeben. Die Bestimmung der Proteinkonzentration des Lysates gelang durch photometrische Analyse im Verhältnis zur Standardreihe mittels BCA-Reagenz (Pierce Biotechnology, Rockford, USA) aus 10µl des Lysates.

Das Lysat wurde im Verhältnis 1:3 mit dem Ladepuffer versetzt, 2-Mercaptoethanol im Verhältnis 1:10 zum Ladepuffer (zur Lösung der Disulfidbrücken) hinzugegeben und für 5 Minuten bei 95°C im Heizblock denaturiert. Gegebenenfalls konnten nun die Proben eingefroren werden.

Eine Gesamtproteinmasse je Probe von 5-10 μ g pro Gelkammer hat sich für die hier gewählte Untersuchungsmethodik als sinnvoll erwiesen.

2.10.4 Elektrophorese

Als visueller Marker wurde 10 μ l Bromphenolblaulösung (0,75 mM), als Markerspur mit definierten Proteinanteilen 5 μ l Benchmark Prestained Protein Ladder (Invitrogen™) in die äußeren Taschen der Trenngele mittels Hamiltonpipette eingegeben. Zur Elektrophorese wurden die Gele in eine mit Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer eingespannt. Vor Eingabe der Proben in die Kammern wurden diese erhitzt (5 Minuten, 95°C) und kurz an zentrifugiert (2500 rpm, 5 Sekunden). Je Probe erfolgte die Eingabe von 5-10 μ g Protein je Kammer, danach unter konstantem Gleichstrom (16 mA für 60-120 Minuten) die Elektrophorese der SDS-gekoppelten Proteine unter visueller Kontrolle des Bromphenolblau-Markers.

2.10.5 Immunoblot

Zur Vorbereitung wurde die PVDF Membran zunächst für 2 Minuten in 100% Methanol und anschließend in Transferpuffer getränkt. Nach Entfernung der umgebenen Gläser wurde das Gel auf der PVDF Membran platziert, es folgte eine Schichtung in der Reihenfolge: Schwamm – Filter – PVDF Membran – Gel – Filter – Schwamm. Der Transfer wurde in einem Transfertank unter konstantem Gleichstrom von 100 V für 1,5 bis 2h in gekühltem Transferpuffer vollzogen. Es wurde die PVDF Membran mittels TBST für 5 Minuten gespült und anschließend die unspezifischen Antikörperbindungsstellen mittels 5% BSA und Natriumazid 0,05% in TBST und für eine Stunde auf dem Taumelrollmischer blockiert.

Die PVDF Membran wurde mit den Primärantikörpern über Nacht bei 4°C in 5% BSA in TBST inkubiert. Danach erfolgte die 3-malige jeweils 10-minütige Spülung in frischem TBST. Die Sekundärantikörper (in 5% BSA in TBST) wurden für ein Stunde bei Raumtemperatur hinzugegeben und anschließend erneut gewaschen.

Die Entwicklung des Filmes erfolgte mittels enhance chemoluminescence (ECL).

Als Ladekontrolle wurde zudem die Färbung von Glyceraldehyde 3-phosphate Dehydrogenase (GAPDH, 37kDa) mittels Antikörper verwendet. Dieses Protein ist Teil

der Glykolyse und stellt durch seine meist konstante und hohe Expression einen Kontrollmarker für die Banden der verschiedenen Proben dar.

2.11 Immunhistochemische Färbung (IHC)

Die auf den Deckgläsern adhärenen Zellen wurden für 30 Minuten in 2% Paraformaldehyd (PFA) in PBS fixiert und deren Zellmembranen mit 0,2 % Triton-X 100 in PBS für 2 Minuten permeabilisiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde mit der Blockierlösung (4% Ziegen Serum (NGS) und 0,1% Triton-X100 in PBS) für 1 h inkubiert, um etwaige unspezifische Bindung des Antikörpers zu vermindern. Nach Hinzugabe der Primäantikörper in Blockierlösung (z.B. anti-E2F2-AK Kaninchen, 1:1000; anti-Ki67-AK, Maus, 1:300) erfolgte eine erneute Inkubation bei Raumtemperatur für eine Stunde. Anschließend wurden die Deckgläser dreimalig mit PBS gewaschen und der Sekundäantikörper (z.B. anti-Kaninchen; anti-Maus) für 1 h inkubiert. Zum Abschluss erfolgte ein erneutes dreimaliges Waschen mit PBS und gegebenenfalls die DAPI-Färbung der Nuklei. Mit *VECTASHIELD® HardSet Antifade Mounting Medium with DAPI* werden die Deckgläser zum Schutz der Fluoreszenz versiegelt und gleichzeitig die DAPI-Färbung durchgeführt. Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte mittels *Axio Scope.A1* von Zeiss in 40-facher Vergrößerung.

2.12 DAPI-Färbung

4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der mit hoher Spezifität an doppelsträngige DNA bindet und DNA-DAPI Komplexe bildet [62].

2.12.1 Durchführung

Nach erfolgten immunhistochemischen Färbung erfolgte die Behandlung und Versiegelung der vorbehandelten ARPE-19 Monolayer mittels *VECTASHIELD® HardSet Antifade Mounting Medium with DAPI* (Vector Laboratories, Burlingam, USA). Darin enthalten ist DAPI zur Markierung der DNA. Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte mittels *Axio Scope.A1* von Zeiss in 40-facher Vergrößerung.

2.13 Proliferationsmarker

2.13.1 Intranukläres Ki67

Die Akkumulation von Ki67 findet lediglich in der S-, G2- und M-Phase des Zellzyklus statt, daher gilt Ki67 als Proliferationsmarker [63]. Die Immunfärbung gegen das intranukläre Ki67 Antigen erfolgte mittels monoklonaler Antikörper.

2.13.2 Bromodeoxyuridin (BrdU) Markierung

BrdU ist ein chemisches Analogon des Nucleosids Desoxyuridin bzw. Thymidin. Wird BrdU im Medium von sich proliferierenden Zellen bereitgestellt, so kommt es in der S-Phase aufgrund der analogen Struktur zum Einbau in die sich duplizierende DNA und markiert die nach der Hinzugabe von BrdU entstandene DNA und Zellen [64].

2.13.2.1 Durchführung

Es wurde zunächst die BrdU-Markierlösung (32,6mM) hergestellt. Dazu wurden 250mg BrdU Pulver (Sigma) in 25 ml sterilem PBS gelöst (30 min) und anschließend steril gefiltert (Porengröße 0,22µm). Zur Markierung der Zellen wurden diese für 5 Stunden mit BrdU-Markierlösung (1:2000 in DMEM 2% FCS verdünnt) inkubiert. Anschließend erfolgte das dreimalige Waschen mit PBS. Die auf den Deckgläsern adhären Zellen wurden für 30 Minuten in 2% PFA in PBS fixiert und deren Zellmembranen mit 0,2% Triton-X 100 in PBS für 2 Minuten durchlässiger gemacht. Es erfolgte das zweimalige Waschen mittels PBS. Nun erfolgte für 30 Minuten die Inkubation bei 37°C mit 2N HCl, um die DNA in Einzelstränge aufzuspalten, eine 10-minütige Inkubation in Natriumtetraborat bei Raumtemperatur und ein 3-maliges 5-minütige Waschen in PBS. Anschließend erfolgte die Inkubation mit der Blocklösung (4% Ziegen Serum (NGS) und 0,1% Triton-X100 in PBS) für eine Stunde um etwaige unspezifische Bindung des Antikörpers zu vermindern. Nach Hinzugabe der Primärantikörper in Blocklösung (anti-BrdU, Maus, 1:500, Sigma) erfolgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 1 Stunde oder über Nacht bei 4°C. Anschließend wurden die Deckgläser dreimalig mit PBS gewaschen und der Sekundärantikörper (Alexa Fluor® 568 Goat Anti-Mouse IgG (H+L), 1:500, life technologie) für 1 h inkubiert. Zum Abschluss erfolgte ein erneutes dreimaliges Waschen mit PBS. Anschließend erfolgte die Behandlung und Versiegelung der vorbehandelten ARPE-19 Monolayer mittels *VECTASHIELD® HardSet Antifade*

Mounting Medium mit DAPI. Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte mittels Axio Scope.A1 von Zeiss in 40-facher Vergrößerung.

2.14 Kits

2.14.1 Apoptose Testung : TUNEL Test

Der TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling)-Test (*APO-BrdU™ TUNEL Assay Kit, with Alexa Fluor™ 488 Anti-BrdU, Invitrogen™*, Massachusetts, USA) diente in diesen Versuchen zum Nachweis apoptotischer Zellen [65]. Hierbei wurden apoptosebedingte DNA-Degeneration mit Strangbrüchen und eine hohe Zahl an freien Hydroxygruppen mittels terminaler Desoxynukleotidyl Transferase (TdT) mit BrdUTP (5-Bromo-2'-Deoxyuridin 5'-Triphosphat) gekennzeichnet. Nach der Markierung der DNA mit BrdUTP wurde dieses durch *Alexa Fluor™ 488 anti-BrdU-Antikörper* mittels Fluoreszenzmikroskop detektiert.

2.14.1.1 Durchführung

Zur Durchführung des TUNEL-Tests erfolgte die Aussaat der ARPE-19 Zellen für zwei Wochen zu je 2×10^5 Zellen je Well einer 24 Well-Platte in DMEM 2% FCS. Anschließend erfolgte die Transfektion mit E2F2 oder als Negativkontrolle nur die Behandlung mit dem Transfektionsreagenz. Als Positivkontrolle wurden ARPE-19 Zellen mit dem Zytostatikum Etoposid (250µM) behandelt.

Die auf den Deckgläsern adhärenen Zellen wurden für 30 Minuten in 2% PFA in PBS fixiert und deren Zellmembranen mit 0,2% Triton-X 100 in PBS für 3 Minuten permeabilisiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Proben mit der Blockierlösung (4% Ziegen Serum (NGS) und 0,1% Triton-X100 in PBS) für 1 h inkubiert, um etwaige unspezifische Bindung des Antikörpers zu vermindern. Pro Well wurden 50µl *DNA-Labbling Lösung* (Mixture: 10 µl *reaction buffer* + 0.75 µl *TdT enzyme* + 8,0 µl *BrdUTP* + 31,25 µl A. bidest) hinzugegeben und für 1,5 Stunden im Zellkulturschrank kultiviert. Anschließend wurden die Deckgläser zweimal mit 1 ml des *rinse buffer* gespült. Anschließend wurde der anti-BrdU-Antikörper (5µl *Anti-BrdU mouse monoclonal antibody PRB-1, Alexa Fluor 488 conjugate* in 95µl *rinse buffer*) für 60 Minuten den Deckgläsern hinzugegeben.

Anschließend wurden die Deckgläser dreimalig mit PBS gewaschen und die DAPI-Färbung *mittels VECTASHIELD® HardSet Antifade Mounting Medium with DAPI* (Vector Laboratories) durchgeführt. Die Detektion erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskop.

2.14.2 Viabilitätstest: XTT-Test

Der XTT-Test (*Cell Proliferation Kit II*, Roche, Basel, Schweiz) dient zum Nachweis vitaler Zellen und derer Viabilität [66].

Lediglich gesunde Zellen können mittels mitochondrialer Dehydrogenasen farbloses XTT (Natrium-2,3-bis- (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl) -5- [(phenylamino) carbonyl] -2H-tetrazolium) zu wasserlöslichem, orangem Formazan reduzieren. Die Absorption des Farbstoffs wird fotometrisch detektiert und ist proportional zur Zellzahl [66].

2.14.2.1 Durchführung

Zur Durchführung des XTT-Tests erfolgte die Aussaat der ARPE-19 Zellen, je 2×10^5 Zellen in einer 24 Well-Platte bzw. je 3×10^4 Zellen in einer 96 Well-Platte in DMEM 2% FCS für zwei Wochen. Es erfolgte die Transfektion mit E2F2 bzw. lediglich die Behandlung mit dem Transfektionsreagenz. Zudem verblieben unbehandelte ARPE-19 Monolayer (Negativkontrolle/ Referenz) und lediglich mit farblosem DMEM 1% FCS befüllte Wells (Blank-Wert). Die Zellen wurden mit farblosem (ohne Phenl-Rot) DMEM 1 % FCS gewaschen und anschließend in 100µl (96-Well) und in 1000µl (24-Well) farblosen DMEM 1 % FCS für 20 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden je 96-Well 20µl und je 24-Well 200µl XTT-Mixtur - bestehend aus *XTT Teil I* (5ml) und *XTT Teil II* (Aktivierungsreagens 0,1 ml) - hinzugegeben und für weitere 2 Stunden im Zellkulturschrank inkubiert. Anschließend erfolgte die spektralphotometrische Auswertung der Absorption des nun gegebenenfalls farbigen Mediums mittels ELISA (Absorptionswellenlänge: 450 nm; Referenzwellenlänge: 650nm). Nach der Messung erfolgte das erneute zweimalige Waschen und die weitere Kultivierung im DMEM 2% FCS Medium.

spezifische Absorption (Probe)

$$= A_{450nm}(Probe) - A_{650nm}(Probe) - A_{450nm}(Blank)$$

Als Referenz wurde die Absorption der unbehandelten ARPE-19 Monolayer als 100% gesetzt.

2.14.3 Permeabilitätstest: FITC-Dextran-Assay

Die parazelluläre Permeabilität des ARPE-19 Monolayers wurde mittels *Fluorescein Isothiocyanat (FITC) -Dextran-Assay* im Transwell-System (Porendurchmesser 0,4 μm) getestet [67].

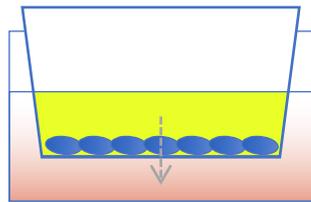


Abbildung 3: schematische Darstellung des FITC-Dextran-Assay zur Testung der Barrierefunktion des ARPE-19-Monolayers

FITC-Dextran ist mit Fluorescein-Isothiocyanat markiertes Dextran mit einer Molekülmasse von 4kDa. Im Versuch wurde FITC-Dextran mit einer Konzentration von 0,25 mg/ml auf in das Innere der Transwell® Zellkultureinlagen pipettiert und die Diffusion durch den Monolayer in das zu Beginn Dextran-freie Medium nach 24 Stunden mittels Spektrophotometrie quantifiziert.

2.14.3.1 Durchführung

Zur Testung der parazellulären Permeabilität erfolgte die Aussaat der ARPE-19 Zellen gemäß Protokoll auf Zellkultureinsätzen mit einer Porengröße von 0,4 μm in der 12 Well-Platte zu je 2×10^5 Zellen und die anschließende Kultivierung in DMEM 2% FCS für 2 Wochen. Anschließend erfolgte die Behandlung der ARPE-19 Monolayer: E2F2 Transfektion, als Kontrollen nur PEI Behandlung sowie Behandlung mit EDTA (Positivkontrolle; EDTA 20mM in DMEM 2% FCS für 10 Minuten). Als Negativkontrolle dienten unbehandelte ARPE-19 Zellen.

Je 2 ml farblosem 2% FCS Medium wurde 100mg Dextran-FITC (4kDa, Sigma-Aldrich) gelöst, sodass eine Endkonzentration von 0,25mg/ μl vorlag. Die alten Medien wurden zu Beginn der Untersuchung abgesaugt, dann wurde der Außenbereich mit farblosem 2% FCS Medium 2ml (ohne Dextran) und die innere Kammer mit 750 μl 2% FCS mit Dextran-FITC in einer Konzentration von 0,25mg/ μl befüllt und für 24h im

Zellkulturschrank belassen. Der Füllstand im Außen- und Innenbereich sollte immer auf demselben Niveau liegen.

Anschließend erfolgte die Probenpipettierung aus Innen- und Außenbereich (jeweils 3x) zu je 100µl in eine 96 Well-Platte und die Konzentration des Dextran-FITC wurde im Fluoreszenz-Reader (Spectrophotometer) gemessen.

Anschließend erfolgte die zweimalige Waschung der Zellschichten der apikalen und basalen Medien und eine weitere Kultivierung in DMEM 2% FCS. Dextran ist in dieser Konzentration nicht toxisch.

Die Permeabilität wurde als % angegeben und wie folgt berechnet:

$$\text{Dextran – Diffusion (\%)} = \frac{\text{Absorption untere Kammer}}{\text{Absorption obere Kammer}} \times 100$$

2.15 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mittels Mikroskopie der gefärbten und fixierten Zellen auf den Deckgläsern der 12- bzw. 24 -Well Platten. Es erfolgte die Markierung per DAPI und immunhistochemische Färbung von z.B. ZO-1, E2F2. Pro Coverslip wurden fünf standardisierte Fotoaufnahmen (1388x1038 Pixel) angefertigt (Mikroskop: Axio Scope.A1; Objektiv: Zeiss Objektiv A-Plan 40x/0,65 M27) angefertigt. Gezählt wurde manuell unter Zuhilfenahme des Programmes *NIH ImageJ* (<https://imagej.nih.gov/ij/>, Version 1.51) mit dem *Cell Counter plugin* (<https://imagej.nih.gov/ij/plugins/cell-counter.html>), wobei angeschnittene Zellen am Bildrand nicht mitgezählt wurden. Die Anzahl wurde pro Coverslip gemittelt.

2.16 Statistische Auswertung

Für jede Untersuchung erfolgte eine statistische Auswertung. Bei Vergleich zweier normalverteilter Messwertreihen erfolgte die Testung mittels T-Test. Wurden mehr als zwei Werte miteinander verglichen, so erfolgte die Auswertung mit der Einweg-Varianzanalyse (one-way analysis of variance, kurz: one-way ANOVA). Die Analysen erfolgten mit der Software *Prism8* (graphpad, San Diego, CA, USA).

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung eines nicht proliferativen RPE-Zellmodells

ARPE-19 Zellen sind spontan immortalisierte humane RPE Zellen. Um Untersuchungen bezüglich des Proliferationsverhalten durchzuführen, müssen die ARPE-19 Zellen zu Beginn der Versuche weitestgehend amitotisch und kontaktinhibiert vorliegen. Zur Etablierung des Zellmodells erfolgte für 24 Stunden die Aussaat der ARPE-19 Zellen in DMEM 10% FCS Nährmedium und anschließend der Wechsel in DMEM 2% FCS.

3.1.1 Spontaner Wachstumsarrest zwei Wochen nach Aussaat

Nach Aussaat der ARPE-19 Zellen erfolgte die Quantifizierung des Anteils der proliferierenden Zellen im Verhältnis zur absoluten Zellzahl. Als Proliferationsmarker diente die Färbung des intranukleären Ki67, die Bestimmung der Gesamtzellzahl erfolgte mittels der DAPI-Färbung.

Die absolute Zellzahl zeigte gemäß des logarithmischen Zellkulturwachstums eine asymptotische Zunahme über 2 Wochen. Der Anteil der Ki67 positiven Zellen an der Gesamtzellzahl zeigte eine inverse Korrelation zur Gesamtzellzahl: Zu Beginn beträgt der Anteil Ki67 positiver Zellen $92,9 \pm 7,3\%$ (Mittelwert \pm Standardabweichung). Im zeitlichen Verlauf kommt es zur asymptotischen Reduktion auf $4,1 \pm 1,0\%$ nach zwei bzw. $0,6 \pm 0,1\%$ nach drei Wochen.

Es zeigt sich somit ein spontaner Wachstumsstopp nach 2 bis 3 Wochen Kultivierung in Minimalmedium.

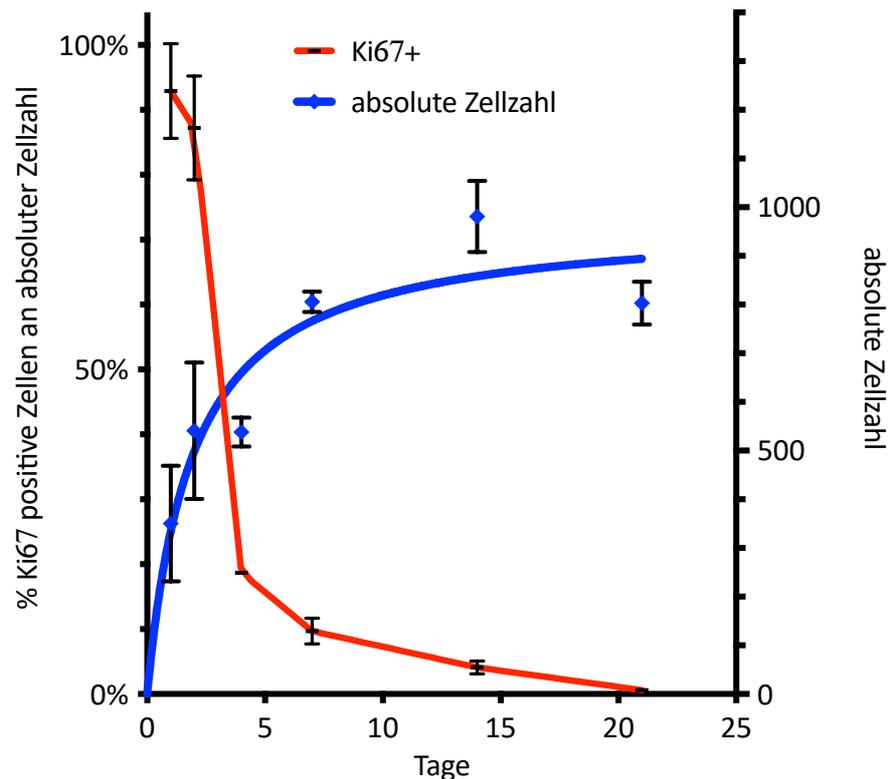


Abbildung 4 : Wachstumsarrest der ARPE-19 Zellen, Quantifizierung der Immunhistochemie (IHC)

ARPE-19 Zellen wurden für 48h in DMEM 10% FCS und dann für bis zu 3 Wochen in DMEM 2% FCS kultiviert. Die absolute Zellzahl zeigte eine asymptotische Annäherung an eine Maximalzellzahl, der Anteil Ki67positiver Zellen zeigte eine inverse Korrelation. Pro Zeitpunkt $n=3$ Coverslips (jeweils 5 Zählungen pro Coverslip wurden gemittelt), Mittelwert mit Standardabweichung.

3.1.2 Zunahme der ZO-1 Expression als Zeichen der Integrität der Zonulae occludentes
Als Zeichen der Kontaktinhibition erfolgte die Untersuchung der Expression des Zonula occludens Protein 1 (ZO-1) der ARPE-19 Zellen [68]. ZO-1 bindet an den intrazellulären Teil des Occludin, das durch seinen extrazellulären Anteil die Zell-Zell Verbindung bildet und die parazelluläre Permeabilität reguliert [68, 69].

Nach ARPE-19-Aussaat wurde ZO-1 und Ki67 immunhistochemisch angefärbt.

