

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Martin Spitzer

## **Untersuchung der Beteiligung von TRP-Kanälen an der Calciumhomöostase in Pigmentepithelzellen**

### **DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Sebastian Seyler  
aus Hamburg

Hamburg 2020

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 04.03.2022**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Dr. Andreas Guse**

**Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: PD Dr. Andrea Hassenstein**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Das menschliche Auge .....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Anatomischer Aufbau .....	1
1.1.2	Die Retina.....	1
1.1.3	Das retinale Pigmentepithel.....	3
<b>1.2</b>	<b>Calcium - ein universeller Botenstoff .....</b>	<b>5</b>
<b>1.3</b>	<b>Transient Receptor Potential Channels (TRP) .....</b>	<b>8</b>
1.3.1	TRPC (Classical/Canonical).....	9
1.3.2	TRPV (Vanilloid).....	11
1.3.3	TRPM (Melastatin) .....	14
<b>1.4</b>	<b>Die altersbedingte Makuladegeneration.....</b>	<b>16</b>
1.4.1	Einleitung .....	16
1.4.2	Therapie .....	19
<b>2</b>	<b>Arbeitshypothese und Ziel der Arbeit .....</b>	<b>25</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>26</b>
<b>3.1</b>	<b>Material.....</b>	<b>26</b>
3.1.1	Reagenzien .....	26
3.1.2	Geräte .....	27
3.1.3	Verbrauchsmaterial .....	28
3.1.4	Software .....	28
3.1.5	Zellen .....	28
<b>3.2</b>	<b>Methoden der Zellkultur.....</b>	<b>29</b>
3.2.1	Verwendete Medien .....	29
3.2.2	Zellkultur der ARPE-19-Zelllinie .....	30
3.2.3	Zellkultur humaner primärer RPE-Zellen (hRPE) .....	30
<b>3.3</b>	<b>Methodik des Calcium-Imaging.....</b>	<b>31</b>
3.3.1	Fura-2AM .....	32
3.3.2	Verwendete Lösungen .....	33

3.3.3	Versuchsvorbereitung .....	35
3.3.4	Versuchsaufbau .....	35
3.3.5	Durchführung der Ca <sup>2+</sup> -Messungen .....	37
3.3.6	Agonisten .....	37
3.3.7	Hitzestimulation 45°C/56°C .....	38
3.3.8	Laserlicht (810nm Diodenlaser).....	39
3.3.9	Blocker .....	40
3.3.10	Kalibrierung .....	40
3.3.11	Datenerfassung .....	41
3.3.12	Datenauswertung .....	42
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>43</b>
<b>4.1</b>	<b>Hitzestimulation.....</b>	<b>43</b>
4.1.1	Beispielmessung: Hitzestimulation an ARPE-19-Zellen mit 56°C ..	44
4.1.2	Vergleich ARPE-19 und hRPE (56°C).....	45
4.1.3	Blocker .....	52
4.1.4	Hitzestimulation mit 45°C und 56°C .....	55
<b>4.2</b>	<b>Capsaicin .....</b>	<b>57</b>
<b>4.3</b>	<b>Laserlichtexposition (810nm Diodenlaser) .....</b>	<b>57</b>
<b>4.4</b>	<b>Carbachol.....</b>	<b>60</b>
4.4.1	Thapsigargin.....	61
4.4.2	Lanthan .....	61
4.4.3	Ruthenium Rot .....	62
<b>4.5</b>	<b>Koffein.....</b>	<b>63</b>
4.5.1	Thapsigargin.....	64
4.5.2	Lanthan .....	65
4.5.3	Ruthenium Rot .....	65
<b>4.6</b>	<b>VEGF-C.....</b>	<b>66</b>
<b>4.7</b>	<b>Dopamin.....</b>	<b>67</b>
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>68</b>
<b>5.1</b>	<b>Untersuchung der Beteiligung von TRP-Kanälen an der Calciumhomöostase in Pigmentepithelzellen.....</b>	<b>68</b>

5.1.1	Zellkultur.....	69
5.1.2	Calcium-Imaging .....	70
<b>5.2</b>	<b>Hitzestimulation.....</b>	<b>70</b>
5.2.1	Leerprobe .....	70
5.2.2	Basale Calciumkonzentration .....	71
5.2.3	Maximum.....	72
5.2.4	Minimum.....	73
5.2.5	Anstiegsdauer .....	73
5.2.6	Endwert .....	73
5.2.7	Blockerwirksamkeit.....	74
5.2.8	Capsaicin .....	74
5.2.9	Hitzestimulation: Vergleich 45°C und 56°C .....	75
5.2.10	Weiterführende Untersuchungen.....	75
<b>5.3</b>	<b>Untersuchung laservermittelter Effekte .....</b>	<b>77</b>
<b>5.4</b>	<b>Carbachol.....</b>	<b>79</b>
<b>5.5</b>	<b>Koffein .....</b>	<b>80</b>
<b>5.6</b>	<b>VEGF-C.....</b>	<b>81</b>
<b>5.7</b>	<b>Dopamin.....</b>	<b>81</b>
<b>5.8</b>	<b>Relevanz / Ausblick.....</b>	<b>82</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>84</b>
<b>7</b>	<b>Appendix .....</b>	<b>86</b>
7.1	Abkürzungsverzeichnis .....	86
7.2	Danksagung.....	89
7.3	Lebenslauf .....	90
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>91</b>
<b>9</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>106</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Das menschliche Auge

### 1.1.1 Anatomischer Aufbau

Als Sinnesorgan dient das menschliche Auge einer essenziellen Funktion, der visuellen Wahrnehmung. Der anatomische Aufbau des Auges ist komplex. Die äußerste Schicht des Augapfels (Bulbus oculi) wird durch die derbe, bindegewebige Lederhaut (Sklera) gebildet, welche im ventralen Anteil in die lichtdurchlässige Hornhaut (Cornea) übergeht. Das Augeninnere ist in einen vorderen und einen hinteren Abschnitt unterteilt. Der vordere Abschnitt wird durch die mit Kammerwasser (Humor aquosus) gefüllte vordere und hintere Augenkammer (Camera anterior et posterior bulbi), die Regenbogenhaut (Iris) und die Linse (Lens) gebildet. Im hinteren Abschnitt befinden sich der Glaskörper (Corpus vitreum), die Aderhaut (Chorioidea) und die Netzhaut (Retina), welche der Lederhaut (Sklera) innenseitig aufliegen. Linse, Glaskörper, Hornhaut und Kammerwasser bilden ein optisches System, den sogenannten dioptrischen Apparat, welcher durch Lichtbrechung scharfes Sehen ermöglicht. In der Mitte der Retina liegt der gelbe Fleck (Makula), der Bereich der größten Dichte der Sehzellen (Photorezeptoren). In ihm liegt die Fovea centralis, der Bereich des schärfsten Sehens. Die Makula nimmt mit etwa 5% nur einen sehr geringen Anteil der Netzhaut ein, für die Sehkraft ist sie jedoch von essenzieller Bedeutung. Hochauflösendes Sehen zur detaillierten Wahrnehmung, Farbsehen sowie scharfes Sehen im Fernbereich erfordern eine einwandfreie Funktion der Makula.

### 1.1.2 Die Retina

#### 1.1.2.1 Anatomischer Aufbau

Im hinteren Augenabschnitt befindet sich zwischen Glaskörper und der Aderhaut die Retina. Sie lässt sich in zwei Bereiche unterteilen, den im hinteren Augenabschnitt liegenden lichtempfindlichen (Pars optica retinae) und den lichtunempfindlichen Bereich (Pars caeca retinae), welcher im vorderen Augenabschnitt liegt. Die Übergangszone zwischen beiden Bereichen wird durch die sogenannte Ora serrata gebildet, welche etwa 8-9mm dorsal des Hornhautrandes (Limbus corneae) verläuft. Der lichtempfindliche Anteil der Retina

weist im Querschnitt einen charakteristischen, mehrschichtigen Aufbau auf und besteht aus 3 hintereinander geschalteten Neuronen. Des Weiteren sorgen Interneurone für eine horizontale Informationsverarbeitung. Die äußerste Schicht wird von den lichtempfindlichen Photorezeptoren gebildet (1. Neuron). Dabei lassen sich bezüglich Morphologie und Funktionalität zwei verschiedene Gruppen von Zellen, die Stäbchenzellen und die Zapfenzellen, voneinander unterscheiden. Im menschlichen Auge befinden sich ca. 120 Mio. Stäbchenzellen und ca. 6 Mio. Zapfenzellen. Die Stäbchenzellen befinden sich überwiegend in den peripheren Anteilen der Retina und weisen eine hohe Lichtempfindlichkeit auf, welche für das Sehen bei schwachen Lichtverhältnissen (skotopisches Sehen) erforderlich ist. Im zentralen Bereich (Fovea centralis) dominieren hingegen die Zapfenzellen, welche für das Sehen bei Tageslicht (photopisches Sehen) erforderlich sind. Die Photorezeptoren lassen sich in Außensegment, Innensegment, Zellkörper und Synapse gliedern. Die Zellkerne der Photorezeptoren bilden die sogenannte äußere Körnerschicht. Das 2. Neuron wird von den Bipolarzellen gebildet, deren Zellkerne zusammen mit den Zellkernen von Horizontalzellen und amakrinen Zellen, welche als Interneurone fungieren, die sogenannte innere Körnerschicht bilden. Die Bipolarzellen empfangen die Nervenimpulse der Photorezeptoren und leiten sie an die Ganglienzellen (3. Neuron) weiter. Die Axone der Ganglienzellen ziehen zur Papille und vereinen sich im Sehnerv (Nervus opticus). Spezielle Gliazellen, die sogenannten Müller-Zellen, durchziehen in stützender Funktion senkrecht sämtliche Schichten der Retina.

Die Photorezeptoren stehen mit ihren Außensegmenten mit dem retinalen Pigmentepithel (RPE) in Kontakt, welches wiederum durch die Bruch-Membran von der Chorioidea separiert wird.

### **1.1.2.2 Funktionsweise der Retina**

Das einfallende Licht passiert den dioptrischen Apparat und durchdringt alle Schichten der Retina, bevor es an den Außensegmenten der Photorezeptoren detektiert wird. Hier erfolgt die Umwandlung der Lichtenergie in eine elektrische Erregung. Durch Auslösung einer Signalkaskade kommt es zur Hyperpolarisation der Zellmembran des Außensegmentes auf  $-55\text{mV}$ . Dieses induziert eine Hemmung der Freisetzung des Neurotransmitters Glutamat im Synapsenspalt des Photorezeptors, es kommt zur Potentialveränderung in den nachgeschalteten

Neuronen. Das so entstandene elektrische Signal wird über den Sehnerv an das Gehirn weitergeleitet, wo in der Sehrinde die Informationsverarbeitung erfolgt.

### **1.1.3 Das retinale Pigmentepithel**

#### **1.1.3.1 Anatomischer Aufbau**

Die äußerste Schicht der Retina (Stratum pigmentosum) wird durch das retinale Pigmentepithel (RPE) gebildet. Die pigmentierten, hexagonalen Zellen des RPE bilden ein einschichtiges Epithel, welches morphologisch und funktionell eine Polarität aufweist (Marmor 1975; Strauss 2005). Im apikalen Anteil umgeben lange Zellfortsätze, die Mikrovilli, die Außensegmente der Photorezeptoren und stehen so mit ihnen in direktem Kontakt (Marmorstein 2001). Zwischen den Photorezeptoren und dem apikalen Pol des RPE formiert sich der subretinale Spalt. Dieser Raum ist von der Interphotorezeptormatrix ausgefüllt, welche eine Interaktion beider Zelltypen vermittelt (Hageman und Johnson 1991; Steinberg 1985b). Die Bruch-Membran grenzt basolateral an das RPE und separiert dieses von der Chorioidea. Zwischen der Neuroretina und der Chorioidea bildet das RPE die äußere Blut-Retina-Schranke (Rizzolo 1997).

#### **1.1.3.2 Funktionen des RPE**

Das RPE übernimmt eine Vielzahl von Aufgaben, die für die Aufrechterhaltung der Funktionalität der Photorezeptoren von essenzieller Bedeutung sind (Strauss 2005):

- Die pigmentierten Zellen des RPE absorbieren das Licht, welches durch den optischen Apparat auf die Retina fokussiert wird (Bok 1993). Zudem dient die Absorption des Lichtes als Schutz vor reaktiven Photooxidanzien, die durch die hohen Lichtenergien in großem Maße entstehen (Boulton und Dayhaw-Barker 2001).
- Das RPE bietet eine bidirektionale Transportfunktion. Einerseits werden Nährstoffe wie Glucose, Retinol und Fettsäuren aus dem Blut zu den Photorezeptoren transportiert, zum anderen werden Wasser, Ionen und Metabolite aus dem subretinalen Raum abtransportiert und in das Blut abgegeben (La Dornonville de Cour 1993; Marmor 1999; Miller und Edelman 1990; Steinberg 1985a; Strauss 2005).



- Für die ungestörte Funktionsweise der Photorezeptoren ist eine korrekte Ionenzusammensetzung im subretinalen Spalt erforderlich, welche durch epithelialen Transport von Ionen an der apikalen Membran des RPE gewährleistet wird (La Dornonville de Cour 1993).
- Unter Einwirkung der Lichtenergie kommt es zu einer Schädigung der Membranen der Außensegmente der Photorezeptoren. Die beschädigten Anteile werden abgestoßen und vom RPE phagozytiert (Steinberg et al. 1977; Young und Bok 1969). Hierbei werden wichtige Bausteine wie Retinal und Docosahexaensäure wiederverwertet und den Photorezeptoren zur Regeneration wieder zugeführt (Bibb und Young 1974; Rodriguez de Turco et al. 1999).
- Eine weitere zentrale Rolle nimmt das RPE im sogenannten Sehzyklus ein. Durch Lichtabsorption kommt es in den Photorezeptoren zu einer Umwandlung von 11-cis-Retinal in das all-trans-Retinal. Zur Aufrechterhaltung der Erregbarkeit der Photorezeptoren ist eine Reisomerisierung erforderlich. Das entsprechende Enzym befindet sich im RPE, jedoch nicht in den Photorezeptoren. Das all-trans-Retinal wird vom RPE aufgenommen, reisomerisiert und den Photorezeptoren als erregbares 11-cis-Retinal wieder zugeführt (Baehr et al. 2003; Besch et al. 2003; Thompson und Gal 2003).
- Das RPE sezerniert verschiedene Substanzen. Immunologische Faktoren ermöglichen die Ausbildung eines immunprivilegierten Raumes im Auge (Ishida et al. 2003; Streilein et al. 2002). Wachstumsfaktoren wie PEDF (Pigment Epithelium-Derived Factor) (Patricia Becerra et al. 2004; Steele et al. 1993) und VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (Blaauwgeers et al. 1999) sind zur Aufrechterhaltung der Integrität von Retina und Choriocapillaris von essenzieller Bedeutung.

Viele Funktionen des retinalen Pigmentepithels werden über Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentration reguliert (Wimmers et al. 2007).

## 1.2 Calcium - ein universeller Botenstoff

Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) kommt als chemisches Element der Erdalkalimetall-Kategorie ubiquitär in menschlichen Zellen vor und ist in seiner Funktion als universeller Botenstoff für die Regulation verschiedenster zellulärer Funktionen von essenzieller Bedeutung. Aufgrund einer hohen Affinität führen Calciumionen nach Bindung an Proteinen zu einer Veränderung der Konformation, wodurch Proteinfunktionen moduliert werden können (Carafoli 2005a, 2005b). Im retinalen Pigmentepithel zählen grundlegende Funktionen wie Dunkeladaptation der Photorezeptoren, Phagozytose, transepithelialer Transport von Wasser und Ionen, Sekretion und Zelldifferenzierung zu den calciumregulierten Zellfunktionen (Wimmers et al. 2007). Calciumionen können dabei durch Interaktion mit Rezeptoren der Plasmamembran als primärer Botenstoff fungieren oder sie dienen, eingebunden in intrazelluläre Signalwege, als sekundärer Botenstoff, um Informationen zu intrazellulären Zielen weiterzuleiten (Carafoli und Krebs 2016). In der Funktion als Botenstoff weist Calcium ambivalente Eigenschaften auf. Während Calcium einerseits für die korrekte Aufrechterhaltung physiologischer Zellfunktionalität unabdingbar ist, so kann Calcium in hohen Konzentrationen andererseits schwere Zeldysfunktionen auslösen oder gar Apoptose induzieren (Carafoli 2005a; Carafoli und Krebs 2016). Darüber hinaus unterliegt die Botenstofffunktion einer gewissen Autoregulation, so wird beispielsweise die Menge und Verteilung der Calciumionen innerhalb einer Zelle wiederum durch Calcium reguliert (Carafoli 2005a). Diese Diversität des Calciums erfordert eine enge Kontrolle der Calciumhomöostase, hierzu verfügen Zellen über verschiedene Calciumkanäle, Ionenpumpen oder Calcium-Transportproteine. In Ruhe beträgt die intrazelluläre Calciumkonzentration etwa 100nM (Berridge et al. 2000; Berridge et al. 2003), dem steht eine 10.000-fach höhere extrazelluläre Calciumkonzentration von 1-1,5mM entgegen, was zur Entstehung eines enormen elektrochemischen Calciumgradienten über der Plasmamembran führt (Berridge et al. 2000; Berridge et al. 2003; Carafoli und Krebs 2016). Unterschiedlichste Zellstimulationen führen zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration, es entstehen Calciumsignale. Die Vielseitigkeit dieser spezifischen Signale resultiert aus der Variation von Amplitude sowie räumlicher und zeitlicher Verteilung der Calciumionen im Zytosol (Berridge et al. 2000). Das zur Generierung der Signale benötigte Calcium kann entweder aus intrazellulären

Calciumspeichern freigesetzt werden oder über die Plasmamembran aus dem Extrazellulärraum in die Zelle einströmen (Berridge et al. 2000). Neben Mitochondrien, endoplasmatischem Retikulum und sauren Endosomen dienen in RPE-Zellen Melanosomen als intrazelluläre Calciumspeicher, welche große Mengen an Calcium aufnehmen können (Wimmers et al. 2007). Zytosolische Proteine, wie beispielsweise Calretinin, Calbindin und Parvalbumin, können zudem bedarfsweise  $\text{Ca}^{2+}$  binden respektive freisetzen und dienen damit als Calcium-Puffer (Berridge et al. 2000; Ikura 1996).

Calciumionen können entgegen dem Calciumgradienten aus der Zelle in den Extrazellulärraum extrudiert werden. Diese Aufgabe erfolgt im Wesentlichen über die membranständigen  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) und Calcium-ATPasen (Plasma Membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase; PMCA). NCX transportiert hierbei ein Calciumion aus der Zelle heraus, während 3 Natriumionen entlang ihres Gradienten in die Zelle einströmen. Im Gegensatz dazu erfolgt der Transport der Calciumionen in das extrazelluläre Kompartiment durch die PMCA aktiv unter Hydrolyse von ATP (Clapham 2007). Auch die Aufnahme von Calciumionen in intrazelluläre Speicher erfolgt über eine ATPase, die Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums (Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase; SERCA) (Carafoli 2005a; Clapham 2007).

Die Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern erfolgt zum Beispiel durch Aktivierung speichermembranständiger Inositol-1,4,5-Trisphosphat-Rezeptoren ( $\text{IP}_3$ -Rezeptoren) und Ryanodin-Rezeptoren (Santulli und Marks 2015).  $\text{IP}_3$ -Rezeptoren werden auf der Oberfläche des endoplasmatischen Retikulums exprimiert. Die Stimulation von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren oder Tyrosinkinase-Rezeptoren führt zu einer Aktivierung der Phospholipase C, dieses bewirkt eine Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $\text{PIP}_2$ ) in Inositoltrisphosphat ( $\text{IP}_3$ ) und Diacylglycerol (DAG).  $\text{IP}_3$  führt zu einer Aktivierung des  $\text{IP}_3$ -Rezeptors mit konsekutiver Calciumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum (Clapham 2007). Ryanodinrezeptoren befinden sich in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums. Neben zyklischer ADP-Ribose und Koffein können auch erhöhte zytosolische Calciumkonzentrationen eine Aktivierung dieses Rezeptors und damit eine Calciumfreisetzung aus dem

sarkoplasmatischen Retikulum bewirken. Dieser Mechanismus wird als calciuminduzierte Calciumfreisetzung bezeichnet (Calcium-Induced Calcium Release; CICR) (Ozawa 2010).

Zur Regulation des Calciumeinstromes aus dem Extrazellulärraum stehen der Zelle verschiedene membranständige calciumpermeable Kanäle zur Verfügung. Anhand des Aktivierungsmechanismus lassen sich diese in spannungs-, liganden-, rezeptor- und speichergesteuerte Kanäle unterteilen (Berridge et al. 2003; Carafoli 2005a). Eine weitere Charakterisierung erfolgt anhand der Ionenleitfähigkeit der Kanäle, so werden selektive von nicht-selektiven Calciumkanälen unterschieden, wobei letztgenannte Kanäle neben einer Calciumleitfähigkeit auch eine Permeabilität für  $K^+$ - oder  $Na^+$ - Ionen besitzen. Spannungsgesteuerte Ionenkanäle öffnen und schließen in Abhängigkeit des Membranpotentials und kommen typischerweise in erregbaren Zellen wie beispielsweise am Herzen oder in Neuronen vor (Carafoli 2005a). Anhand ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften erfolgt die Einteilung dieser Kanäle in die L-, N-, T-, P/Q- und R-Subtypen (Carafoli 2005a; Wimmers et al. 2007), denen allen ein tetramerer Aufbau aus porenformender  $\alpha 1$ -,  $\alpha 2$ - $\delta$ ,  $\beta$ - und  $\gamma$ - Untereinheit gemeinsam ist (Carafoli 2005a). Im retinalen Pigmentepithel konnten bereits spannungsgesteuerte Ionenkanäle vom L- und T-Typ identifiziert werden (Rosenthal und Strauss 2002; Wimmers et al. 2008). Ligandengesteuerte Ionenkanäle werden durch Bindung eines Liganden am Ionenkanal aktiviert. Ein Vertreter dieser Gruppe, der ATP-aktivierte Ionenkanal vom Typ P2X7, erlangte durch seine Beteiligung in Signalkaskaden zur Auslösung der Apoptose in RPE-Zellen besondere Aufmerksamkeit und stellt damit Schlüsselfaktor und therapeutisches Ziel in der Therapie retinaler Degenerationserkrankungen, wie der altersbedingten Makuladegeneration, dar (Reichenbach und Bringmann 2016; Yang et al. 2011). Erfolgt die Aktivierung eines Kanals hingegen durch einen sekundären Botenstoff, der infolge einer Rezeptorstimulation freigesetzt wurde, so wird dieser Kanaltyp als rezeptorgesteuert bezeichnet. Im Falle der speichergesteuerten Ionenkanäle erfolgt die Aktivierung dieser durch Freisetzung von Calciumionen aus intrazellulären Calciumspeichern (Berridge et al. 2000; Parekh und Putney 2005). Entscheidend hierbei ist die Interaktion zwischen zwei Proteinen, STIM-1 (Stromal Interacting Molecule-1) und Orai. STIM-1 wird in der

Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) exprimiert, ein calciumsensitiver Teil, welcher in das Lumen des ER ragt, dient hierbei als Calciumsensor. Ein Abfall der endoluminalen Calciumkonzentration im ER bewirkt eine Konformationsänderung des STIM-1, wodurch eine Interaktion und damit Aktivierung von Orai-Kanälen erfolgt, welche in der Plasmamembran exprimiert werden (Carafoli und Krebs 2016). Dieser sogenannte SOCE-Mechanismus (Store-Operated Calcium Entry) konnte nach Detektion von STIM-1 und Orai auch in RPE-Zellen nachvollzogen werden (Cordeiro und Strauss 2011).

Im Gegensatz zu diesen klar umschriebenen Mechanismen zur Kanalöffnung gibt es auch Ionenkanäle, die einer multimodalen Aktivierung durch verschiedene Stimuli, beispielsweise Temperatur, mechanische Reize, pH, Second Messenger oder Osmolarität, unterliegen (Berridge et al. 2003; Venkatachalam und Montell 2007). Viele dieser Ionenkanäle gehören der umfassenden Familie der TRP (Transient Receptor Potential Channels) an, welche in dieser Arbeit näher untersucht werden.

### **1.3 Transient Receptor Potential Channels (TRP)**

Transient Receptor Potential Channels (TRP) wurden zum ersten Mal bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* beschrieben. Cosens und Manning entdeckten 1969 bei der Untersuchung des visuellen Systems der *Drosophila melanogaster* eine Mutante, die im Elektroretinogramm (ERG) nach Lichtreizexposition im Gegensatz zum Wildtyp anstelle persistierender elektrischer Potentiale transiente Ströme aufwies (Cosens und Manning 1969). Jahre später gelang die Klonierung des verantwortlichen Gens, das Genprodukt stellte sich als Transmembranprotein dar (Montell und Rubin 1989). Derzeit konnten in Säugetieren 28 TRP identifiziert werden, zusammen bilden sie die TRP-Superfamilie, deren Mitglieder sich anhand ihrer Aminosäuresequenzen in die sechs Untergruppen TRPC (Classical/Canonical), TRPV (Vanilloid), TRPM (Melastatin), TRPA (Ankyrin), TRPP (Polycystin) und TRPML (Mucolipin) einteilen lassen (Clapham et al. 2005; Ramsey et al. 2006; Samanta et al. 2018). Eine weitere Gruppe, die Gruppe der TRPN (No Mechanoreceptor Potential C), kommt nur außerhalb der Klasse der Säugetiere bei Wirbeltieren vor, der einzige Vertreter TRPN1 wurde in Zebrafischen identifiziert (Nilius und Owsianik 2011).

Alle TRP weisen 6 Transmembrandomänen (S1-S6), zytosolisch gelegene N- und C-Termini und eine Kationenpermeabilität auf (Wu et al. 2010), jedoch unterscheiden sie sich hinsichtlich des Aktivierungsmechanismus und der Ionenselektivität voneinander (Venkatachalam und Montell 2007). Diese nicht-selektiven Kationenkanäle sind überwiegend in der Plasmamembran lokalisiert, einige von ihnen stellen als Calciumkanal einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Eintrittsweg in die Zelle dar (Nilius und Owsianik 2011; Nilius und Szallasi 2014). TRP-Kanäle sind aber auch als intrazelluläre Ionenkanäle auf den Membranen verschiedener Zellorganellen, wie Lysosomen, Endosomen, endoplasmatischem Retikulum und dem Golgi-Apparat zu finden und können an der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern beteiligt sein (Gees et al. 2012). TRP-Kanäle werden in einer Vielzahl verschiedener Gewebe exprimiert, deren Aktivierung polymodal durch eine Vielzahl chemischer und physischer Stimuli (Spannung, Temperatur, Druck, Zug, pH, Osmolarität), aber auch durch Second Messenger, Liganden, G-Proteine oder durch Calciumfreisetzung im Rahmen von intrazellulären Signalkaskaden erfolgt (Nilius und Szallasi 2014; Ramsey et al. 2006; Wimmers et al. 2007). Entsprechend sind TRP-Kanäle in verschiedene sensorische Prozesse (Wahrnehmung von Schmerz, Geschmack, Temperatur, Pheromonen), aber auch in motorische Prozesse (Vasoregulation, Muskelkontraktion) eingebunden (Nilius und Owsianik 2011). Während bei vielen TRP die genaue physiologische Funktion noch unbekannt ist, konnten einige Defekte TRP-codierender Gene Krankheitsbildern zugeordnet werden (TRP Channelopathies) (Nilius und Owsianik 2010). In der Literatur finden sich Angaben zur Expression der TRP-Kanäle C1, C4 und C7, TRPV1-6 sowie TRPM1, M3 und M7 in humanen RPE-Zellen (Bollimuntha et al. 2005; Cordeiro et al. 2010; Kennedy et al. 2010; Wimmers und Strauss 2007; Zhao et al. 2015), diese Kanaltypen werden folgend näher betrachtet.

### **1.3.1 TRPC (Classical/Canonical)**

Die TRP-Kanäle vom C-Typ sind denen der *Drosophila* am ähnlichsten, weshalb sie den Namen der „klassischen“ TRP tragen. Anhand von Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz können 7 Mitglieder der TRPC-Familie in 4 Unterfamilien eingeteilt werden: TRPC1, TRPC2, TRPC3/6/7 und TRPC4/5 (Clapham et al. 2001). TRPC2 kommt im Menschen lediglich als Pseudogen vor und wird nicht exprimiert (Nilius und Szallasi 2014; Wang et al. 2020). Auf molekularer Ebene

besitzen alle TRPC-Kanäle eine porenbildende Region zwischen der 5. und 6. Transmembrandomäne, 3-4 Ankyrin-Wiederholungen am N-Terminus und eine TRP-Domäne am C-Terminus (Nilius und Szallasi 2014; Venkatachalam und Montell 2007). TRPC-Kanäle sind nicht-selektive Kationenkanäle, die sich bezüglich der  $\text{Ca}^{2+}$ - respektive der  $\text{Na}^{+}$ -Permeabilität voneinander unterscheiden (Liu et al. 2020; Wang et al. 2020). Die Aktivierung dieser Kanäle erfolgt über Phospholipase C infolge einer Ligandenbindung an G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, verschiedene Lipide wie DAG modulieren die Kanalaktivität oder die Insertionsrate der Kanäle in der Plasmamembran (Nilius und Szallasi 2014). Die Option der TRPC als speichergesteuerte Kanäle wird bis heute kontrovers diskutiert.

#### **1.3.1.1 TRPC1**

TRPC1 war das erste TRP-Gen, das bei Säugetieren beschrieben wurde (Nilius und Szallasi 2014). TRPC1 bildet Heterotetramere mit anderen TRPC-Mitgliedern, aber auch mit Mitgliedern anderer Unterfamilien, wie TRPV4 oder TRPP2 (Dietrich et al. 2014; Nilius und Szallasi 2014). Funktionelle TRPC1-Homotetramere wurden bislang nicht beschrieben (Storch et al. 2012). TRPC1 wird in diversen Geweben exprimiert, eine hohe Expressionsrate findet sich in Geweben von Herz, Gehirn, Hoden und Ovarien (Dietrich et al. 2014; Montell et al. 2002).

#### **1.3.1.2 TRPC4**

TRPC4 stellt ein Homolog von TRPC5 dar und wird in diversen Geweben, beispielsweise im Endothel, glatter Muskulatur, Gehirn, Niere und dem Intestinum exprimiert (Nilius und Szallasi 2014). TRPC4 bildet Homotetramere, ebenso wie Heterotetramere mit TRPC1, C3, C5 und C6, deren Aktivierung im Wesentlichen durch den  $G_{q/11}$ -Protein-vermittelten Signalweg erfolgt, die Option der speichergesteuerten Aktivierung von TRPC4 ist Gegenstand aktueller Diskussion (Mederos Y Schnitzler et al. 2018).

#### **1.3.1.3 TRPC7**

TRPC7 teilt eine Sequenzhomologie von 81% mit TRPC3 und 75% mit TRPC6. TRPC7 bildet Homotetramere, aber auch Heterotetramere mit TRPC1, C3 und C6 (Nilius und Szallasi 2014). Dieser Kanal wird in diversen Geweben exprimiert, hierzu zählen Gewebe im Auge, Gehirn, Herz, Intestinum, Lunge und der Niere

(Nilius und Szallasi 2014). Die Aktivierung von TRPC7 erfolgt hauptsächlich durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, DAG und PIP<sub>2</sub> wirken dabei als direkte Modulatoren der TRPC7-Aktivität (Zhang et al. 2016). Über die funktionellen Eigenschaften von TRPC7 ist bis dato nicht viel bekannt.

#### **1.3.1.4 TRPC in humanen RPE-Zellen**

In 2005 beschrieben Bollimuntha et al. die Expression von TRPC1 in der humanen RPE-Zelllinie ARPE-19, welche Hinweise auf eine Protein-Protein-Interaktion mit zytoskelettalen  $\beta$ -Tubulinen aufzeigten (Bollimuntha et al. 2005). Wimmers und Strauss konnten eine Expression von TRPC1, C4 und C7 in frisch isolierten hRPE-Zellen und in Zellen der humanen Zelllinie ARPE-19 detektieren, funktionell zeigte sich eine Relevanz für die Aufrechterhaltung des Membranpotentials und den basalen Calciumeinstrom aus dem extrazellulären Kompartiment (Wimmers und Strauss 2007). Zhao et al. beschrieben eine Expression von TRPC4 in fetalen humanen RPE-Zellen, nähere Angaben zur funktionellen Rolle wurden nicht gemacht (Zhao et al. 2015).

#### **1.3.2 TRPV (Vanilloid)**

Der Familienname der TRPV resultierte aus der Beschreibung des ersten Vertreters dieser Gruppe, der durch das Vanilloid Capsaicin aktiviert werden kann (Caterina et al. 1997). Dieser initial als VR1 oder Capsaicin-Rezeptor benannte Kanal entspricht nach heutiger Nomenklatur dem TRPV1 (Nilius und Owsianik 2011; Samanta et al. 2018). Die TRPV-Familie besteht aus 6 Mitgliedern, TRPV1-6, die anhand struktureller und funktioneller Eigenschaften in vier Gruppen TRPV1/2, TRPV3, TRPV4 und TRPV5/6 eingeteilt werden können (Nilius und Szallasi 2014). Die Mitglieder dieser Familie bilden Tetramere, charakteristisch sind sechs Ankyrin-Wiederholungen am N-Terminus und eine C-terminale TRP-Box (Nilius und Szallasi 2014). Während TRPV1-4 nicht-selektive Kationenkanäle darstellen, besitzen TRPV5 und V6 eine ausgeprägte Selektivität für Ca<sup>2+</sup>-Ionen (Nilius und Szallasi 2014; Samanta et al. 2018). TRPV-Kanäle weisen polymodale Aktivierungsmechanismen auf und besitzen komplexe pharmakologische Eigenschaften, als hochselektiver Agonist führt Capsaicin beispielsweise zu einer Aktivierung von TRPV1, während der nicht-selektive Agonist 2-APB (2-Aminoethoxydiphenylborat) zu einer Aktivierung von TRPV1-3 führt (Nilius und Szallasi 2014; Vriens et al. 2009). TRPV1-4 gehören zudem zu den



thermosensitiven TRP-Kanälen, deren Aktivierung durch warme respektive noxische Temperaturen erfolgt (Uchida et al. 2017; Wang 2017).

### **1.3.2.1 TRPV1/TRPV2**

TRPV1 wird in verschiedenen nicht-neuronalen Geweben, insbesondere jedoch in sensorischen Neuronen exprimiert (Nilius und Szallasi 2014; So et al. 2020). Die Aktivierung erfolgt polymodal durch Capsaicin, Protonen, verschiedene Toxine, Endocannabinoide sowie Temperaturen im noxischen Bereich  $>42^{\circ}\text{C}$ , wodurch TRPV1 eine wichtige Rolle in der chemischen und thermischen Schmerzwahrnehmung einnimmt (Nilius und Szallasi 2014; Samanta et al. 2018; So et al. 2020). TRPV2 und TRPV1 besitzen eine Sequenzhomologie von 50% (Nilius und Szallasi 2014). TRPV2 wird in diversen neuronalen und nicht-neuronalen Geweben exprimiert. Wie TRPV1 wird TRPV2 durch Temperaturen im noxischen Bereich aktiviert, wobei der Temperaturbereich mit  $>52^{\circ}\text{C}$  deutlich über dem des TRPV1 liegt (Samanta et al. 2018; So et al. 2020). Weitere Aktivatoren sind 2-APB, Probenecid, Cannabidiol und Tetrahydrocannabinol (Hastrate et al. 2020; Nilius und Szallasi 2014; Vriens et al. 2009). Nagasawa und Kojima beschrieben eine Aktivierung von TRPV2 durch mechanischen Stress (Nagasawa und Kojima 2015). Über die Regulationsmechanismen von TRPV2 ist noch nicht viel bekannt, es wird angenommen, dass Wachstumsfaktoren wie IGF-1 (Insulin-Like Growth Factor 1) die Insertion von TRPV2 in der Plasmamembran triggern und dadurch die TRPV2-Aktivität regulieren (Nilius und Szallasi 2014).

### **1.3.2.2 TRPV3**

TRPV3 ist ebenfalls thermosensitiv, jedoch unempfindlich für Capsaicin (Smith et al. 2002). Der Temperaturbereich zur Aktivierung von TRPV3 liegt im Gegensatz zu TRPV1 und V2 im physiologischen Bereich bei  $33-39^{\circ}\text{C}$  (Hastrate et al. 2020). Darüber hinaus werden verschiedene endo- und exogene Agonisten wie 2-APB, Camphor, Carvacol und Eugenol als Aktivatoren beschrieben (Hastrate et al. 2020; Nilius und Szallasi 2014; So et al. 2020). TRPV3 wird in diversen Geweben, insbesondere jedoch in Hautepithelzellen, der Mundhöhle und im Gastrointestinaltrakt exprimiert (Samanta et al. 2018).

### 1.3.2.3 TRPV4

Eine hohe Expressionsrate von TRPV4 findet sich in Geweben des peripheren und zentralen Nervensystems, aber auch eine Expression in diversen nicht-neuronalen Zellen wird beschrieben (Nilius und Szallasi 2014). TRPV4 wird als thermosensitiver Kanal durch moderate Temperaturen  $>24^{\circ}\text{C}$  aktiviert, darüber hinaus wird eine Sensitivität für osmotische und mechanische Reize beschrieben (Nilius und Szallasi 2014; Rosenbaum et al. 2020; Vriens et al. 2009).

### 1.3.2.4 TRPV5/TRPV6

TRPV5 und V6 unterscheiden sich durch eine ausgeprägte  $\text{Ca}^{2+}$ -Selektivität von den anderen Mitgliedern dieser Familie, wodurch sie eine wichtige Rolle in der Regulation der Calciumhomöostase einnehmen. TRPV5 und V6 besitzen eine Sequenzhomologie von etwa 75% (Samanta et al. 2018). Expressionsstudien mit Knockout-Mäusen zeigten, dass TRPV5 und V6 eine wichtige Rolle für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme in epithelialen Zellen sowie bei der intestinalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Absorption und der  $\text{Ca}^{2+}$ -Reabsorption in der Niere einnehmen (So et al. 2020).

### 1.3.2.5 TRPV in humanen RPE-Zellen

In Vorarbeiten zu dieser Arbeit konnten wir die temperatursensitiven TRPV1, V2, V3 und V4 in hRPE- und ARPE-19-Zellen identifizieren, TRPV2 erwies sich in diesem Zusammenhang als Schlüsselfaktor für die Sekretion des Wachstumsfaktors VEGF-A (Cordeiro et al. 2010). Im selben Jahr beschrieben Kennedy et al. die  $\text{Ca}^{2+}$ -selektiven Kanäle TRPV5 und V6 als funktionell aktive Proteine in nativen und kultivierten humanen RPE-Zellen (Kennedy et al. 2010). An Zellen der humanen RPE-Linie ARPE-19 zeigten Reichhart et al. 2015, dass Aktivität und Oberflächenexpression von TRPV2 durch IGF-1 und Cannabidiol (CBD) reguliert werden (Reichhart et al. 2015). Zhao et al. detektierten TRPV4 in der apikalen Plasmamembran von fetalen humanen RPE-Zellen (Zhao et al. 2015). Arredondo Zamarripa et al. beschrieben eine TRPV4-Expression in ARPE-19-Zellen, welche eine Relevanz für die Regulation der Gefäßpermeabilität und die Aufrechterhaltung der Blut-Retina-Schranke zeigten (Arredondo Zamarripa et al. 2017).

### 1.3.3 TRPM (Melastatin)

Die 8 Mitglieder der TRPM-Familie lassen sich anhand von Sequenzhomologien in 4 Untergruppen einteilen: TRPM1/3, TRPM2/8, TRPM4/5 und TRPM6/7 (Huang et al. 2020). Benannt wurde die Gruppe nach dem ersten Vertreter TRPM1 (Melastatin-1), dessen Expressionsrate mit der Tendenz zur Metastasierung von Melanomen korreliert (Duncan et al. 1998). Alle TRPM-Kanäle weisen lange zytosolische Termini, eine charakteristische TRPM-Homologiedomäne am N-Terminus und eine TRP-Domäne am C-Terminus auf (Huang et al. 2020; Venkatachalam und Montell 2007). Die einzelnen Mitglieder dieser Familie unterscheiden sich bezüglich des Aktivierungsmechanismus und der Kationenselektivität, funktionell konnte unter anderem eine Beteiligung an Temperatur- und Geschmackswahrnehmung sowie der Regulation der  $Mg^{2+}$ -Homöostase nachgewiesen werden (Samanta et al. 2018). TRPM-Kanäle sind nicht-selektive  $Ca^{2+}$ -permeable Kationenkanäle, ausgenommen hiervon sind TRPM4 und M5, welche keine  $Ca^{2+}$ -Leitfähigkeit besitzen (Kraft und Harteneck 2005).

#### 1.3.3.1 TRPM1

Aufgrund der Korrelation zwischen der TRPM1-Expression und der Metastasierungstendenz von Melanomen wird TRPM1 als Tumormarker eingesetzt (Miller et al. 2004). Im Auge wird TRPM1 in ON-Bipolarzellen der Retina exprimiert, hier erfolgt eine Regulation der Aktivität des Kanals durch metabotrope Glutamatrezeptoren (Nilius und Szallasi 2014). Die Bindung von Glutamat am metabotropen Glutamatrezeptor führt bei Dunkelheit zu einer Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, was zu einer Hemmung der TRPM1-Aktivität führt. In der Umkehr führt Belichtung zur Öffnung des Kanals (Shen et al. 2012). Mutationen im TRPM1-codierenden Gen sind beim Menschen mit der kongenitalen stationären Nachtblindheit assoziiert (van Genderen et al. 2009).

#### 1.3.3.2 TRPM3

TRPM3 kommt durch alternatives Spleißen in verschiedenen Isoformen, sowohl als Homotetramer oder als Heterotetramer im Komplex mit TRPM1, vor (Held et al. 2015). Verschiedene Stimuli wie Zellschwellung und Hitze (40°C) führen zu einer Aktivierung des Kanals, als molekulare Aktivatoren wurden Sphingolipide, Pregnenolon-Sulfat und Nifedipin beschrieben (Held et al. 2015). Eine Korrelation

zwischen Mutationen im TRPM3-Gen und dem Auftreten von erblich-bedingtem Glaukom und Katarakt konnte nachvollzogen werden (Bennett et al. 2014).

### **1.3.3.3 TRPM7**

TRPM7-Kanäle sind bifunktionelle Proteine, neben der Funktion als Kationenkanal besitzt TRPM7 eine funktionelle enzymatische Domäne am C-Terminus (Kraft und Harteneck 2005). In der Funktion als Kationenkanal besitzt TRPM7 eine Permeabilität für die divalenten Ionen  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  und ist von besonderer Bedeutung für die Regulation der  $Mg^{2+}$ -Homöostase (Samanta et al. 2018). TRPM7 wird ubiquitär in menschlichen Geweben exprimiert (Huang et al. 2020).

### **1.3.3.4 TRPM in humanen RPE-Zellen**

Zhao et al. detektierten die Expression von TRPM1, M3 und M7 in humanen fetalen RPE-Zellen, TRPM3 konnte apikal an Tight-Junctions und basisnah an Primärzilien lokalisiert werden, nähere Angaben zur funktionellen Rolle werden nicht gemacht (Zhao et al. 2015).

Viele TRP-Kanäle besitzen eine Permeabilität für Calcium, einige dieser Vertreter werden in humanen RPE-Zellen exprimiert. Es kann angenommen werden, dass TRP-Kanäle eine essenzielle Rolle in der Regulation der Calcium-Homöostase retinaler Pigmentepithelzellen übernehmen. Im visuellen System bilden RPE und Retina eine funktionelle Einheit, in der diverse Zellfunktionen über Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentration reguliert werden. Calcium und Calciumkanäle sind für die Aufrechterhaltung der funktionellen Integrität des RPE von essenzieller Bedeutung. Kompromittierungen von RPE-Funktionen können schwere Erkrankungen zur Folge haben. Hier ist insbesondere die altersbedingte Makuladegeneration (AMD) zu nennen, die Hauptursache für Erblindung in den westlichen Industrienationen, von der weltweit zwischen 30-50 Millionen Menschen betroffen sind (Colijn et al. 2017).

## 1.4 Die altersbedingte Makuladegeneration

### 1.4.1 Einleitung

Die altersbedingte Makuladegeneration (AMD) stellt in den westlichen Industrienationen die häufigste Ursache von Erblindungen dar (Klein et al. 1992; Vingerling et al. 1995; Williams 1998). Das Erkrankungsrisiko steigt dabei mit zunehmendem Lebensalter, ca. 25% der Achtzigjährigen in der Bevölkerung weisen spezifische Anzeichen einer AMD auf (Friedman et al. 2004). Die Ursache der Entstehung der AMD ist multifaktoriell. Das Hauptaugenmerk liegt hierbei auf der genetischen Prädisposition, Umweltfaktoren scheinen den Verlauf der Erkrankung maßgeblich zu modulieren (Seddon et al. 2005). Im Laufe der Zeit konnten verschiedene Genvarianten detektiert werden, die mit einer Erhöhung des AMD-Erkrankungsrisikos einhergehen. Dem Komplementfaktor H (CFH-Gen) beispielsweise wird eine Schlüsselrolle in der Regulation des alternativen Komplementsystems der unspezifischen Immunabwehr beigemessen, es konnte gezeigt werden, dass eine Mutation im CFH-Gen (Aminosäureaustausch an Position 402) mit einer signifikanten Erhöhung des AMD-Erkrankungsrisikos korreliert (Jabbarpoor Bonyadi et al. 2018). Aber auch das AMD-Susceptibility Gene 2 (ARMS2), das HtrA Serine Peptidase 1 Gene (HTRA1) und das ABCA1-Gen, relevant für den Cholesterin- und Phospholipidtransport, konnten als genetische prädisponierende Faktoren zur Entstehung einer AMD identifiziert werden (Matušková et al. 2020; Ratnapriya und Chew 2013; Wang et al. 2016). Darüber hinaus gilt Rauchen (Erhöhung von oxidativem Stress bei Kompromittierung der Mikrozirkulation) als erheblicher Risikofaktor (Khan et al. 2006), ein fototoxischer Effekt durch vermehrte Lichtbelastung wird als modulierender Faktor diskutiert (Marquioni-Ramella und Suburo 2015). Zudem konnte ein Zusammenhang zwischen abdomineller Fettleibigkeit und einer Risikoerhöhung zur Krankheitsprogression festgestellt werden (Seddon et al. 2003).

Die AMD lässt sich in eine trockene und eine feuchte (exsudative) Form einteilen. Während die trockene Form der AMD im fortgeschrittenen Stadium durch eine Atrophie von RPE und sensorischer Netzhaut gekennzeichnet wird, stehen bei der feuchten Form eine pathologische Gefäßneubildung (chorioidale

Neovaskularisation; CNV) mit subretinaler Exsudation bzw. Einblutungen und RPE-Abhebungen im Vordergrund.

Auf pathophysiologischer Ebene wird die AMD durch degenerative Veränderungen der äußeren Netzhaut und der Photorezeptoren, des retinalen Pigmentepithels, der Choriokapillaris und der Bruch-Membran charakterisiert. Mit fortschreitendem Alterungsprozess kommt es zu einer degenerativen Verdickung der Bruch-Membran durch kalk- und lipidhaltige Ablagerungen. Diese Verdickung führt zu einer konsekutiven Abnahme der Elastizität und der Wasserleitfähigkeit der Bruch-Membran, wodurch Stoffwechselprozesse behindert werden. Dieses betrifft insbesondere den Abtransport von Metaboliten phagozytierter Photorezeptoraußensegmente in Richtung der Choriokapillaris. Die Kumulation dieser Metabolite führt zur Entstehung einer Diffusionsbarriere, wodurch wiederum der Abbau von Proteinen, Lipiden und Lipofuszin kompromittiert wird (Grehn 2012; Schargus 2015). Diese klinisch sichtbaren Ablagerungen werden Drusen genannt, wobei zwischen kleinen ( $<63\mu\text{m}$ ), mittelgroßen ( $>63\mu\text{m}$  und  $\leq 125\mu\text{m}$ ) und großen Drusen ( $>125\mu\text{m}$ ) differenziert wird. Große Drusen können aus mittelgroßen und mittelgroße aus kleinen Drusen hervorgehen. Große Drusen können bereits singulär zu einer Metamorphopsie führen, darüber hinaus stellen mittelgroße und große Drusen im Allgemeinen einen Risikofaktor zur Entwicklung einer fortgeschrittenen Form der AMD mit Abhebung des RPE oder einer CNV dar (Schargus 2015).

Die Klassifikation nach Ferris et al. lässt anhand funduskopischer Netzhautveränderungen (Netzhautveränderungen im Areal von 2 Papillendurchmessern um die Fovea) - neben der klassischen Einteilung der AMD in eine trockene und eine feuchte Form - eine Differenzierung in Früh-, Intermediär- und Spätstadium zu. Dabei werden die Größe der Drusen sowie Pigmentveränderungen berücksichtigt. Das Vorliegen mittelgroßer und großer Drusen in Kombination mit Hyper- oder Hypopigmentierungen werden dabei als AMD-typische Pigmentveränderungen definiert (Ferris et al. 2013).

<b>AMD Klassifikation</b>	<b>Definition</b>
Keine altersbedingten Veränderungen	Keine Drusen; keine AMD-typischen Veränderungen
Normale altersbedingte Veränderungen	Kleine Drusen (<63µm); keine AMD-typischen Veränderungen
Frühe AMD	Mittelgroße Drusen (>63µm und ≤125µm); keine AMD-typischen Veränderungen
Intermediäre AMD	Große Drusen (>125µm) und/oder AMD-typischen Veränderungen
Späte AMD	Chorioidale Neovaskularisation und/oder geographische Atrophie

Tab 1.1: Klinische Einteilung der altersbedingten Makuladegeneration nach Ferris et al. (Ferris et al. 2013).