Als Zeichen der Integrität der Zonulae occludentes zeigte sich eine Zunahme der ZO-1-Expression bei gleichzeitiger Reduktion des Ki67 positiven Zellanteils im Zeitverlauf. 2 bis 3 Wochen nach Aussaat zeigte sich ein konfluierender intakter ARPE-19 Zellmonolayer ohne Hinweis auf signifikante Proliferationen.

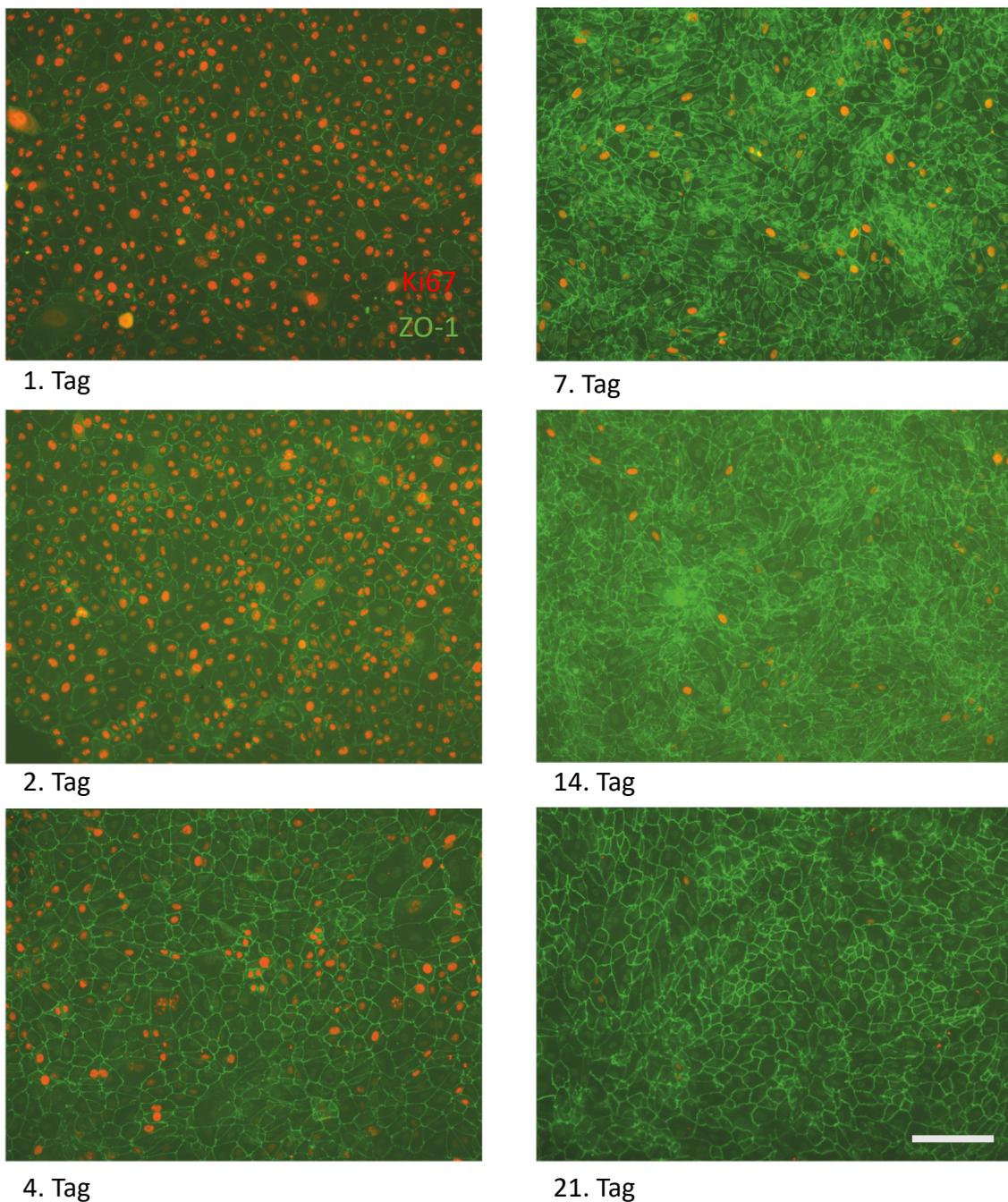


Abbildung 5: Wachstumsarrest der ARPE-19 Zellen, Immunhistochemie

ARPE-19 Zellen wurden für 48h in DMEM 10% FCS und dann für bis zu 3 Wochen in DMEM 2% FCS kultiviert. Der Proliferationsmarker Ki67 (rot) zeigte eine sukzessive Abnahme, der Zell-Zell Kontakt Marker ZO-1 (grün) zeigte eine stetige Zunahme. Maßstabelleiste (grauer Balken) 100µm.

3.2 E2F2 Transfektion führt zur Proliferationssteigerung

Zwei Wochen nach Aussaat zeigt sich ein ARPE-19 Zellmodell im Wachstumsarrest. Grundlegendes Konzept der Zellvermehrung und Regeneration von Geweben ist die

Zellteilung bzw. Zellproliferation [70]. Die Beeinflussung der Proliferation durch eine Beeinflussung des Zellzyklus mittels E2F2 soll hier genauer untersucht werden.

3.2.1 E2F2 Transfektion führt zur Erhöhung der E2F2-Expression

Zur Bestimmung der Effizienz der Transfektion des *E2F2*-Plasmids mittels PEI erfolgte die Untersuchung der E2F2-Proteinexpression. Hierzu erfolgte zwei Tage nach Transfektion der ARPE-19 Zellen die immunhistochemische Färbung des Transkriptionsfaktors E2F2. Durch Quantifizierung des Anteils der E2F2 positiven Zellen an der Gesamtzellzahl (DAPI-Färbung) konnte die Effektivität berechnet werden. Als Negativkontrolle dienten mit Transfektionsreagenz PEI ohne Plasmid behandelte Zellen.

Zwei Tage nach *E2F2* Transfektion zeigten $16,7 \pm 2,9$ % aller Zellen eine Expression von E2F2, die nur mit Transfektionsreagenz behandelten Zellen zeigten einen Anteil von $0,7 \pm 0,5$ %. Somit liegt die E2F2 Expression im Gruppenvergleich um den Faktor 24 höher als die Negativkontrolle (t-Test: $P < 0,0001$).

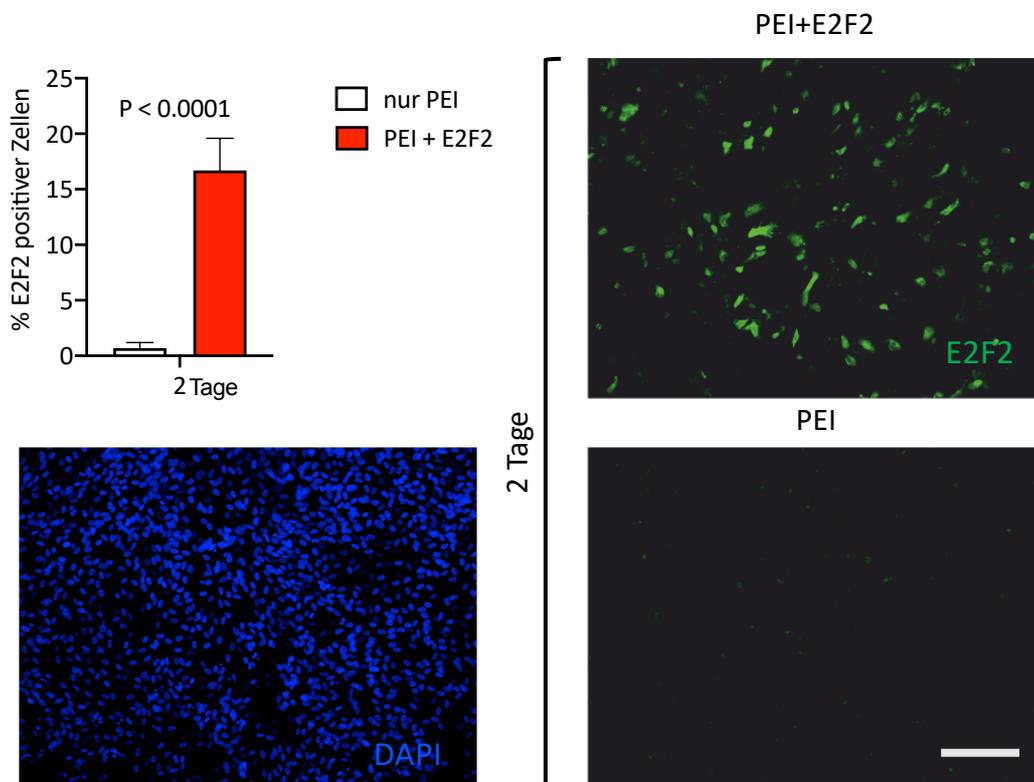


Abbildung 6: Effektivität der E2F2 Transfektion durch PEI nach zwei Tagen, Immunhistochemie

ARPE-19 Zellen wurden für 48h in DMEM 10% FCS und dann für 2 Wochen in DMEM 2% FCS kultiviert. Es erfolgte die E2F2-Transfektion mit PEI und als Kontrolle die Behandlung der ARPE-19 Zellen mit PEI ohne das E2F2-Plasmid. Zwei Tage nach Behandlung zeigte sich eine deutliche Zunahme des Anteils E2F2 positiver Zellen nach E2F2-Transfektion an der Gesamtzellzahl (DAPI). Pro Zeitpunkt n=3 Coverslips (jeweils 5 Zählungen pro Coverslip wurden gemittelt), Mittelwert mit Standardabweichung, t-Test.

3.2.2 E2F2 Transfektion führt zur Überexpression des Proliferationsmarkers Cyclin D1
Zur Untersuchung des Effekts von E2F2 auf den Zellzyklus wurden ARPE19-Zellen mit E2F2-Plasmid transfiziert und die Expression des Zellzyklusmarkers Cyclin D1 untersucht. Der Zellzyklusregulator Cyclin D1 weist bei Überschreitung des Zellzyklusarrests am G1/S -Übergang eine erhöhte Expression auf [71]. Es erfolgte die semiquantitative Bestimmung des E2F2-Proteins und des Proliferationsmarkers Cyclin D1 mittels Westernblot/Immunoblot. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet, als Negativkontrolle dienten ARPE-19 Zellen nach Behandlung mit dem Transfektionsreagenz PEI ohne DNA.

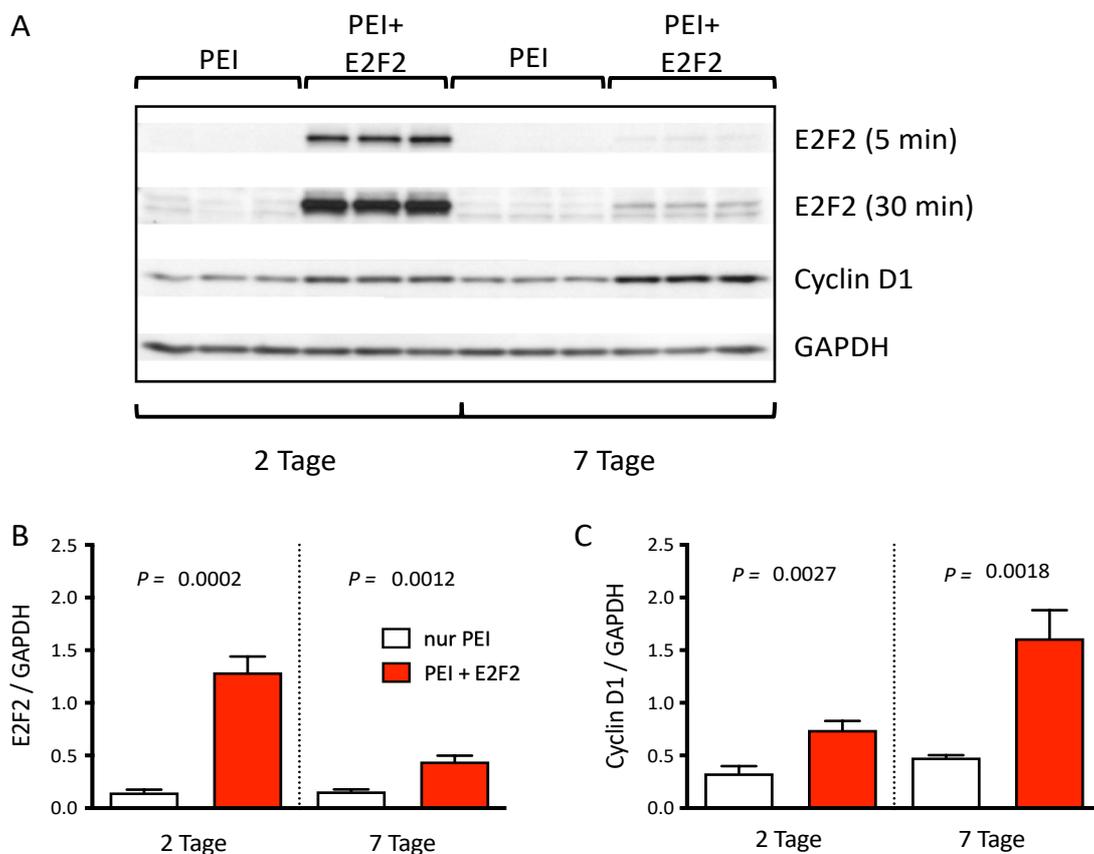


Abbildung 7: E2F2 Transfektion induziert Überexpression von E2F2 und Cyclin D1 in kontaktinhibierten ARPE-19 Zellen, Western Blot mit Quantifizierung

ARPE-19 Zellen wurden für 48h in DMEM 10% FCS und dann für 2 Wochen in DMEM 2% FCS kultiviert. Es erfolgte die E2F2-Transfektion mit PEI für 5 bzw. 30 Minuten und als Kontrolle die Behandlung der ARPE-19 Zellen mit PEI ohne das E2F2-Plasmid.

A: E2F2 Transfektion führte zur Überexpression von E2F2 und Expression von Cyclin D1 im Western Blot

B: E2F2 Transfektion führte zur Überexpression von E2F2 um den Faktor 9,2 (Tag 2) bzw. 2,8 (Tag 7) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Y-Achse Proteinlevel E2F2 zu GAPDH.

C: E2F2 Transfektion führte zur Überexpression von Cyclin D1, Faktor 2,3 (Tag 2); 3,4 (Tag 7) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Y-Achse Proteinlevel Cyclin D1 zu GAPDH. Pro Zeitpunkt n=3 Coverslips (jeweils 5 Messungen pro Coverslip wurden gemittelt), Mittelwert mit Standardabweichung, t-Test

Zwei Tage nach Transfektion zeigte sich eine deutliche Überexpression des E2F2, sieben Tage nach Transfektion eine reduzierte, aber noch immer signifikant erhöhte Expression. Parallel zeigte sich im Verhältnis zu den Kontrollgruppen vermehrte Expression von Cyclin D1 an Tag zwei mit Zunahme bis zum siebten Tag.

In der semiquantifizierten Auswertung ergaben sich zwei Tage nach E2F2-Transfektion eine 9,2 -fach höhere E2F2 Expression als in der Kontrollgruppe. Am Tag sieben nach Intervention ergab sich immer noch eine Mehrexpression um den Faktor 2,8 in der E2F2 transfizierten Gruppe.

Die Untersuchung des Cyclin D1 zeigte an Tag zwei für die E2F2 transfizierte Gruppe eine Zunahme der Expression um das 2,3-fache, an Tag sieben nach Transfektion eine Zunahme der Expression im Verhältnis zur Kontrollgruppe um den Faktor 3,4.

Zusammenfassend zeigte sich also nach E2F2 Transfektion eine deutliche, aber im Zeitverlauf abnehmende Überexpression von E2F2. Des Weiteren ergab sich ein Anstieg des Cyclin D1 Proliferationsmarkers mit einer Zunahme im Zeitverlauf nach E2F2 Transfektion.

3.2.3 E2F2 Transfektion führt zu Überexpression des Proliferationsmarkers Ki67 und Anstieg der Gesamtzellzahl

ARPE-19 Zellen befanden sich 2 Wochen nach Aussaat im Wachstumsarrest. Zur Untersuchung des Effekts von E2F2 auf den Anteil proliferierender Zellen erfolgte nach Transfektion von E2F2-Plasmid die Quantifizierung Ki67 positiver Zellen. Die Gesamtzellzahl wurde mittels DAPI-Färbung bestimmt. ARPE-19 Zellen nach Behandlung mit dem Transfektionsreagenz PEI ohne DNA dienten als Kontrolle.

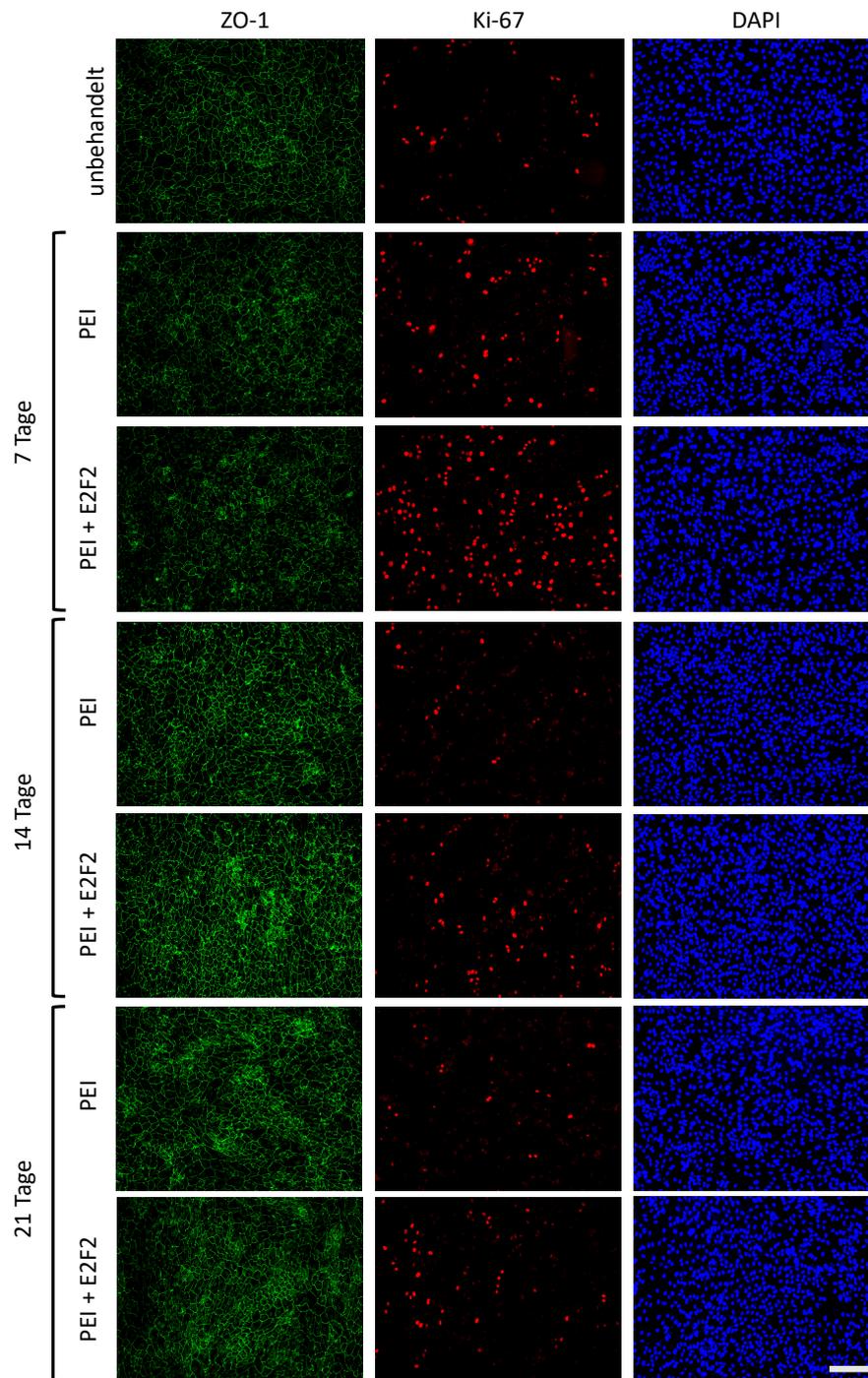


Abbildung 8: Proliferationssteigerung nach E2F2 Transfektion im ARPE-19 Zellmodell, Immunhistochemie
 ARPE-19 Zellen wurden für 48h in DMEM 10% FCS und dann für 2 Wochen in DMEM 2% FCS kultiviert. Es erfolgte die E2F2-Transfektion mit PEI und als Kontrolle die Behandlung der ARPE-19 Zellen mit PEI ohne das E2F2-Plasmid. Durch E2F2 Überexpression induzierte Ki67 Expression (rot). Expression des Zonula occludens Markers ZO-1 (grün) nach PEI Behandlung und E2F2 Transfektion zunächst reduziert (Tag 7), im Verlauf (Tag 14, 21) zunehmend. Maßstab 100µm.