Das Spätstadium der trockenen AMD ist durch das Auftreten einer geographischen Atrophie gekennzeichnet. Es wird angenommen, dass die Verkalkung und Regression von Drusen zu einer Ernährungsstörung des RPE und damit zum Untergang dieser Zellen führt (Strachwitz 2013). Die exsudative Form der späten AMD wird durch das Auftreten einer CNV in Addition zu den Merkmalen der frühen und intermediären AMD sowie durch eine rasche Progredienz charakterisiert (Schargus 2015). Obwohl eine CNV bei nur 10-20% der AMD-Erkrankten festgestellt wird, so ist diese jedoch für 90% der Erblindungen im Sinne des Gesetzgebers verantwortlich (Bressler et al. 1988; Votruba und Gregor 2001). Auf histopathologischer Ebene kommt es von der Chorioidea ausgehend zum pathologischen Einsprießen neu gebildeter Gefäße durch die Bruch-Membran in den subretinalen Raum (klassische CNV) respektive unter das RPE (okkulte CNV) (Grehn 2019; van Lookeren Campagne et al. 2014). Es wird angenommen, dass Schäden an RPE-Zellen und die damit verbundenen Immunantworten als Stimulus für die Bildung pro-angiogenetischer Faktoren dienen, aber auch degenerative Veränderungen chorioidaler Gefäße werden als plausible Ursache für eine pathologische Gefäßneubildung angesehen (Ambati und Fowler 2012; van Lookeren Campagne et al. 2014). Bei Säugetieren wird die Angiogenese im Wesentlichen durch Signalmoleküle der Gruppe der vaskulären endothelialen

Wachstumsfaktoren (VEGF) reguliert. Die Gruppe dieser Wachstumsfaktoren wird aus den fünf Mitgliedern VEGF-A, -B, -C, -D und dem humanen plazentaren Wachstumsfaktor (Placental Growth Factor; PIGF) gebildet. Dem VEGF-A wird bei der Entwicklung einer CNV eine Schlüsselrolle beigemessen (Frank 1997). Die Signaltransduktion erfolgt hierbei bei allen Mitgliedern über die Bindung an eine Tyrosinkinase, dem VEGF-Rezeptor (VEGFR), wobei drei Typen (VEGFR1-3) bekannt sind. Die Sekretion von Wachstumsfaktoren gehört, wie bereits in 1.1.3.2 dargelegt, zu den essenziellen Funktionen des RPE. Rosenthal et al. konnten 2007 aufzeigen, dass die VEGF-Sekretionsrate im RPE durch  $Ca^{2+}$ -Kanäle vom L-Typ reguliert wird (Rosenthal et al. 2007).

### **1.4.2 Therapie**

Da derzeit kein kurativer Therapieansatz zur Behandlung der AMD bekannt ist, stützen sich die Strategien auf Krankheitsprävention durch Ausschaltung von Risikofaktoren und Maßnahmen zur Krankheitsfrüherkennung sowie auf Therapieoptionen, die zu einer Verlangsamung der Krankheitsprogression bzw. zur Regression – bestenfalls unter Verbesserung der Sehfähigkeit – führen.

#### **1.4.2.1 AREDS-Medikation**

In einer großen randomisierten US-amerikanischen Studie des National Eye Institute, der Age-Related Eye Disease Study (AREDS), konnte gezeigt werden, dass die Einnahme hochdosierter Antioxidanzien (500mg Vitamin C, 400IE Vitamin E, 15mg beta-Carotin, 80mg Zink und 2mg Kupfer) die AMD-Progression aus dem intermediären in fortgeschrittenere Krankheitsstadien verringern kann (National Eye Institute 2001).

#### **1.4.2.2 Intravitreale Injektion von VEGF-Inhibitoren**

Als hocheffektive Therapiestrategie wurde 2006 im New England Journal of Medicine hingegen die intravitreale Injektion monoklonaler VEGF-Antikörper zur Behandlung der exsudativen AMD bezeichnet (Stone 2006). Diese Aussage basierte im Wesentlichen auf den Erkenntnissen zweier Studien, welche ebenfalls in selbiger Ausgabe des Journals vorgestellt wurden. In der MARINA Studie (multizentrisch, randomisiert) erhielten die Probanden monatlich intravitreale Injektionen des VEGF-Hemmers Ranibizumab oder Scheininjektionen (Sham Injection) (Rosenfeld et al. 2006). Während bei 95% der Patienten innerhalb der



Verum-Gruppe nach einem Jahr keine signifikante Visusverschlechterung festgestellt wurde, kam es bei 38% der Probanden in der Sham-Gruppe zu einer Verschlechterung der Sehschärfe. Bei etwa 30% der Probanden konnte in der Verum-Gruppe sogar eine Visusverbesserung beobachtet werden, welche in der Sham-Gruppe nur bei etwa 5% auftrat. Die MARINA Studie war die erste klinische randomisierte Studie, die eine signifikante Verbesserung der Sehfähigkeit nach anti-VEGF-Therapie demonstrieren konnte. In der ANCHOR-Studie (ebenfalls multizentrisch, randomisiert) wurden die Ergebnisse nach Injektion von Ranibizumab bzw. nach photodynamischer Therapie unter Verwendung von Verteporfin (s.u.) hinsichtlich der Visusveränderungen untersucht (Brown et al. 2006). Es konnte nach zweijähriger Beobachtungsdauer in der Gruppe der Probanden, die Ranibizumab erhielten, bei 95% keine Visusverschlechterung beobachtet werden. Ein signifikanter Unterschied konnte hingegen gegenüber den Therapieergebnissen der Verteporfin-Gruppe festgestellt werden, hier wurde bei 36% der Probanden eine relevante Verschlechterung des Sehvermögens festgestellt. Die Ergebnisse dieser Studien führten zur Etablierung der VEGF-A-Inhibition als derzeitigen Goldstandard zur Behandlung der exsudativen AMD.

Aktuell stehen zur VEGF-A-Inhibition drei Präparate zur Verfügung, wovon zwei unter anderem zur Behandlung der CNV in Deutschland zugelassen sind (BVA, DOG, RG 2018; Strauss 2016). Unterscheiden lassen sich diese Inhibitoren hinsichtlich des molekularen Aufbaus und ihrer Wirkungsweise. Anti-VEGF-A-Präparate können prinzipiell drei pharmakologischen Klassen zugeordnet werden, 1. Moleküle, die VEGF-Isoformen binden, 2. Moleküle, die VEGF-Rezeptoren inhibieren und 3. Moleküle, die den VEGF-induzierten Signalweg inhibieren (Amadio et al. 2016). Während es sich bei Ranibizumab (Lucentis®) um das antigenbindende Fragment eines rekombinierten monoklonalen VEGF-Antikörpers handelt, besteht das synthetische Molekül Aflibercept (Eylea®) als sogenanntes Fusionsprotein aus den extrazellulären Domänen der humanen VEGF-A-Rezeptoren VEGFR1 und VEGFR2 sowie dem Fc-Fragment des humanen IgG1 (BVA, DOG, RG 2018; Strauss 2016). Verschiedene Studien belegten zwar die Wirksamkeit von Bevacizumab (Avastin®), einem klassischen Antikörper der Immunglobulingruppe IgG1, jedoch erfolgte bislang keine

Zulassung zur CNV-Behandlung, weshalb dieses Präparat derzeit nur als Off-Label-Use in Studien Anwendung findet (BVA, DOG, RG 2018).

#### **1.4.2.3 Lasergestützte Verfahren**

Basierend auf der Erkenntnis, dass eine fortschreitende Netzhautablösung an einer Narbe sistiert, entwickelte Gerhard Rudolph Edmund Meyer-Schwickerath (\* 1920 in Elberfeld; † 1992 in Essen) Ende der 1940er Jahre eine Methode zur Induktion einer chorioretinalen Narbe. 1949 ließ er auf dem Dach der Augenklinik des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf einen selbst entwickelten Sonnenlicht-Koagulator installieren, dessen gebündelte Sonnenstrahlen über ein Spiegelsystem in den Operationssaal und in das Auge eines Patienten gelenkt wurden, wodurch die erste erfolgreiche Behandlung einer Netzhautablösung durch Lichtkoagulation gelang (Meyer-Schwickerath 1989). Im Rahmen der Weiterentwicklung dieser Lichtkoagulation wurde das Sonnenlicht durch verschiedene Lichtquellen ersetzt (Meyer-Schwickerath 1954). Seither hat sich die Netzhautkoagulation zu einer Standardprozedur beispielsweise zur Behandlung einer Netzhautablösung etabliert, die dafür benötigte Lichtenergie wird heutzutage durch Laser generiert.

Verschiedenartige Laser werden in der Augenheilkunde zu diagnostischen und therapeutischen Anwendungen eingesetzt, sie unterscheiden sich durch Wellenlänge (Ultraviolett, Grün-Rot-Spektrum, Infrarot), Energieabstrahlung und Gewebewechselwirkung (Grehn 2019). Dabei ist die Laserenergie bei diagnostischen Lasern entsprechend gering, so dass keine Schäden am Auge entstehen, therapeutische Laser hingegen sind durch eine sehr hohe Energiedichte gekennzeichnet, die eine Erwärmung, Koagulation oder Disruption im Zielgewebe bewirken können. Die Wirkung therapeutischer Laser ist zudem von der Größe des bestrahlten Areals (Spotsize), der Bestrahlungsdauer und der Applikationsform abhängig, hier wird eine kontinuierliche von einer gepulsten Applikation unterschieden (Framme et al. 2008). Therapeutische Laser finden u.a. zur Behandlung verschiedener Formen von Netzhauterkrankungen, zur Glaukom-Behandlung, zur Behandlung von Fehlsichtigkeit und im Rahmen verschiedener ästhetischer und chirurgischer Eingriffe am Auge Anwendung.

Zur Therapie der AMD wurden verschiedene lasergestützte Therapieformen erprobt. Allen gemeinsam ist eine Wärmeentwicklung im Bereich des RPE-Chorioidea-Komplexes, diese ist abhängig von verschiedenen Laserparametern (Wellenlänge, Spotgröße, Pulsdauer und Laserleistung). Aufgrund der deutlichen Überlegenheit der intravitrealen anti-VEGF-Therapie spielen lasergestützte Therapieformen in der Behandlung der AMD derzeit eine untergeordnete Rolle und finden nur in Einzelfällen Anwendung.

#### **1.4.2.3.1 Laserkoagulation bei chorioidaler Neovaskularisation**

Bei der Laserkoagulation wird Laserlicht in den hinteren Abschnitt des Auges eingestrahlt. In den pigmentierten Strukturen kommt es durch Absorption der Lichtenergie zu einer Wärmeentwicklung im RPE-Chorioidea-Komplex. Neben den Pigmenten Xanthophyll (Lutein und Zeaxanthin) und Hämoglobin ist Melanin, welches in den Melanosomen des RPE gespeichert wird, im Wesentlichen für diese Energiedeposition verantwortlich (Framme et al. 2008). Durch Wärmeleitung kommt es zu einer räumlichen Ausdehnung mit Bildung eines Temperaturfeldes. Ist die Expositionszeit lang genug, resultieren eine fokale thermische Denaturierung der Proteinstrukturen und konsekutiv Zellnekrosen (Framme et al. 2008). Im Rahmen der altersbedingten Makuladegeneration können hierdurch chorioidale Neovaskularisationen unter Verwendung eines Grün-Lasers verödet werden. Da diese unselektive Methode neben der Zerstörung der chorioidalen Gefäßmembranen auch die darüber liegenden retinalen Abschnitte betrifft, ist ein Einsatz nur in extrafoveal gelegenen Bereichen (mit einem fovealen Abstand von  $>200\mu\text{m}$ ) möglich, um eine Zerstörung von Sehzellen der Makula zu verhindern (Grehn 2019; Marshall und Mellerio 1967).

#### **1.4.2.3.2 Koagulation von Drusen**

Das Auftreten von Drusen im Rahmen der altersbedingten Makuladegeneration gilt als bedeutsamer Risikofaktor für die Entstehung einer chorioidalen Neovaskularisation. Verschiedene Autoren berichteten über eine Regression von Drusen nach durchgeführter konventioneller Lasertherapie (Sigelman 1991; Wetzig 1988), was zu der Annahme führte, dass die Progression der AMD durch retinale Lasertherapie verlangsamt oder gar gestoppt werden könne. Demnach soll die Lasertherapie zu einer Steigerung der Stoffwechselleistung, insbesondere der Phagozytoseleistung des RPE führen, so dass Drusen und

Pigmentveränderungen abgebaut und damit die Funktionalität der gesamten Retina verbessert werden (BVA, DOG, RG 2017). Auch bei dieser Methode wird das applizierte Laserlicht grüner Wellenlänge zum größten Teil in den Melanosomen des RPE absorbiert, so dass es zu einer thermischen Destruktion des RPE und zu einer Koagulation der darüber liegenden retinalen Abschnitte kommt (BVA, DOG, RG 2017). Das Ziel hierbei ist die Auslösung einer biologischen Reaktion, wobei benachbarte RPE-Zellen in den laserinduzierten Defekt migrieren bzw. proliferieren und zu einer Defektdeckung sowie mutmaßlich zu der o.g. Funktionssteigerung des RPE führen (Framme et al. 2008). Zur Induktion dieser reaktiven biologischen Prozesse ist die Koagulation der neurosensorischen Retina selbst nicht notwendig, es befinden sich derzeit selektive Verfahren zur Lasertherapie des RPE in klinischer Evaluation (Selektive Retinatherapie; SRT). Unter Einsatz gepulster Laser, wobei die Pulsdauer bei der sogenannten Subthreshold-Lasertherapie im unteren Mikrosekunden- bzw. Nanosekundenbereich liegt, sollen thermische Schäden außerhalb des RPE minimiert und die neurosensorische Retina verschont werden (Chehade et al. 2016). Bei dem sogenannten Mikropuls-Verfahren liegt die Impulsdauer hingegen typischerweise zwischen 100µs und 300µs (Dorin 2003).

#### **1.4.2.3.3 Transpupilläre Thermotherapie (TTT)**

Bei der transpupillären Thermotherapie (TTT) erfolgt eine langandauernde retinale Laserlichtexposition mit niedriger Energiedichte (z.B. 60s, 3mm Spotsize, 700mW) unter Verwendung eines Diodenlasers (Wellenlänge 810nm). Hierdurch soll eine lokale Hyperthermie chorioidaler Gefäße bei CNV induziert werden, die Temperaturerhöhung im Zielgewebe liegt hierbei unter 10°C (Framme et al. 2008). Die Wirkung der TTT bei Vorliegen einer occulter subfovealen CNV (Läsionsanteile im geographischen Zentrum der Fovea) wurde 1999 von Reichel et al. untersucht, demnach konnte mittels TTT ein Verschluss der chorioidalen Gefäße bei Visusstabilisierung mit 75% erzielt werden (Reichel et al. 1999). Der zugrundeliegende Wirkmechanismus der TTT ist weiterhin ungeklärt, es wird angenommen, dass der Gefäßverschluss über Hitze-Schock Proteine mit konsekutiver Apoptose der Endothelzellen und Thrombosierung des Gefäßes vermittelt wird (Mainster und Reichel 2000). Andere Studien konnten die positiven Ergebnisse der Pilotstudie nicht bestätigen, teilweise wird über hohe Rezidivraten berichtet (Haas et al. 2003; Tsai et al. 2007).

#### **1.4.2.3.4 Photodynamische Therapie (PDT)**

Bei der photodynamischen Therapie erfolgt zunächst die intravenöse Injektion eines Porphyrin-Farbstoffes, dem Verteporfin (Visudyne®). Dieser photosensible Farbstoff reichert sich in dem Endothel chorioidaler Gefäße an. Durch Laserlichtexposition mit der Wellenlänge 689nm (Diodenlaser) kommt es zur Induktion eines photochemischen Prozesses, der die Verödung der chorioidalen Gefäße zur Folge hat (Grehn 2019). Dieses Verfahren eignet sich bei Vorliegen einer klassischen CNV im Rahmen einer exsudativen AMD. Da der Effekt nicht primär durch die Laserapplikation vermittelt wird, handelt es sich um ein indirektes Verfahren, nicht um eine direkte Lasertherapie. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass die PDT der anti-VEGF-Therapie im Outcome hinsichtlich der Visusstabilität unterlegen ist, weshalb diese Therapieform aktuell nur noch in Einzelfällen beispielsweise bei Non-Responder oder in Addition zur anti-VEGF-Therapie durchgeführt wird.

## 2 Arbeitshypothese und Ziel der Arbeit

Viele für die Sehfunktion essenzielle Funktionen des retinalen Pigmentepithels (RPE) werden über Änderungen des freien zytosolischen Calciums reguliert. Die Mechanismen zur Kontrolle der Homöostase des freien zytosolischen Calciums in Pigmentepithelzellen sind noch unzureichend erforscht. Neben spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen,  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschern und  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen konnten in humanen RPE- und ARPE-19-Zellen die Expression der Mitglieder der TRP-Superfamilie TRPC1, C4, C7, TRPM1, M3, M7 sowie TRPV1-6 nachgewiesen werden. Über die generelle Relevanz dieser Kanäle für Pigmentepithelfunktionen ist bislang wenig bekannt, es wird jedoch angenommen, dass diese Kationenkanäle für die Calciumregulation im RPE von Bedeutung sind. Störungen der Calciumregulation können zu einer Beeinträchtigung von RPE-Funktionen führen. Zhang et al. konnten zeigen, dass die Akkumulation von Lipofuszin, wie sie auch bei der altersbedingten Makuladegeneration (AMD) beobachtet wird, von der intrazellulären Calciumkonzentration abhängig ist (Zhang et al. 2011). Die generelle Untersuchung der Faktoren zur Regulation des freien zytosolischen Calciums in Pigmentepithelzellen stellt damit einen essenziellen Beitrag zum Verständnis dieser Erkrankung dar. In dieser Arbeit wurde die Relevanz von TRP-Kationenkanälen für die Regulation des freien zytosolischen Calciums in Pigmentepithelzellen sowie etwaige Implikationen für RPE-Zellfunktionen untersucht. Hierzu wurden verschiedene Agonisten und Stimuli ausgewählt. Dabei standen Dopamin (Phagozytose) und VEGF-C (Sekretion von VEGF-A, Angiogenese) für essenzielle RPE-Funktionen, Koffein und Carbachol für etablierte Induktoren intrazellulärer Calciumsignale. Die Messung der freien intrazellulären Calciumkonzentration erfolgte unter Verwendung des  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2. Eine etwaige TRP-Beteiligung wurde dabei unter Einsatz der TRP-Blocker Lanthan und Ruthenium Rot untersucht, zusätzlich erfolgten Experimente nach Entleerung intrazellulärer Calciumspeicher unter Einsatz des SERCA-Blockers Thapsigargin. Im Falle der thermosensitiven TRP-Kanäle TRPV1, V2 und M3 erfolgten Hitzestimulationen, thermische Effekte von Lasertherapien, die in der Behandlung der AMD in unterschiedlichsten Formen Anwendung fanden, wurden in einem Laserexpositionsmodell untersucht.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Reagenzien

CaCl <sub>2</sub>	Carl Roth, Deutschland
Capsaicin	Sigma Aldrich, Deutschland
Carbachol	Sigma Aldrich, Deutschland
DMSO	Sigma Aldrich, Deutschland
Dopamin Hydrochlorid	Sigma Aldrich, Deutschland
D-PBS (ohne Ca <sup>2+</sup> / ohne Mg <sup>2+</sup> )	Gibco, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle's Medium / Nutrient F-12 Ham mit Glutamin	Gibco, Deutschland
EDTA	Sigma Aldrich, Deutschland
EGTA	Sigma Aldrich, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco, Deutschland
Fibronektin	Sigma Aldrich, Deutschland
Fura-2AM	Fluka, Schweiz
Glucose	Carl Roth, Deutschland
HCl	Sigma Aldrich, Deutschland
HEPES	Sigma Aldrich, Deutschland
Insulin-Transferrin-Sodium-Selenit	Roche Diagnostics, Deutschland
Ionomycin	Serva, Deutschland
KCl	Carl Roth, Deutschland
Koffein	Sigma Aldrich, Deutschland
Kollagenase IA, IV	Sigma Aldrich, Deutschland
Lanthan	Sigma Aldrich, Deutschland
MgCl <sub>2</sub>	Carl Roth, Deutschland
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Carl Roth, Deutschland
NaCl	Carl Roth, Deutschland
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Carl Roth, Deutschland
NaHCO <sub>3</sub>	Sigma Aldrich, Deutschland
NaOH	Carl Roth, Deutschland

Nicht-essentielle Aminosäuren	Gibco, Deutschland
Penicillin-Streptomycin	Gibco, Deutschland
Ruthenium Rot	Sigma Aldrich, Deutschland
Thapsigargin	Calbiochem, USA
Trypsin-EDTA-Lösung 0,05%	Sigma Aldrich, Deutschland
VEGF-C	Sigma Aldrich, Deutschland

### 3.1.2 Geräte

#### Allgemeine Geräte

Digitalthermometer	Voltcraft, Schweiz
Feinwaage (Toledo AG 240; d=0,1 mg / max 210g)	Mettler, Deutschland
Magnetrührer (Stuart)	Bibby Scientific Ltd, United Kingdom
pH-Meter (inoLab pH level 1)	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Deutschland
Pipetten (Reference; 0,5µl-20µl / 20µl-100µl / 100µl-1000µl)	Eppendorf AG, Deutschland
Thermoblock (TM1)	Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Deutschland
Waage (Explorer E06120)	Ohaus, Schweiz

#### Geräte zur Calciummessung

Badkammerheizung (ecoline RE106)	Lauda, Deutschland
Digitalkamera (CoolSnap)	Roper Scientific, USA
Imaging System (VisiChrome High Speed Polychromator System)	Visitron System GmbH, Deutschland
Lichtquelle (Xenon Kurzbogenlampe 75W)	Visitron System GmbH, Deutschland
Mikroskop (Axiovert 35)	Carl Zeiss Meditec, Deutschland
Objektiv (Fluar 40x / 1,3 Ölimmersionsobjektiv)	Carl Zeiss Meditec, Deutschland
Pumpenschläuche (Ismatec TYGON R3607, id 0,76mm / wall 0,86mm)	IDEX Health and Science GmbH, Deutschland



Rollenpumpe (Ismatec TYGON R3607, id 0,76mm / wall 0,86mm)	Idex Health and Science GmbH, Deutschland
Shutter (Mac5000 Shutterssystem)	Ludl Electronic Products Ltd., USA

### Laser

Infrarotlaser (Oculight SL 810nm)	Iridex, USA
Spaltlampenadapter (Operating Microscope Adapter)	Iridex, USA

### Geräte zur Zellkultur:

Sterile Werkbank (Gelaire BSB 4A)	ICN Biomedicals, USA
Zellkulturschrank (Hera Cell 240)	Heraeus, Deutschland
Zentrifuge (Megafuge 1.0R)	Heraeus, Deutschland

### **3.1.3 Verbrauchsmaterial**

Sämtliche Kunststoffverbrauchsartikel wurden von der Sarstedt AG & Co. in Deutschland bezogen.

### **3.1.4 Software**

Zur Datenerfassung bzw. Auswertung wurde folgende Software verwendet:

Metaflour 5.0	Universal Imaging Corporation, USA
Metaflour Analyst	Universal Imaging Corporation, USA
Excel 2003 / 2010	Microsoft, USA

### **3.1.5 Zellen**

In dieser Arbeit wurden Zellen der Zelllinie ARPE-19 und humane RPE-Primärkulturen (hRPE) verwendet. Die ARPE-19-Zellen stammten aus der American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). ARPE-19 ist eine humane RPE-Zelllinie, die sich spontan durch Trypsinierung aus einer humanen RPE-Primärkultur eines 19-jährigen männlichen Spenders entwickelte. Diese Zelllinie besitzt eine epitheliale Morphologie und zeichnet sich durch eine hohe Proliferationsrate aus (Dunn et al. 1996).

Die Gewinnung der humanen primären RPE-Zellen erfolgte aus Bulbi Verstorbener, die nach Einwilligung zur Hornhautspende respektive Verwendung von Gewebe zu Forschungszwecken der Hornhautbank der Universitären Augenklinik Hamburg-Eppendorf zur Verfügung standen. Nach Entnahme der Cornea durch die Hornhautbank standen die Bulbi innerhalb von 24h post mortem der Abteilung für Experimentelle Ophthalmologie zur Verfügung. Der Umgang mit den humanen Geweben erfolgte streng unter Einhaltung der ethischen Grundsätze zur medizinischen Forschung am Menschen (Deklaration von Helsinki).

Die Verfügbarkeit der Spenderaugen unterlag keiner Regelmäßigkeit, weshalb in dieser Arbeit nur ausgewählte Experimente an beiden Zellreihen durchgeführt werden konnten.

## 3.2 Methoden der Zellkultur

### 3.2.1 Verwendete Medien

#### ARPE-19-Zellkulturmedium:

Zur Kultivierung der ARPE-19-Zellen wurde das ARPE-19-Zellkulturmedium verwendet und nach folgender Rezeptur hergestellt:

DMEM / Ham's F12 (mit Glutamin)	500ml
Penicillin/Streptomycin	5ml
Insulin-Transferrin-Sodium-Selenit	250µl
Nicht-essentielle Aminosäuren	5ml
HEPES-Puffer (1M)	2,5ml
Fetales Kälberserum (FCS)	50ml

#### ARPE-19-Zellkulturmedium ohne FCS:

Zur Kultivierung der frisch isolierten humanen RPE-Zellen wurde serumfreies ARPE-19-Zellkulturmedium verwendet, dieses enthielt:

DMEM / Ham's F12 (mit Glutamin)	500ml
Penicillin/Streptomycin	5ml
Insulin-Transferrin-Sodium-Selenit	250µl
Nicht-essentielle Aminosäuren	5ml
HEPES-Puffer (1M)	2,5ml

Die Medien wurden nach der Herstellung sofort sterilfiltriert (Porengröße 0,22µm) und bei +4°C gelagert.

### **3.2.2 Zellkultur der ARPE-19-Zelllinie**

Die ARPE-19-Zellen wurden in einer 100ml Zellkulturflasche unter Zugabe von ARPE-19-Zellkulturmedium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Das Medium wurde erstmalig nach 3 Tagen gewechselt. Die Zellen zeigten nach etwa 5 Tagen eine vollständige Konfluenz und wurden anschließend zweimal wöchentlich passagiert. Das Medium wurde hierzu abgesogen und die Zellen zweimal mit jeweils 5ml D-PBS ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> gespült. Anschließend wurden die Zellen mit 2ml 0,05% Trypsin-EDTA-Lösung für 5min inkubiert, hierdurch lösten sich die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche ab. Durch Zugabe von 7ml ARPE-Medium wurde die Trypsinierung gestoppt. Jeweils 2ml dieser Zellsuspension wurden zusammen mit 5ml ARPE-Medium in eine neue Zellkulturflasche gegeben und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die restlichen Zellen wurden in einer 24-Well Zellkulturplatte auf Deckgläschen ausgesät, hierzu wurde jedes Deckgläschen mit 80µl Zellsuspension und 1ml ARPE-19-Zellkulturmedium bedeckt und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Zellen waren am 5. Tag konfluent und konnten zur Calciummessung eingesetzt werden. Für die Calciummessungen wurden Zellen bis zur 75. Passage verwendet.

### **3.2.3 Zellkultur humaner primärer RPE-Zellen (hRPE)**

Die Präparation der Bulbi erfolgte unter semi-sterilen Bedingungen. Die Spenderaugen wurden bis maximal 36h post mortem verwendet.

#### **3.2.3.1 Präparation**

Die Bulbi wurden durch einen zirkulären Einschnitt auf Höhe der pars plana eröffnet. Nach Entfernung der Iris und des Linsenapparates (anteriores Segment) wurde der Glaskörper entfernt. Anschließend wurde der Nervus opticus durchtrennt und die Retina vorsichtig mit einer chirurgischen Pinzette entnommen. Unter Zuhilfenahme einer chirurgischen Schere wurde als Nächstes das RPE samt Choroidea von der Sklera separiert, vorsichtig mit D-PBS ohne Mg<sup>2+</sup> und Ca<sup>2+</sup> gespült und über Nacht unter Zugabe von jeweils 0,5mg/ml Kollagenase IA und IV in serumfreiem ARPE-19-Zellkulturmedium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

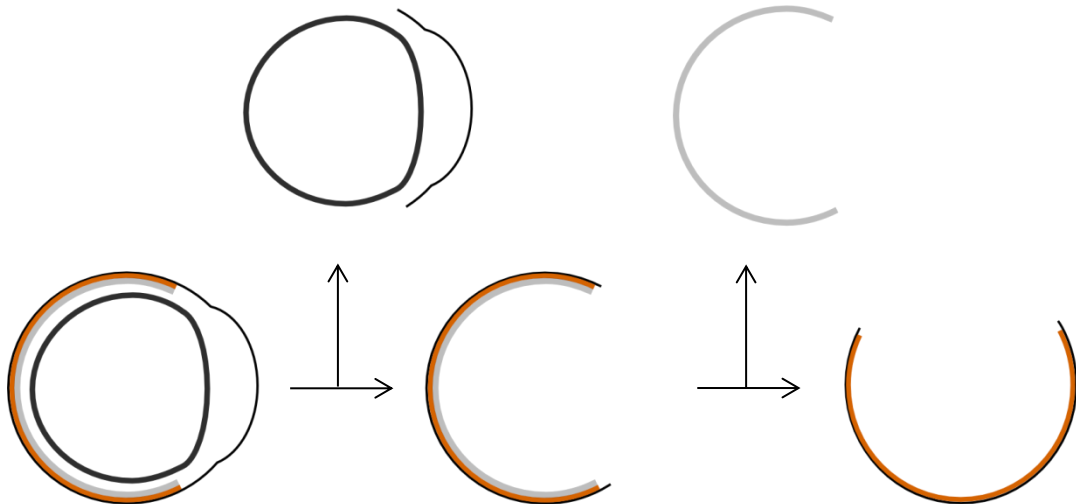


Abb. 3-1: Präparation der humanen Bulbi: Nach Eröffnung der Bulbi durch einen zirkulären Schnitt werden das anteriore Segment und der Glaskörper entfernt. Nach Durchtrennung des Nervus opticus wird die Retina (grau) entfernt, das retinale Pigmentepithel (braun) liegt nun frei.

### 3.2.3.2 Kultivierung von hRPE-Zellen

Am Folgetag wurde die Zellsuspension aufgenommen und für 5min bei 50g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend mit 4ml ARPE-19-Zellkulturmedium resuspendiert und in einer 24-Well Zellkulturplatte auf Deckgläschen ausgesät. Die Deckgläschen wurden hierzu jeweils mit 80µl Zellsuspension und 1ml ARPE-19-Zellkulturmedium bedeckt. Um die Adhäsion der Zellen zu unterstützen, wurde vorab jedes Deckgläschen mit 100µl Fibronectinlösung (80µg Fibronectin auf 6ml ARPE-19-Zellkulturmedium) benetzt. Nach 96h wurde erstmalig ein Medienwechsel vorgenommen, die nicht adhärenen Zellen wurden dabei entfernt. Nach 5-6 Tagen erreichten die Zellen eine Konfluenz und wurden zur Calciummessung eingesetzt.

## 3.3 Methodik des Calcium-Imaging

Calcium-Imaging ist eine Technik zur Bestimmung von intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen. Hierzu werden die Zellen mit einem  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff beladen und mittels UV-Licht zweier verschiedener Wellenlängen angeregt. Das emittierte Licht wird von einer Kamera aufgezeichnet, digitalisiert und softwaregestützt graphisch dargestellt. Aus den resultierenden

Datensätzen kann anschließend die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration errechnet werden.

Alle Versuche wurden bei Raumtemperatur (20-23°C) in einem abgedunkelten Raum durchgeführt.

### 3.3.1 Fura-2AM

Die Messung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration erfolgte unter Verwendung des  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2, welcher mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen Chelatkomplexe bildet (Grynkiewicz et al. 1985). Die Fluoreszenzeigenschaften des Fura-2 ändern sich in Abhängigkeit von der Bindung freier  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Zur Messung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wird das Fura-2 durch UV-Licht der Wellenlängen 340nm und 380nm angeregt. Die Intensität des emittierten Lichtes steigt bei einer Anregung mit 340nm mit zunehmender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration an. Wird Fura-2 jedoch mit 380nm angeregt, so ändern sich die Fluoreszenzeigenschaften genau entgegengesetzt und die Intensität des emittierten Lichtes sinkt mit zunehmender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wird durch Bildung des Quotienten der Fluoreszenzintensitäten 340nm/380nm bestimmt. Durch Bindung an den Acetoxymethylester (AM) entsteht ein membrangängiges Derivat, in dieser Form kann das Fura-2AM passiv in die Zellen aufgenommen werden. Intrazellulär kommt es durch endogene Esterasen zur hydrolytischen Abspaltung des Acetoxymethylesters, wodurch das Fura-2 aktiviert wird und seine Membrangängigkeit verliert.

Da Fura-2 sehr lichtempfindlich ist, erfolgte jeglicher Umgang mit Fura-2 in einem abgedunkelten Raum.

### 3.3.2 Verwendete Lösungen

#### Krebs-Henseleit-Stock (10x):

Für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen wurde eine physiologische Elektrolytlösung nach der Rezeptur von Krebs-Henseleit verwendet. Zunächst wurde eine 10x Stocklösung folgendermaßen hergestellt:

NaCl	1180mmol/l
KCl	50mmol/l
MgCl <sub>2</sub>	12mmol/l
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	12mmol/l
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20mmol/l

Gelöst wurden die Reagenzien bei Raumtemperatur in 1000ml Aqua destillata, die Einstellung des pH-Wertes auf 7,4 erfolgte durch Titration von 1M NaOH- oder 1M HCl-Lösung. Die Stocklösung wurde bei 4°C gelagert und für maximal 4 Wochen verwendet.

#### Krebs-Henseleit-Lösung (KHS):

60 Minuten vor Versuchsbeginn wurden 100ml der Stocklösung aus dem Kühlschrank entnommen und um folgende Reagenzien ergänzt:

HEPES	20,1mmol/l
CaCl <sub>2</sub>	1,8mmol/l
Glucose	9,1mmol/l

Es erfolgte eine erneute Prüfung des pH-Wertes, bei Bedarf wurde eine Einstellung auf pH 7,4 durch Zugabe von 1M NaOH- oder 1M HCl-Lösung durchgeführt.

#### Fura-2AM-Lösung:

Zunächst wurde eine 10mM Fura-2AM-Stocklösung hergestellt, hierzu wurde 1mg Fura-2AM Salz in 100µl DMSO gelöst und in 0,5µl Einheiten aliquotiert. Die Lagerung erfolgte lichtgeschützt bei -18°C. Vor der Verwendung wurde eine Einheit der Lösung 30min bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend mit 500µl KHS zu einer 10µM Konzentration verdünnt.

Ionomycin-Stocklösung:

Zur Herstellung einer 10mM Stocklösung wurde 1mg Ionomycin in 134µl DMSO gelöst und aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -18°C, vor der Verwendung wurde die Lösung 30min bei Raumtemperatur aufgetaut.

EGTA-Kalibrierlösung:

Die Herstellung der EGTA-Kalibrierlösung erfolgte nach folgender Rezeptur:

KHS	10ml
EGTA 0,5M	600µl
Ionomycin Stock (10mM)	10µl

CaCl<sub>2</sub>-Kalibrierlösung:

Die Herstellung der CaCl<sub>2</sub>-Kalibrierlösung erfolgte nach folgender Rezeptur:

KHS	10ml
CaCl <sub>2</sub>	0,4g
Ionomycin Stock (10mM)	10µl

Weitere Stock-Lösungen:

Im Rahmen der Ca<sup>2+</sup>-Messungen kamen folgende weitere Lösungen zum Einsatz:

Lösung	Wirkstoff	Wirkstoffkonzentration	Lösungsmittel
Koffeinlösung	Koffein	50mM	Aqua destillata
Capsaicinlösung	Capsaicin	10µM	DMSO
Carbachollösung	Carbachol	100µM	Aqua destillata
Dopaminlösung	Dopamin	1µM	Aqua destillata
Lanthanlösung	Lanthan	100µM	Aqua destillata
Ruthenium Rot-Lsg.	Ruthenium Rot	1µM	Aqua destillata
Thapsigarginlösung	Thapsigargin	1µM	DMSO
VEGF-C-Lösung	VEGF-C	50ng/ml	Aqua destillata

Tab 3.1: weitere Lösungen zum Ca<sup>2+</sup>-Imaging.

### 3.3.3 Versuchsvorbereitung

Die zu untersuchenden Zellen wurden auf 13mm Deckgläschen kultiviert. Vor Durchführung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Messung wurden die Deckgläschen aus dem Inkubator entnommen, in KHS gewaschen und mit Fura-2 beladen. Hierzu wurden die Zellen 40min in 500 $\mu\text{l}$  einer 10 $\mu\text{M}$  Fura-2AM-Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläschen zweimalig mit KHS gespült, um nicht aufgenommenes Fura-2 zu entfernen und für weitere 30min in KHS inkubiert.

### 3.3.4 Versuchsaufbau

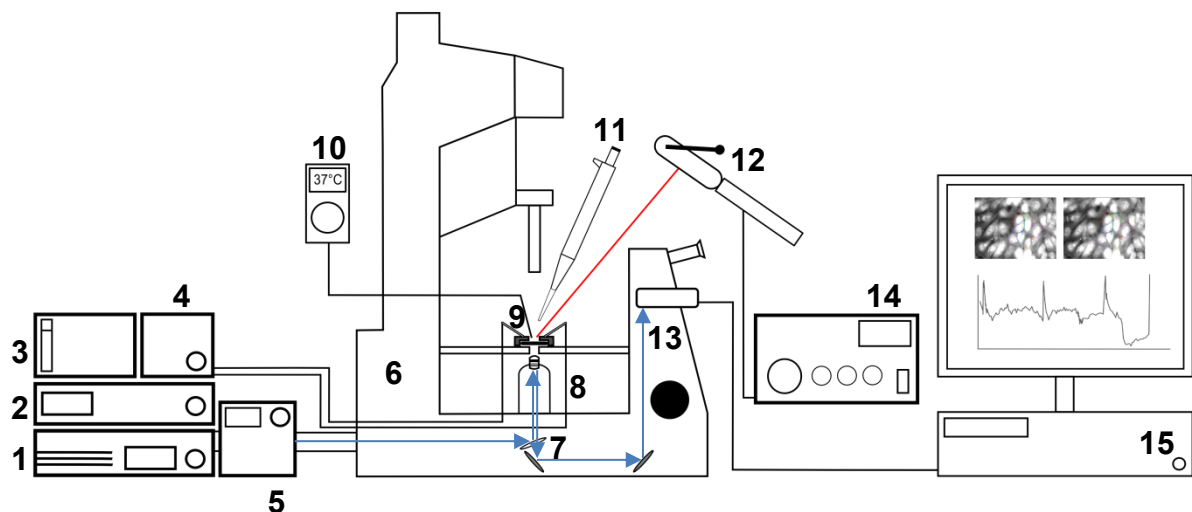


Abb. 3-2: Versuchsaufbau des Fura-Messstandes: 1 Xenon Kurzbogenlampe 75W | 2 Polychromator | 3 Badkammerheizung | 4 Rollenpumpe | 5 Shutter | 6 Mikroskop | 7 dichromatischer Spiegel | 8 Ölimmersionsobjektiv (40x) | 9 Badkammer mit Zu- und Ablauf | 10 Digitalthermometer | 11 Pipette | 12 Spaltlampenadapter | 13 Digitalkamera | 14 Infrarotlaser | 15 PC mit Metaflour Software.

Die Deckgläschen wurden anschließend mit Silikon unter eine 700 $\mu\text{l}$  Messkammer geklebt und ein beheiztes Perfusionssystem mit einer Temperatur von 37°C angeschlossen. Die Perfusionsgeschwindigkeit wurde über eine verstellbare Rollradpumpe reguliert, die Perfusionslösungen konnten ausgetauscht werden, begonnen wurde stets mit der KHS. Die Messkammer wurde in ein inverses Mikroskop mit Ölimmersionsobjektiv eingesetzt, welches auf einem schwingungsgedämpften Tisch montiert war. An dem Mikroskop war ein Calcium-



Imaging System der Firma Visitron angeschlossen. Die Verwendung eines dichromatischen Spiegels ermöglichte während der Versuchsdurchführung eine zeitgleiche Beleuchtung der Zellen mit UV-Licht der Wellenlängen 340nm und 380nm und das Erfassen der dadurch resultierenden Lichtemissionen, deren Maximum eine Wellenlänge von 510nm hat, durch eine CCD- (Charged-Coupled Device) Kamera. Durch ein Shutterssystem wurde die Beleuchtung unterbrochen, um ein frühzeitiges Ausbleichen des Farbstoffes zu verhindern, wobei das Messintervall zwischen 0,5s und 30s gewählt werden konnte. Die Daten wurden von der CCD-Kamera an einen Computer weitergeleitet und durch die Software MetaFlour 5.0 dargestellt und gespeichert.

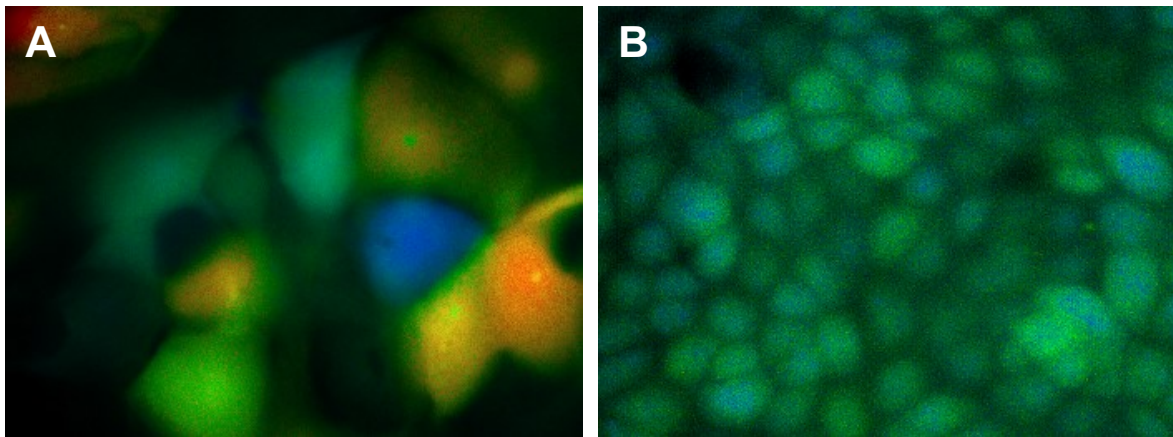


Abb. 3-3: Fluoreszenzmikroskopische Bilder nach Beladung der Zellen mit Fura-2. **A** humane RPE-Primärkultur, **B** ARPE-19-Zelllinie.

### 3.3.5 Durchführung der Ca<sup>2+</sup>-Messungen

Die Messungen wurden bei Raumtemperatur (20-23°C) in einem abgedunkelten Raum nach folgendem Ablaufschema durchgeführt:

Schritt	Dauer	Messintervall	Beschreibung
1	5-10min	30s	Warten auf Einstellen des Ca <sup>2+</sup> -Ruhewertes
2	10s	0,5s	Ausstellen der Perfusion
3	150s	0,5s	Applikation des Agonisten in 10x Konzentration / Applikation erhitzter KHS, Erhöhung der Bildfolge
4	180s	5s	Anstellen der Perfusion, Reduktion der Bildfolge
5	5-10min	30s	Warten auf Einstellung des Ca <sup>2+</sup> -Endwertes
6a	1-3x Wiederholung der Schritte 2-5, anschließend Fortsetzung bei 7		
6b	Einsatz einer blockerhaltigen Perfusionslösung, Wiederholung der Schritte 1-5, anschließend Fortsetzung bei 7		
7	3-5min	5s	Perfusion mit EGTA-Kalibrierlösung
8	5-10min	5s	Perfusion mit CaCl <sub>2</sub> -Kalibrierlösung

Tab 3.2: Schematischer Ablauf der Ca<sup>2+</sup>-Messung.

### 3.3.6 Agonisten

In dieser Arbeit wurden insgesamt 5 Agonisten eingesetzt. Zunächst wurde untersucht, ob die Applikation des jeweiligen Agonisten zu einer Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> führte. Wenn eine Veränderung der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> beobachtet wurde, erfolgte in weiteren Versuchsreihen die Untersuchung dieses Effektes hinsichtlich einer möglichen Beteiligung von TRP-Kanälen. Hierzu wurden die TRP-Kanalblocker Ruthenium Rot und Lanthan verwendet. Des Weiteren wurde der SERCA-Blocker Thapsigargin eingesetzt, um die Herkunft des intrazellulären Calciums näher zu untersuchen.

Folgende Agonisten wurden eingesetzt:

#### **3.3.6.1 Capsaicin**

Die Untersuchung des Effektes von Capsaicin erfolgte an ARPE-19- und hRPE-Zellen, es wurden Wirkstoffkonzentrationen von 1 $\mu$ M, 10 $\mu$ M und 100 $\mu$ M eingesetzt.

#### **3.3.6.2 Dopamin**

Die Untersuchung des Effektes von Dopamin erfolgte an ARPE-19-Zellen, hierbei wurden Wirkstoffkonzentrationen von 0,5 $\mu$ M und 1 $\mu$ M eingesetzt.

#### **3.3.6.3 VEGF-C**

Die Untersuchung des Effektes von VEGF-C erfolgte an ARPE-19-Zellen, hierbei wurden Wirkstoffkonzentrationen von 5ng/ml und 50ng/ml eingesetzt.

#### **3.3.6.4 Carbachol**

Die Untersuchung des Effektes von Carbachol erfolgte unter Verwendung von ARPE-19-Zellen, es wurde eine Wirkstoffkonzentration von 100 $\mu$ M eingesetzt.

#### **3.3.6.5 Koffein**

Die Untersuchung des Effektes von Koffein erfolgte unter Verwendung von ARPE-19-Zellen, es wurde eine Wirkstoffkonzentration von 50mM eingesetzt.

#### **3.3.7 Hitzestimulation 45°C/56°C**

TRPV1 und V2-Kanäle können beispielsweise durch noxische Hitzereize aktiviert werden (Clapham et al. 2001). In einer weiteren Versuchsreihe wurden ARPE-19- und hRPE-Zellen mit Hitze stimuliert. Hierzu wurde die Perfusionslösung unter kontinuierlicher Temperaturmessung mit einem Digitalthermometer sukzessiv auf 45°C respektive 56°C erhitzt. Bei Erreichen der Zieltemperatur wurde die Perfusion gestoppt und ergänzend zum o.g. Schema der Inhalt der Badkammer auf ein Volumen von 200 $\mu$ l reduziert. Anschließend erfolgte die Applikation von 570 $\mu$ l der erhitzten Perfusionslösung in die Badkammer. Die Temperaturmessung innerhalb der Badkammer zeigte, dass Temperaturen >43°C bzw. >54°C erreicht wurden.

### 3.3.8 Laserlicht (810nm Diodenlaser)

Wie bereits unter 1.4.2.3 aufgeführt werden in der Ophthalmologie schon seit mehreren Jahrzehnten Laser zur operativen Therapie verschiedenster Erkrankungen, z.B. Glaukom, diabetische Retinopathie, AMD, Frühgeborenenretinopathie oder subretinaler Neovaskularisation, eingesetzt. Dabei kommen unterschiedliche Lasertypen zum Einsatz.

In dieser Arbeit wurde ein Diodenlaser mit einer Wellenlänge von 810nm eingesetzt, welcher im klinischen Einsatz unter anderem zur Photokoagulation bzw. zur transpupillären Thermotherapie verwendet wird. Durch den Anwender können die Lichtleistung des Lasers, die Expositionszeit und die Größe des Belichtungsareals (Spotsize) verändert werden. Zur Durchführung dieser Versuche wurde der bereits beschriebene Versuchsaufbau durch einen Spaltlampenadapter erweitert. Es wurde eine Spotsize von 3mm gewählt, begonnen wurde mit einer Lichtleistung von 630mW und einer Applikationsdauer von 2,5s. Lichtleistung und Applikationsdauer wurden im Verlauf gesteigert. Untersucht wurde in dieser Versuchsserie der Effekt einer Laserlichtexposition *in vitro* unter Verwendung von ARPE-19-Zellen und hRPE-Zellen.

#### 3.3.8.1 Ablauf der $\text{Ca}^{2+}$ -Messung bei Laserlichtexposition

Schritt	Dauer	Messintervall	Beschreibung
1	5-10min	30s	Warten auf Einstellen des $\text{Ca}^{2+}$ -Ruhewertes
2	10s	0,5s	Ausstellen der Perfusion
3	150s	0,5s	Applikation Laserlicht
4	180s	5s	Anstellen der Perfusion
5	Mehrfache Wiederholung der Schritte 2-4, abschließend Fortsetzung bei 6		
6	3-5min	5s	Perfusion mit EGTA-Kalibrierlösung
7	5-10min	5s	Perfusion mit $\text{CaCl}_2$ -Kalibrierlösung

Tab 3.3: Schematischer Ablauf der  $\text{Ca}^{2+}$ -Messung unter Laserlichtexposition.

### 3.3.9 Blocker

#### 3.3.9.1 Lanthan und Ruthenium Rot

Eine mögliche Beteiligung der TRP-Kanäle wurde durch die Applikation mikromolarer Konzentrationen der TRP-sensitiven Kanalblocker Lanthan und Ruthenium Rot untersucht (Clapham et al. 2001; Clapham et al. 2005). Im Rahmen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Messung erfolgte zunächst die Applikation des Agonisten in gewünschter Wirkkonzentration (entsprechend Ablaufschema Tab. 3.2, Punkt 3). Wurde ein Effekt beobachtet, wurden die Zellen mit einer blockerhaltigen Perfusionslösung perfundiert (entsprechend Ablaufschema Tab. 3.2, Punkt 6b). In Anwesenheit der blockerhaltigen Perfusionslösung erfolgte nun eine weitere Applikation des jeweiligen Agonisten. Zur Beurteilung der Blockerwirksamkeit wurden die Amplituden des Anstieges der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in An- und Abwesenheit der blockerhaltigen Perfusionslösung miteinander verglichen.

#### 3.3.9.2 Thapsigargin

Thapsigargin ist ein Blocker der sarco- / endoplasmatischen Retikulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA). Thapsigargin verhindert bei einer Konzentration von  $1\mu\text{M}$  den Transport von  $\text{Ca}^{2+}$  in das endoplasmatische Retikulum, welcher durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase vermittelt wird (Rogers et al. 1995). Neben dieser aktiven Aufnahme von freiem zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$  in die intrazellulären Calciumspeicher kommt es durch passives Entweichen zur Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus den intrazellulären Calciumspeichern in das Zytosol. Wird nun die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase geblockt, kommt es sukzessiv zur Entleerung der intrazellulären Calciumspeicher (Lytton et al. 1991; Stalmans und Himpens 1997). Thapsigargin kann dadurch zur Untersuchung der Herkunft des freien zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$  eingesetzt werden.