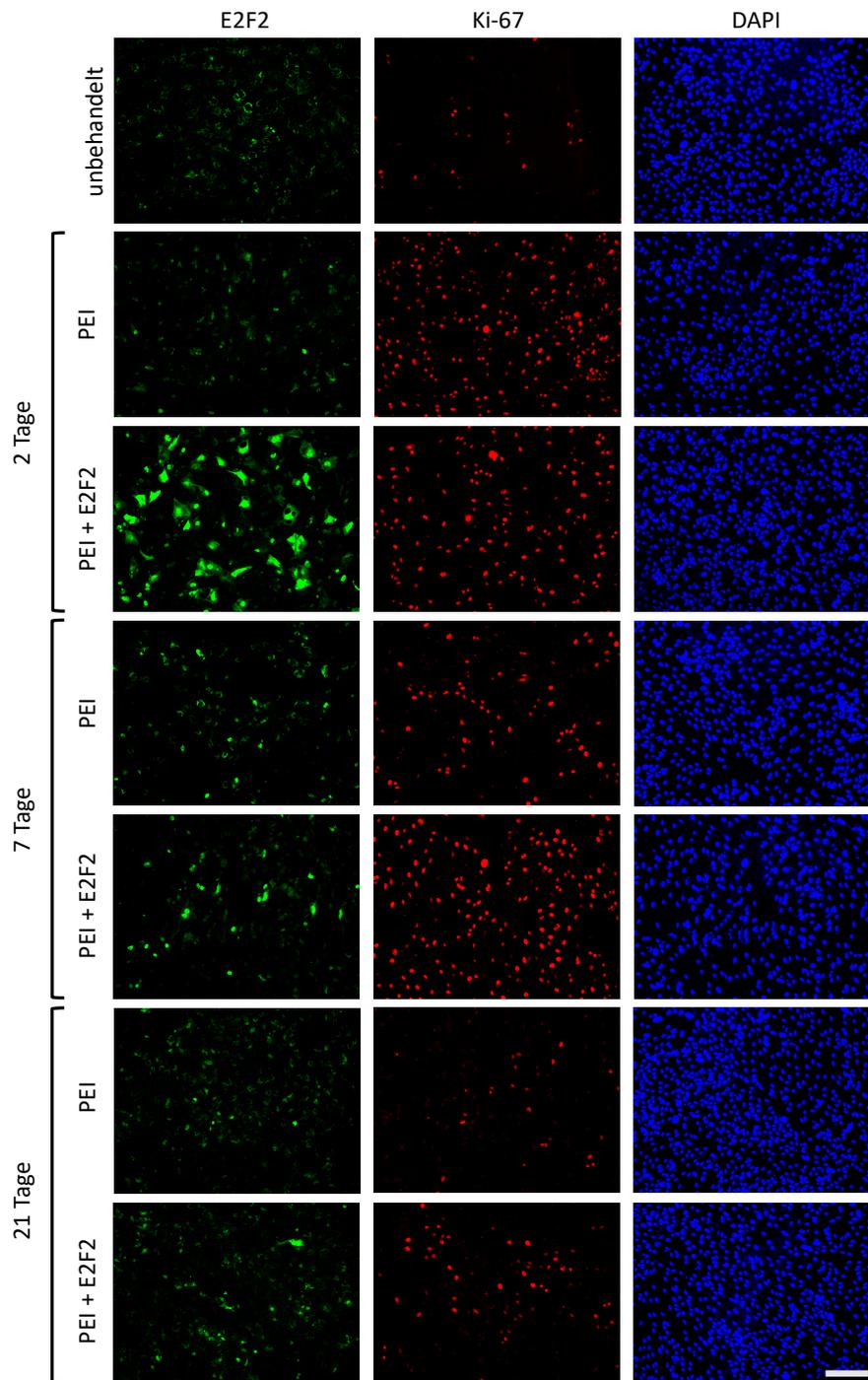


Abbildung 9: Fortsetzung zu Proliferationssteigerung nach E2F2 Transfektion im ARPE-19 Zellmodell, Immunhistochemie

ARPE-19 Zellen wurden für 48h in DMEM 10% FCS und dann für 2 Wochen in DMEM 2% FCS kultiviert. Es erfolgte die E2F2-Transfektion mit PEI und als Kontrolle die Behandlung der ARPE-19 Zellen mit PEI ohne das E2F2-Plasmid. Durch E2F2 Überexpression induzierte Ki67 Expression (rot). E2F2 Transfektion führte zur E2F2 Überexpression (grün) an allen Zeitpunkten (Tag 2, 7, 14). Maßstab 100µm

An Tag zwei nach Behandlung zeigten beide Gruppen eine deutliche Erhöhung des Anteils Ki67 positiver Zellen: *E2F2*-transfizierte ARPE-19 $86,1 \pm 11,4\%$ vs. Kontrolle $88 \pm 10,3\%$. Nach sieben Tagen war der Anteil proliferierender Zellen in der *E2F2*-Gruppe um den Faktor 2,3 höher als in der Kontrollgruppe, nach 21 Tagen zeigte sich ein 1,7-fach höherer Anteil proliferierender Zellen. Eine Signifikanz des Unterschiedes zwischen den beiden Gruppen lag ab Tag sieben vor.

Die Transfektion von *E2F2* führt zur Induktion von Proliferation von ARPE-19 Zellen.

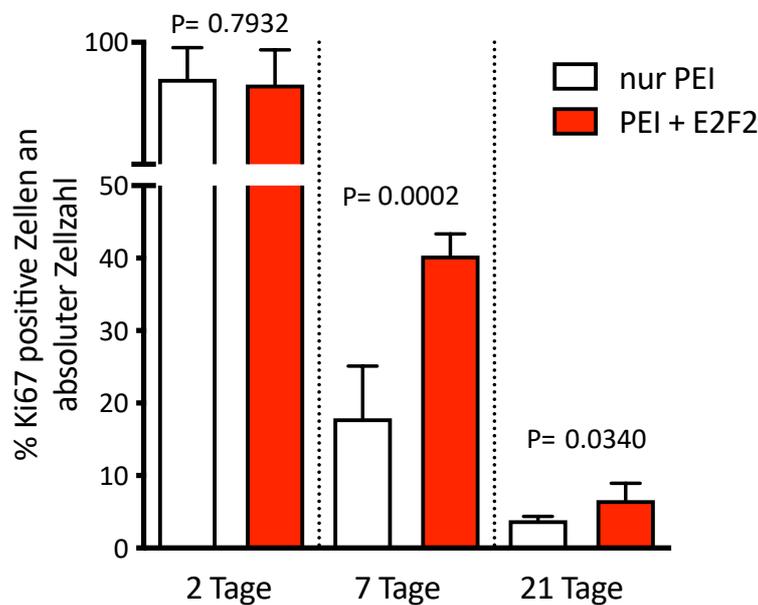


Abbildung 10: *E2F2* Überexpression induziert Proliferation in kontaktinhibierten ARPE-19 Zellen (Ki67), Quantifizierung der IHC

ARPE-19 Zellen wurden für 48h in DMEM 10% FCS und dann für 2 Wochen in DMEM 2% FCS kultiviert. Es erfolgte die *E2F2*-Transfektion mit PEI und als Kontrolle die Behandlung der ARPE-19 Zellen mit PEI ohne das *E2F2*-Plasmid. Die *E2F2* Überexpression induzierte eine Überexpression des Proliferationsmarkers Ki67. Erhöhung des Anteils Ki67 positiver Zellen an der Gesamtzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe: Tag 7 - Faktor 2,3; Tag 21 - Faktor 1,7 Pro Zeitpunkt $n=3$ Coverslips (jeweils 5 Zählungen pro Coverslip wurden gemittelt), Mittelwert mit Standardabweichung, t-Test.

Die Gesamtzellzahl zeigte sich an Tag zwei in der transfizierten (Gesamtzellzahl (GZ): 628 ± 151 Zellen pro mm^2) und in der mit Transfektionsreagenz behandelten Gruppe (GZ: 699 ± 240) ähnlich und nicht signifikant verschieden, nach einer Woche kam es zu einem deutlichen Anstieg der Gesamtzellzahl. Bis zum Tag 21 nach Behandlung erreichten die transfizierte Gruppe eine höhere Gesamtzellzahl (GZ: $2302 \pm 622,5$) als die lediglich mit

PEI behandelte Kontrollgruppe (GZ: $1746,2 \pm 412,7$), der Unterschied war statistisch jedoch nicht signifikant (t-Test, $P = 0,1347$).

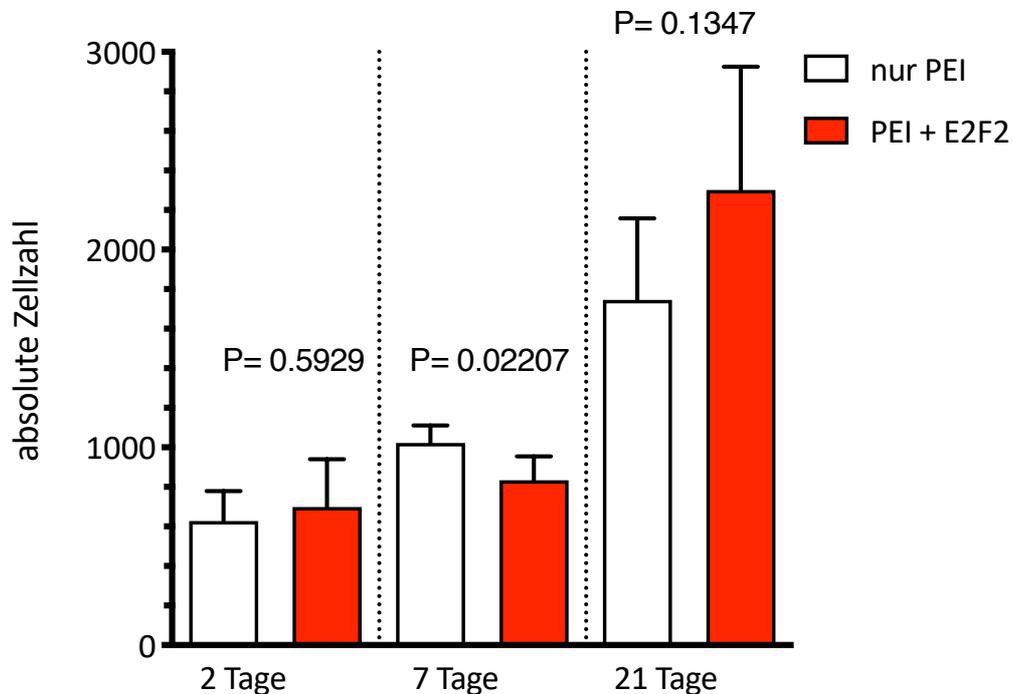


Abbildung 11: Anstieg der absoluten Zellzahl pro mm^2 nach E2F2 Transfektion in kontaktinhibierten ARPE-19 Zellen, Quantifizierung der IHC

ARPE-19 Zellen wurden für 48h in DMEM 10% FCS und dann für 2 Wochen in DMEM 2% FCS kultiviert. Es erfolgte die E2F2-Transfektion mit PEI und als Kontrolle die Behandlung der ARPE-19 Zellen mit PEI ohne das E2F2-Plasmid. Erhöhung der absoluten Zellzahl mit Zunahme bis Tag 21. Unterschied zwischen E2F2-transfizierten Zellen und der Kontrollgruppe zu keinem Zeitpunkt signifikant. Pro Zeitpunkt $n=3$ Coverslips (jeweils 5 Zählungen pro Coverslip wurden gemittelt), Mittelwert mit Standardabweichung, t-Test.

3.2.4 E2F2 Transfektion führt zum Anstieg der intrazellulären BrdU Aufnahme

Zur weiteren Untersuchung der Proliferationsrate nach E2F2-Plasmid Transfektion erfolgte die Markierung proliferierender Zellen durch BrdU-Inkorporation, einem Marker für die DNA-Synthese. Die Quantifizierung erfolgte mittels Immunfärbung von BrdU (sich teilende und neu entstandene Zellen) und durch DAPI-Färbung (alle Zellen). Als Kontrolle wurden mit Transfektionsreagenz PEI ohne DNA behandelte ARPE-19 Zellen beurteilt.

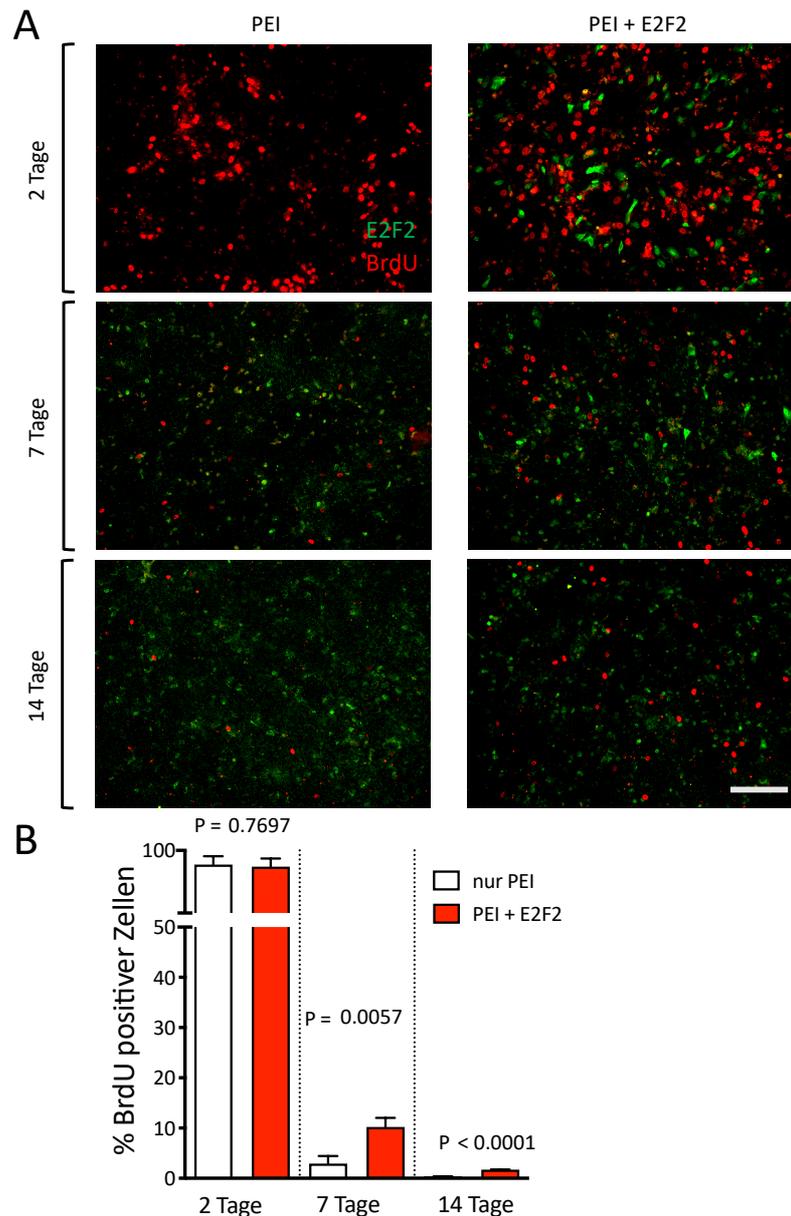


Abbildung 12: Steigerung der Proliferation (BrdU-Aufnahme) durch E2F2 Überexpression, Immunhistochemie mit Quantifizierung

ARPE-19 Zellen wurden für 48h in DMEM 10% FCS und dann für 2 Wochen in DMEM 2% FCS kultiviert. Es erfolgte die E2F2-Transfektion mit PEI und als Kontrolle die Behandlung der ARPE-19 Zellen mit PEI ohne das E2F2-Plasmid.

A: Anteil BrdU positiver Zellen (rot) an der Gesamtzellzahl E2F2-transfizierter Zellen(grün) im Vergleich zur PEI behandelten Kontrollgruppe. Durch E2F2-Transfektion induzierte E2F2 Überexpression (grün), Abnahme im Zeitverlauf Maßstab 100µm.

B: E2F2 Überexpression führte zur Steigerung der Brd-aufnehmenden ARPE-19 Zellen als Marker der Proliferation. Erhöhung des Anteils BrdU positiver Zellen an der Gesamtzahl: Tag 7: Faktor 3,5; Tag 14: Faktor 5,3. Pro Zeitpunkt n=3 Coverslips (jeweils 5 Zählungen pro Coverslip wurden gemittelt), Mittelwert mit Standardabweichung, t-Test.

An Tag zwei nach Transfektion zeigte sich ein deutlicher Anstieg profilierender ARPE-19 Zellen in beiden Gruppen: *E2F2*-transfiziert $91 \pm 5,3\%$ vs. Kontrolle $89,6 \pm 5,1\%$, ohne signifikanten Unterschied ($P = 0,7697$). Sieben Tage nach Behandlung lag der Anteil proliferierender Zellen nach *E2F2* Transfektion 3,5-fach höher als in der Kontrolle ($P = 0,0057$). Zwei Wochen nach Transfektion ergab sich weiterhin eine um den Faktor 5,3 erhöhte Proliferationsrate nach Transfektion mit *E2F2*-Plasmid ($P < 0,0001$).

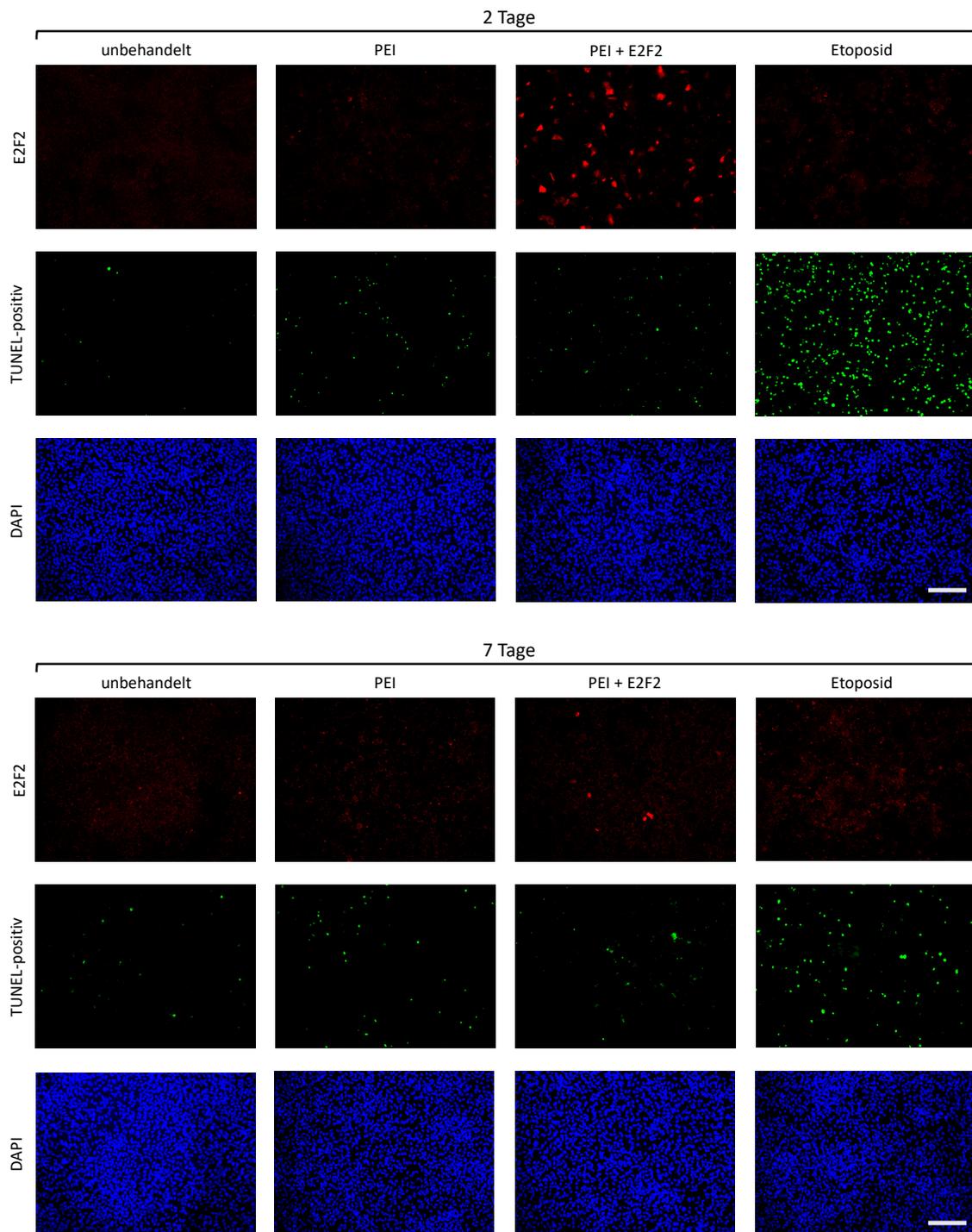
Die Transfektion von *E2F2* führte somit zur Induktion von Proliferation von ARPE-19 Zellen.

3.3 Die *E2F2* Transfektion bewirkt eine kurzfristige Steigerung der Apoptoserate

Grundlage der Untersuchungen ist das unter 3.1 etablierte amitotische ARPE-19 Zellmodell. Zur Untersuchung des Effekts von *E2F2* auf die Zell-Apoptose wurde der Anteil der apoptotischen Zellen mittels TUNEL-Test markiert und durch die DAPI-Färbung die Gesamtzellzahl quantifiziert.

Es erfolgte die Quantifizierung des Anteils apoptotischer Zellen an der Gesamtzellzahl in vier Gruppen:

- (1) unbehandelte ARPE-19 Zellen (Negativkontrolle),
- (2) mit Transfektionsreagenz PEI behandelte ARPE-19 Zellen,
- (3) *E2F2* transfizierte Zellen,
- (4) mit Etoposid ($250\mu\text{M}$) behandelte Zellen. Letzteres ist ein Zytostatikum, induziert Apoptose und diente somit als Positivkontrolle. Die Dosierung von $250\mu\text{M}$ wurde in vorangegangenen Dosis-Wirkungs-Testungen etabliert [72].



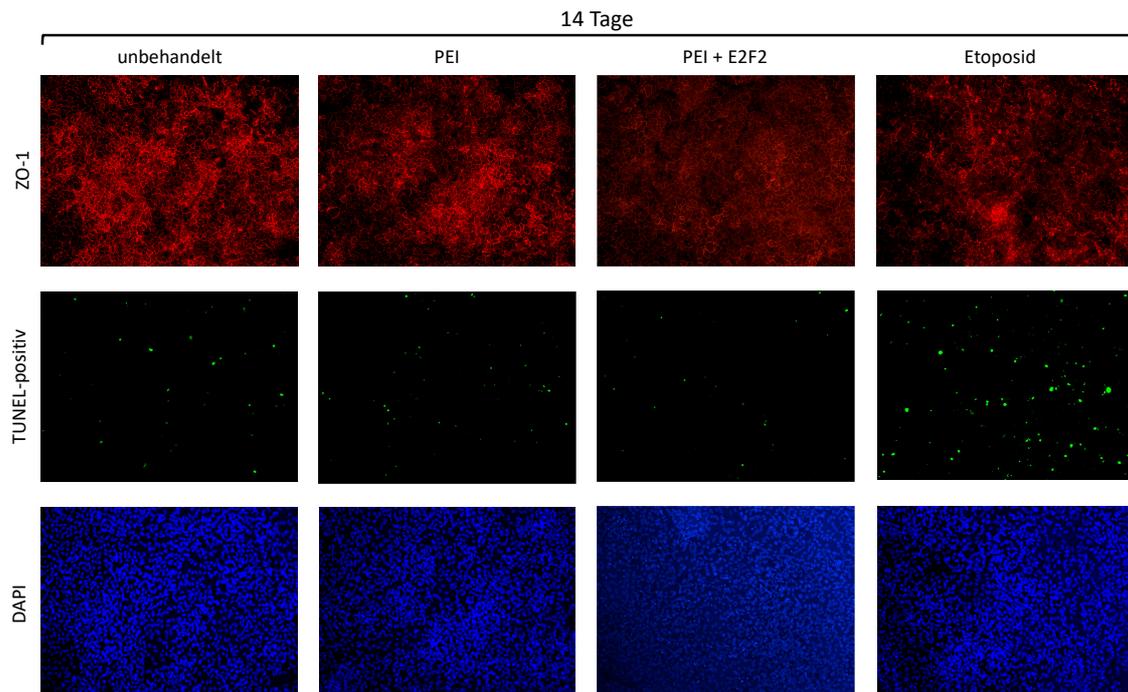


Abbildung 13: E2F2 Transfektion führt zur passageren Zunahme apoptotischer Zellen, Immunhistochemie

ARPE-19 Zellen wurden für 48h in DMEM 10% FCS und dann für 2 Wochen in DMEM 2% FCS kultiviert. Es erfolgte die E2F2-Transfektion mit PEI und als Kontrolle die Behandlung der ARPE-19 Zellen mit PEI ohne E2F2-Plasmid. E2F2 Transfektion erhöht die Expression von E2F2 (rot) mit Maximum an Tag 2 und Abnahme an Tag 7. Zunahme TUNEL-positiver Zellen (grün) nach E2F2 Transfektion und PEI Behandlung an Tag 2 und 7 im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. An Tag 14 wieder Niveau der unbehandelten Gruppe. Positivkontrolle durch mit Etoposid behandelte ARPE-19 Zellen zeigte eine Zunahme TUNEL-positiver Zellen (grün) mit einem Maximum an Tag 2 und kontinuierlicher Abnahme über die Zeit (Tag 7 und 14) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. An Tag 14 nach Behandlung erfolgte anstatt der Färbung gegen E2F2 die Färbung gegen ZO-1 (rot) als Zeichen der Zellmonolayer-Integrität: Hierbei zeigten sich in der unbehandelten, der PEI und PEI + E2F2 Gruppe eine ähnliche Expression, die Etoposidkontrollgruppe zeigt eine im Vergleich deutlich geringere und inhomogene Expression von ZO-1.