#### 3.3.10 Kalibrierung

Zum Abschluss der Messung wurde das Fluoreszenzsignal auf die korrelierende  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kalibriert. Zur Ermittlung des Minimalwertes ( $R_{\min}$ ) erfolgte der Einsatz der unter 3.3.2 beschriebenen EGTA-Kalibrierlösung, wobei das freie Calcium durch das EGTA zu einem Komplex gebunden wurde. Anschließend wurde die hochkonzentrierte  $\text{CaCl}_2$ -Kalibrierlösung eingesetzt, um das Maximum ( $R_{\max}$ ) zu ermitteln. Durch die Zugabe des Calciumionophors Ionomycin wurde die Zellmembran für Calcium permeabel. Jene Messungen, in denen  $R_{\min}$  oder  $R_{\max}$

nicht erreicht werden konnten, wurden als „unvollständig kalibriert“ deklariert und von der statistischen Auswertung ausgeschlossen.

### 3.3.11 Datenerfassung

Die Fura-2 beladenen Zellen wurden in definierten Zeitintervallen mit Licht der Wellenlänge 340nm und 380nm angeregt, das emittierte Licht (510nm) wurde photooptisch erfasst, digitalisiert und an einen Computer weitergeleitet. Unter Verwendung der Software MetaFlour 5.0 wurden Messbereiche (ROIs: Regions Of Interest) definiert und die Daten als Verhältniszahl R (Ratio) der Emissionen (340nm/380nm) graphisch dargestellt und gespeichert.

#### 3.3.11.1 ROIs (Regions Of Interest)

Zur Festlegung der Messbereiche wurden 8 Zellen ausgewählt, anhand der sichtbaren Zellgrenzen erfolgte per Hand die Definition der Messbereiche, deren Daten jeweils einzeln erfasst wurden (Abb. 3-4 A). Die Auswertung zeigte, dass die einzelnen Zellen sich bezüglich der absoluten Werte der  $[Ca^{2+}]_i$  zwar geringfügig unterschieden, jedoch im Wesentlichen einen synchronen Verlauf besaßen (Abb. 3-4 B).

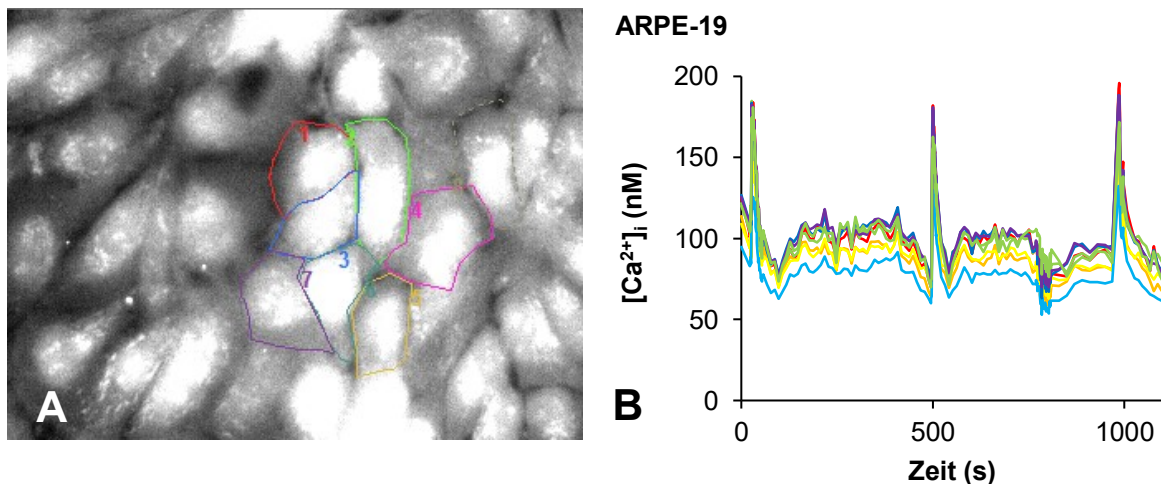


Abb. 3-4: **A** Fluoreszenzmikroskopische Bilderfassung, Definition der Messbereiche. **B** Graphische Darstellung der Messwerte in Excel.

### 3.3.12 Datenauswertung

Die Datensätze wurden in Excel importiert und anhand der von Grynkiewicz erstellten Formel die freie zytosolische Calciumkonzentration errechnet (Grynkiewicz et al. 1985).

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d * \frac{(R-R_{\min})}{(R_{\max}-R)} * \frac{S_f}{S_b}$$

$K_d$  beschreibt die Bindungsaffinität von Fura-2 zu freien zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Für *in vitro*-Experimente wurde von Grynkiewicz et al. ein  $K_d$ -Wert von 224nM ermittelt.  $S_f$  beschreibt die Intensität des Fluoreszenzlichtes bei Anregung mit 380nm von  $R_{\min}$  und  $S_b$  die Intensität des Fluoreszenzlichtes bei Anregung mit 380nm von  $R_{\max}$ .

Aus den Ergebnissen wurden die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) errechnet,  $n$  beschreibt jeweils die Anzahl der untersuchten Zellen. Pro Messung wurden die Datensätze von 8 Zellen erfasst. Die graphische Darstellung und statistische Auswertung erfolgten in Excel.

#### 3.3.12.1 Signifikanz:

Die Auswertung erfolgte aus mindestens drei, idealerweise aus mehr als fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Aus jedem Experiment wurde von 8 Zellen die Konzentration des freien zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$  bestimmt, sodass hier die  $n$ -Zahl der insgesamt ausgewerteten Zellen verwendet wurde. Die Bestimmung der Signifikanzen erfolgte ebenfalls in Excel. Aus den Datensätzen wurde unter Anwendung des  $t$ -Tests die Irrtumswahrscheinlichkeit ( $p$ ) berechnet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von kleiner als 5% ( $p < 0,05$ ) wurde als statistisch signifikant angesehen. Die Signifikanzniveaus wurden in den Abbildungen folgendermaßen dargestellt:

\* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$

## 4 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde die Relevanz von TRP-Kationenkanälen für die Regulation des freien zytosolischen Calciums in Pigmentepithelzellen sowie etwaige Implikationen für RPE-Zellfunktionen untersucht. Hierzu wurden verschiedene Agonisten und Stimuli ausgewählt. Dabei standen Dopamin (Phagozytose) und VEGF-C (Sekretion von VEGF-A, Angiogenese) für essenzielle RPE-Funktionen, Koffein und Carbachol für etablierte Induktoren intrazellulärer Calciumsignale. Eine etwaige TRP-Beteiligung wurde dabei unter Einsatz der TRP-Blocker Lanthan und Ruthenium Rot untersucht, zusätzlich erfolgten Experimente nach Entleerung intrazellulärer Calciumspeicher unter Einsatz des SERCA-Blockers Thapsigargin. Im Falle der thermosensitiven TRP-Kanäle TRPV1, V2 und M3 erfolgten Hitzestimulationen, thermische Effekte von Lasertherapien, die in der Therapie der AMD in unterschiedlichsten Formen Anwendung fanden, wurden in einem Laserepositionsmodell untersucht.

### 4.1 Hitzestimulation

Um eine funktionale Präsenz thermosensitiver Kanäle in RPE-Zellen zu untersuchen, wurde in den folgenden Messungen die Perfusionslösung (KHS) auf 45°C bzw. 56°C erhitzt und während der Messung in die Badkammer appliziert. Hierdurch resultierte ein Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$ , das folgende Beispiel erläutert den Ablauf einer Messung unter Verwendung der Hitzestimuli.



#### 4.1.1 Beispielmessung: Hitzestimulation an ARPE-19-Zellen mit 56°C

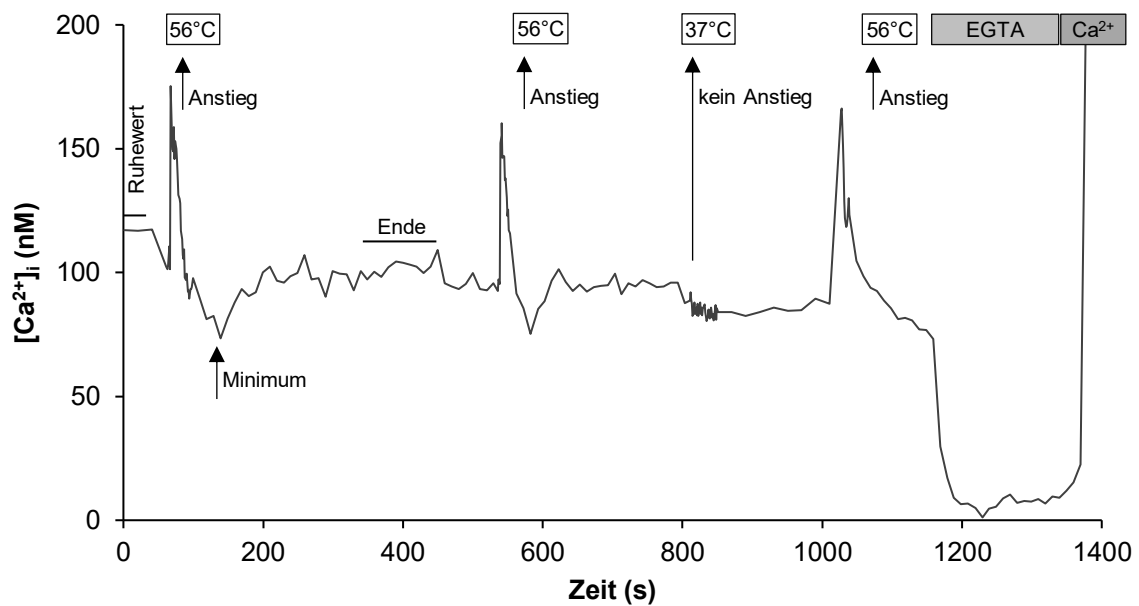


Abb. 4-1: Messung der  $[Ca^{2+}]_i$  (ARPE-19-Zellen), 3-fache Applikation erhitzter Perfusionslösung (56°C), Leerprobe (37°C) und abschließende Kalibrierung mit EGTA und  $Ca^{2+}$ .

Nach dem Start der Messung stellt sich ein Ruhewert ein, an diesem Punkt können nur minimale Schwankungen der  $[Ca^{2+}]_i$  beobachtet werden. Ist der Ruhewert erreicht, wird die Temperatur in der Badkammer von 37°C auf 54°C angehoben (Sekunde 63). Hierdurch steigt die  $[Ca^{2+}]_i$  in kürzester Zeit auf ein Maximum an. Nach Erreichen des Maximums fällt die  $[Ca^{2+}]_i$  ab, unterschreitet den Ruhewert und erreicht ein Minimum (Sekunde 140). Ausgehend von dem Minimum steigt die  $[Ca^{2+}]_i$  wieder an und es stellt sich erneut ein Ruhewert ein (Ende). In Sekunde 525 erfolgt die zweite Applikation erhitzter Perfusionslösung. Wiederum wird zunächst ein Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  beobachtet, gefolgt von einem Abfall der  $[Ca^{2+}]_i$  auf ein Minimum. Das Signal gleicht in der Konfiguration dem der ersten Applikation. In Sekunde 815 wird eine Leerprobe durchgeführt, hierzu wird 37°C warme Perfusionslösung in die Badkammer appliziert, eine wesentliche Veränderung der  $[Ca^{2+}]_i$  kann hierbei nicht beobachtet werden. Anschließend wird die Temperatur in der Badkammer erneut auf 54°C angehoben (Sekunde 1010), wiederum kommt es zu einem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  auf ein Maximum. Nach Erreichen des Maximums fällt die  $[Ca^{2+}]_i$  wiederum ab. Die Messung wird in diesem Fall vor Erreichen des Minimums beendet und eine Kalibrierung eingeleitet. Hierzu

wird das Calcium durch EGTA gebunden und somit ein Minimalwert erzeugt, welcher in Sekunde 1229 erreicht wird. Anschließend erfolgt eine Überflutung mit Calcium (Sekunde 1329), hierdurch ergibt sich ein Maximalwert.

#### 4.1.1.1 Gegenkontrolle (Leerprobe)

In allen Messungen zur Untersuchung hitzeinduzierter Calciumsignale wurden Leerproben durchgeführt. Hierdurch sollte ausgeschlossen werden, dass es sich bei den gemessenen Signalen um Applikationsartefakte handelt, die durch Aktivierung mechano-sensitiver Ionenkanäle entstehen können. Durch die Applikation von 37°C warmer Perfusionslösung (Leerprobe) konnte weder bei ARPE-19-Zellen (n=304 Zellen aus 7 Kulturen), noch bei hRPE-Primärkulturen (n=96 Zellen aus 3 Kulturen) ein Calciumanstieg beobachtet werden (Abb. 4-2).

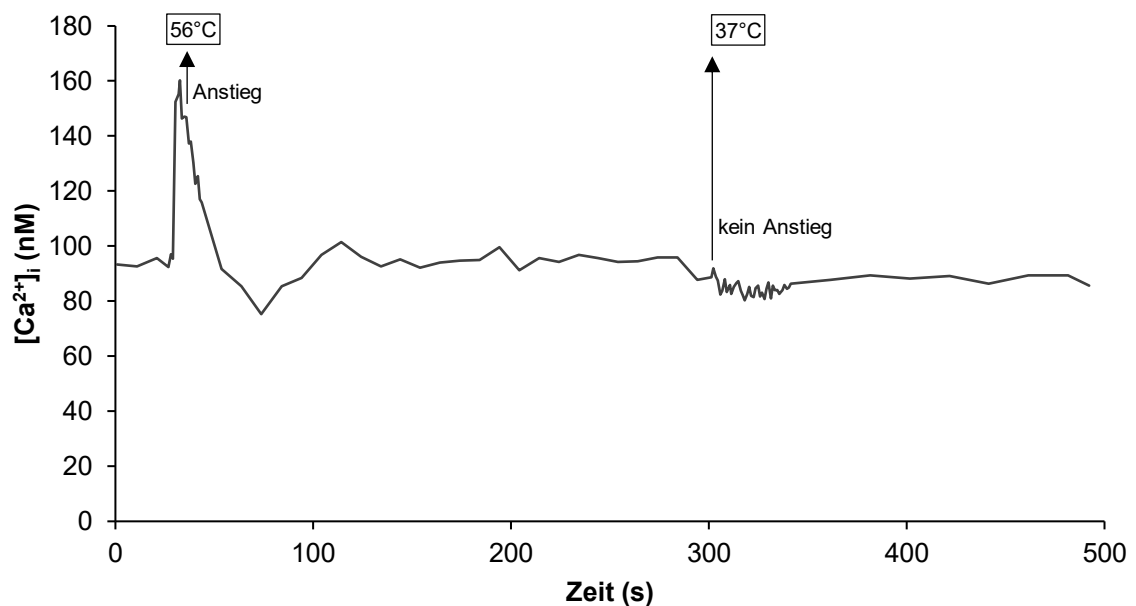


Abb. 4-2: Leerprobe (ARPE-19-Zellen), 1. Applikation: 56°C erhitzte Perfusionslösung, 2. Applikation: 37°C warme Perfusionslösung.

#### 4.1.2 Vergleich ARPE-19 und hRPE (56°C)

Die Applikation erhitzter Perfusionslösung (56°C) führte in 100% an ARPE-19- und hRPE-Zellen zu einem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  (ARPE-19: n=304 Zellen aus 7 Kulturen, hRPE n=96 Zellen aus 3 Kulturen). Dieses Calciumsignal ist in Abb. 4-3 anhand der charakteristischen Merkmale schematisch dargestellt.

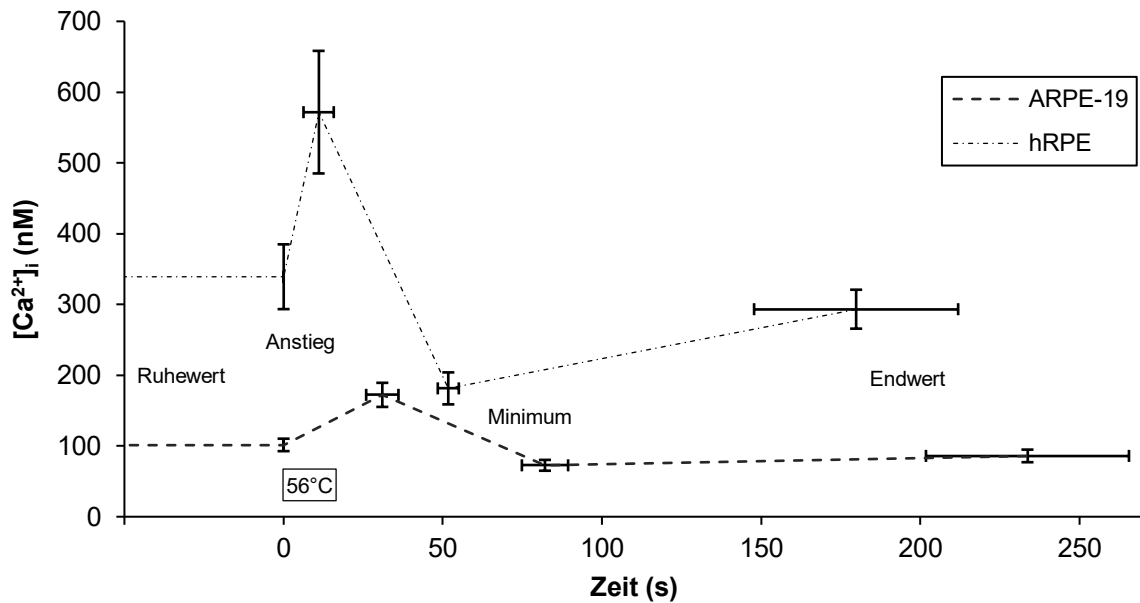


Abb. 4-3: Schematische Darstellung der charakteristischen Merkmale des hitzeinduzierten Calciumsignals unter Betrachtung der absoluten  $[Ca^{2+}]_i$  (nM). Vergleich ARPE-19 (n=304 Zellen aus 7 Kulturen) und hRPE (n=96 Zellen aus 3 Kulturen).

Die jeweiligen Ereignisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aller Messungen aufgeführt. Dabei unterscheiden sich die Calciumsignale an ARPE-19- und hRPE-Zellen bezüglich der Amplituden und der zugehörigen Zeitwerte. Die einzelnen Ereignisse werden später detaillierter betrachtet.

Errechnet man aus den Mittelwerten der Messungen den prozentualen Anstieg über dem Ruhewert (Maximum/Ruhewert), so zeigt sich im Vergleich von ARPE-19- und hRPE-Zellen eine ähnliche Konfiguration des Calciumsignals (Abb. 4-4).

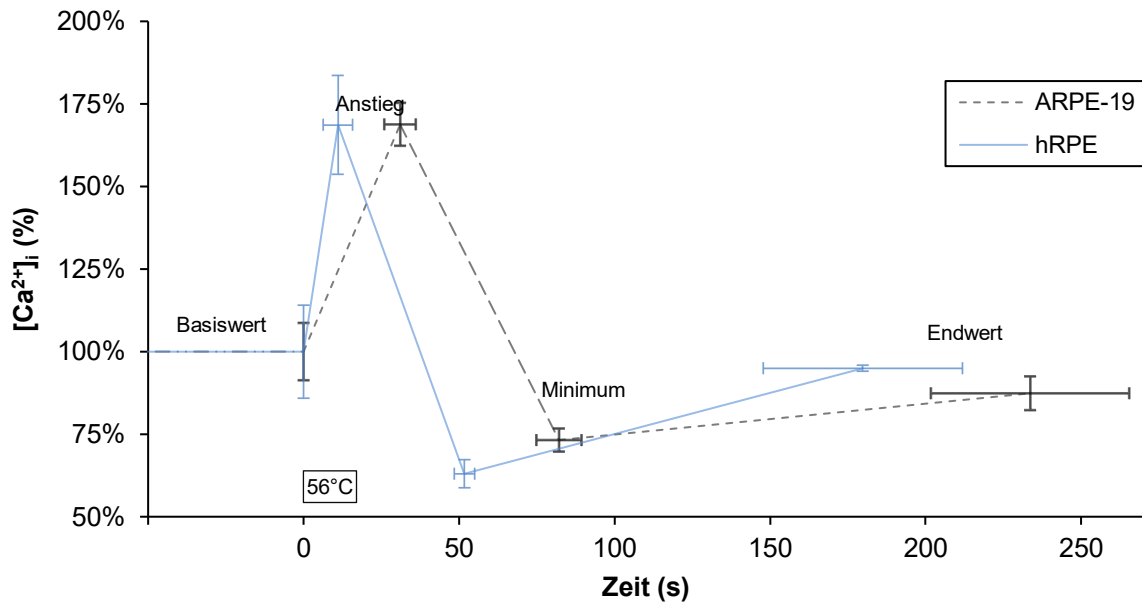


Abb. 4-4: Schematische Darstellung der charakteristischen Merkmale des hitzeinduzierten Calciumsignals unter Betrachtung des prozentualen Anstieges über dem Ruhewert. Vergleich ARPE-19 (n=304 Zellen aus 7 Kulturen) und hRPE (n=96 Zellen aus 3 Kulturen).

#### 4.1.2.1 Ruhecalcium

Nach Beginn der Messung stellte sich ein Ruhewert ein. Der errechnete Mittelwert betrug bei ARPE-19-Zellen  $101,45 \pm 8,80 \text{ nM}$  (n=304 Zellen aus 7 Kulturen), bei hRPE-Primärkulturen  $339,12 \pm 45,76 \text{ nM}$  (n=96 Zellen aus 3 Kulturen), die statistische Auswertung zeigt einen hochsignifikanten Unterschied (Abb. 4-5).

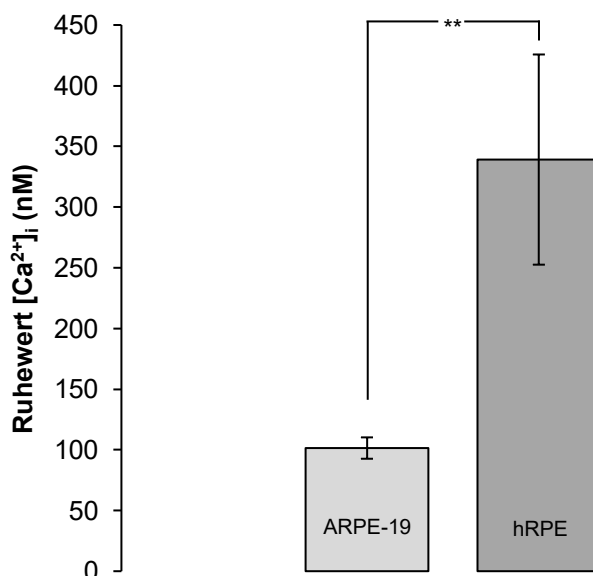


Abb. 4-5: Vergleich der Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Ruhecalciumwertes zwischen ARPE-19-Zellen (n=304 Zellen aus 7 Kulturen) und hRPE-Primärkulturen (n=96 Zellen aus 3 Kulturen),  $p < 0,01$ .

#### 4.1.2.2 Maximum

Nach der Applikation der auf 56°C erhitzten Perfusionslösung konnte ein schneller Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  auf ein Maximum beobachtet werden. Der Mittelwert dieses Maximums betrug bei ARPE-19-Zellen  $172,18 \pm 8,80$  nM (n=304 Zellen aus 7 Kulturen) und bei hRPE-Primärkulturen  $571,68 \pm 86,58$  nM (n=96 Zellen aus 3 Kulturen). Vergleicht man die Ergebnisse der Messungen miteinander, so lässt sich ein hochsignifikanter Unterschied zwischen ARPE-19-Zellen und den hRPE-Primärkulturen feststellen (Abb. 4-6).

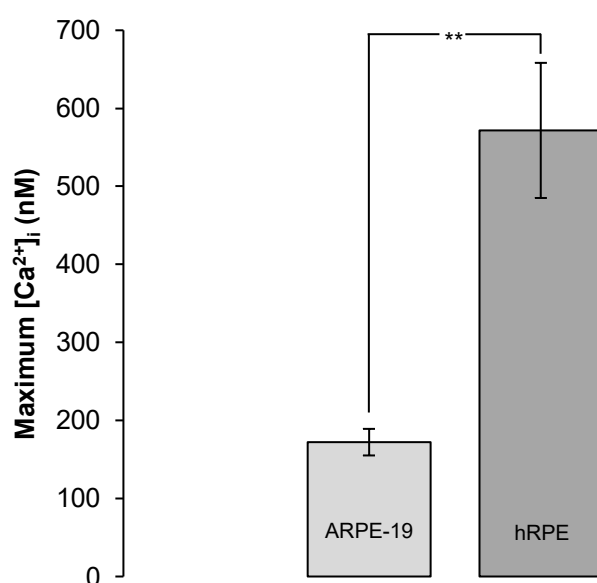


Abb. 4-6: Vergleich der Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des erreichten Maximums  $[Ca^{2+}]_i$  (nM) nach Applikation erhitzter Perfusionslösung (56°C) zwischen ARPE-19- (n=304 Zellen aus 7 Kulturen) und hRPE-Zellen (n=96 Zellen aus 3 Kulturen),  $p < 0,01$ .

Betrachtet man hingegen das Maximum im Verhältnis zum Ausgangswert (Maximum/Ruhewert), so ergibt sich ein Maximum der  $[Ca^{2+}]_i$  bezogen auf den Ausgangswert von  $168,82 \pm 6,50\%$  (n=304 Zellen aus 7 Kulturen) bei ARPE-19-Zellen und von  $168,67 \pm 14,96\%$  bei hRPE-Primärkulturen (n=96 Zellen aus 3 Kulturen), ein signifikanter Unterschied kann hierbei nicht festgestellt werden (Abb. 4-7).

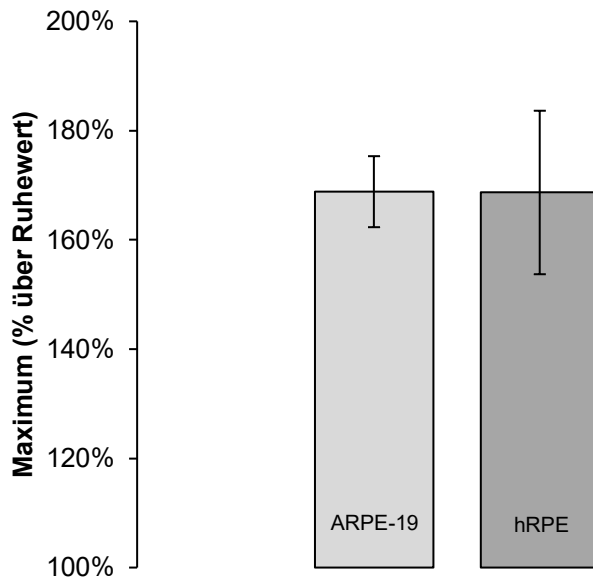


Abb. 4-7: Vergleich der Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des errechneten Maximums  $[Ca^{2+}]_i$  (%) nach Applikation erhitzter Perfusionslösung ( $56^\circ C$ ) zwischen ARPE-19- ( $n=304$  Zellen aus 7 Kulturen) und hRPE-Zellen ( $n=96$  Zellen aus 3 Kulturen),  $p>0,05$ .

#### 4.1.2.3 Minimum

Nach Erreichen des Maximums fiel die  $[Ca^{2+}]_i$  wieder ab, unterschritt den Ruhewert und erreichte ein Minimum. Der Mittelwert der Minima betrug bei ARPE-19-Zellen  $72,63 \pm 7,63 nM$  ( $n=304$  Zellen aus 7 Kulturen), das Minimum wurde im Mittel nach  $82,09 \pm 7,26 s$  erreicht. An hRPE-Primärkulturen betrug der Mittelwert der Minima  $181,34 \pm 22,61 nM$  und stellte sich nach  $51,73 \pm 3,30 s$  ein ( $n=96$  Zellen aus 3 Kulturen). Die statistische Auswertung der Ergebnisse zeigt einen hochsignifikanten Unterschied der Minima an ARPE-19-Zellen und hRPE-Primärkulturen (Abb. 4-8).

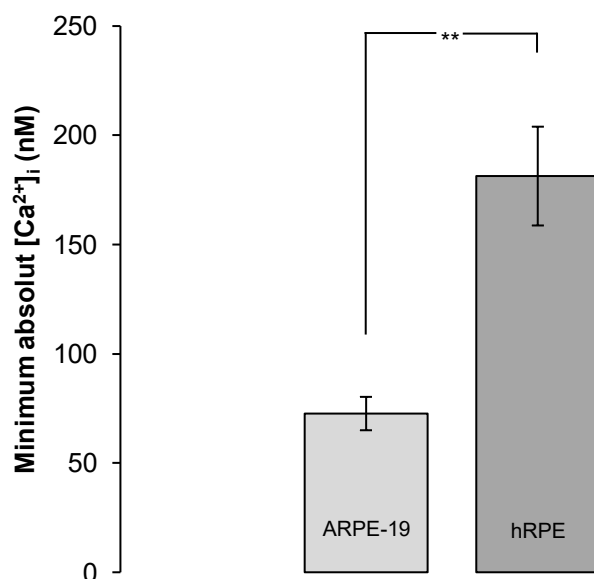


Abb. 4-8: Vergleich der Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der Minima  $[Ca^{2+}]_i$  (nM) zwischen ARPE-19- ( $n=304$  Zellen aus 7 Kulturen) und hRPE-Zellen ( $n=96$  Zellen aus 3 Kulturen),  $p<0,01$ .

Ein signifikanter Unterschied zeigt sich auch bei der Betrachtung der Minima in Relation zum Ruhewert. Hier beträgt der Mittelwert des Minimums  $73,21 \pm 3,50\%$  ( $n=304$  Zellen aus 7 Kulturen) bei ARPE-19-Zellen und  $59,87 \pm 4,26\%$  bei hRPE-Primärkulturen ( $n=96$  aus 3 Kulturen) (Abb. 4-9).

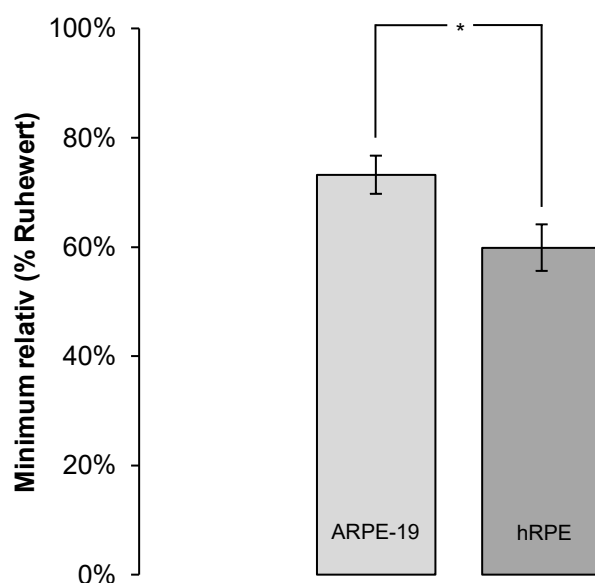


Abb. 4-9: Vergleich der Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der Minima  $[Ca^{2+}]_i$  (nM) zwischen ARPE-19- ( $n=304$  Zellen aus 7 Kulturen) und hRPE-Zellen ( $n=96$  Zellen aus 3 Kulturen), bezogen auf den Ruhewert,  $p < 0,05$ .

#### 4.1.2.4 Anstiegsdauer

Als Anstiegsdauer wurde die Zeit von der Applikation der erhitzten Perfusionslösung bis zum erneuten Erreichen des Ruhewertes definiert. Die Anstiegsdauer betrug im Mittel  $31 \pm 5,07s$  bei ARPE-19-Zellen ( $n=304$  Zellen aus 7 Kulturen) und  $11 \pm 4,75s$  bei hRPE-Primärkulturen ( $n=96$  Zellen aus 3 Kulturen). Es besteht ein hochsignifikanter Unterschied (Abb. 4-10).

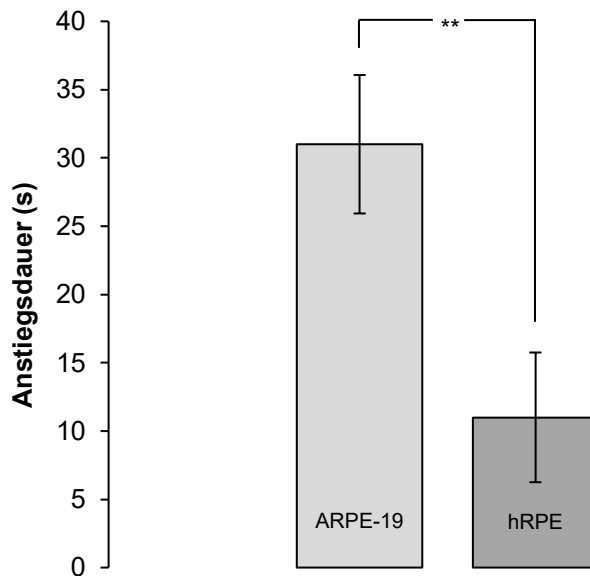


Abb. 4-10: Vergleich der Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der Anstiegsdauer (s) nach Applikation erhitzter Perfusionslösung (56°C) zwischen ARPE-19- (n=304 Zellen aus 7 Kulturen) und hRPE-Zellen (n=96 Zellen aus 3 Kulturen),  $p < 0,01$ .

#### 4.1.2.5 Ende

Nach Erreichen des Minimums stieg die  $[Ca^{2+}]_i$  wieder an, es stellte sich erneut ein Ruhewert (Ende) ein. Dieser Endwert betrug im Mittel bei ARPE-19-Zellen  $85,90 \pm 8,89$  nM (n=304 Zellen aus 7 Kulturen), entsprechend  $87,39 \pm 5,11\%$  des Ausgangswertes. Bei hRPE-Primärkulturen betrug der Endwert  $293,24 \pm 27,53$  nM, entsprechend  $97,35 \pm 0,91\%$  (n=96 Zellen aus 3 Kulturen) (Abb. 4-11).

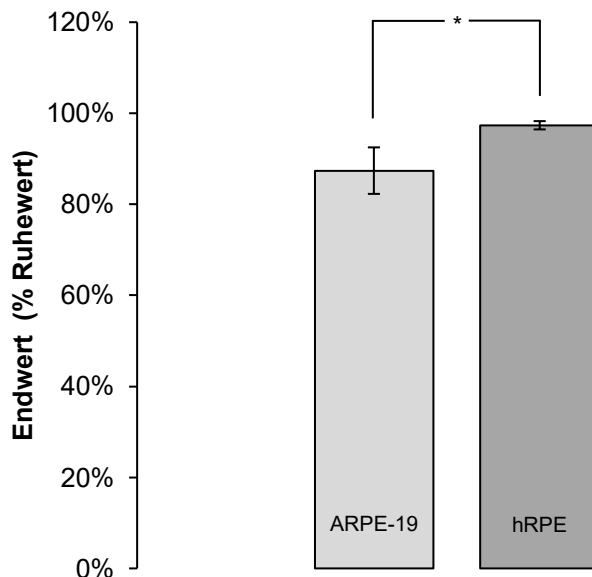


Abb. 4-11: Vergleich der Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der Endwerte  $[Ca^{2+}]_i$  (% Ruhewert) zwischen ARPE-19- (n=304 Zellen aus 7 Kulturen) und hRPE-Zellen (n=96 Zellen aus 3 Kulturen)  $p < 0,05$ .



### 4.1.3 Blocker

In einer weiteren Versuchsserie wurde die Wirksamkeit der TRP-Kanalblocker Lanthan ( $\text{La}^{3+}$ ) und Ruthenium Rot (RuR) untersucht. Hierzu wurde zunächst eine Hitzestimulation durchgeführt, anschließend die jeweilige blockerhaltige Perfusionslösung in die Badkammer eingeschwenkt und eine weitere Hitzestimulation in Anwesenheit der blockerhaltigen Perfusionslösung durchgeführt.

#### 4.1.3.1 Lanthan

In Anwesenheit von  $\text{La}^{3+}$  [ $100\mu\text{M}$ ] zeigte sich das Maximum des schnellen Anstieges der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  nach Hitzestimulation ( $56^\circ\text{C}$ ) deutlich verringert. Die Maxima betragen in Anwesenheit von  $\text{La}^{3+}$  [ $100\mu\text{M}$ ]  $135,47\pm 17,23\text{nM}$  bei ARPE-19-Zellen und  $175,60\pm 35,93\text{nM}$  bei hRPE-Primärkulturen. Die Abbildungen 4-12 und 4-13 zeigen jeweils Messungen an ARPE-19-Zellen und hRPE-Primärkulturen, es ist eine deutliche Reduktion der Maxima in Anwesenheit von  $\text{La}^{3+}$  [ $100\mu\text{M}$ ] zu erkennen.

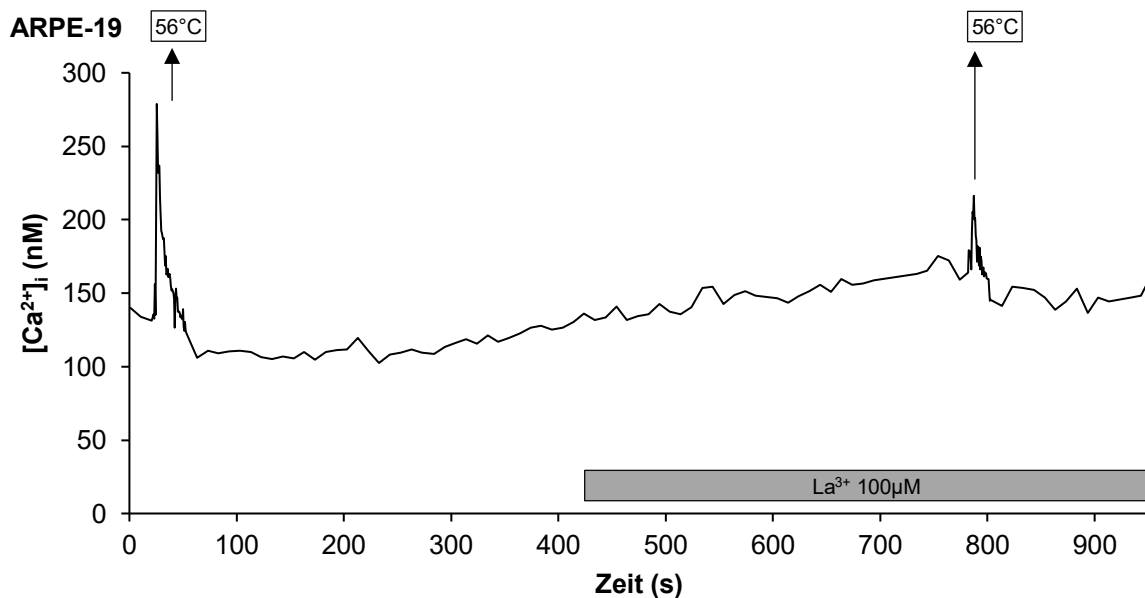


Abb. 4-12: Zweifache Hitzestimulation ( $56^\circ\text{C}$ ) von ARPE-19-Zellen, deutliche Minderung des Maximums in Anwesenheit von  $\text{La}^{3+}$  [ $100\mu\text{M}$ ].

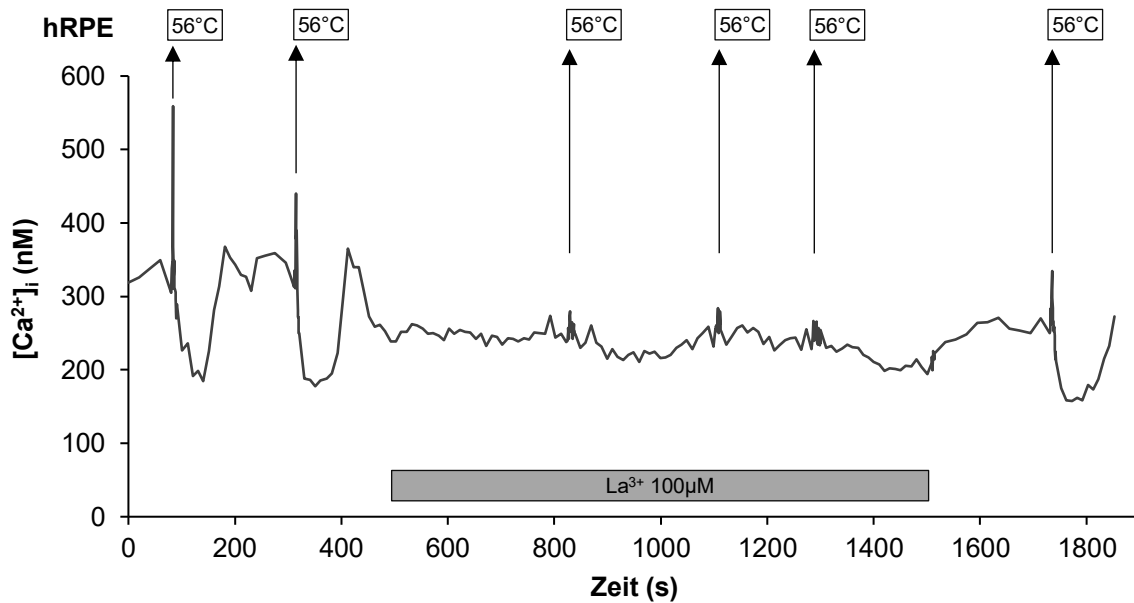


Abb. 4-13: Sechsfache Hitzestimulation (56°C) von Zellen einer hRPE-Primärkultur, deutliche Minderung des Maximums in Anwesenheit von  $\text{La}^{3+}$  [100 $\mu\text{M}$ ].

Die Anwesenheit des Blockers  $\text{La}^{3+}$  [100 $\mu\text{M}$ ] führte zu einer signifikanten Reduktion des Maximums. Das Maximum betrug in Anwesenheit von  $\text{La}^{3+}$  [100 $\mu\text{M}$ ] bezogen auf die Kontrollgruppe (CTRL)  $64,01 \pm 9,27\%$  bei ARPE-19-Zellen und  $36,08 \pm 6,59\%$  bei hRPE-Primärkulturen.

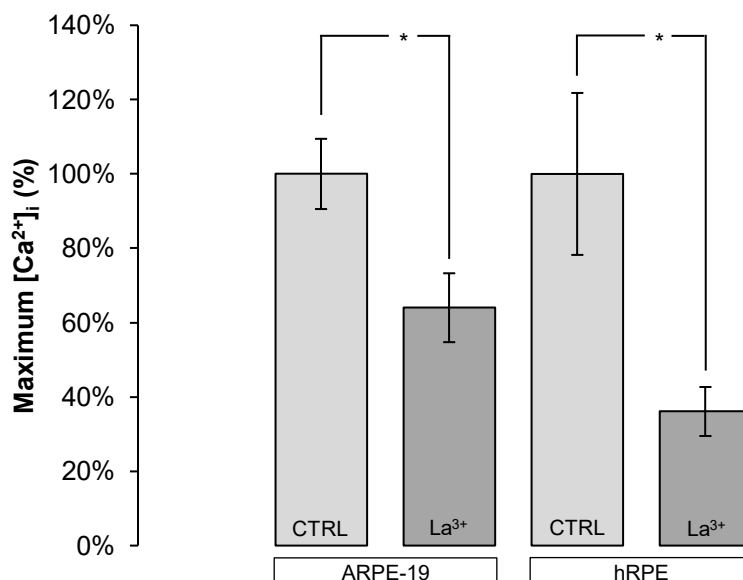


Abb. 4-14: Vergleich der Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Maximums in Anwesenheit von  $\text{La}^{3+}$  [100 $\mu\text{M}$ ] an ARPE-19-Zellen (n=56 Zellen aus 3 Kulturen),  $p < 0,05$  und hRPE-Zellen (n=24 Zellen aus 2 Kulturen),  $p < 0,05$ .

#### 4.1.3.2 Ruthenium Rot

Auch die Anwesenheit des Kanalblockers Ruthenium Rot [1 $\mu\text{M}$ ] führte zu einer signifikanten Reduktion des Maximums. Dieses betrug bei ARPE-19-Zellen

137,01±14,06nM und bei hRPE-Primärkulturen 175,60±35,93nM. Die Abbildungen 4-15 und 4-16 zeigen die Hitzestimulation an ARPE-19- und hRPE-Primärkulturen, erkennbar ist eine deutliche Reduktion des Maximums in Anwesenheit von RuR [1µM].

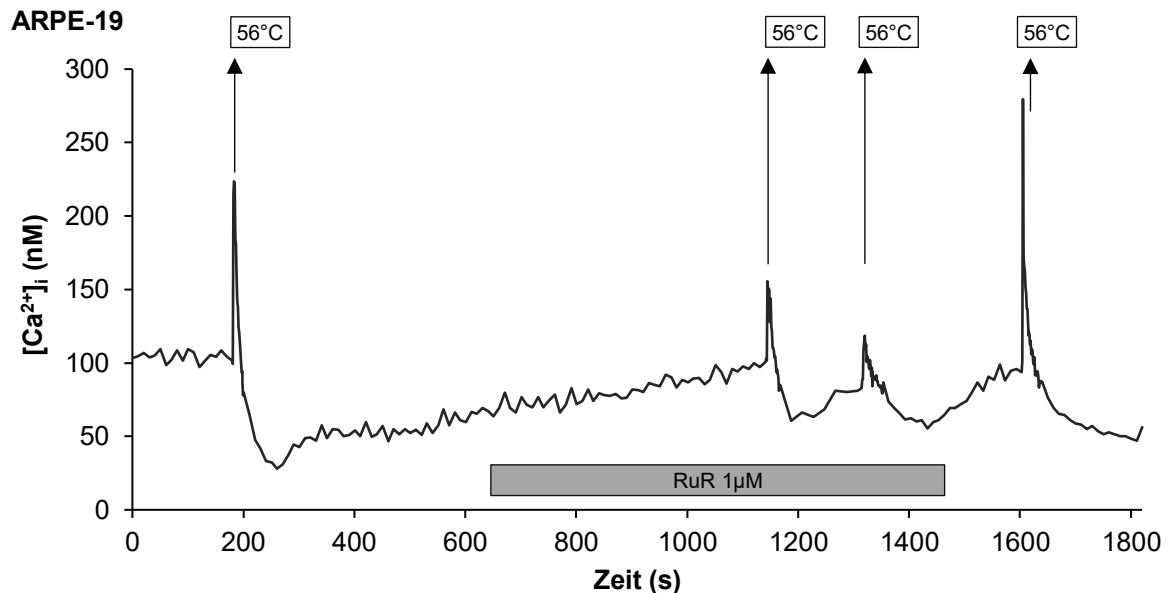


Abb. 4-15: Vierfache Hitzestimulation (56°C) von ARPE-19-Zellen, deutliche Reduktion des Maximums in Anwesenheit von RuR [1µM].

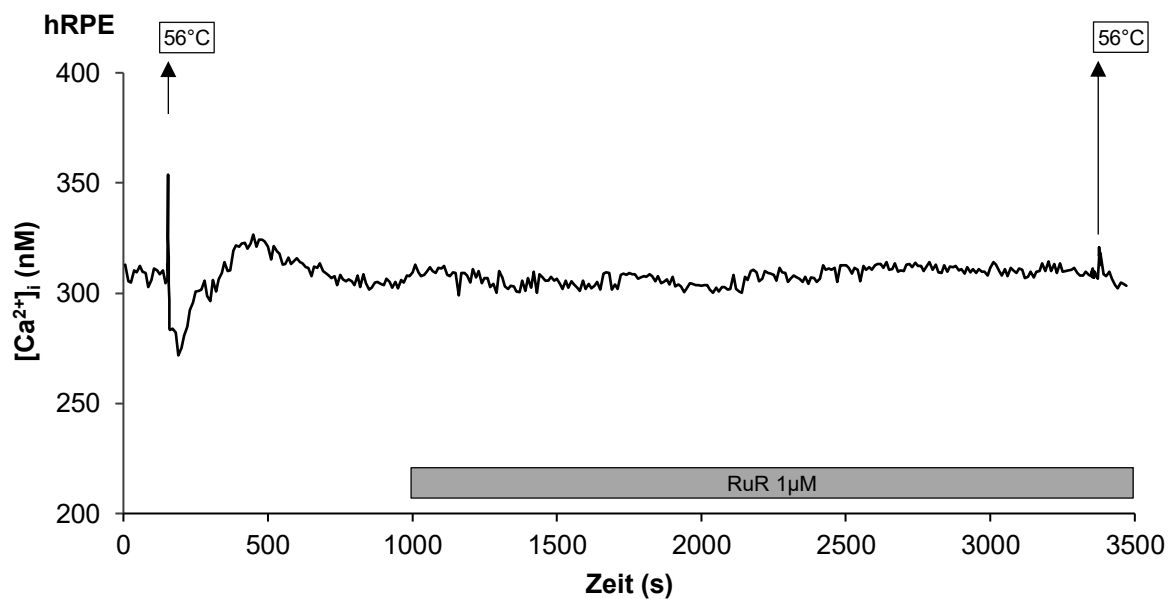


Abb. 4-16: Hitzestimulation (56°C) von Zellen einer hRPE-Primärkultur, deutliche Minderung des Maximums in Anwesenheit von RuR [1µM].

Die Anwesenheit des Blockers RuR [ $1\mu\text{M}$ ] führte zu einer signifikanten Reduktion des Maximums. Das Maximum betrug in Anwesenheit von RuR  $61,20\pm 11,70\%$  des Maximums der Kontrollgruppe bei ARPE-19-Zellen und  $42,11\pm 8,05\%$  bei hRPE-Primärkulturen.

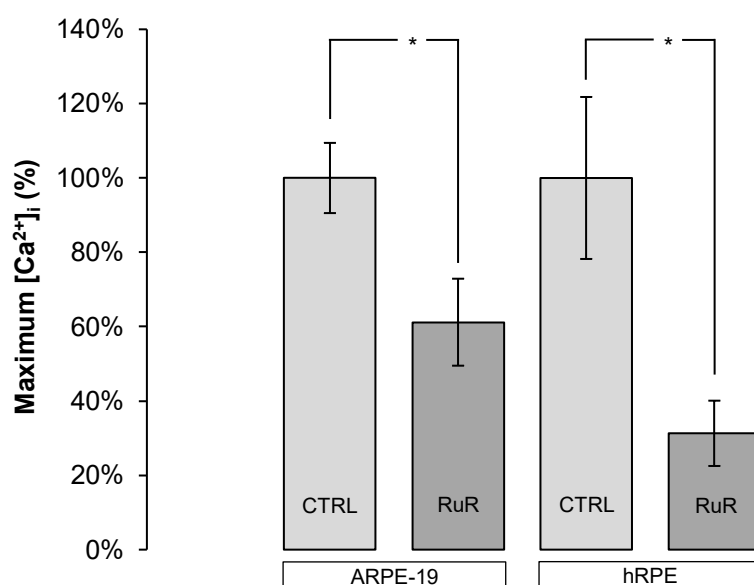


Abb. 4-17: Vergleich der Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Maximums in Anwesenheit von RuR [ $1\mu\text{M}$ ] an ARPE-19-Zellen (n=64 Zellen aus 3 Kulturen),  $p < 0,05$  und hRPE-Zellen (n=24 Zellen aus 3 Kulturen),  $p < 0,05$ .