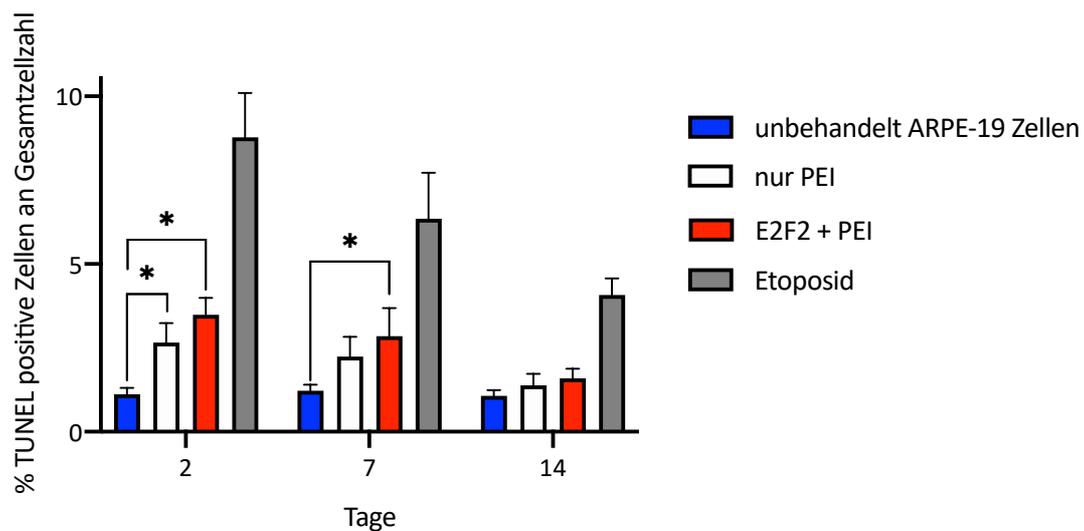


Abbildung 14: E2F2 Transfektion führt zur passageren Zunahme apoptotischer Zellen, Quantifizierung der IHC
 ARPE-19 Zellen wurden für 48h in DMEM 10% FCS und dann für 2 Wochen in DMEM 2% FCS kultiviert. Es erfolgte die E2F2-Transfektion mit PEI und als Kontrolle die Behandlung der ARPE-19 Zellen mit PEI ohne E2F2-Plasmid. Es zeigt sich eine Zunahme der Anteil der apoptotischen Zellen (TUNEL positiv) an der Gesamtzellzahl nach E2F2 Transfektion und PEI Behandlung an Tag 2 und 7 im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (Tag 2 - PEI: Faktor 2,4; PEI + E2F2: 3,1; Tag 7 - Faktor 1,8 und 2,3). An Tag 14 lagen die Werte wieder auf dem Niveau der unbehandelten Gruppe. Die Unterschiede zwischen PEI und PEI-E2F2 waren zu keinem Zeitpunkt signifikant. Die Positivkontrolle mit Etoposid zeigte eine Zunahme apoptotischer Zellen mit einem Maximum an Tag 2 (Faktor 7,8) und Abnahme über die Zeit (Tag 7: Faktor 5,2; Tag 14: Faktor 3,8) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (zu allen Gruppen stets signifikant unterschiedlich; in der Abbildung nicht dargestellt). Pro Zeitpunkt n=3 Coverslips (jeweils 5 Zählungen pro Coverslip wurden gemittelt), Mittelwert mit Standardabweichung, One-way ANOVA; * p<0,05.

Der Anteil apoptotischer Zellen betrug in der unbehandelten Kontrollgruppe gleichbleibend circa $1,14 \pm 0,07\%$. Im Verhältnis hierzu zeigte die Positivkontrolle kurz nach Behandlung mit dem Zytostatikum einen deutlichen Anstieg um das 7,8-fache, im Verlauf kam es zur sukzessiven Reduktion der Apoptoserate.

Nach Behandlung zeigte sich in der E2F2- und PEI-Kontrollgruppe eine signifikante Zunahme der Apoptoserate um das 3,1- bzw. 2,4-fache im Verhältnis zur unbehandelten Kontrollgruppe an Tag 2 (E2F2 + PEI p=0,0054; PEI p=0,0398). Eine Woche nach Einsatz des PEI kam es zur Reduktion der Apoptoserate auf das 2,3- bzw. 1,8-fache im Verhältnis zur unbehandelten Kontrollgruppe (E2F2 + PEI p=0,049; PEI p=0,1847). An Tag 14 betrug die Apoptoserate 1,59% (E2F2 + PEI) bzw. 1,38% (PEI) und war nicht signifikant von der unbehandelten Gruppe (1,07%) abweichend (E2F2 + PEI p=0,102;

PEI $p=0,3029$). Die Unterschiede der Apoptoseraten beider mit PEI behandelte Gruppen waren untereinander zu keinem Zeitpunkt signifikant (Tag 2: $p=0,2227$; Tag 7 $p=0,4107$; Tag 14 $p=0,4771$).

Somit führt die E2F2 Transfektion passagere zur Zunahme der Apoptoserate des ARPE-19 Zellenverbundes, dieser erholt sich jedoch binnen 14 Tagen vollständig. Da die Apoptoseraten zwischen nur PEI und PEI + E2F2 transfizierten Zellen zu keinem Zeitpunkt signifikant verschieden sind, ist davon auszugehen, dass E2F2 Überexpression nicht zur gesteigerten Apoptose führt. Die gesteigerte Apoptoserate ist somit Folge der Behandlung mit den Transfektionsreagenzien.

3.4 Die E2F2 Transfektion führt zur passageren Viabilitätsreduktion

Zur Untersuchung des Einflusses der *E2F2* Transfektion auf die Viabilität der ARPE-19 Zellen erfolgte die Anwendung des XTT-Tests. Zur Testung erfolgte die Durchführung des Tests innerhalb folgender Gruppen:

- (1) unbehandelte ARPE-19 Zellen (Negativkontrolle),
- (2) Kontrolle durch Transfektionsreagenz behandelte ARPE-19 Zellen,
- (3) Transfektion von *E2F2* mit PEI.

Als 100% Referenz diente das Viabilitätsniveau der unbehandelten Kontrollgruppe.

Initial ergab sich eine deutliche und signifikante Viabilitätsreduktion der transfizierten und der lediglich mit Transfektionsreagenz behandelten Zellen auf $63,97 \pm 3\%$ bzw. $68,99 \pm 2,6\%$ (PEI+ *E2F2* vs PEI Tag 1 $p = 0,0466$) im Vergleich zu unbehandelten ARPE-19 Zellen ($p < 0,0001$). Es kam binnen der ersten 7 Tage zur Erholung der Viabilität, sodass ab Tag sieben fast das Viabilitätsniveau der unbehandelten Kontrollgruppe erreicht wurde. Ab dem siebten Tag war die Viabilität der behandelten Gruppen nicht signifikant verschieden zu derer der unbehandelten Kontrollgruppe. Eine Signifikanz des Unterschiedes zwischen der mit Transfektionsreagenz behandelten und der transfizierten Gruppen lag ab Tag vier nicht vor.

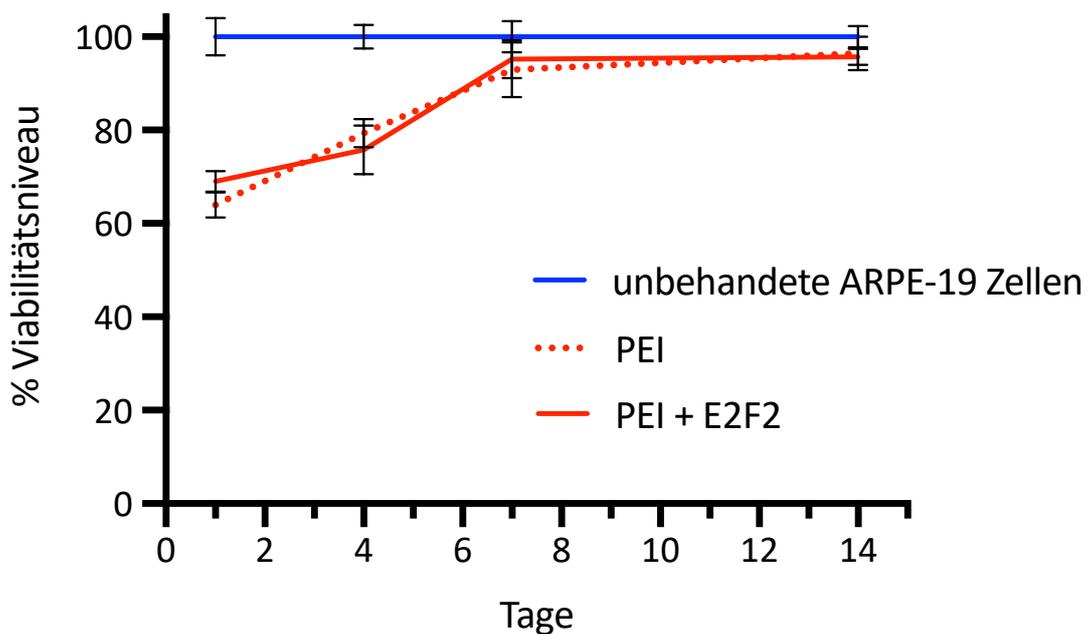


Abbildung 15: passagere Viabilitätsreduktion durch E2F2 Transfektion, XTT-Assay

ARPE-19 Zellen wurden für 48h in DMEM 10% FCS und dann für 2 Wochen in DMEM 2% FCS kultiviert. Es erfolgte die E2F2-Transfektion mit PEI und als Kontrolle die Behandlung der ARPE-19 Zellen mit PEI ohne E2F2-Plasmid. Viabilität gemessen im Verhältnis zur unbehandelten Negativkontrolle (100%). PEI Behandlung und E2F2 Transfektion führten zu einer Reduktion der Viabilität mit dem Maximum an Tag 1 (PEI: 63,97%; PEI + E2F2: 68,99%) und Regeneration über Tag 4 (PEI: 79,35%; PEI + E2F2: 75,79%), Tag 7 (PEI: 92,92%; PEI + E2F2: 95,21%) bis Tag 14 (PEI: 96,39%; PEI + E2F2: 95,69%). Außer Tag 1 kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden behandelten Gruppen. Pro Zeitpunkt $n=3$ Coverslips (jeweils 5 Zählungen pro Coverslip wurden gemittelt), Mittelwert mit Standardabweichung, One-way ANOVA.

Der Viabilitätsverlust der behandelten Gruppen zeigte sich kurz nach Transfektion deutlich, binnen einer Woche kam es jedoch zur Erholung der Zellkulturen. Nach dieser passageren Reduktion zeigte sich im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe keine signifikante Viabilitätsreduktion mehr. Der Viabilitätsverlust zwischen E2F2-transfizierten und PEI-behandelten Zellen war außer an Tag eins nicht signifikant und zeigte die selbe Dynamik. Nach Transfektion mit E2F2 oder Behandlung mit Transfektionsreagenz kommt es gleichermaßen zur passageren Viabilitätsreduktion. Es kann davon ausgegangen werden, dass der Viabilitätsreduktion auf der Methodik der Transfektion mittels PEI beruht. Die Überexpression von E2F2 führte somit nicht zur Minderung der Viabilität.

3.5 Die E2F2 Transfektion führt zur passageren Permeabilitätssteigerung

Zur Untersuchung des Einflusses der *E2F2* Transfektion auf die Barrierefunktion des ARPE-19 Monolayers entwickelten wir einen FITC-Dextran-Assays mit einer Laufzeit von 24 Stunden. Die Quantifizierung erfolgte mittels Spektrophotometrie. Die Konzentration des Dextran-Testmediums von 0,25 mg/ml diente als 100% Referenz, das Dextran-freie Medium als 0% Referenz. Die Dextran-Diffusion (in %) gibt das Verhältnis der Konzentrationen des Dextran im Inneren des Transwellfilters zur Konzentration im Außenbereich nach 24 Stunden an.

Folgende Versuchsgruppen wurden verglichen:

- (1) leerer Transwellfilter ohne Zellen,
- (2) unbehandelter konfluenten ARPE-19 Zell-Monolayer (Negativkontrolle),
- (3) mit EDTA zum Zeitpunkt der Transfektion behandelte Zellen (Positivkontrolle),
- (4) mittels Transfektionsreagenz behandelte ARPE-19 Zell-Monolayer und
- (5) mit *E2F2* transfizierte ARPE-19 Zellen.

Als Positivkontrolle dienten mit EDTA behandelte ARPE-19 Zellmonolayer (0,5mM, 10 Minuten). Der Chelatbildner EDTA bindet die für die Funktion und Morphologie der Zona occludens essentiellen Metall- und Kalzium-Kationen, führt so zur Lösung der Zell-Zell-Verbindung und damit zur Steigerung der parazellulären Permeabilität [73, 74].

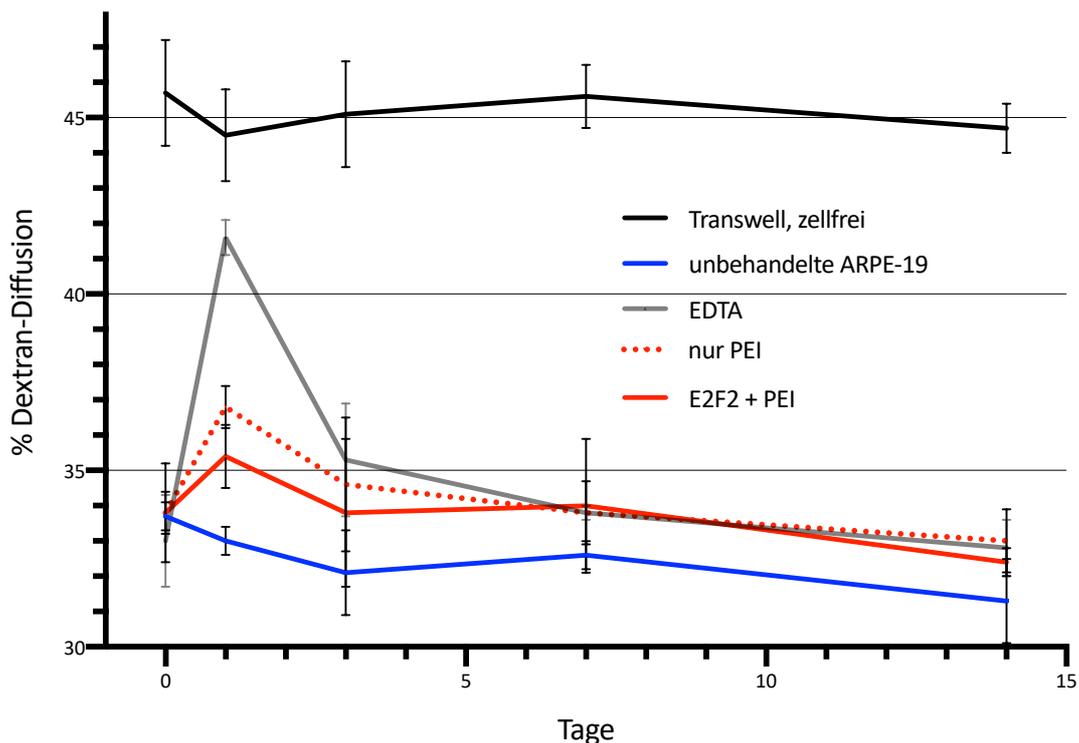


Abbildung 16: Passagere Permeabilitätssteigerung des ARPE-19 Monolayers nach E2F2 Transfektion, FITC-Dextran-Assay

ARPE-19 Zellen wurden für 48h in DMEM 10% FCS und dann für 2 Wochen in DMEM 2% FCS kultiviert. Es erfolgte die E2F2-Transfektion mit PEI und als Kontrolle die Behandlung der ARPE-19 Zellen mit PEI ohne E2F2-Plasmid. Als Positivkontrolle erfolgte die Behandlung von ARPE-19 Zellen mit EDTA, als Negativkontrolle diente eine unbehandelte Kontrollgruppe. Messung der Dextran-Diffusion über den ARPE-19 Monolayer als Indikator für die Monolayer-Permeabilität.

Nach EDTA Behandlung beobachtet man eine Zunahme der Permeabilität an Tag 2 (Zunahme der Dextran-Diffusion: 26%) und Regeneration ab Tag 3 (10%), Tag 7 (3,7%) und Tag 14 (4,8%) im Vergleich zur Negativkontrolle. PEI Behandlung und E2F2 Transfektion führten zum Anstieg der Permeabilität an Tag 1 (PEI: 11,5%; PEI + E2F2: 7,3%) und reduzierte sich über Tag 3 (PEI: 7,8%; PEI + E2F2: 5,3%), Tag 7 (PEI: 3,7%; PEI + E2F2: 4,3 %) und Tag 14 (PEI: 5,4%; PEI + E2F2: 3,5%) fast auf das Niveau der Negativkontrolle. Es zeigte sich zwischen den beiden behandelten Gruppen zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied. Pro Zeitpunkt n=3 Transwellfiltersysteme (jeweils 5 Zählungen pro Transwellfilter wurden gemittelt), Mittelwert mit Standardabweichung, One-way ANOVA.

3.5.1 Permeabilität der nicht transfizierten Gruppen

Das leere Transwellssystem zeigte eine konstante Dextran-Diffusion zwischen 44,7 und 45,7% bei sehr geringer Standardabweichung (SD 0,5%). Die Negativkontrolle mit konfluenter ARPE-19 Zellschicht und regelrechten Zonulae occludentes zeigt eine konstante Permeabilität zwischen 32,4 bis 35,4% (SD 0,9%). Einen Tag nach EDTA-Behandlung zeigte der ARPE-19 Monolayer eine Zunahme der Dextran-Diffusion um

26% ($p < 0,001$), drei Tage nach EDTA Eingabe eine um 9,9% stärkere Diffusion ($p = 0,0448$) im Verhältnis zum unbehandelten ARPE-19 Monolayer. Ab dem siebten Tag zeigte sich die Permeabilität nicht signifikant verschieden zu der Negativkontrolle.

Nach initialer Lösung der Zell-Zell Verbindung durch EDTA kommt es innerhalb von 7 Tagen zur Regeneration der Barrierefunktion und folglich zur Reduktion der parazellulären Permeabilität auf den Ausgangswert.

3.5.2 Permeabilitätszunahme nach Transfektion

Die Permeabilität des Monolayers nahm am ersten Tagen nach Behandlung allein mit dem Transfektionsreagenz um 11,5% ($p = 0,0006$), nach *E2F2* Transfektion um 7,3% ($p = 0,0113$) signifikant im Verhältnis zum unbehandelten ARPE-19 Monolayer zu. Innerhalb der ersten drei Tage reduzierte sich die parazelluläre Permeabilität beider Gruppen auf das Niveau der nicht transfizierten Kontrollgruppe ohne signifikanten Unterschied. Im weiteren Verlauf (Tag 7, 14) zeigte sich die Permeabilität fast identisch mit der nicht behandelten Kontrollgruppe. Die Permeabilität der beiden Gruppen (nur PEI und PEI + *E2F2*) zeigte zu keinem Messzeitpunkt einen signifikanten Unterschied.

Die *E2F2* Transfektion bewirkt eine kurzzeitige und reversible Permeabilitätssteigerung des ARPE-19 Monolayers.

Eine gesonderte Zunahme der Permeabilität durch Überexpression von *E2F2* im Vergleich zur Transfektion ohne Plasmid zeigt sich nicht. Somit ist davon auszugehen, dass die reversible Permeabilitätssteigerung aufgrund der gewählten Transfektionsmethode mittels PEI beruht.

3.6 *E2F2* Transfektion induzierte keine Überexpression der Marker-Proteine für epithelial-mesenchymale Transition (EMT)

Grundlegendes Konzept der Zellvermehrung und Regeneration von Geweben ist Zellteilung [70]. Der in dieser Arbeit gewählte Ansatz hatte das Ziel, durch Überexpression von *E2F2* die Proliferation und somit Regeneration der spezialisierten ARPE-19 Zellen anzuregen. Es zeigte sich jedoch, dass die Regeneration von Geweben und damit einhergehende Zellproliferation zur EMT führen kann [69]. Im Folgenden wird daher die mögliche Induktion von EMT durch *E2F2* Transfektion im ARPE-19 Zellmodell untersucht.

3.6.1 Epithelial-mesenchymale Transition

Die EMT beschreibt einen biologischen Prozess, der Epithelzellen betrifft. Epithelzellen treten als konfluente Zell-(Mono-)Layer auf, dessen Zellen durch Zell-Zell-Verbindungen kontaktinhibiert und polarisiert sind [75]. Epitheliale Zellen sind terminal differenziert und somit hoch spezialisiert, um spezifische Funktionen zu erfüllen [69]. Dagegen weisen mesenchymale Stammzellen einen weniger spezialisierten Phänotyp auf und besitzen die Fähigkeit, in eine Vielzahl von Zellarten zu differenzieren. Die Form von mesenchymalen Zellen ist unregelmäßiger, enge Zell-Zell-Verbindungen oder konstant anhaltende Polarisierung werden nicht ausgebildet. Es ergibt sich eine deutlich erhöhte Migrationskapazität [75]. Die EMT führt somit funktionell und phänotypisch zum Übergang der epithelialen in mesenchymale Zellen. Es kommt zur Lösung der Epithelzellen aus dem Zellverbund, zu Änderung der phänotypischen Eigenschaften, zur De-Differenzierung und somit zum Funktionsverlust des spezifischen Epithels [76].

3.6.2 EMT Marker

Im ARPE-19 Zellmodell untersuchten wir die Expression verschiedener Markerproteine der EMT: N-Cadherin, Fibronectin, β -Caterin, Kollagen IV und α -smooth muscle actin (α -SMA). Bei Überexpression dieser Proteine ist von einer Transition in einen mesenchymalen Phänotyp mit konsekutiver Reduktion epithelialer Funktion auszugehen [69, 77].