#### 4.1.4 Hitzestimulation mit $45^\circ\text{C}$ und $56^\circ\text{C}$

Auch die Hitzestimulation mit  $45^\circ\text{C}$  führte an ARPE-19-Zellen zu einem Anstieg der [ $\text{Ca}^{2+}$ ]<sub>i</sub>. Das Maximum betrug hier  $137,07\pm 7,30\%$  des Ausgangswertes (n=40 Zellen aus 3 Kulturen). In Abbildung 4-18 erfolgt eine zweifache Hitzestimulation an ARPE-19-Zellen, zunächst mit  $45^\circ\text{C}$ , anschließend mit  $56^\circ\text{C}$ .

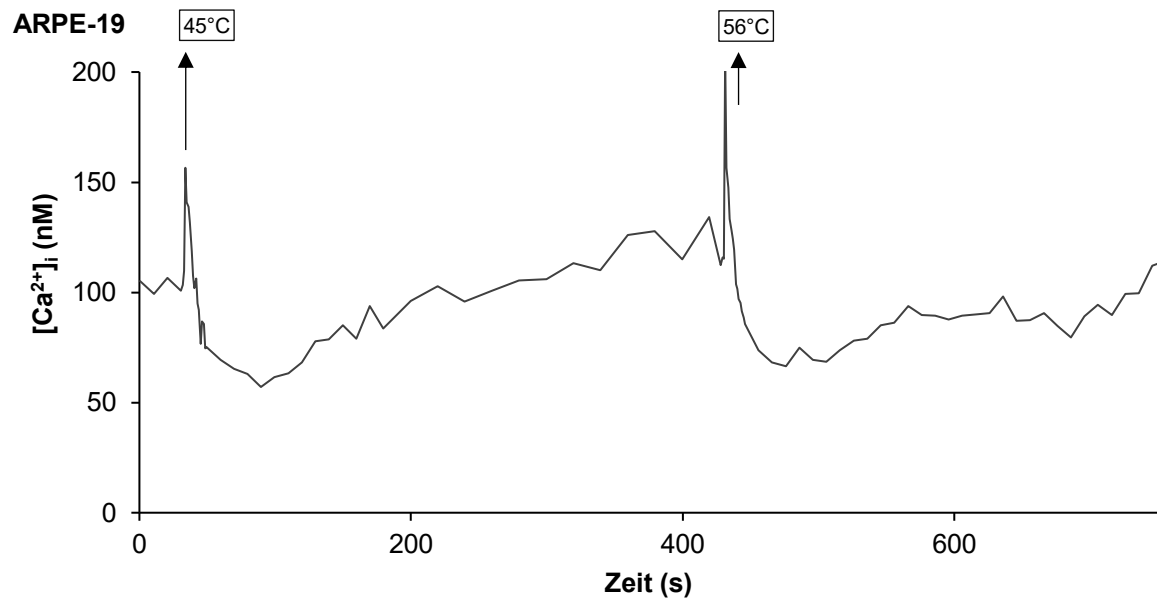


Abb. 4-18: Hitzestimulation von ARPE-19-Zellen. 1. Stimulation 45°C, 2. Stimulation 56°C.

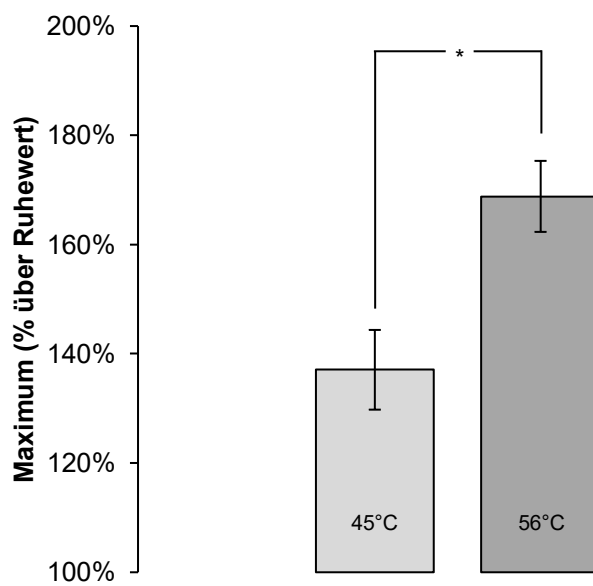


Abb. 4-19: Vergleich der Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Maximums unter Hitzestimulation mit 45°C (n=40 Zellen aus 3 Kulturen) und 56°C (n=304 Zellen aus 7 Kulturen) an ARPE-19-Zellen,  $p < 0,05$ .

## 4.2 Capsaicin

Die Applikation von Capsaicin (1 $\mu$ M, n=56 Zellen / 10 $\mu$ M, n=24 Zellen / 100 $\mu$ M, n=24 Zellen) führte sowohl an ARPE-19-Zellen, als auch an hRPE-Zellen (1 $\mu$ M, n=32 Zellen / 10 $\mu$ M, n=24 Zellen / 100 $\mu$ M, n=24 Zellen) zu keiner Veränderung der  $[Ca^{2+}]_i$ .

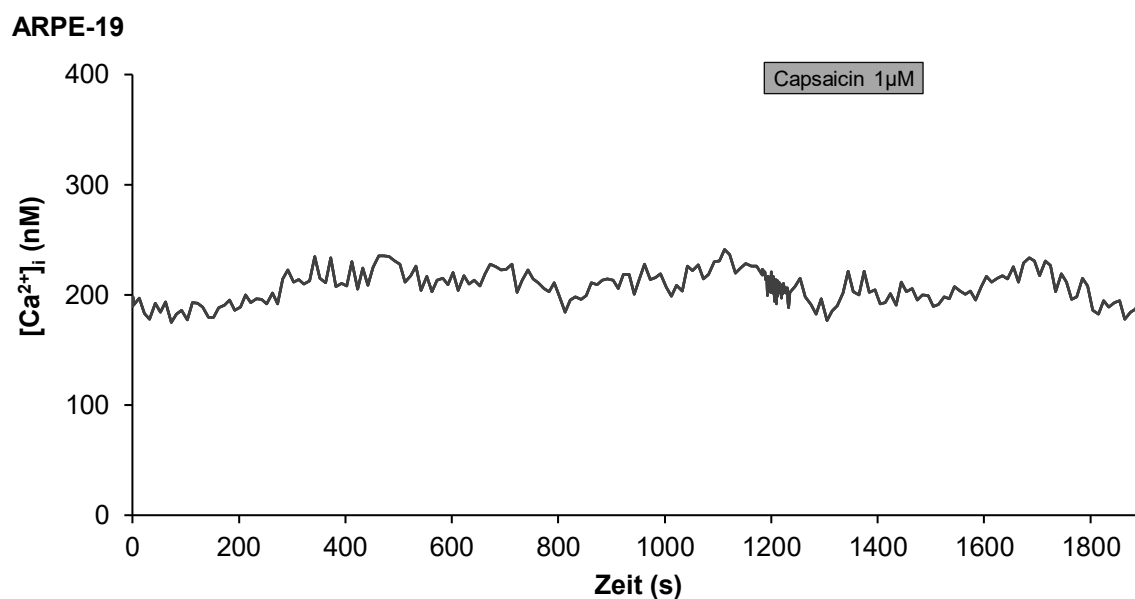


Abb. 4-20: Applikation von Capsaicin 1 $\mu$ M, ARPE-19-Zellen.

## 4.3 Laserlichtexposition (810nm Diodenlaser)

In einem weiteren Experiment sollte der Effekt einer Laserlichtexposition an ARPE-19- und hRPE-Zellen unter *in vitro* Bedingungen untersucht werden. Zu Beginn wurde eine Leistung von 630mW bei einer Expositionsdauer von 2,5s gewählt, im Verlauf wurden Leistung und Expositionsdauer sukzessiv gesteigert (Tab 4.1 und Tab 4.2). Die Blendengröße (Spotsize) wurde nicht variiert und betrug konstant 3mm.

ARPE-19													
Nr	SpS	L	ED										
1	3	630	2,5	2,5	5	5	10	10					
2	3	630	2,5	2,5	5	5	10	15	20	50			
3	3	630	2,5	2,5	5	5	10	30	60	120	180	240	300
4	3	900	2,5	2,5	5	5	10	10					
5	3	900	2,5	2,5	5	5	10	15	20	50			
6	3	900	2,5	2,5	5	5	10	30	60	120	180	240	300
7	3	1200	2,5	2,5	5	5	10	10					
8	3	1200	2,5	2,5	5	5	10	15	20	50			
9	3	1200	2,5	2,5	5	5	10	30	60	120	180	240	300

Tab 4.1: Ca<sup>2+</sup>-Messung unter Laserlichtexposition an ARPE-19-Zellen (Nr: Nummer der Messung, SpS: Spotsize [mm], L: Leistung [mW], ED: Expositionsdauer [s]).

hRPE											
Nr	SpS	L	ED								
1	3	630	3	5	10	30	90	150			
2	3	630	3	5	10	30	90	150			
3	3	630	3	5	10	30	90	150	300	480	
4	3	900	3	5	10	30	90	150			
5	3	900	3	5	10	30	90	150	300	480	
6	3	1200	3	5	10	30	90	150			
7	3	1200	3	5	10	30	90	150	300	480	

Tab 4.2: Ca<sup>2+</sup>-Messung unter Laserlichtexposition an hRPE-Zellen (Nr: Nummer der Messung, SpS: Spotsize [mm], L: Leistung [mW], ED: Expositionsdauer [s]).

In der Beispielmessung (Abb. 4-21) wird eine zweifache Laserlichtexposition mit einer Dauer von jeweils 10s gezeigt, die Leistung beträgt dabei 1200mW. Während der Exposition wurde die Bildfrequenz auf 1/s eingestellt.

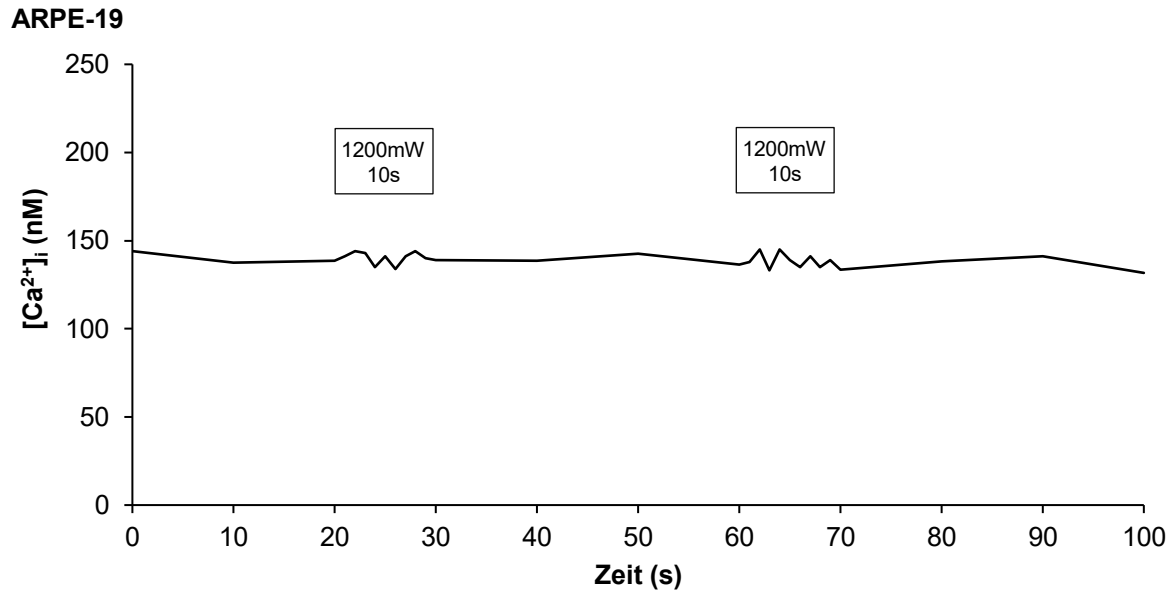


Abb. 4-21: Beispielmessung: Laserlichtexposition mit 1200mW, Spotsize 3mm, Expositionsdauer 10s, ARPE-19-Zellen.

In sämtlichen Messungen zur Untersuchung des Effektes einer Laserlichtexposition unter *in vitro* Bedingungen konnten an ARPE-19 (n=72 Zellen aus 4 Kulturen) und hRPE (n=56 Zellen aus 3 Kulturen) kein Anstieg der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> objektiviert werden. Als Gegenkontrolle wurde erneut 56°C erhitzte Perfusionslösung (KHS) eingesetzt und vor Abschluss der Messung appliziert, dieses führte in 100% zu dem unter 4.1 beschriebenen Anstieg der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>.



#### 4.4 Carbachol

Die Untersuchung des carbacholinduzierten Effektes erfolgte an ARPE-19-Zellen. Die Applikation von Carbachol (Cch) [100 $\mu$ M] führte in allen Messungen zu einem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  (n=88 Zellen aus 4 Kulturen). Der Verlauf des Signals zeigt ebenfalls die bereits in den Untersuchungen zur Hitzestimulation beschriebenen charakteristischen Merkmale auf. Ausgehend von einem mittleren Ruhewert von 137,54 $\pm$ 32,66nM stieg die  $[Ca^{2+}]_i$  nach Applikation des Agonisten an, das Maximum der  $[Ca^{2+}]_i$  betrug im Mittel 199,20 $\pm$ 49,40nM, in Relation zum Ausgangswert entspricht dieses einem Anstieg von 43,52 $\pm$ 7,47%. Anschließend sank die  $[Ca^{2+}]_i$  wieder ab, unterschritt den Ausgangswert bis zum Erreichen eines Minimums. Dieses Minimum betrug im Mittel 79,57 $\pm$ 12,20nM. Nach Erreichen des Minimums stieg die  $[Ca^{2+}]_i$  wieder an, es stellte sich erneut ein Ruhewert ein. Die Dauer des Anstieges der  $[Ca^{2+}]_i$  betrug im Mittel 36 $\pm$ 5,59s.

Weitere 3 Messungen wurden aufgrund einer unvollständigen Kalibrierung von der statistischen Auswertung ausgeschlossen.

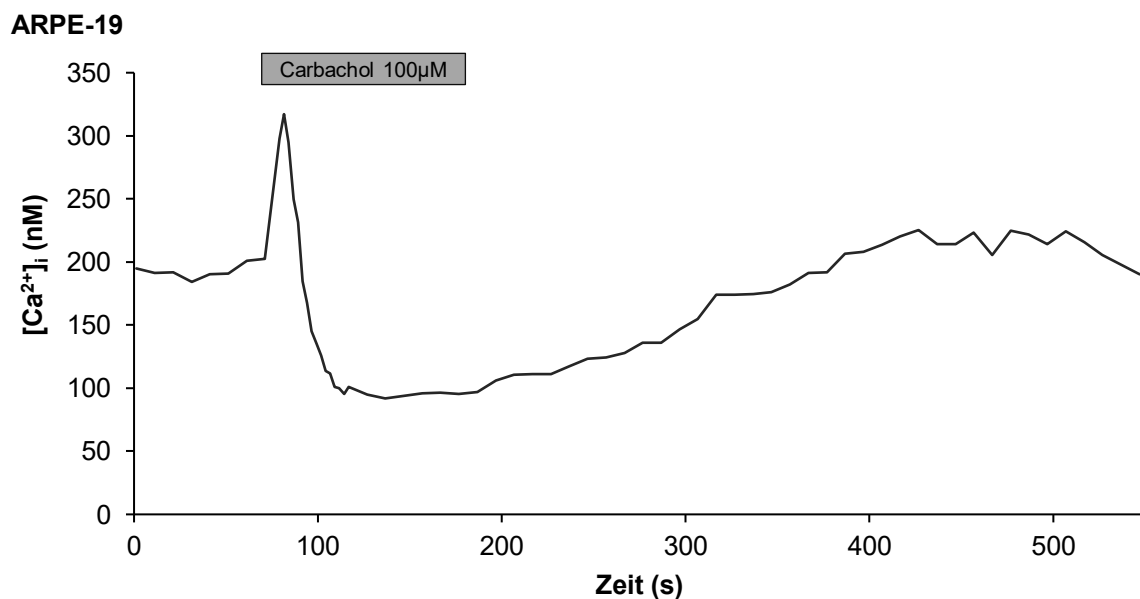


Abb. 4-22: Applikation von Cch [100 $\mu$ M], Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$ , ARPE-19-Zellen.

#### 4.4.1 Thapsigargin

Zur Bestimmung der Herkunft des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  erfolgte in einer weiteren Versuchsserie die Applikation von Cch [100 $\mu\text{M}$ ] nach Entleerung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher durch Einsatz des SERCA-Blockers Thapsigargin [1 $\mu\text{M}$ ]. In Anwesenheit von Thapsigargin führte die Applikation von Cch [100 $\mu\text{M}$ ] in keiner Messung zu einem Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (n=40 Zellen aus 3 Kulturen), jedoch konnte nach Applikation des Agonisten ein Absinken der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  auf ein Minimum beobachtet werden, dieses Minimum betrug im Mittel  $78,67 \pm 13,36 \text{ nM}$ . Nach Erreichen des Minimums stieg die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  wieder an, es stellte sich erneut ein Ruhewert ein.

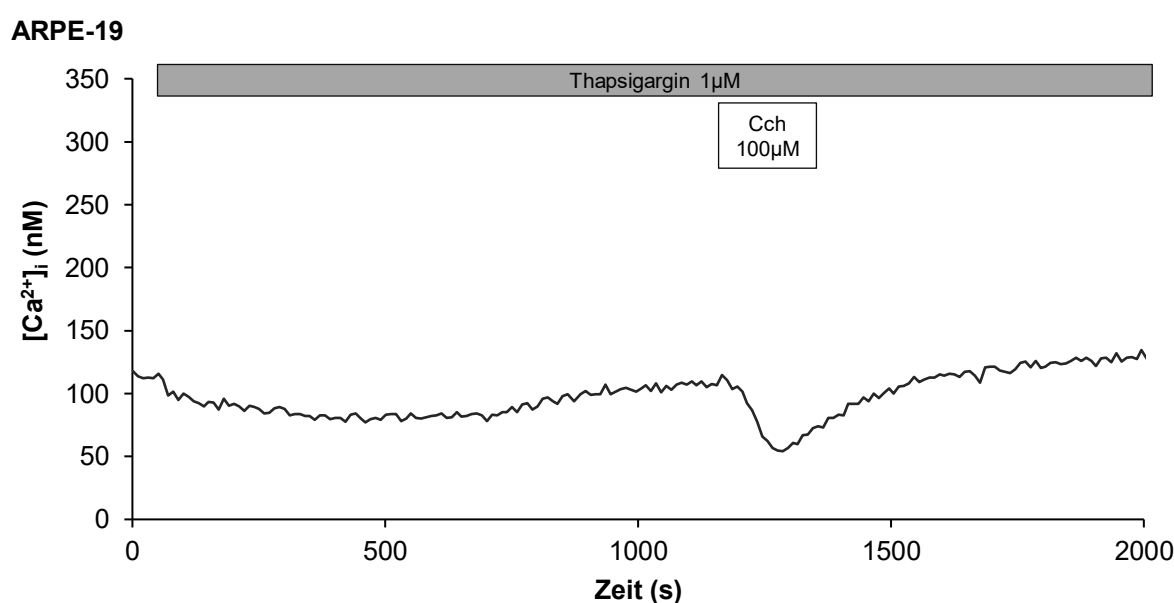


Abb. 4-23: Applikation von 100 $\mu\text{M}$  Carbachol in Anwesenheit von 1 $\mu\text{M}$  Thapsigargin, ARPE-19-Zellen.

#### 4.4.2 Lanthan

Um eine mögliche Beteiligung von TRP-Kanälen zu untersuchen, erfolgte in einer weiteren Versuchsserie die Applikation von Cch unter Verwendung einer blockerhaltigen Perfusionslösung (n=48 Zellen aus 4 Kulturen). Als Blocker wurde wie bereits in den Versuchen zur Hitzestimulation Lanthan ( $\text{La}^{3+}$ ) mit einer Wirkstoffkonzentration von 100 $\mu\text{M}$  eingesetzt. Die Abb. 4-24 zeigt den Ablauf einer Messung, zunächst wurde Cch unter Perfusion einer blockerfreien

Perfusionslösung appliziert, dieses führte zu dem in 4.4 beschriebenen Effekt. Anschließend erfolgte der Austausch der Perfusionslösung. In Anwesenheit der  $\text{La}^{3+}$ -haltigen Perfusionslösung zeigte sich das Maximum des carbacholinduzierten Anstieges der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  geringfügig vermindert (n=48 Zellen aus 4 Kulturen).

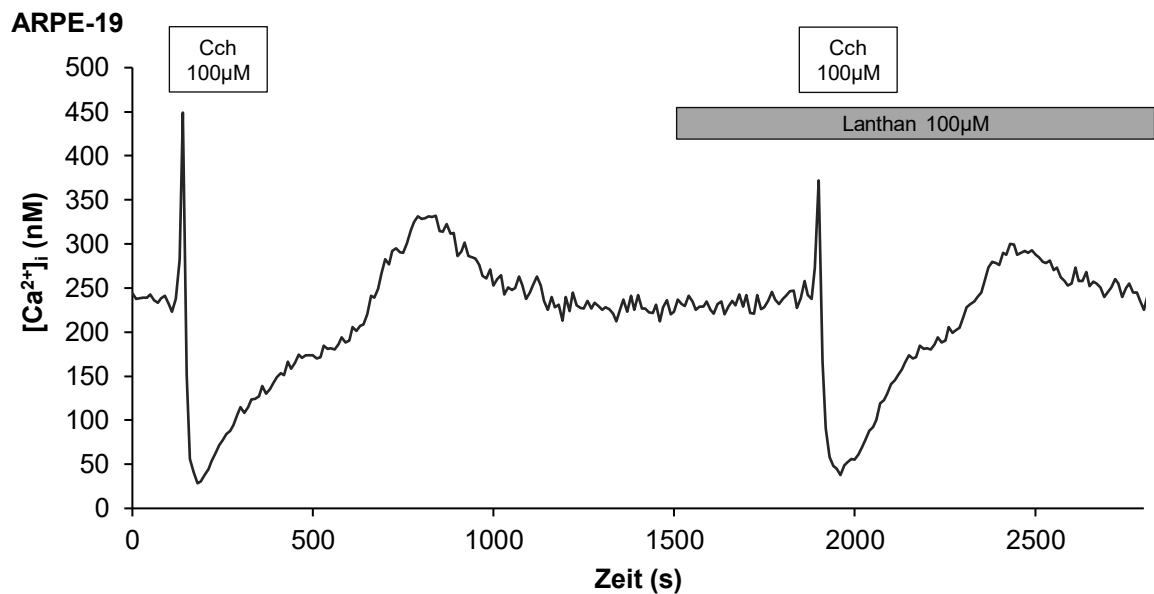


Abb. 4-24: Applikation von Carbachol [100 $\mu\text{M}$ ] an ARPE-19-Zellen, 1. Applikation unter Verwendung blockerfreier Perfusionslösung, 2. Applikation in Anwesenheit von  $\text{La}^{3+}$  [100 $\mu\text{M}$ ].

Im Mittel betrug das Maximum des carbacholinduzierten Anstieges der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in Anwesenheit von  $\text{La}^{3+}$  [100 $\mu\text{M}$ ] 82,85 $\pm$ 11,67% des Maximums nach Cch-Applikation in Anwesenheit der blockerfreien Perfusionslösung (Abb. 4-25). Im Rahmen der statistischen Auswertung lässt sich unter dieser Betrachtungsweise bei  $p > 0,05$  kein signifikanter Unterschied objektivieren.

#### 4.4.3 Ruthenium Rot

Auch in dieser Versuchsreihe wurde Ruthenium Rot (RuR) als TRP-Kanalblocker eingesetzt. Nach Austausch der blockerfreien Perfusionslösung gegen eine Perfusionslösung mit Ruthenium Rot (Wirkstoffkonzentration 1 $\mu\text{M}$ ) erfolgte eine erneute Applikation von Carbachol (100 $\mu\text{M}$ ). Hier betrug das Maximum des carbacholinduzierten Anstieges der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in Anwesenheit von RuR [1 $\mu\text{M}$ ]

86,13±9,26% des Maximums verglichen mit dem Maximum nach Cch-Applikation in Anwesenheit der blockerfreien Perfusionslösung (n=32 Zellen aus 3 Kulturen). Auch hier lässt sich im Rahmen der statistischen Auswertung bei  $p>0,05$  kein signifikanter Unterschied objektivieren.