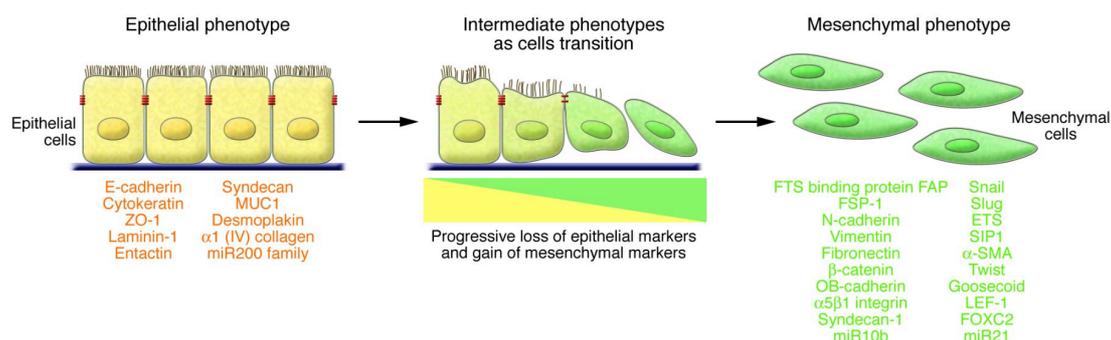


Abbildung 17: EMT und EMT Proteinmarker (aus dem Englischen nach von Kalluri 2009 [69])

EMT führt zum funktionellen Übergang von polarisierten Epithelzellen in mobile und extrazelluläre Matrix produzierende mesenchymale Zellen. Die aufgelisteten Zellmarker werden aktuell in der EMT-Forschung verwendet. ZO-1, zona occludens 1; MUC1, mucin 1; miR200, microRNA 200; miR10b, microRNA 10b; SIP1, survival of motor neuron protein interacting protein 1; α -SMA, α - smooth muscle actin; LEF-1, Lymphoid Enhancer-Binding Factor 1; FOXC2,

forkhead box C2; miR21, microRNA 21 [69]. Copyright © 2009, American Society for Clinical Investigation, DOI: (10.1172/JCI39104)

3.6.3 Transforming Growth Factor (TGF)- β 2 induziert die Überexpression der EMT Marker Kollagen IV und α -SMA

Der Transforming Growth Factor (TGF)- β 2 ist einer der bedeutendsten Regulatoren der EMT und induziert EMT auch im ARPE-19 Zellmodell [78, 79]. Zur Untersuchung der EMT und Etablierung einer Positivkontrolle erfolgte die Stimulation der ARPE-19 Zellen durch TGF- β 2 und anschließend die qualitative Auswertung der Expression der EMT-Markerprotein Kollagen IV, Fibronectin und α -SMA [69].

Grundlage der Untersuchungen ist das unter 3.1 etablierte, amitotische ARPE-19 Zellmodell.

3.6.3.1 TGF- β 2 induziert die Expression von Kollagen IV und α -SMA (IF)

Es erfolgte die einmalige Behandlung kultivierter ARPE-19 Zellen mit TGF- β 2 (2 ng/ml, PeproTech, Inc., Rocky Hill, NJ, USA) zum Zeitpunkt 0. Anschließend wurde die Fixierung und immunhistochemische Färbung gegen Kollagen IV und α -SMA und jeweils ZO-1 durchgeführt.

Die Kollagen IV – Expression nahm bis zum ersten Tag nach Behandlung deutlich zu (Maximum), anschließend kam es zur sukzessiven Abnahme der Expression. Die TGF- β 2 Behandlung bewirkt eine Zunahme des EMT Markers α -SMA. Es kommt sukzessive zum dezenten Anstieg des α -SMA mit einem Maximum am 7. Tag.

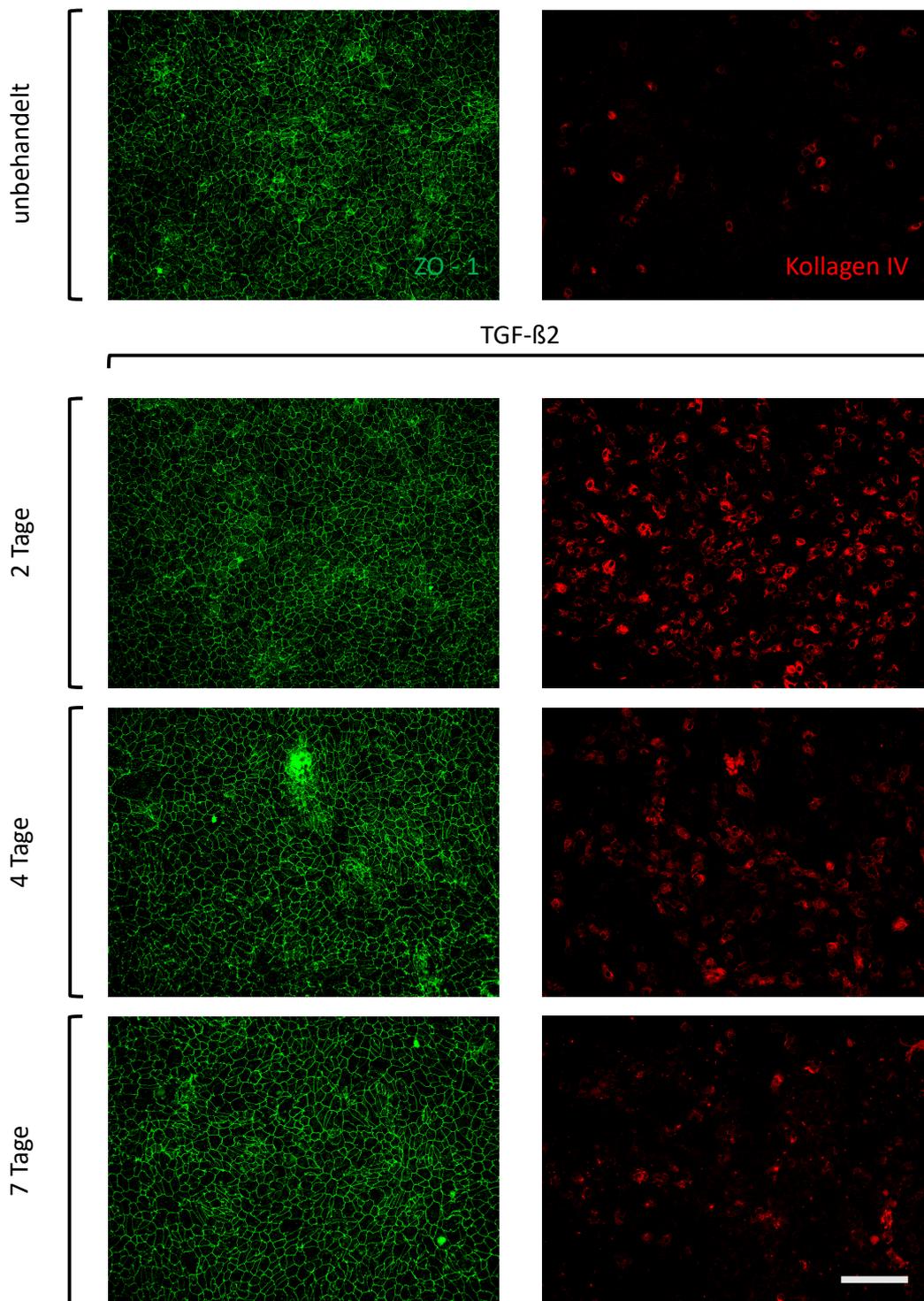


Abbildung 18: Zunahme der Kollagen IV Expression nach TGF- β 2 Behandlung der ARPE-19 Zellen, Immunhistochemie ARPE-19 Zellen wurden für 48h in DMEM 10% FCS und dann für 2 Wochen in DMEM 2% FCS kultiviert. Es erfolgte die einmalige Behandlung mit TGF- β 2 (2 ng/ml) zum Zeitpunkt 0. TGF- β 2 induzierte die Überexpression von Kollagen IV (rot) mit Maximum an Tag 2 und Abnahme bis Tag 7 (ZO-1, grün).

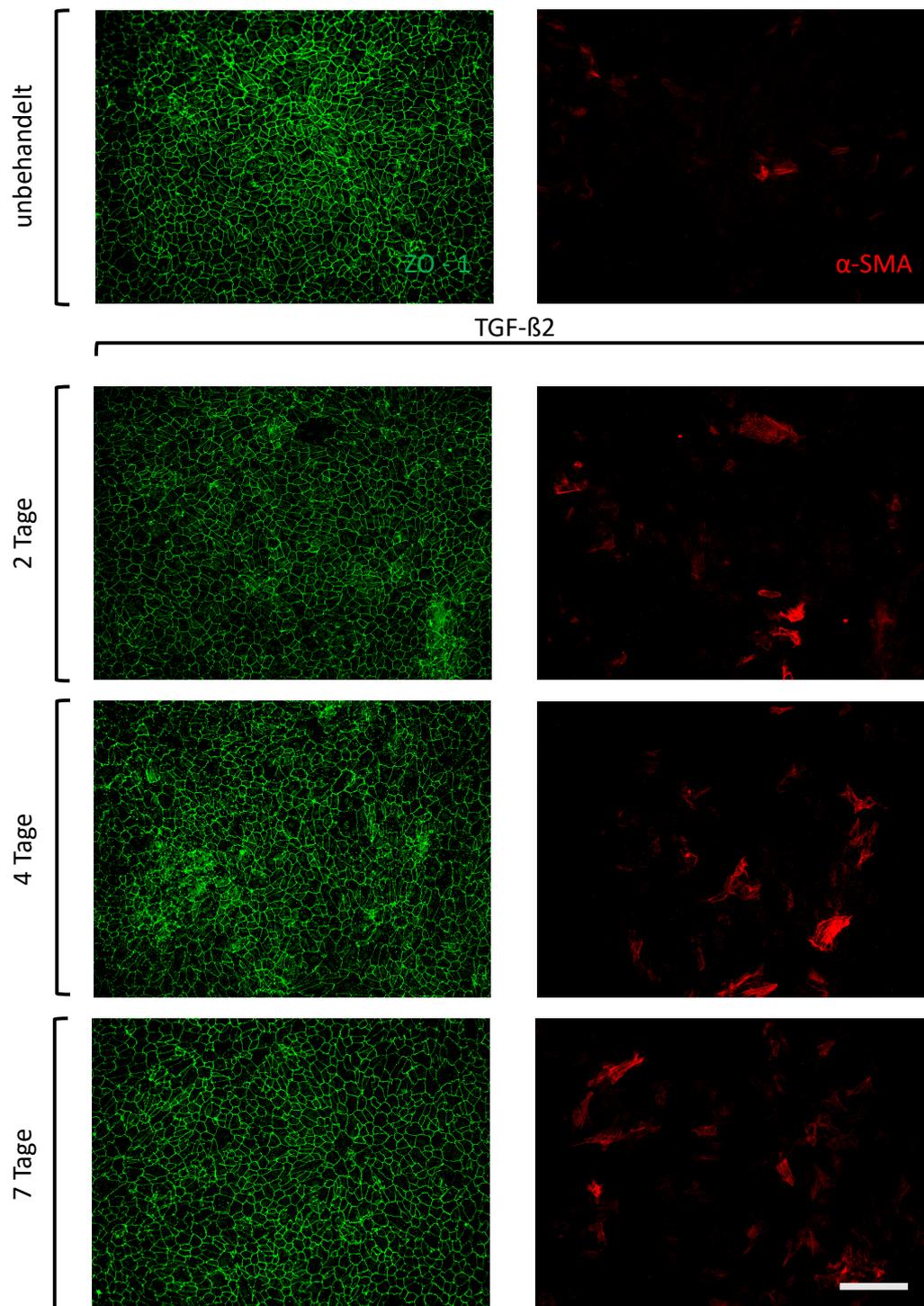


Abbildung 19: Zunahme der α -SMA Expression nach TGF- β 2 Behandlung des ARPE-19 Zellen, Immunhistochemie
 ARPE-19 Zellen wurden für 48h in DMEM 10% FCS und dann für 2 Wochen in DMEM 2% FCS kultiviert. Es erfolgte die einmalige Behandlung mit TGF- β 2 (2 ng/ml) zum Zeitpunkt 0. TGF- β 2 induzierte die Überexpression von α -SMA Expression (rot) mit Zunahme bis Tag 7 (ZO-1, grün).

3.6.3.2 TGF- β 2 induziert die Expression von Kollagen IV, Fibronectin und α -SMA (WB)

Zur weiteren Untersuchung der TGF- β 2 induzierten EMT auf ARPE-19 Zellen erfolgte die semiquantitative Auswertung mittels Western Blot. Nach Behandlung mit TGF- β 2 wurden die EMT-Marker Kollagen IV, Fibronectin und α -SMA untersucht. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet, als Kontrolle diente eine unbehandelte Gruppe ARPE-19 Zellen.

Kollagen IV zeigte passend zu den Untersuchungen der immunhistochemischen Anfärbung eine deutliche Zunahme am ersten Tag nach Behandlung mit TGF- β 2 und eine sukzessive Abnahme innerhalb einer Woche.

α -SMA zeigte eine weitgehend gleichbleibende Expression während des Untersuchungszeitraums von einer Woche mit geringen Schwankungen. Fibronectin wies im Verhältnis zur unbehandelten Kontrollgruppe eine signifikante Erhöhung der Expression mit Maximum am Tag drei und Abnahme bis zum 7. Tag auf.

In Zusammenschau lässt sich somit sagen, dass die Behandlung mit TGF- β 2 der ARPE-19 Zellen zur erhöhten Expression der EMT Marker Kollagen IV, α -SMA und Fibronectin führte und somit Anhalt für EMT gibt. Als EMT Positivkontrolle diente im Folgenden mit TGF- β 2 behandelte ARPE-19 Zellen.

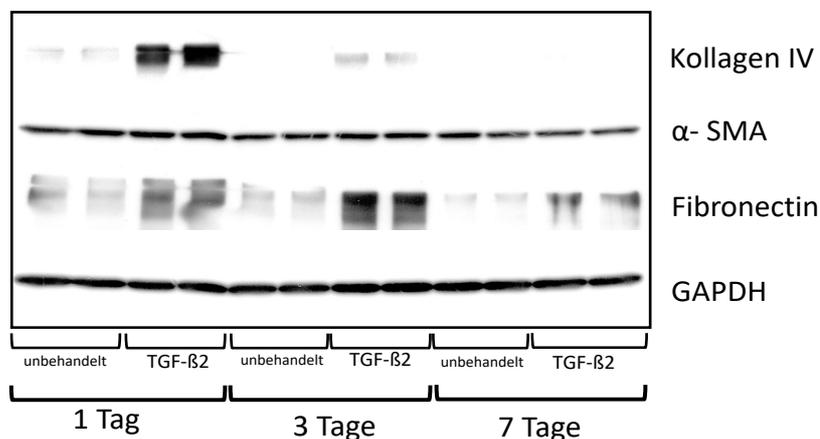


Abbildung 20: TGF- β 2 induziert die Überexpression von EMT-Markerproteinen, Western Blot

ARPE-19 Zellen wurden für 48h in DMEM 10% FCS und dann für 2 Wochen in DMEM 2% FCS kultiviert. Es erfolgte die einmalige Behandlung mit TGF- β 2 (2 ng/ml) zum Zeitpunkt 0.

TGF- β 2 induzierte eine Überexpression von Kollagen IV und α -SMA an Tag 1 mit sukzessiver Abnahme bis Tag 7, eine Überexpression von Fibronectin mit Maximum an Tag 3. Glycerinaldehyd 3-phosphate Dehydrogenase (GAPDH) diente als Ladungskontrolle.

3.6.3.3 E2F2 Transfektion führt nicht zur Zunahme EMT Marker Proteine

Zur Untersuchung des Einflusses der *E2F2* Transfektion auf die mögliche EMT der ARPE-19 Zellen erfolgte die Untersuchung der EMT-Marker im Western Blot. Dazu wurde drei Tage nach Transfektion eine Bestimmung der EMT Marker-Proteine α -SMA und N-Cadherin durchgeführt. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet. Folgende Gruppen wurden untersucht:

- (1) unbehandelte ARPE-19 Monolayer (Referenz: Proteinlevel 1, Negativkontrolle)
- (2) TGF- β 2 Behandlung vor 2 Tagen (Positivkontrolle),
- (3) Behandlung mit Transfektionsreagenz PEI
- (4) Transfektion mit *E2F2*-Plasmid.

Die Proteinlevel der unbehandelten ARPE-19 Monolayer dienten jeweils als Referenz. α -SMA zeigte in der Positivkontrolle mit TGF- β 2 einen relativen Anstieg des Proteinlevels um 43 ± 9 %. Die transfizierten ARPE-19 Monolayer zeigten nach Behandlung mit Transfektionsreagenz ein Absinken des Proteinlevels um 68 ± 13 % bzw. nach *E2F2* Transfektion eine Reduktion um 56 ± 8 %.

Eine Testung der Signifikanz war bei nur zwei Proben je Gruppe nicht möglich.

Für N-Cadherin zeigte sich ein ähnliches Ergebnis: Die Positivkontrolle zeigte einen relativen Anstieg um 37 ± 4 %. Die lediglich mit Transfektionsreagenz behandelte Gruppe zeigte eine Reduktion um 17 ± 23 %, die *E2F2* transfizierte Gruppe eine um 23 ± 16 %.

In Zusammenschau kam es somit drei Tage nach Transfektion nicht zur Überexpression der EMT Markerproteine α -SMA und N-Cadherin. Es konnte sogar eine Reduktion der Expression der beiden Marker nach Transfektion ausgemacht werden.

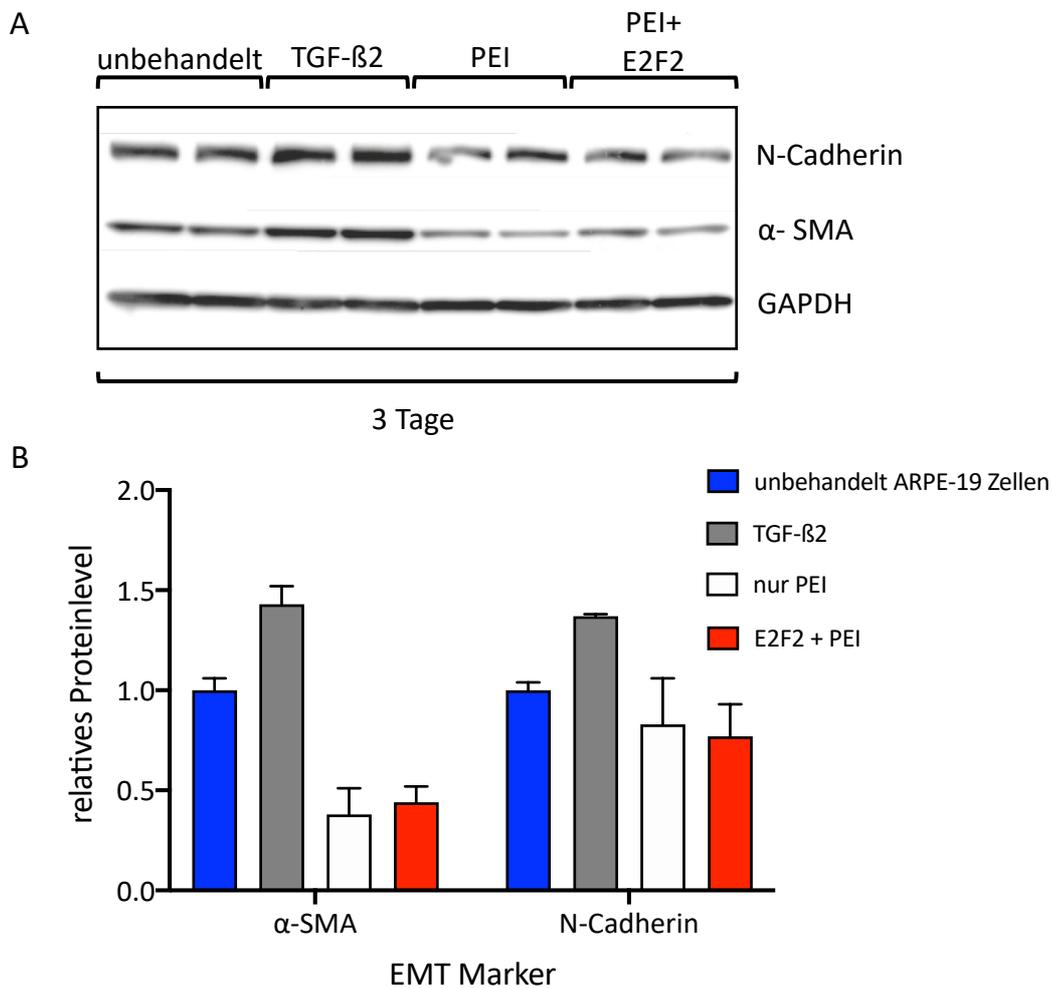


Abbildung 21: E2F2 Überexpression induziert keine Expression der EMT-Marker N-Cadherin und α -SMA nach 3 Tagen, Western Blot mit Quantifizierung

ARPE-19 Zellen wurden für 48h in DMEM 10% FCS und dann für 2 Wochen in DMEM 2% FCS kultiviert. Es erfolgte die E2F2-Transfektion mit PEI und als Kontrolle die Behandlung der ARPE-19 Zellen mit PEI ohne E2F2-Plasmid. Als Positivkontrolle erfolgte die einmalige Behandlung mit TGF- β 2 (2 ng/ml), als Negativkontrolle dienten unbehandelte ARPE-19 Zellen.

A: PEI Behandlung und E2F2 Transfektion induzierten eine verminderte α -SMA und N-Cadherin Expression 3 Tage nach Behandlung. TGF- β 2 führte zur Überexpression der EMT Marker.

B: TGF- β 2 induzierte eine Mehrexpression der EMT Marker im Vergleich zur unbehandelten Gruppe: α -SMA (43%) und N-Cadherin (37%). PEI Behandlung und E2F2 Transfektion führten zur Reduktion der Expression: α -SMA -PEI: 62%; PEI + E2F2 56%; N-Cadherin - PEI: 17%; PEI + E2F2: 23%. Mittelwert mit Standardabweichung, t-Test.

3.6.3.4 E2F2 Transfektion induziert keine EMT

Zur weiteren Untersuchung wurde der Westernblot als Methode der Wahl für zusätzliche EMT-Markerproteine hergenommen. Außerdem wählten wir eine längere

Untersuchungsdauer. des Einflusses der *E2F2* Transfektion auf die mögliche EMT erfolgte der Nachweis von EMT-Proteinen im ARPE-19 Zellmodell.

Es erfolgte der qualitative Nachweis der EMT Marker-Proteine Fibronectin, Kollagen IV, β -Caterin, N-Cadherin und α -SMA im Western Blot.

Folgende Gruppen wurden untersucht und verglichen:

- (1) unbehandelte ARPE-19 Monolayer (Negativkontrolle),
- (2) Behandlung mit Transfektionsreagenz,
- (3) Transfektion mit *E2F2* und
- (4) TGF- β 2 Behandlung der ARPE-19 Zellen zum Zeitpunkt der Transfektion (Positivkontrolle).

Eine Woche nach Transfektion ergab sich weder in der mit Transfektionsreagenz behandelten noch in der *E2F2* transfizierten Gruppe der Nachweis von Fibronectin oder Kollagen IV. N-Cadherin, α -SMA und β -Caterin konnten nachgewiesen werden, zeigte jedoch deutlich weniger Expression als Positiv- und Negativkontrolle.

Zwei Wochen nach Transfektion zeigten sich die Proteinexpression der EMT Markerproteine (Fibronectin, Kollagen IV, N-Cadherin, β -Caterin) im Gruppenvergleich kaum verschieden. Lediglich die α -SMA Expression schien nach Transfektion mit *E2F2* geringer.

Nach *E2F2* Transfektion konnte nach einer und zwei Wochen eine Überexpression von *E2F2* nachgewiesen werden. In der zweiten Woche (insgesamt fünfte Woche nach Aussaat) zeigten sich deutlich geringere Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen. Dies kann zum einen auf einen geringeren Effekt der *E2F2* Transfektion als auch TGF- β 2 Exposition im zeitlichen Verlauf zurückgeführt werden, zum anderen auf eine begrenzte Lebensdauer des Zellkulturmodells hinweisen.

In Zusammenschau lässt sich somit keine *E2F2* spezifische Erhöhung der Expression von EMT-Markerproteinen nach Transfektion mit *E2F2* feststellen.

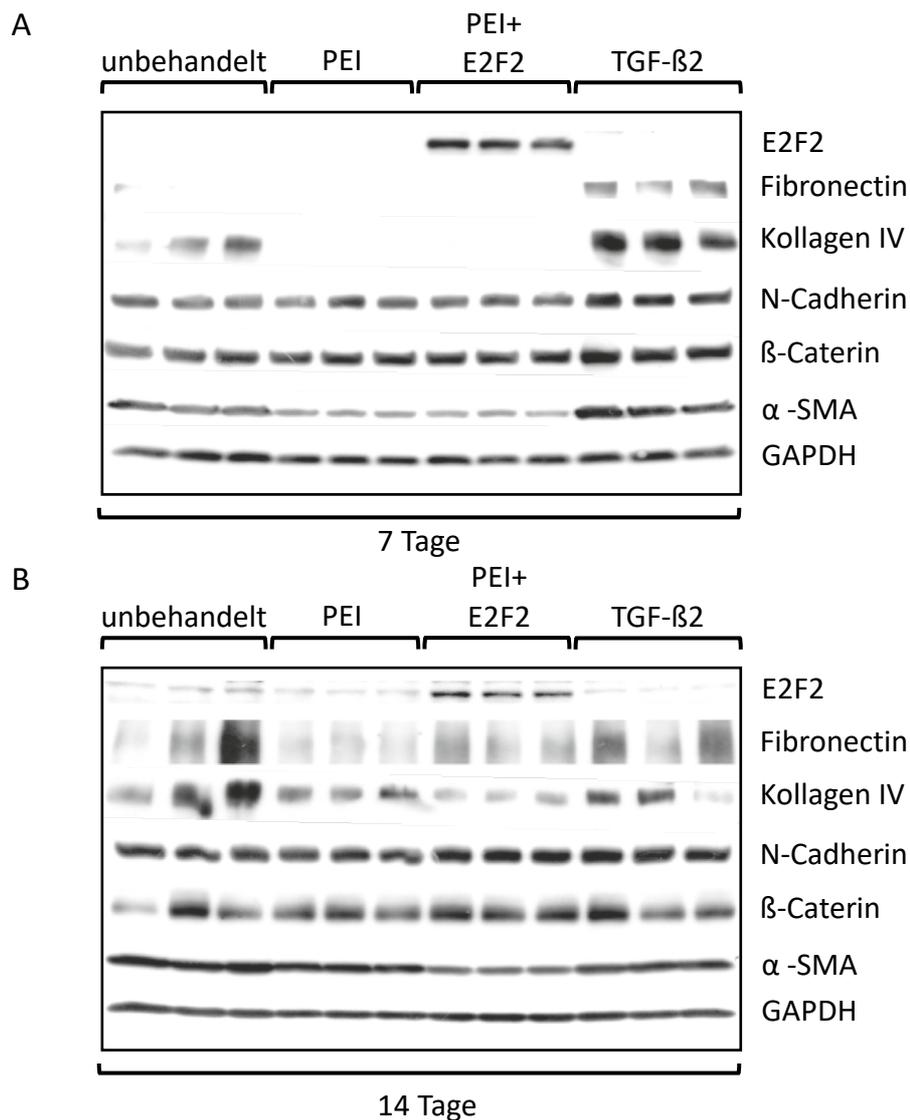


Abbildung 22: E2F2 Überexpression induziert keine Überexpression der MET Marker Fibronectin, Kollagen IV, N-Cadherin, β -Caterin und α -SMA nach 1 bzw. 2 Wochen, Western Blot

ARPE-19 Zellen wurden für 48h in DMEM 10% FCS und dann für 2 Wochen in DMEM 2% FCS kultiviert. Es erfolgte die E2F2-Transfektion mit PEI und als Kontrolle die Behandlung der ARPE-19 Zellen mit PEI ohne E2F2-Plasmid. Als Positivkontrolle erfolgte die einmalige Behandlung mit TGF- β 2 (2 ng/ml), als Negativkontrolle dienten unbehandelte ARPE-19 Zellen.

A: 1 Woche nach Behandlung: TGF- β 2 induzierte die Expression der EMT Marker. PEI behandelte und E2F2 transfizierte Zellen zeigten bzgl. N-Cadherin und β -Caterin ein ähnliches Expressionslevel wie die unbehandelte Kontrolle, Kollagen IV, α -SMA und Fibronectin zeigten eine verminderte Expression.

B: 2 Wochen nach Behandlung: bzgl. Fibronectin, N-Cadherin und β -Caterin zeigten sich ähnliche Expressionslevel in allen Gruppen. E2F2 transfizierte Zellen zeigten eine dezente Reduktion der Kollagen IV und α -SMA Expression.

4 Diskussion

Eine gemeinsame zentrale Pathologie der altersbedingten Makuladegeneration ist der progrediente RPE-Zell-Verlust im Bereich der makulären Netzhaut. Zwei grundlegende Therapiekonzepte zur RPE-Regeneration werden aktuell untersucht: a) die chirurgische Translokation von gesundem RPE aus der Peripherie unter die zentrale Netzhaut, und b) die zelluläre RPE-Regeneration durch Transplantation allogener und autologer Stammzellen.

Neu ist das Konzept dieser Arbeit: Der minimalinvasive Therapieansatz sieht vor, die RPE-Regeneration durch Gentransfer des Transkriptionsfaktors *E2F2* in situ zu induzieren. Diese *in vitro*-Versuche untersuchen die Proliferationsfähigkeit der RPE-Zellen nach *E2F2*-Überexpression sowie mögliche Nebenwirkungen durch Überschreitung des G1/S-Kontrollpunktes des Zellzyklus durch temporäre *E2F2*-Überexpression. Hierzu diente das ARPE-19 Zellmodell.

4.1 Effekte der *E2F2* Transfektion auf ARPE-19 Zellen

4.1.1 Proliferation: Steigerung durch *E2F2* Überexpression

Im ARPE-19 Zellmodell ergab sich bei der Transfektion von *E2F2* mittels PEI eine Effizienz von 16,7%. In den Untersuchungen der Proliferation mit den Markern Ki67 und BrdU zeigte sich zwei Tage nach Transfektion sowohl in der *E2F2* transfizierten als auch in der nur mit PEI behandelten Kontrollgruppe gleichermaßen ein Anstieg der Fraktion proliferierender Zellen ohne signifikanten Unterschied.

Bei bekannter zytotoxischer Wirkung auf Zellen bei Behandlung mit PEI stellte die Transfektion zunächst eine Schädigung für die sich im Wachstumsarrest befindenden ARPE-19 Zellen dar [80]. Die Untersuchungen bezüglich der Apoptose der ARPE-19 Zellen nach Transfektion zeigten einen signifikanten Anstieg apoptotischer Zellen nach Behandlung mit PEI in den ersten Tagen nach Behandlung. Durch die Toxizität des PEI kam es zunächst unabhängig von dem Transkriptionsfaktor *E2F2* in beiden Gruppen zum Anstieg der Apoptoserate.

Reaktiv auf diesen Zelluntergang, die Abnahme der Zelldichte und die konsekutive Verringerung der Kontaktinhibition kam es dann zum Anstieg der Proliferationsrate in beiden Gruppen. Sowohl nach einer als auch nach drei Wochen zeigte sich jedoch eine

signifikant höhere Proliferationsrate der *E2F2* transfizierten Zellen im Vergleich zu den nur mit Transfektionsreagenz behandelten ARPE-19 Zellen. Bei ansonsten gleichen Bedingungen ist dieser Effekt auf die Überexpression des Transkriptionsfaktors E2F2 zurückzuführen. Diese Ergebnisse deckten sich mit Versuchen von Joyce et al. In diesen konnte eine anhaltende Proliferationssteigerung von Hornhautendothelzellen im Hasenmodell nach Transfektion mit E2F2 nachgewiesen werden [81].

In Zusammenschau zeigen diese Untersuchungen, dass eine E2F2-abhängige und eine PEI-unabhängige Proliferationssteigerung im ARPE-19 Zellmodell eintritt.

Die Untersuchungen konnten jedoch nicht nachweisen, dass es zu einer absoluten Zunahme der Gesamtzellzahl nach Transfektion kommt. Eine Erklärung hierfür ist, dass die Kontaktinhibition der differenzierten ARPE-19 Epithelzellen eine stärkere Inhibition der Proliferation darstellt als E2F2 proliferationsfördernd wirkt. Wie anfangs gezeigt, führte die Kontaktinhibition der ARPE-19 Zellen nach Aussaat spontan zu einer asymptotischen Zunahme gegen eine maximale Zellzahl und zu einem Wachstumsarrest. Trotz *E2F2* Transfektion ist eine weitere Proliferation der ARPE-19 Zellen über eine Maximalzellzahl und bei Erreichen einer maximalen Zelldichte nicht mehr möglich. Passend zeigten Puliafito et al. 2012 im *in vitro* Modell mit Epithelzellen (Madin Darby canine kidney Zellen), dass nach Aussaat und initialer Proliferation ein vollständiger Wachstumsarrest eintrat, wenn die Zellgröße einen kritischen Wert unterschreitet, also eine maximale Zelldichte erreicht war [82]. Es lässt sich folgern, dass die homogen ausgesäten ARPE-19 Zellen solange proliferieren, bis die endliche Well-Fläche vollständig bewachsen und eine Verkleinerung der Epithelzellvolumina als Zeichen der Differenzierung stattfindet, sich konsekutiv die Epithelzelldichte bis zu einem Maximum erhöht und so ein Wachstumsarrest eintritt.

Mitbedingende Ursache der Proliferationssteigerung durch E2F2 kann somit auch die im vornherein durch PEI induzierte Apoptose mit Zellverlust und reduzierter ARPE-19 Zelldichte sein [80]. Andererseits ist die Beibehaltung dieser Kontaktinhibition trotz Stimulation zur Proliferation mit Ausbildung einer Maximalzelldichte als Zeichen der Ausdifferenzierung epithelialer Zellen essentiell, vor allem zur Abwehr von ungehemmter Proliferation nach E2F2 Transfektion und Bildung von Neoplasien [83].

Wie anfangs erläutert, zeigt sich im Rahmen der AMD ebenfalls eine reduzierte RPE-Zellzahl und -dichte mit Hyperplasie der einzelnen RPE Zellen [20, 21]. Die Ausgangsbedingungen für die E2F2 induzierte Proliferationssteigerung des RPEs bei AMD wären somit ähnlich wie im ARPE-19 Zellmodell nach PEI Behandlung mit ähnlichen Chancen zur Proliferationssteigerung. Vergleichbares zeigten die Arbeiten von Kampik et al. (2017, 2019) an einem ex-vivo-Modell der humanen Hornhaut: Nach Induktion zur Proliferation des ebenfalls kontaktinhibierten Korneaendothels bedingte eine im Verhältnis reduziertere Zelldichte eine höhere Proliferationsrate und umgekehrt eine hohe Zelldichte eine geringe Proliferationsrate. Es kam also zu einer erhöhten Proliferationssteigerung, falls genug Platz zur Zellteilung bestand [84, 85].

Eine weitere Erklärung für den ausbleibenden Anstieg der absoluten Gesamtzellzahl nach Transfektion stellt der „Zelluntergang durch die mitotische Katastrophe“ dar. Castedo et al. postulierten 2004, dass die mitotische Katastrophe aus fehlerhaften Zellzykluskontrollpunkten (check points) und Zellschäden resultiert [86]. E2F2 induziert das Voranschreiten des Zellzyklus über den G1/S-Kontrollpunkt und könnte so trotz korrupter DNA ein Voranschreiten des Zellzyklus und die Aufnahme des BrdU zur DNA-Synthese induzieren [50]. Nach zum Teil abgeschlossener DNA Synthese mit BrdU-Markierung, aber ohne Zellteilung kommt es nun zur mitotischen Katastrophe und zum Zelluntergang. Daher kommt es trotz BrdU-Markierung als proliferierende Zelle zum Zelluntergang und folglich zur Verminderung der Gesamtzellzahl.

4.1.2 Apoptose: kein langfristiger Einfluss durch E2F2 Überexpression

Kurz nach Behandlung mit Transfektionsreagenz zeigte sich in beiden Gruppen eine signifikante Zunahme der Apoptose, jedoch zu jedem Zeitpunkt ohne signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen mit und ohne *E2F2*-Plasmid. Es kann gefolgert werden, dass die gesteigerte Apoptoserate kurz nach Transfektion Folge der Behandlung mit den Transfektionsreagenzien und deren Toxizität und nicht die des Transkriptionsfaktors E2F2 ist [80]. Es kam nach Abklingen der PEI bedingten Apoptose im weiteren Verlauf zu keiner erhöhten Apoptoserate in der *E2F2* transfizierten Gruppe trotz E2F2 Überexpression über mehr als 2 Wochen. Dies deutet darauf hin, dass die isolierte E2F2 Überexpression akut und im Verlauf keine signifikante Apoptose induziert.

Joyce et al. zeigten 2004 für transfizierte Korneaendothelzellen entsprechende Ergebnisse ohne Anstieg der Apoptose durch Überexpression von E2F2 im *in vivo* Kaninchenzellmodell [81].

Es sollte jedoch beachtet werden, dass - falls der Effekt durch Überexpression von E2F2 auf die Apoptose sehr gering ausfällt - dieser aufgrund PEI induzierten Apoptose gegebenenfalls gerade kurz nach Behandlung schlecht zu detektieren und folglich nicht sicher zu beurteilen ist.

In jedem Falle ist für die *in situ* Anwendung ein schonenderes Transfektionsverfahren wie zum Beispiel durch die Verwendung viraler Vektoren zu wählen.

4.1.3 Zell-Viabilität: Erhalt der Viabilität unter E2F2 Überexpression

Kurz nach Transfektion mit PEI und *E2F2* zeigte sich eine Reduktion der Viabilität der ARPE-19-Zellen. Die Viabilität der *E2F2* transfizierten Zellen war zu keinem Zeitpunkt niedriger als die der nur mit Transfektionsreagenz behandelten Kontrollgruppe. Die Viabilitätsreduktion beider behandelten Gruppen war (außer an Tag eins) nicht signifikant verschieden und zeigte im Verlauf dieselbe Dynamik. Es kann davon ausgegangen werden, dass - wie bereits beschrieben - die anfängliche Viabilitätsreduktion auf der Zell-Toxizität der Transfektion mittels PEI beruht. Die über zwei Wochen anhaltende Überexpression von E2F2 führte nicht zur einer Minderung der Viabilität.

4.1.4 Parazelluläre Permeabilität: Erhalt der Permeabilität unter E2F2 Überexpression

Das RPE bildet mit seinen tight junctions einerseits eine Barriere zwischen Aderhaut und Photorezeptoren der Netzhaut, andererseits auch die äußere Blut-Retina-Schranke. Die Barrierefunktion ist somit wichtiges Kriterium für ein funktionierendes RPE. Auch im ARPE-19-Zellkulturmodell ist diese Permeabilitätsbarriere nachgebildet. Nach Transfektion mit PEI und *E2F2* zeigten beide Gruppen einen Anstieg der Permeabilität des Monolayers im Rahmen der ersten drei Tage, danach normalisierte sich die Permeabilität beider Gruppen mit gleicher Dynamik.

Es ist davon auszugehen, dass die initiale reversible Permeabilitätssteigerung auf der gewählten Transfektionsmethode mittels PEI beruht. Einen signifikanten Anstieg der Permeabilität aufgrund der E2F2 Überexpression zeigte sich zu keinem Zeitpunkt im untersuchten Zeitintervall. Ab dem siebten Tag wiesen die transfizierten ARPE-19

Monolayer erneut dieselbe Permeabilität wie die unbehandelten Negativ- und mit EDTA behandelten Positivkontrollen auf.

Zu Beginn des untersuchten Zeitraumes (Tag 1-3) zeigte sich eine nicht signifikant höhere Permeabilitätszunahme (nur PEI 11,5% vs E2F2 Transfektion 7,3%) für die nur mit dem Transfektionsreagenz behandelten im Vergleich zu den E2F2 transfizierten ARPE-19 Zellen (Tag 1-3). Durch PEI kommt es zur Apoptose, somit zu Zellenlücken im ARPE-19 Monolayer und konsekutiv zur Abnahme der Barrierefunktion und Zunahme der transepithelialen Permeabilität. Durch Überexpression von E2F2 können die transfizierten ARPE-19 Zellen diese entstandenen Lücken eventuell rascher durch Proliferation schließen als nicht transfizierte Zellen. Somit käme es durch E2F2 Überexpression schneller zur Regeneration des Zellverbundes und zur Regeneration der Permeabilität.

4.1.5 Epithelial-mesenchymale Transition (EMT): E2F2 Transfektion führt nicht zur Zelldedifferenzierung durch EMT

Untersuchungen bezüglich Epithelzellen des Lungenkarzinoms von Feliciano et al. aus dem Jahr 2017 ergaben den Hinweis, dass E2F2 neben dem Tumorwachstum auch die EMT induzieren kann [87]. Bezüglich RPE Zellen zeigten Untersuchungen, dass diese bei Ablatio retinae durch das Herauslösen aus dem geordneten subretinalen Raum proliferieren [88]. Kampik et al. konnten zeigen, dass diese herausgelösten RPE-Zellen in situ zu Fibroblasten-ähnlichen Zellen transdifferenzieren [89]. Zellmorphologisch konnte Kirchhof *in vitro* die Transdifferenzierung der RPE Zellen darstellen [90]. Daher stellte sich für unsere Untersuchungen die Frage, ob die E2F2 induzierte Proliferationssteigerung der ARPE-19 Zellen eine Transdifferenzierung im Rahmen der EMT bedingt.

Wie auch Sugioka et al. zeigten, führt die Stimulation der ARPE-19 Zellen mit TGF- β 2 erwartungsgemäß zum Anstieg der EMT Marker N-Cadherin, α -SMA, Fibronectin, Kollagen IV und so zur EMT [79]. Nach Behandlung mit PEI und Transfektion mit E2F2 zeigten sich in beiden Gruppen keine Hinweise auf eine Überexpression dieser EMT-Marker, die beiden Gruppen zeigten untereinander keine signifikant verschiedenen Expressionsmengen/-muster der Markerproteine.

Die E2F2 Überexpression führte somit nicht zur EMT. Diese Ergebnisse beziehen sich jedoch nur auf eine einmalige und selbstlimitierte E2F2 Überexpression. Bei langfristiger Überexpression ist gemäß den Untersuchungen von Feliciano et al. mit einer Entdifferenzierung und gegebenenfalls malignen Entartung zu rechnen [87]. Für eine Therapiestrategie mittels RPE-Proliferation ist wahrscheinlich ein streng zeitlich limitierter Proliferationsreiz wichtig.

4.2 ARPE-19 Zellen als Modell für adulte RPE Zellen

Zur Untersuchung der Fragestellungen bezüglich des humanen adulten RPE erwiesen sich ARPE-19 Zellen als gut geeignet. Diese sind spontan immortalisiert, differenziert und bilden adhärente Epithelzellen und einen Monolayer aus. Aufgrund des humanen Ursprungs zeigen sie funktionell und morphologisch viele spezifische Eigenschaften des RPEs auf und sind einfach in der Handhabung.

Ablonczy et al. verglichen zwei etablierte *in vitro* RPE-Zellmodelle: fetales humanes RPE (fhRPE) und ARPE-19 Zellen. Das fhRPE zeigte anders als ARPE-19 Zellen deutliche Pigmentierung, einheitliche Größe und Form, hohe Expression von RPE-Markerproteinen, metabolische Aktivität im Rahmen der Fototransduktion und eine ausgeprägte Barrierefunktion [91]. Daher postulierten Ablonczy et al., dass fhRPE im Vergleich zu ARPE-19 das bessere *in vitro* Modell zu Untersuchungen der physiologischen Retina darstellt [91]. Im Mittelpunkt der RPE-Regeneration durch Proliferation zur Therapie der AMD *in situ* stehen jedoch nicht physiologische und gesunde RPE Zellen, sondern das pathologische und altersbedingt veränderte RPE der erkrankten Netzhaut. Wie bereits beschrieben, zeigt das humane RPE im Rahmen der AMD eine Rarifizierung der Zelldichte mit konsekutiver Hyperplasie und unregelmäßiger Form auf. ARPE-19 Zellen stellen somit bei deutlich besserer Verfügbarkeit und einfacherer Handhabung das hier passendere *in vitro* Modell für RPE Zellen des alternden/ erkrankten humanen Auges dar.

Im adulten Individuum zeigt sich als pathologisches Korrelat der AMD neben Bildung von Drusen vor allem eine makuläre Rarifizierung der RPE Zellen.

Aufgrund der hohen Komplexität der funktionellen Einheit aus RPE, Bruch'scher Membran und Photorezeptoren erfolgte in dieser Arbeit die singuläre und somit simplifizierte Betrachtung der RPE-Zellen. Wie eingangs erwähnt, ergibt sich die Vielzahl der funktionellen Eigenschaften des RPEs durch Interaktion mit den umgebenden Zellschichten. Dieses kann und möchte diese Arbeit jedoch nicht leisten. Sie untersucht lediglich die essentiellen Funktionen des ARPE-19 Monolayer wie die Permeabilität und die Monolayerintegrität. Weitere relevante funktionelle und immunologische Aspekte bezüglich der Interaktion der Bruch'schen Membran und Photorezeptoren wie die Phagozytose und Zytokinproduktion konnten in diesem ARPE-19 Zellmodell nicht untersucht werden. Frühere Arbeiten von Gehrs et al. zeigten beispielsweise, dass interzelluläre immunologische Prozesse im hohen Maße an der Pathogenese der AMD beteiligt sind [1].

Diese Arbeit postuliert zwar Ergebnisse bezüglich Funktion und Morphologie des ARPE-Monolayers, gibt jedoch keine Hinweise auf die Auswirkung der Proliferation auf die Interaktion mit den Nachbarstrukturen wie Photorezeptoren und Bruch'scher Membran *in situ* an.

Sinnvoll wäre in diesem Zusammenhang zunächst die Gewinnung von humanen Netzhäuten aus Kadaveraugen und die Untersuchung und Testung dieses Modells an postmortalen primären humanen RPE-Zellen. Die Schwierigkeit liegt hier darin, dass innerhalb von Minuten bis Stunden post mortem sich die RPE-Zellschicht zersetzt und für weitere Kultivierung unbrauchbar wird.

Ein Zwischenschritt bis zur Anwendung an humanem vitalen Gewebe stellen weitere Untersuchungen in Tiermodellen dar. Dies wurde mittlerweile in einem ersten Tierversuch realisiert. Kampik et al. konnten im Mausmodell zeigen, dass es nach subretinaler Eingabe von *E2F2* transduzierenden nicht integrierenden lentiviralen Vektoren zu einer Proliferationssteigerung der RPE Zellen und zum Anstieg der RPE-Zelldichte kommt [84, 92].

Dunn et al. und Samuel et al. zeigten, dass eine deutliche Pigmentierung als Zeichen der höhergradigen Differenzierung der ARPE-19 Zellen erst 3-4 Wochen nach Bildung eines konfluenten Monolayers erfolgte [53, 55]. In dem in dieser Arbeit gewählten Inkubationszeitraum war für Testungen der verschiedenen RPE-Funktionen eine

ausreichende Differenzierung bereits zwei Wochen nach Aussaat erkennbar. Es zeigte sich beispielsweise im Permeabilitätstest eine gleichbleibende Dextran-Diffusion innerhalb von weiteren zwei Wochen der Differenzierung nach Testbeginn. Somit ist für die hier untersuchten Funktionen von einer ausreichenden Differenzierung der ARPE-19 Zellen schon zwei Wochen nach Aussaat auszugehen.

4.3 Chancen und Risiken der autologen RPE-Regeneration mittels E2F2

4.3.1 Chirurgische Translokation vs in situ-RPE-Regeneration durch Vektor-E2F2

Verschiedene Studien zeigten die prinzipielle Möglichkeit der Therapie der fortgeschrittenen AMD durch chirurgische Translokation eines RPE-Grafts aus der Peripherie [26, 93]. Dieser therapeutische Ansatz hat sich jedoch aufgrund des chirurgischen Umfangs mit hohem Risikoprofil und Aufwand nicht als Standardtherapie etabliert. Die in situ Regeneration bietet den Vorteil, dass durch (minimal-) invasive Applikation des E2F2 Vektors (je nach Vektor subretinal/ intravitreal) es bei deutlich reduziertem perioperativem Risiko zur Proliferation der RPE-Zellen kommen und sich das Sehen so potentiell verbessern bzw. stabilisieren kann.

4.3.2 Autologe RPE-Regeneration vs allogene Transplantation

Ausgangspunkt und Therapieziel des E2F2 Gentransfers sind RPE-Zellen des erkrankten Auges von AMD Patienten. Wie bei Behandlungen mit autologen Stammzellen (iPSC) weisen auch hier die RPE-Ausgangszellen die gleiche DNA des gealterten und erkrankten AMD Patienten auf [28]. Diese DNA weist genetische Anomalien und Veränderungen auf, die für altersbedingte Erkrankungen – beispielsweise der AMD – prädisponieren. Eine autologes Therapieverfahren ist für die therapeutische Anwendung daher kritisch zu sehen und hat somit natürliche Limitationen. Dagegenhalten sollte man dennoch, dass es sich bei der AMD nicht um eine monogenetische Erkrankung handelt, sondern dass auch von der genetischen Prädisposition unabhängige Faktoren wie der Nikotinabusus oder UV-Exposition Einfluss auf die Entstehung der Erkrankung hat [94]. Ein weiterer Vorteil der in dieser Arbeit untersuchten autologen RPE-Regeneration stellt die Tatsache dar, dass anders als bei allogener Quelle des RPE-Ersatzes keine Immunsuppression notwendig ist [37]. Gerade bei hohem Patientenalter stellt dies im Verhältnis zur allogenen RPE Regeneration einen immanenten Vorteil dar.

4.3.3 Therapieausblick des E2F2 Gentransfers in situ: Risiken, Gentransfektion, Regulation und Therapiezeitpunkt

4.3.3.1 Der Weg in die Zelle – virale Gentransfektion

Russell et al. zeigten im Jahr 2005 die Möglichkeit des Gentransfers mit nicht humanpathogenem rekombinanten adeno-assoziierten Virus (AAV) als Vektoren [95]. Hierbei zeichneten sich diese durch eine hohe Stabilität, geringe Immunogenität und effiziente homologe Genom-Integration aus [96]. Es zeigte sich, dass der Serotyp 2 (AAV2) aufgrund des Serotyp-abhängigen Tropismus besonders für Gentransfer in RPE Zellen geeignet ist [97]. 2018 wurde die Gentherapie des RPEs mit *voretigene neparvovec-rzyl* (Luxturna™, Novartis) bei Netzhautdystrophie bei biallelischen Mutationen des RPE65 Gens zugelassen [98]. Hier wird der AAV-Vektor im Rahmen einer Operation (Vitrektomie) subretinal injiziert. Genauso könnte das Einbringen des E2F2 Gens und seiner regulierenden Sequenzen mittels rekombinanten viralen Vektoren erfolgen. Hierzu müsste analog zur Behandlung mit Luxturna™ eine Standardvitrektomie mit subretinaler Injektion des Vektors mittels 41 Gauge Kanüle an den Zielort erfolgen [99]. Nach Genom-Integration verbleibt das Gen dauerhaft in der DNA der RPE Zellen.

Im Gegensatz zu dieser etablierten und im Rahmen der Luxturna™-Therapie angewandten und zugelassenen Operation stellt die chirurgische autologe RPE-Transplantation/ -Translokation eine traumatischere Methode dar. Diese beinhaltet zusätzlich zur Vitrektomie eine chirurgisch induzierte Netzhautablösung, gegebenenfalls eine Retinektomie mit nachfolgender Silikonölotamponade und ein erhöhtes perioperatives Risiko für Makulaforamina, Netzhautablösungen oder intraokulären Blutungen [24]. Auch Therapieansätze mit der subretinalen Eingabe von RPE-Zellen im Gebiet der Makula führen aufgrund des Umfangs der Zellsuspension zu einer erheblichen Störung der Gewebsintegrität [100]. Im Gegensatz hierzu wäre eine subretinale Eingabe von Vektoren eine im Verhältnis atraumatischere Methode.

4.3.3.2 Therapiezeitpunkt

RPE, Bruch'sche Membran und die Photorezeptoren bilden eine funktionelle Einheit, die sich in ihrer Viabilität gegenseitig bedingen. Bei späten Formen der AMD kommt es zur Atrophie des RPEs und irreversibler sekundären Photorezeptoratrophy. Dies bedeutet für die Behandlung der AMD durch RPE-Regeneration, dass diese nur Erfolgsaussichten hat,

wenn ausreichend regenerationsfähiges RPE und vitale Photorezeptoren mit nachgeschalteten Nervenzellen vorliegen – im atrophen Spätstadium ist die Visusprognose sehr reduziert. Ähnliche Probleme zeigten Untersuchungen von Caramoy et al. im Rahmen der makulären RPE-Translokation: Diese wurde lediglich bei Patienten mit atrophen Endstadien der AMD angewandt, die Visusprognose war trotz postoperativ vitalem RPE bei atrophen Photorezeptoren entsprechend reduziert [26]. Andererseits konnten Caramoy et al. zeigen, dass durch die Translokation des RPE-Grafts aus der Peripherie unter die zentrale Netzhaut eine Stabilisierung sowie der Erhalt der Viabilität der makulären Photorezeptoren erreicht werden kann [26].

Um vor schweren Sehstörungen oder Erblindung zu schützen ist somit der Behandlungszeitpunkt entscheidend. Dieser muss vor Eintritt in den Circulus vitiosus des RPE-Zellverlusts liegen, somit am ehesten im Stadium der frühen bis intermediären AMD. Gleichzeitig hat dieses Patientenkollektiv bei noch relativ gutem Rest-Visus oft einen geringen Leidensdruck. Daher wäre die Indikationsstellung zur chirurgischen Therapie und die Bereitschaft der Patienten zur invasiven Gentherapie bei unklarem Krankheitsverlauf sehr schwierig zu stellen.

4.3.3.3 Risiken der E2F2 Überexpression

Der Transfektionsfaktor E2F2 besitzt eine Schlüsselfunktion in der Regulation des Zellzyklus [50]. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Überexpression dieses Transkriptionsfaktors zu einer Proliferationssteigerung im ARPE-19 Zellmodell führt. Verschiedene Arbeiten im Fachgebiet der Onkologie beschrieben jedoch den Einfluss der Dysregulation der E2F2 Transkription auf die Entstehung und Unterhaltung von verschiedenen Karzinomen: Prostatakarzinom [101], Hepatozelluläres Karzinom [102] und Gliom [103]. Daher stellt der Eingriff in die Balance von *E2F2* potentiell ein Risiko für die Entstehung von malignen Neoplasien dar.

In diesem Zellkultur-Modell mit einmaliger Transfektion kommt es lediglich zum einmaligen Anstieg und kontinuierlicher Abnahme des E2F2 Proteins intrazellulär. Eine dauerhafte Überexpression des E2F2 Transkriptionsfaktors im Rahmen einer viralen Gentransfektion würde höchstwahrscheinlich zu einer malignen Entartung der RPE Zellen führen.

Bei Therapieansätzen mit Eingriff in die Regulation des Zellzyklus muss die Expression des Transkriptionsfaktors möglichst exakt kontrolliert werden. Zur RPE-Regeneration durch E2F2 Überexpression nach Gentransfektion sollte keine spontane Aktivität der Expression von E2F2 vorliegen. Bei makulär geringer RPE-Zelldichte im Rahmen der AMD sollte es nach Genom-Integration mittels subretinaler Eingabe nur bei externem Stimulus passager zur Überexpression von E2F2 kommen und so die Proliferation induziert werden.

Sanftner et al. etablierten einen Regulationsmechanismus zur Steuerung der Expression von per rekombinanten AAV in die Retina eingebrachter Gene an Ratten [104]. Hierbei erfolgte die Doxycyclin-abhängige Genexpression nach oraler Doxycyclin-Einnahme. Stieger et al. konnten die Doxycyclin-abhängig Transgen-Expression in Primaten über einen Zeitraum von über zwei Jahren nachweisen [105]. Hierbei zeigte sich eine Expression des transgen kodierten Proteins 48 Stunden nach Ingestion und eine Normalisierung zehn Tage nach Absetzen der Medikation. Somit wäre eine temporäre Proliferationssteigerung der rarifizierten RPE-Zellen möglich. Sollte es im Verlauf zur erneuten kritischen Abnahme der RPE-Zelldichte kommen, könnte durch einen erneuten Doxycyclin-Zyklus die RPE-Proliferation kurzzeitig angeregt werden.

Ein alternativer Sicherheitsmechanismus wäre die virale Gentransfektion mittels nicht-integrierender Vektoren. Der Vorteil dieser Vektoren besteht darin, dass das transfizierte genetische Material nicht in das Zielzell-Genom integriert wird. Nach einmaliger Transduktion der E2F2-RNA käme es zeitlich begrenzt zur Expression des Transgens [106]. Yáñez-Muñoz et al. konnten im Mausmodell mittels Gentransfektion von nicht-integrierender lentiviraler Vektoren eine effiziente Transgenexpression von RPE65 in RPE-Zellen erreichen, ohne dass eine Vektorintegration mit entsprechenden Risiken erforderlich war [107].

Eine weitere neuartige Möglichkeit mit einem noch höheren Sicherheitsstandard wäre der virale Transport des gesamten funktionstüchtigen E2F2 Proteins direkt ins Zytoplasma. Hierbei würde nicht die E2F2-DNA transfiziert, sondern analog der viruseigenen Proteine (bspw. Integrasen oder Transkriptasen) das gesamte E2F2 Protein mittels Lentiviren in die RPE Zelle abgegeben werden. Eine ungehemmte Expression des E2F2 ist prinzipiell so nicht möglich. Eine einmalige Stimulation zur Proliferation der RPE-Zellen wäre durch eine E2F2-Protein-Fähre mit hohem Sicherheitsstandard möglich.

4.4 Ausblick

Die hier untersuchte Methode der in situ-Regeneration des retinalen Pigmentepithels bei altersbedingter Makuladegeneration ist ein neues Konzept, das von anderen Gruppen bisher nicht untersucht wurde. Verglichen mit den bisherigen Therapien verspricht dieses Konzept verschiedene Vorteile:

- Therapie der trockenen AMD möglich
- geringerer Aufwand und im Idealfall nur eine einmalige Therapie im Gegensatz zur monatlichen intravitrealen Medikamenteneingaben bei der bisherigen Standardtherapie der feuchten AMD mit anti-VEGF
- Nachhaltigere Behandlung, da direkt die RPE-Zellrarifizierung behandelt und so der circulus vitiosus durchbrochen wird
- Vermeidung von flächiger RPE-Atrophie, sekundärer Photorezeptoratrophy und Gesichtsfeld- /Visusverlust als Folgeerscheinung
- Gentransfer in das RPE über virale Vektoren ist eine bereits zugelassene Therapie

Die hier durchgeführten Untersuchungen geben Hinweise darauf, dass E2F2 ein geeigneter Zellzyklus-Regulator für dieses Therapiekonzept ist. Es induziert eine Proliferation der RPE-Zellen, aber keine Apoptose, keine EMT, keine Permeabilitätsstörung oder Viabilitätsreduktion.

Der wichtigste Hinderungsgrund für eine klinische Anwendung stellt die Sicherheit dar. Erst wenn das Risiko einer malignen Entartung der Zielzellen überwunden ist, wird eine klinische Anwendung greifbar. *E2F2* als Zellzyklus-regulierendes Transgen erfordert eine extrem kontrollierte Limitierung der Expression, die durch regulierbare Promotoren nur eingeschränkt gewährleistet werden kann und ein umschriebenes Restrisiko verbleibt. Ein direktes Einschleusen des E2F2-Proteins in die RPE-Zellen könnte eine ausreichende Sicherheit für eine klinische Anwendung bieten. Entsprechende aus Viren entwickelte Vektoren, die nicht als Gen-Fähren sondern als Protein-Fähren konzipiert sind, existieren bereits [108].

5 Zusammenfassung

Altersbedingte Makuladegeneration (AMD) ist weltweit die häufigste Ursache von irreversibler Erblindung des alternden Menschen. Mit der anti-VEGF-Behandlung steht für die deutlich seltenere feuchte AMD eine zugelassene Therapie bereit, die deutlich häufigere trockene AMD entzieht sich aktuell jedoch jeglicher Therapie. Ein zentraler Pathomechanismus der AMD ist der progrediente Untergang des retinalen Pigmentepithels (RPE). Die Rarifizierung und letztendlich Atrophie des RPEs führt zum Untergang der funktionellen Einheit aus RPE, Photorezeptoren und Bruch'scher Membran und somit zum irreversiblen Funktionsverlust. Ein möglicher therapeutischer Ansatz, der progredienten Atrophie des RPEs entgegenzuwirken, ist, das prinzipiell post-mitotischen RPE zur Proliferation anzuregen.

Grundlage unserer *in vitro* Untersuchungen ist das ARPE-19 Zellmodell. Um die Proliferation anzuregen wurden die RPE-Zellen mit *E2F2*, einem Zellzyklus-regulierendem Transkriptionsfaktor, transfiziert.

Zunächst wurde ein nicht-proliferatives RPE-Zellmodell mit spontanem Wachstumsarrest etabliert. Innerhalb von zwei Wochen konnte die Ausbildung von Zonulae occludentes als Zeichen der Integrität des adhärennten Zellmonolayers beobachtet werden. Die chemische Transfektion von *E2F2* unter einem CMV-Promoter führte zur Überexpression von E2F2-Protein. Der proliferationssteigernde Effekt von E2F2 konnte durch die Proliferationsmarker Cyclin D1 sowie Ki67, dem Anstieg der BrdU-Aufnahme und der nach Transfektion mit *E2F2* zunehmenden Gesamtzellzahl nachgewiesen werden.

Der Zellzahlerhöhung standen jedoch potentiell qualitative und funktionelle Einbußen entgegen. So zeigten sich nach Behandlung mit *E2F2* die Zellviabilität reduziert und die Apoptoserate sowie die Permeabilität des Epithels erhöht. Diese Einschränkungen waren jedoch nur passager bis 7 Tage nach Transfektion sichtbar und reversibel. Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass diese Defizite nicht durch E2F2 selbst, sondern durch das Transfektionsreagenz PEI bedingt waren. Weitere funktionelle Defizite könnten durch epithelial-mesenchymale Transition (EMT) verursacht werden. Hier zeigte sich durch *E2F2* keine De-Differenzierung im Sinne einer typischen EMT-Marker-Expression.

Die vorliegende Arbeit zeigt in einem *in vitro* Zellmodell die Grundlagen eines vielversprechenden Ansatzes zur Therapie der trockenen AMD: Durch Überexpression eines den Zellzyklus regulierenden Gens (hier E2F2) wurde die RPE-Regeneration angeregt. Analog zur schon zugelassenen Gentherapie des RPEs bei RPE65-assoziierten Netzhautdystrophien mit Luxturna® (Voretigen Neparvovec) durch die *in situ* Transfektion von funktionstüchtigem RPE-Gen mittels Adeno-assoziierten Viren könnte mit einer viralen E2F2-Protein-Fähre mit Lentiviren eine Stimulation des RPEs zur Proliferation möglich sein. Entscheidend ist der möglichst gute Struktur- und Funktionserhalt des Photorezeptor-Bruch'sche-Membran-RPE Komplexes. Eine Therapie sollte daher in frühen Krankheitsstadien erfolgen, um die Progression zu fortgeschrittenen Erkrankungsstadien mit irreversiblen Funktionsverlust zu verzögern oder zu verhindern.

6 Literaturverzeichnis

1. Gehrs, K.M., et al., *Age-related macular degeneration--emerging pathogenetic and therapeutic concepts*. Ann Med, 2006. **38**(7): p. 450-71.
2. Colijn, J.M., et al., *Prevalence of Age-Related Macular Degeneration in Europe: The Past and the Future*. Ophthalmology, 2017. **124**(12): p. 1753-1763.
3. Wong, W.L., et al., *Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis*. The Lancet Global Health, 2014. **2**(2): p. e106-e116.
4. Holz, F.G., et al., *Multi-country real-life experience of anti-vascular endothelial growth factor therapy for wet age-related macular degeneration*. Br J Ophthalmol, 2015. **99**(2): p. 220-6.
5. Ambati, J., et al., *Age-related macular degeneration: etiology, pathogenesis, and therapeutic strategies*. Surv Ophthalmol, 2003. **48**(3): p. 257-93.
6. Jager, R.D., W.F. Mieler, and J.W. Miller, *Age-related macular degeneration*. N Engl J Med, 2008. **358**(24): p. 2606-17.
7. Yannuzzi, L.A., et al., *RETINAL ANGIOMATOUS PROLIFERATION IN AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION*. RETINA, 2012. **32**: p. 416-434.
8. Bird, A., et al., *An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration*. Survey of ophthalmology, 1995. **39**(5): p. 367-374.
9. van Leeuwen, R., et al., *Grading of age-related maculopathy for epidemiological studies: Is digital imaging as good as 35-mm film?* Ophthalmology, 2003. **110**(8): p. 1540-1544.
10. Strauss, O., *The retinal pigment epithelium in visual function*. Physiol Rev, 2005. **85**(3): p. 845-81.
11. da Cruz, L., et al., *RPE transplantation and its role in retinal disease*. Prog Retin Eye Res, 2007. **26**(6): p. 598-635.

12. Strauss, O., *The Retinal Pigment Epithelium*, in *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*, H. Kolb, E. Fernandez, and R. Nelson, Editors. 1995: Salt Lake City (UT).
13. Bok, D., *The retinal pigment epithelium: a versatile partner in vision*. *J Cell Sci Suppl*, 1993. **17**: p. 189-95.
14. Dornonville de la Cour, M., *Ion transport in the retinal pigment epithelium. A study with double barrelled ion-selective microelectrodes*. *Acta Ophthalmol Suppl*, 1993(209): p. 1-32.
15. Bosch, E., J. Horwitz, and D. Bok, *Phagocytosis of outer segments by retinal pigment epithelium: phagosome-lysosome interaction*. *J Histochem Cytochem*, 1993. **41**(2): p. 253-63.
16. McBee, J.K., et al., *Confronting complexity: the interlink of phototransduction and retinoid metabolism in the vertebrate retina*. *Prog Retin Eye Res*, 2001. **20**(4): p. 469-529.
17. Ishida, K., et al., *Participation of pigment epithelium in ocular immune privilege. 3. Epithelia cultured from iris, ciliary body, and retina suppress T-cell activation by partially non-overlapping mechanisms*. *Ocul Immunol Inflamm*, 2003. **11**(2): p. 91-105.
18. Dorey, C.K., et al., *Cell loss in the aging retina. Relationship to lipofuscin accumulation and macular degeneration*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1989. **30**(8): p. 1691-9.
19. Del Priore, L.V., Y.H. Kuo, and T.H. Tezel, *Age-related changes in human RPE cell density and apoptosis proportion in situ*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002. **43**(10): p. 3312-8.
20. Marshall, J., *The ageing retina: physiology or pathology*. *Eye (Lond)*, 1987. **1 (Pt 2)**: p. 282-95.
21. Zarbin, M.A., *Current concepts in the pathogenesis of age-related macular degeneration*. *Arch Ophthalmol*, 2004. **122**(4): p. 598-614.

22. Machemer, R. and U.H. Steinhorst, *Retinal separation, retinotomy, and macular relocation: II. A surgical approach for age-related macular degeneration?* Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 1993. **231**(11): p. 635-41.
23. Mruthyunjaya, P., S.S. Stinnett, and C.A. Toth, *Change in visual function after macular translocation with 360 degrees retinectomy for neovascular age-related macular degeneration.* Ophthalmology, 2004. **111**(9): p. 1715-24.
24. Eandi, C.M., F. Giansanti, and G. Virgili, *Macular translocation for neovascular age-related macular degeneration.* Cochrane Database Syst Rev, 2008(4): p. CD006928.
25. Jousseaume, A.M., et al., *Autologous translocation of the choroid and retinal pigment epithelium in patients with geographic atrophy.* Ophthalmology, 2007. **114**(3): p. 551-60.
26. Caramoy, A., et al., *Autologous translocation of choroid and retinal pigment epithelium in geographic atrophy: long-term functional and anatomical outcome.* Br J Ophthalmol, 2010. **94**(8): p. 1040-4.
27. Majji, A.B. and E. de Juan, Jr., *Retinal pigment epithelial autotransplantation: morphological changes in retina and choroid.* Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2000. **238**(9): p. 779-91.
28. Nazari, H., et al., *Stem cell based therapies for age-related macular degeneration: The promises and the challenges.* Progress in Retinal and Eye Research, 2015. **48**: p. 1-39.
29. Klimanskaya, I., et al., *Derivation and comparative assessment of retinal pigment epithelium from human embryonic stem cells using transcriptomics.* Cloning Stem Cells, 2004. **6**(3): p. 217-45.
30. Thomson, J.A., et al., *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts.* Science, 1998. **282**(5391): p. 1145-7.
31. Lund, R.D., et al., *Human embryonic stem cell-derived cells rescue visual function in dystrophic RCS rats.* Cloning Stem Cells, 2006. **8**(3): p. 189-99.

32. Lu, B., et al., *Long-term safety and function of RPE from human embryonic stem cells in preclinical models of macular degeneration*. *Stem Cells*, 2009. **27**(9): p. 2126-35.
33. Schwartz, S.D., et al., *Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: follow-up of two open-label phase 1/2 studies*. *Lancet*, 2015. **385**(9967): p. 509-16.
34. Schwartz, S.D., et al., *Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report*. *The Lancet*, 2012. **379**(9817): p. 713-720.
35. da Cruz, L., et al., *Phase 1 clinical study of an embryonic stem cell–derived retinal pigment epithelium patch in age-related macular degeneration*. *Nature Biotechnology*, 2018. **36**: p. 328.
36. Diniz, B., et al., *Subretinal Implantation of Retinal Pigment Epithelial Cells Derived From Human Embryonic Stem Cells: Improved Survival When Implanted as a Monolayer*. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2013. **54**(7): p. 5087-5096.
37. Takahashi, K., et al., *Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors*. *Cell*, 2007. **131**(5): p. 861-872.
38. Rathod, R., et al., *Induced pluripotent stem cells (iPSC)-derived retinal cells in disease modeling and regenerative medicine*. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 2019. **95**: p. 81-88.
39. Buchholz, D.E., et al., *Derivation of functional retinal pigmented epithelium from induced pluripotent stem cells*. *Stem Cells*, 2009. **27**(10): p. 2427-34.
40. Carr, A.J., et al., *Protective effects of human iPS-derived retinal pigment epithelium cell transplantation in the retinal dystrophic rat*. *PLoS One*, 2009. **4**(12): p. e8152.
41. Li, Y., et al., *Long-term safety and efficacy of human-induced pluripotent stem cell (iPS) grafts in a preclinical model of retinitis pigmentosa*. *Mol Med*, 2012. **18**: p. 1312-9.

42. Al Hussaini, H., et al., *Mature retinal pigment epithelium cells are retained in the cell cycle and proliferate in vivo*. Mol.Vis., 2008. **14**: p. 1784-1791.
43. Massague, J., *G1 cell-cycle control and cancer*. Nature, 2004. **432**(7015): p. 298-306.
44. Wu, L., et al., *The E2F1-3 transcription factors are essential for cellular proliferation*. Nature, 2001. **414**(6862): p. 457-462.
45. Serrano, M., G.J. Hannon, and D. Beach, *A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4*. nature, 1993. **366**(6456): p. 704-707.
46. Kato, J., et al., *Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4*. Genes and Development, 1993. **7**: p. 331-331.
47. Dyson, N., *The regulation of E2F by pRB-family proteins*. Genes Dev, 1998. **12**(15): p. 2245-62.
48. Wu, X. and A.J. Levine, *p53 and E2F-1 cooperate to mediate apoptosis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1994. **91**(9): p. 3602-3606.
49. Mudryj, M., S.W. Hiebert, and J.R. Nevins, *A role for the adenovirus inducible E2F transcription factor in a proliferation dependent signal transduction pathway*. The EMBO journal, 1990. **9**(7): p. 2179-2184.
50. DeGregori, J., et al., *Distinct roles for E2F proteins in cell growth control and apoptosis*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 1997. **94**(14): p. 7245-7250.
51. Izumi, M., et al., *Transcription of the catalytic 180-kDa subunit gene of mouse DNA polymerase α is controlled by E2F, an Ets-related transcription factor, and Sp1*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression, 2000. **1492**(2): p. 341-352.
52. Slansky, J.E. and P.J. Farnham, *Transcriptional regulation of the dihydrofolate reductase gene*. BioEssays, 1996. **18**(1): p. 55-62.
53. Dunn, K.C., et al., *ARPE-19, A Human Retinal Pigment Epithelial Cell Line with Differentiated Properties*. Experimental Eye Research, 1996. **62**(2): p. 155-170.

54. Pfeffer, B.A. and N.J. Philp, *Cell culture of retinal pigment epithelium: Special Issue*. Experimental Eye Research, 2014. **126**: p. 1-4.
55. Samuel, W., et al., *Appropriately differentiated ARPE-19 cells regain phenotype and gene expression profiles similar to those of native RPE cells*. Molecular vision, 2017. **23**: p. 60-89.
56. Hamel, C.P., et al., *Molecular cloning and expression of RPE65, a novel retinal pigment epithelium-specific microsomal protein that is post-transcriptionally regulated in vitro*. Journal of Biological Chemistry, 1993. **268**(21): p. 15751-15757.
57. Lukas, J., et al., *Deregulated expression of E2F family members induces S-phase entry and overcomes p16INK4A-mediated growth suppression*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(3): p. 1047-57.
58. Boussif, O., et al., *A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995. **92**(16): p. 7297-7301.
59. Longo, P.A., et al., *Chapter Eighteen - Transient Mammalian Cell Transfection with Polyethylenimine (PEI)*, in *Methods in Enzymology*, J. Lorsch, Editor. 2013, Academic Press. p. 227-240.
60. Smith, B., *SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins*, in *Proteins*. 1984, Springer. p. 41-55.
61. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
62. Kubista, M., B. Akerman, and B. Norden, *Characterization of interaction between DNA and 4',6-diamidino-2-phenylindole by optical spectroscopy*. Biochemistry, 1987. **26**(14): p. 4545-53.
63. Miller, I., et al., *Ki67 is a Graded Rather than a Binary Marker of Proliferation versus Quiescence*. Cell Reports, 2018. **24**(5): p. 1105-1112.e5.

64. Meyer, J.S. and W. He, *Cell proliferation measurements by bromodeoxyuridine or thymidine incorporation: Clinical correlates*. Seminars in Radiation Oncology, 1993. **3**(2): p. 126-134.
65. Kyrylkova, K., et al., *Detection of apoptosis by TUNEL assay*. Methods Mol Biol, 2012. **887**: p. 41-7.
66. Paull, K.D., et al., *The synthesis of XTT: A new tetrazolium reagent that is bio-reducible to a water-soluble formazan*. Journal of Heterocyclic Chemistry, 1988. **25**(3): p. 911-914.
67. Mannermaa, E., et al., *Filter-cultured ARPE-19 cells as outer blood-retinal barrier model*. Eur J Pharm Sci, 2010. **40**(4): p. 289-96.
68. Stevenson, B.R., et al., *Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia*. J Cell Biol, 1986. **103**(3): p. 755-66.
69. Kalluri, R. and R.A. Weinberg, *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. J Clin Invest, 2009. **119**(6): p. 1420-8.
70. Virchow, R., *Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre. Zwanzig Vorlesungen gehalten während der Monate Februar, März und April 1858 in Pathologischen Institute zu Berlin*. 1858: A. Hirschwald.
71. Fu, M., et al., *Minireview: Cyclin D1: Normal and Abnormal Functions*. Endocrinology, 2004. **145**(12): p. 5439-5447.
72. van Maanen, J.M.S., et al., *Mechanism of Action of Antitumor Drug Etoposide: A Review*. JNCI: Journal of the National Cancer Institute, 1988. **80**(19): p. 1526-1533.
73. Balda, M.S. and K. Matter, *Size-selective assessment of tight junction paracellular permeability using fluorescently labelled dextrans*. 2007(1).
74. Wang, X., et al., *Exploring tight junction alteration using double fluorescent probe combination of lanthanide complex with gold nanoclusters*. Scientific reports, 2016. **6**: p. 32218-32218.

75. Lee, J.M., et al., *The epithelial–mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease*. J Cell Biol, 2006. **172**(7): p. 973-981.
76. Kalluri, R. and E.G. Neilson, *Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis*. J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1776-84.
77. Grisanti, S. and C. Guidry, *Transdifferentiation of retinal pigment epithelial cells from epithelial to mesenchymal phenotype*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 1995. **36**(2): p. 391-405.
78. Zavadil, J. and E.P. Bottinger, *TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions*. Oncogene, 2005. **24**(37): p. 5764-74.
79. Sugioka, K., et al., *TGF-β2 promotes RPE cell invasion into a collagen gel by mediating urokinase-type plasminogen activator (uPA) expression*. Experimental Eye Research, 2013. **115**: p. 13-21.
80. Florea, B.I., et al., *Transfection efficiency and toxicity of polyethylenimine in differentiated Calu-3 and nondifferentiated COS-1 cell cultures*. Aaps Pharmsci, 2002. **4**(3): p. 1-11.
81. Joyce, N.C., et al., *Effect of overexpressing the transcription factor E2F2 on cell cycle progression in rabbit corneal endothelial cells*. Invest Ophthalmol.Vis.Sci., 2004. **45**(5): p. 1340-1348.
82. Puliafito, A., et al., *Collective and single cell behavior in epithelial contact inhibition*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012. **109**(3): p. 739.
83. Alberts, B., J. Wilson, and T. Hunt, *Molecular Biology of the Cell (Garland Science, New York)*. USA. 1601p, 2008.
84. Kampik, D., *Regeneration of ocular tissues using gene transfer*. 2017, UCL (University College London).
85. Kampik, D., et al., *Modulation of Contact Inhibition by ZO-1/ZONAB Gene Transfer—A New Strategy to Increase the Endothelial Cell Density of Corneal Grafts*. Investigative ophthalmology & visual science, 2019. **60**(8): p. 3170-3177.
86. Castedo, M., et al., *Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition*. Oncogene, 2004. **23**(16): p. 2825-37.

87. Feliciano, A., et al., *miR-99a reveals two novel oncogenic proteins E2F2 and EMR2 and represses stemness in lung cancer*. Cell death & disease, 2017. **8**(10): p. e3141.
88. Anderson, D.H., et al., *The onset of pigment epithelial proliferation after retinal detachment*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 1981. **21**(1): p. 10-16.
89. Kampik, A., et al., *Epiretinal and vitreous membranes: comparative study of 56 cases*. Archives of ophthalmology, 1981. **99**(8): p. 1445-1454.
90. Kirchhof, B. and N. Sorgente, *Pathogenesis of proliferative vitreoretinopathy. Modulation of retinal pigment epithelial cell functions by vitreous and macrophages*. Developments in ophthalmology, 1989. **16**: p. 1-53.
91. Ablonczy, Z., et al., *Human Retinal Pigment Epithelium Cells as Functional Models for the RPE In Vivo*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2011. **52**(12): p. 8614-8620.
92. Kampik, D., et al., *In situ regeneration of retinal pigment epithelium by gene transfer of E2F2: a potential strategy for treatment of macular degenerations*. Gene therapy, 2017. **24**(12): p. 810-818.
93. Takeuchi, K., et al., *Visual function 5 years or more after macular translocation surgery for myopic choroidal neovascularisation and age-related macular degeneration*. Eye (Lond), 2012. **26**(1): p. 51-60.
94. Katta, S., I. Kaur, and S. Chakrabarti, *The molecular genetic basis of age-related macular degeneration: an overview*. Journal of genetics, 2009. **88**(4): p. 425-449.
95. Hendrie, P.C. and D.W. Russell, *Gene Targeting with Viral Vectors*. Molecular Therapy, 2005. **12**(1): p. 9-17.
96. Buning, H., et al., *Recent developments in adeno-associated virus vector technology*. J Gene Med, 2008. **10**(7): p. 717-33.
97. Roy, K., L. Stein, and S. Kaushal, *Ocular gene therapy: an evaluation of recombinant adeno-associated virus-mediated gene therapy interventions for the treatment of ocular disease*. Hum Gene Ther, 2010. **21**(8): p. 915-27.

98. Russell, S., et al., *Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial*. Lancet, 2017. **390**(10097): p. 849-860.
99. Maguire, A.M., et al., *Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial*. Lancet (London, England), 2009. **374**(9701): p. 1597-1605.
100. Binder, S., et al., *Transplantation of the RPE in AMD*. Prog Retin Eye Res, 2007. **26**(5): p. 516-54.
101. Dong, Q., et al., *MicroRNA let-7a inhibits proliferation of human prostate cancer cells in vitro and in vivo by targeting E2F2 and CCND2*. PloS one, 2010. **5**(4): p. e10147.
102. Hong, S.H., et al., *Epigenetic reader BRD4 inhibition as a therapeutic strategy to suppress E2F2-cell cycle regulation circuit in liver cancer*. Oncotarget, 2016. **7**(22): p. 32628.
103. Song, H., et al., *Let-7b inhibits the malignant behavior of glioma cells and glioma stem-like cells via downregulation of E2F2*. Journal of physiology and biochemistry, 2016. **72**(4): p. 733-744.
104. McGee Sanftner, L.H., et al., *Recombinant AAV-Mediated Delivery of a Tet-Inducible Reporter Gene to the Rat Retina*. Molecular Therapy, 2001. **3**(5): p. 688-696.
105. Stieger, K., et al., *Long-term doxycycline-regulated transgene expression in the retina of nonhuman primates following subretinal injection of recombinant AAV vectors*. Molecular Therapy, 2006. **13**(5): p. 967-975.
106. Luis, A., *The Old and the New: Prospects for Non-Integrating Lentiviral Vector Technology*. Viruses, 2020. **12**(10): p. 1103.
107. Yáñez-Muñoz, R.J., et al., *Effective gene therapy with nonintegrating lentiviral vectors*. Nature Medicine, 2006. **12**(3): p. 348-353.
108. Muratori, C., R. Bona, and M. Federico, *Lentivirus-based virus-like particles as a new protein delivery tool*. Methods Mol Biol, 2010. **614**: p. 111-24.

7 Appendix

7.1 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|---|
| °C | Grad Celsius |
| A. bidest. | zweifach destilliertes Wasser |
| AAV | Adeno-assoziierte Viren |
| AMD | Altersabhängige Makuladegeneration |
| ARPE-19 | Adult Retinal Pigment Epithelial cell line-19 |
| Bp | Basenpaare |
| BrdU | 5-Bromo-2'-Deoxyuridin |
| BrdUTP | 5-Bromo-2'-Deoxyuridin 5'-Triphosphat |
| BSA | Bovine serum albumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| Ca ²⁺ | Calcium-Kation |
| CDK4 | Cyclin-abhängigen-Kinase 4 |
| cDNA | copy DNA |
| Cl ⁻ | Chlor-Anion/ Chlorid |
| CNV | Choroidale Neovaskularisation |
| Coll IV | Kollagen 4 |
| DAPI | 4',6-Diamidin-2-phenylindol |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DMSO | Dimethyl-Sulfoxid |
| DNA | Deoxyribonucleic Acid |
| E2F2 | E2F Transkriptionsfaktor 2 |
| ECL | Enhanced Chemiluminescence |
| EDTA | Ethylenediaminetetraacetic Acid |
| ELISA | Enzyme-linked immunosorbent assay |
| EMT | epithelial-mesenchymale Transition |
| ESC | Embryonale Stammzellen |
| FCS | fetales Kälberserum |

| | |
|------------------|--|
| FITC | Fluorescein-5-Isothiocyanat |
| G1-Phase | Gap-1-Phase |
| G2-Phase | Gap-2-Phase |
| GAPDH | Glyceraldehyde 3-phosphate Dehydrogenase |
| h | Stunde |
| hESC | human embryonic stem cell |
| IHC | Immunhistochemie |
| iPSC | Induced pluripotent stem cell |
| iPSC | Induzierte pluripotente Stammzellen |
| kDa | Kilo-Dalton |
| KI | Konfidenzintervall |
| M-Phase | Mitose-Phase |
| mA | Milliampere |
| mg | Milligramm |
| Mg ²⁺ | Magnesium-Kation |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| mM | Millimol pro Liter |
| nAMD | neovaskuläre Altersabhängige Makuladegeneration |
| NGS | Normal goat serum |
| P/S | Penicillin/Streptomycin |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PBS | phosphate buffered saline |
| PEI | Polyethylenimin |
| RAP | Retinale angiomatöse Proliferation |
| Rb | Retinoblastom-Tumorsuppressor |
| RPE | Retinales Pigmentepithel |
| rpm | rounds per minute |
| RT | Raumtemperatur |
| S-Phase | Synthese-Phase |

| | |
|----------------|---|
| SD | standard deviation |
| SDS | sodium dodecyl sulfate |
| sek | Sekunde |
| TGF- β 2 | Transforming Growth Factor - β 2 |
| TUNEL-Test | (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling)- Test |
| u.a. | unter anderem |
| V | Volt |
| VEGF | Vascular Endothelial Growth Factor |
| XTT | Natrium-2,3-bis- (2-methoxy-4-nitro-5- sulfophenyl) -5- [(phenylamino) carbonyl] -2H- tetrazolium |
| z.B. | zum Beispiel |
| ZO-1 | Zonula occludens Protein 1 |
| α -SMA | α - smooth muscle actin |
| μ g | Mikrogramm |
| μ l | Mikroliter |
| μ m | Mikrometer |
| μ M | Mikromol pro Liter |

7.2 Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Funktionen des retinalen Pigmentepithels (aus dem Englischen nach von Strauss 2005 [10]) | 2 |
| Abbildung 2: Zellzyklus der eukaryoten Zelle mit vereinfachter Darstellung der Regulation des G1-S-Überganges | 7 |
| Abbildung 3: schematische Darstellung des FITC-Dextran-Assay zur Testung der Barrierefunktion des ARPE-19-Monolayers | 28 |
| Abbildung 4 : Wachstumsarrest der ARPE-19 Zellen, Quantifizierung der Immunhistochemie (IHC)..... | 31 |
| Abbildung 5: Wachstumsarrest der ARPE-19 Zellen, Immunhistochemie..... | 32 |
| Abbildung 6: Effektivität der E2F2 Transfektion durch PEI nach zwei Tagen, Immunhistochemie | 33 |
| Abbildung 7: E2F2 Transfektion induziert Überexpression von E2F2 und Cyclin D1 in kontaktinhibierten ARPE-19 Zellen, Western Blot mit Quantifizierung | 34 |
| Abbildung 8: Proliferationssteigerung nach E2F2 Transfektion im ARPE-19 Zellmodell, Immunhistochemie | 36 |
| Abbildung 9: Fortsetzung zu Proliferationssteigerung nach E2F2 Transfektion im ARPE-19 Zellmodell, Immunhistochemie | 37 |
| Abbildung 10: E2F2 Überexpression induziert Proliferation in kontaktinhibierten ARPE-19 Zellen (Ki67), Quantifizierung der IHC..... | 38 |
| Abbildung 11: Anstieg der absoluten Zellzahl pro mm ² nach E2F2 Transfektion in kontaktinhibierten ARPE-19 Zellen, Quantifizierung der IHC..... | 39 |
| Abbildung 12: Steigerung der Proliferation (BrdU-Aufnahme) durch E2F2 Überexpression, Immunhistochemie mit Quantifizierung..... | 40 |
| Abbildung 13: E2F2 Transfektion führt zur passageren Zunahme apoptotischer Zellen, Immunhistochemie | 43 |
| Abbildung 14: E2F2 Transfektion führt zur passageren Zunahme apoptotischer Zellen, Quantifizierung der IHC..... | 44 |
| Abbildung 15: passagere Viabilitätsreduktion durch E2F2 Transfektion, XTT-Assay | 46 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 16: Passagere Permeabilitätssteigerung des ARPE-19 Monolayers nach E2F2 Transfektion, FITC-Dextran-Assay..... | 48 |
| Abbildung 17: EMT und EMT Proteinmarker (aus dem Englischen nach von Kalluri 2009 [69]) | 50 |
| Abbildung 18: Zunahme der Kollagen IV Expression nach TGF- β 2 Behandlung der ARPE-19 Zellen, Immunhistochemie | 52 |
| Abbildung 19: Zunahme der α -SMA Expression nach TGF- β 2 Behandlung des ARPE-19 Zellen, Immunhistochemie | 53 |
| Abbildung 20: TGF- β 2 induziert die Überexpression von EMT-Markerproteinen, Western Blot | 54 |
| Abbildung 21: E2F2 Überexpression induziert keine Expression der EMT-Marker N-Cadherin und α -SMA nach 3 Tagen, Western Blot mit Quantifizierung | 56 |
| Abbildung 22: E2F2 Überexpression induziert keine Überexpression der MET Marker Fibronectin, Kollagen IV, N-Cadherin, β -Caterin und α -SMA nach 1 bzw. 2 Wochen, Western Blot..... | 58 |

7.3 Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1 - verwendete Geräte | 9 |
| Tabelle 2 - Verbrauchsmaterialien und Hersteller..... | 11 |
| Tabelle 3 - Chemikalien und Hersteller | 12 |
| Tabelle 4 - Zellkulturmedien für ARPE 19 Zellen | 14 |
| Tabelle 5 - Zusatzlösungen für Zellkultur | 15 |
| Tabelle 6 - Zusatzlösungen für Immunfärbung..... | 15 |
| Tabelle 7 - Zusatzlösungen und Puffer für Westernblot / Immunfärbung | 15 |
| Tabelle 8 - Zusammensetzung der Agarosegele für Elektrophorese..... | 16 |
| Tabelle 9 - Primärantikörper; Wenn nicht anders erläutert handelt sich um anti-Mensch IgG Antikörper..... | 17 |
| Tabelle 10 - Sekundärantikörper | 17 |
| Tabelle 11 - Transfektionsreagenzien (Polyethylenimin und E2F2 Plasmid) mit Mengenangabe für Well-Platten | 21 |

7.4 Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei Herrn Prof. Dr. Jost Hillenkamp, Direktor der Augenklinik des Universitätsklinikums Würzburg, für die Bereitstellung des interessanten Dissertationsthemas und Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit bedanken.

Sehr herzlich möchte ich mich auch bei Dr. Daniel Kampik für die Themastellung, die hervorragende Betreuung und immense Diskussions- und Hilfsbereitschaft bedanken. Zudem bedanke ich mich herzlich bei Frau Dr. Hong Han für Ihre tatkräftige Unterstützung im Labor und Hilfe bei der Auswertung der Zellversuche.

7.5 Eigene Veröffentlichungen und Kongressteilnahme

Posterpräsentation DOG 2016, Berlin "RPE-Regeneration durch Anregung zur Proliferation: Auswirkungen auf Vitalität, Apoptose, Permeabilität und EMT"