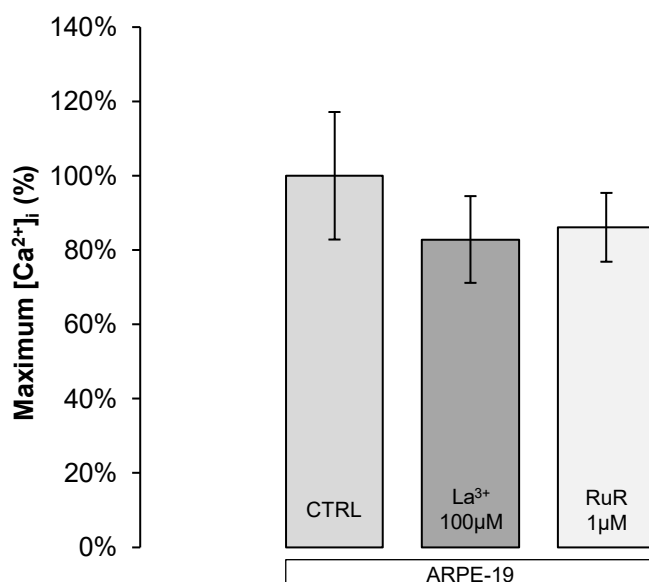


Abb. 4-25: Vergleich der Maxima nach Applikation von Carbachol [100µM] unter Verwendung der blockerfreien Perfusionslösung (CTRL) bzw. der blockerhaltigen Perfusionslösungen 1.  $La^{3+}$  [100µM], 2. RuR [1µM] an ARPE-19-Zellen.

## 4.5 Koffein

Die Untersuchung des koffeininduzierten Effektes erfolgte ebenfalls an ARPE-19-Zellen. Die Applikation einer Koffeinlösung [50mM] führte in allen Messungen zu einem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  (n=40 Zellen aus 3 Kulturen). Ausgehend von einem mittleren Ruhewert von  $97,72\pm 16,89$ nM betrug das mittlere Maximum  $146,97\pm 23,67$ nM, entsprechend einem Anstieg von  $42,99\pm 5,18\%$  über dem mittleren Ruhewert. Die Dauer des Anstieges der  $[Ca^{2+}]_i$  betrug im Mittel  $100\pm 3,98$ s, anschließend fiel die  $[Ca^{2+}]_i$  ab, der Ausgangswert wurde unterschritten und ein Minimalwert erreicht, dieses Minimum betrug im Mittel  $49,96\pm 8,31$ nM. Nach Erreichen des Minimums stieg die  $[Ca^{2+}]_i$  wieder an, es stellte sich erneut ein Ruhewert ein.

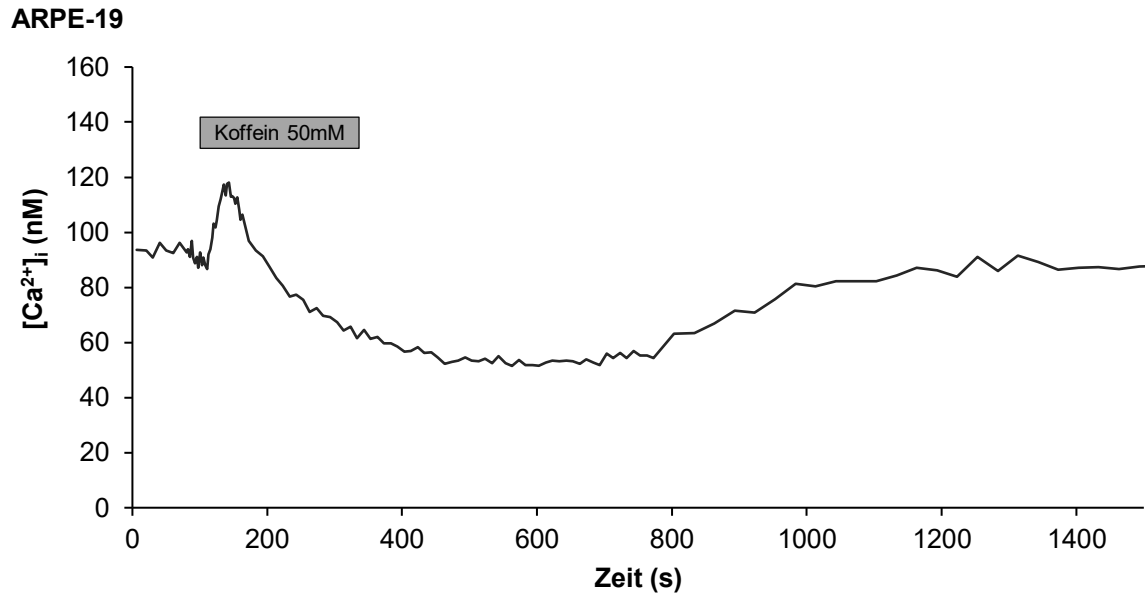


Abb. 4-26: Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  nach Applikation von Koffein [50mM], ARPE-19.

#### 4.5.1 Thapsigargin

Zur Untersuchung der Herkunft des  $Ca^{2+}$  wurde erneut Thapsigargin in einer Wirkkonzentration von  $1\mu M$  eingesetzt. In Anwesenheit von Thapsigargin [ $1\mu M$ ] konnte nach Applikation der Koffeinlösung kein Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  beobachtet werden ( $n=24$  Zellen aus 2 Kulturen). Auch in dieser Versuchsserie zeigte sich nach Applikation des Agonisten in Anwesenheit von Thapsigargin ein Absinken der  $[Ca^{2+}]_i$  auf ein Minimum, dieses betrug im Mittel  $82,91\pm 10,73 nM$ . Nach Erreichen des Minimums stieg die  $[Ca^{2+}]_i$  wieder an, es stellte sich erneut ein Ruhewert ein.

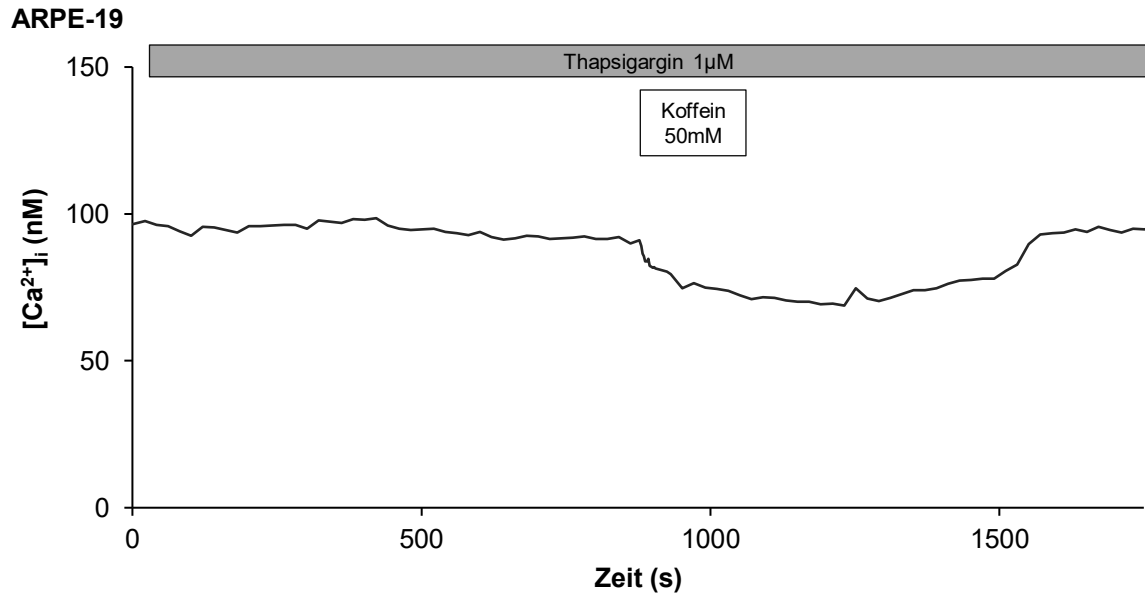


Abb. 4-27: Applikation von Koffein  $[50mM]$  in Anwesenheit von  $1\mu M$  Thapsigargin, ARPE-19-Zellen.

#### 4.5.2 Lanthan

Erneut wurde die Perfusionslösung gegen eine blockerhaltige Perfusionslösung ausgetauscht ( $n=24$  Zellen aus 2 Kulturen). In Anwesenheit von  $La^{3+}$   $[100\mu M]$  zeigte sich das Maximum des Anstieges der  $[Ca^{2+}]_i$  gering vermindert, im Mittel betrug das Maximum hier  $91,45\pm 11,87\%$  verglichen mit dem Maximum nach Applikation von Koffein in blockerfreier Perfusionslösung, bei  $p>0,05$  ergibt sich kein signifikanter Unterschied.

#### 4.5.3 Ruthenium Rot

In Anwesenheit von RuR  $[1\mu M]$  zeigte sich das Maximum der  $[Ca^{2+}]_i$  nach Applikation von Koffein  $[50mM]$  ebenfalls geringfügig vermindert und betrug im Mittel  $89,22\pm 13,67\%$  des mittleren Maximums nach Applikation von Koffein in blockerfreier Perfusionslösung ( $n=24$  Zellen aus 2 Kulturen), bei  $p>0,05$  lässt sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied objektivieren.

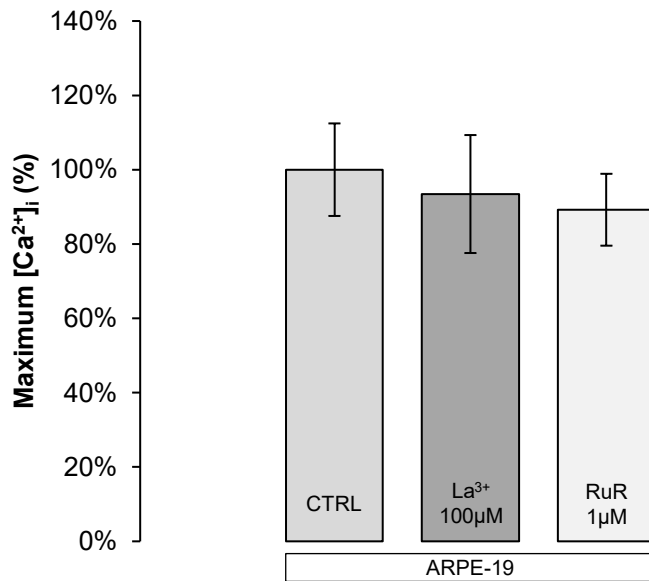


Abb. 4-28: Vergleich der Maxima nach Applikation von Koffein [50mM] unter Verwendung der blockerfreien Perfusionslösung (CTRL) und blockerhaltiger Perfusionslösungen 1.  $La^{3+}$  [100µM], 2. RuR [1µM] an ARPE-19-Zellen.

#### 4.6 VEGF-C

Die Untersuchung des Effektes von VEGF-C erfolgte unter Verwendung von ARPE-19-Zellen. Dabei wurden zwei verschiedene Wirkstoffkonzentrationen, 5ng/ml (n=24 Zellen aus 2 Kulturen) und 50ng/ml (n=24 Zellen aus 3 Kulturen), eingesetzt. Die Applikation des Agonisten führte in keiner Messung zu einem objektivierbaren Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$ .

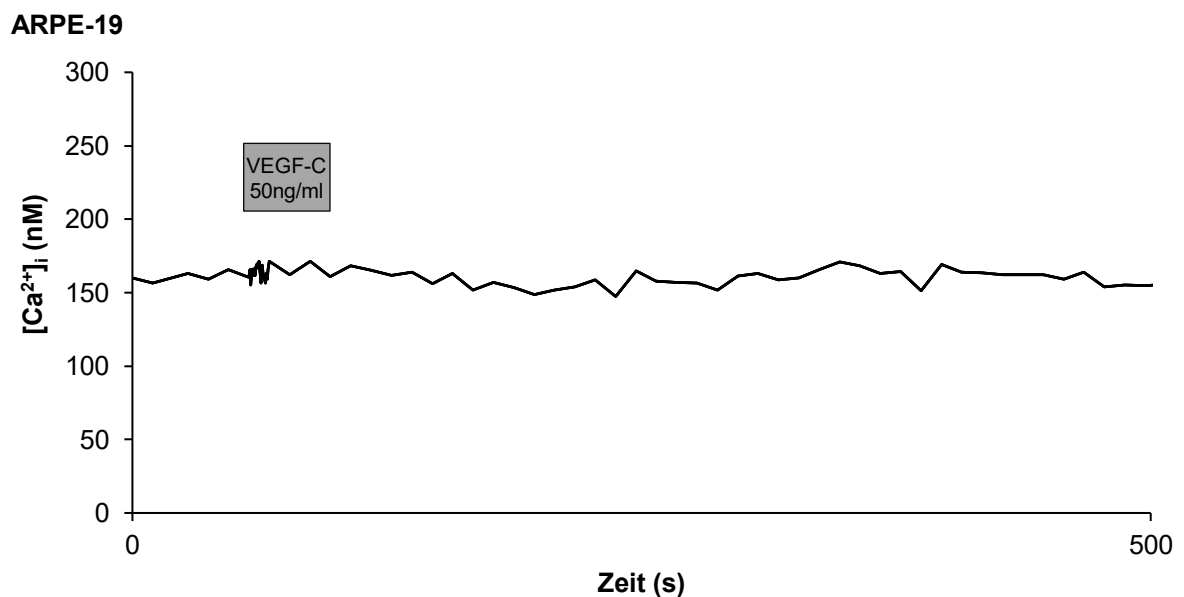


Abb. 4-29: Applikation von VEGF-C [50ng/ml], kein Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  objektivierbar, ARPE-19-Zellen.

## 4.7 Dopamin

Die Untersuchung des Effektes von Dopamin erfolgte an ARPE-19-Zellen. Die Applikation des Agonisten mit einer Wirkstoffkonzentration von  $0,5\mu\text{M}$  ( $n=32$  Zellen aus 3 Kulturen) und  $1\mu\text{M}$  ( $n=24$  Zellen aus 2 Kulturen) führte in keiner Messung zu einem objektivierbaren Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .

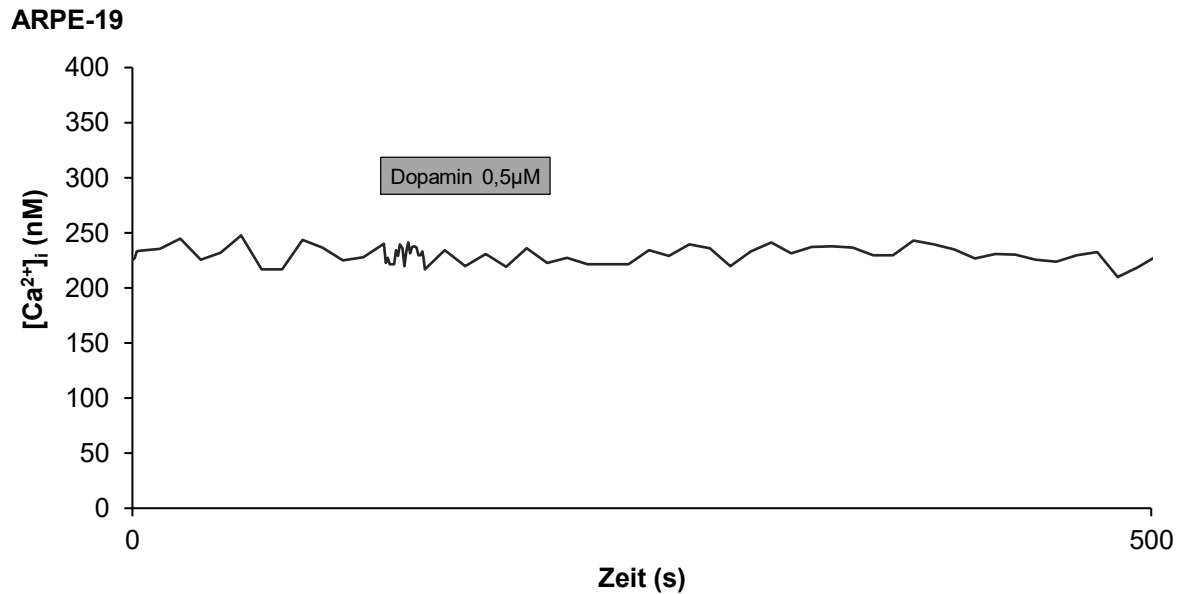


Abb. 4-30: Applikation von Dopamin [ $0,5\mu\text{M}$ ], kein Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  objektivierbar, ARPE-19-Zellen.



## 5 Diskussion

### 5.1 Untersuchung der Beteiligung von TRP-Kanälen an der Calciumhomöostase in Pigmentepithelzellen

Viele essenzielle zelluläre Prozesse im retinalen Pigmentepithel werden über Veränderungen des freien intrazellulären Calciums reguliert. Hierzu zählen beispielsweise die Phagozytose abgestoßener Außensegmente der Photorezeptoren, der transzelluläre Flüssigkeits- und Ionentransport, Zelldifferenzierung sowie die Sekretion von Wachstumsfaktoren (Strauss 2005; Wimmers et al. 2007). Grundsätzlich existieren zwei Wege, die Konzentration des freien intrazellulären Calciums zu erhöhen, so kann Calcium über membranständige Ionenkanäle aus dem Extrazellulärraum in die Zelle einströmen oder aus intrazellulären Calciumspeichern nach Aktivierung von Ryanodin- oder Inositoltrisphosphat (IP<sub>3</sub>)-Rezeptoren ausströmen. Das RPE exprimiert eine Reihe von Calciumkanälen, hierzu gehören neben den Gruppen der spannungsabhängigen L-Typ Kanäle und der ligandengesteuerten Kanäle auch die Gruppe der TRP-Kanäle, deren Mitglieder in 7 Unterfamilien unterteilt werden (Wimmers et al. 2007; Li 2017). In RPE-Zellen konnte bereits die Expression der Mitglieder TRPC1, C4, C7 sowie TRPM1, M3, M7 nachgewiesen werden (Bollimuntha et al. 2005; Wimmers und Strauss 2007; Zhao et al. 2015). Bezüglich der Expression von TRPV-Kanälen im RPE finden sich in der Literatur verschiedene Angaben. Während wir 2010 in eigenen Untersuchungen die Expression von TRPV1, V2, V3 und V4 an frisch isolierten humanen RPE-Zellen und an Zellen der Zelllinie ARPE-19 nachweisen konnten (Cordeiro et al. 2010), berichteten Kennedy et al. im selben Jahr hingegen über die Expression von TRPV5 und V6 in humanen RPE-Primärkulturen (Kennedy et al. 2010). Diese kontroversen Angaben könnten auf der Verwendung unterschiedlicher Zellkulturprotokolle basieren, wobei die verschiedenen Muster der Proteinexpressionen der Zusammensetzung der verwendeten Kulturmedien folgen könnten. Arredondo Zamarripa et al. bestätigten hingegen 2017 die Expression von TRPV4-Kanälen an ARPE-19-Zellen (Arredondo Zamarripa et al. 2017), Zhao et al. berichteten 2015 über die Expression von TRPV4-Kanälen an fetalen humanen RPE-Zellen (Zhao et al. 2015). Über die Funktionalität der TRP-Kanäle in RPE-Zellen ist bislang nur wenig bekannt. Die Aufgabe in dieser Arbeit

bestand in der funktionellen Untersuchung von TRP-Kanälen und deren Beteiligung an der Regulation des freien zytosolischen Calciums in Pigmentepithelzellen sowie der Untersuchung möglicher Implikationen für RPE-Zellfunktionen. Hierzu wurden Messungen des freien zytosolischen Calciums mit Hilfe des calciumsensitiven Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2 an Zellen der humanen RPE-Zelllinie ARPE-19 und an primären RPE-Zellkulturen des Menschen durchgeführt.

### **5.1.1 Zellkultur**

Zur Untersuchung der funktionellen Eigenschaften von Ionenkanälen und Transportern bedarf es häufig Zellen aus Zellkulturen. Zellkulturen bieten den Vorteil, dass sowohl einzelne Zellen, als auch Zellverbände unabhängig von ihren Nachbargeweben untersucht werden können, was eine Voraussetzung für verschiedene Methoden zur Untersuchung von Ionenkanälen, beispielsweise der Patch-Clamp-Technik oder des Calcium-Imaging, darstellt (Reichhart und Strauss 2014). Zur Untersuchung von Ionenkanälen oder Ionentransportern können sowohl Zelllinien als auch Primärkulturen verwendet werden. Es existieren diverse RPE-Zelllinien unterschiedlicher Spezies, hierzu zählt auch die humane Zelllinie ARPE-19. Die ARPE-19-Zelllinie ist sehr gut untersucht, Samuel et al. zeigten vergleichbare Gen-Expressionsmuster an ARPE-19- und nativen RPE-Zellen auf, weshalb ARPE-19-Zellen ein funktionelles Modell für RPE-Studien repräsentieren (Samuel et al. 2017). RPE-Primärkulturen können aus fetalen und adulten RPE-Zellen erzeugt werden (Zhu et al. 1998). In dieser Arbeit wurden humane RPE-Zellen adulter Spender unter geringer Modifikation des Isolationsprotokolls von Zhu et al. extrahiert und kultiviert (Zhu et al. 1998). Da die Verfügbarkeit von Spenderaugen sehr gering ist, wurden Augen zur Isolation der RPE-Zellen bis zu 36h nach Eintritt des Todes verwendet. Mit fortschreitender postmortaler Zeit muss von Veränderungen der Zellregulation und Gen-Expression ausgegangen werden, was in der Interpretation der Untersuchungsergebnisse zu berücksichtigen ist. In anderen Studien fiel die postmortale Zeitspanne deutlich geringer aus, so verwendeten Palanisamy et al. Spenderaugen bis maximal 6h, Jovancevic et al. Spenderaugen 3-10h nach Todeseintritt zur Herstellung der humanen RPE-Primärkulturen (Jovancevic et al. 2017; Palanisamy et al. 2019). Sowohl die hRPE-Zellen als auch die ARPE-19-Zellen erreichten eine Konfluenz nach 5 Tagen. Mikroskopisch konnten jedoch Unterschiede beobachtet werden, so zeigten die

ARPE-19-Zellen am 5. Tag nach Aussaat im Vergleich zu den hRPE-Zellen eine größere Homogenität.

### **5.1.2 Calcium-Imaging**

Die in dieser Arbeit verwendete Methode des Calcium-Imaging unter Einsatz des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2 stellt eine etablierte Methode zur Untersuchung intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale dar und ermöglicht die Identifikation entsprechender Ionenkanäle, die an der Generierung etwaiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale beteiligt sind. Die Aussagekraft der Messergebnisse ist jedoch von der Spezifität der eingesetzten Agonisten und entsprechender Kanalblocker abhängig. Darüber hinaus ist die Verwendung von Zellen aus Zellkulturen zum Calcium-Imaging besser geeignet, da frisch isolierte Zellen einen höheren Grad an Pigmentierung aufweisen, was die Detektion der Fluoreszenz des Fura-2 reduziert (Reichhart und Strauss 2014). Entsprechend wurden die Untersuchungen in dieser Arbeit an Zellen aus Zellkulturen durchgeführt.

## **5.2 Hitzestimulation**

Das TRPV-Expressionsmuster in ARPE-19- und hRPE-Zellen legt nahe, deren funktionelle Expression mittels Calcium-Imaging unter Einsatz des sehr spezifischen Stimulus, nämlich Hitze, zu untersuchen.

Die Hitzestimulation von RPE-Zellen aus der ARPE-19-Zelllinie und hRPE-Primärkulturen wurde unter direkter Applikation erhitzter KHS (56°C) erzielt und führte in sämtlichen durchgeführten Messungen zu einem typischen schnellen transienten Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Ausgehend von einem Ruhewert führte die Hitzestimulation zum Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  auf ein Maximum, gefolgt von einem Abfall der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  auf ein Minimum und konsekutivem erneuten Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  bis zu einem Endwert.

### **5.2.1 Leerprobe**

Die Applikation 37°C warmer, somit normothermer KHS hingegen konnte diesen Effekt nicht erzielen. Dieses ließ ausschließen, dass es sich bei dem beobachteten Effekt um eine Antwort der RPE-Zellen auf einen mechanischen Reiz handelt. Mechanische Reize können in RPE-Zellen Calciumsignale triggern, welche sich von Zelle zu Zelle über das Epithel ausbreiten (Abu Khamidakh et al. 2013; Himpens et al. 1999). Diese Kontrollen wurden in sämtlichen Messungen

durchgeführt und zeigten in allen Fällen, dass die Applikation normothermer KHS zu keinem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration führte.

### 5.2.2 Basale Calciumkonzentration

Die Kurven der hitzeinduzierten Calciumsignale wurden quantitativ nach Amplitudenhöhe und Zeitintervall charakterisiert und miteinander verglichen. Hierbei zeigten sich die Konfigurationen der Signale an ARPE-19-Zellen und hRPE-Zellen vergleichbar, signifikante Unterschiede ergaben sich jedoch hinsichtlich der absoluten Werte. So betrug der errechnete Mittelwert der Ruhecalciumkonzentration an ARPE-19-Zellen  $101,45 \pm 8,80 \text{ nM}$ . Die basale Calciumkonzentration beträgt in unstimulierten RPE-Zellen etwa  $100 \text{ nM}$  (Wimmers und Strauss 2007). In der Literatur werden folgende basale Calciumkonzentrationen beschrieben: humanes fetales RPE  $152 \text{ nM}$  (Halbach et al. 2015), bovines RPE  $130 \text{ nM}$  (Peterson et al. 1997), ARPE-19  $147 \text{ nM}$  (Reigada et al. 2005). Verglichen dazu zeigte sich der errechnete Mittelwert des Ruhecalciumgehaltes der hRPE-Primärkulturen in dieser Arbeit mit  $339,12 \pm 45,76 \text{ nM}$  deutlich erhöht.

Zur Erfüllung diverser Funktionen ist eine enge Regulation der Calciumhomöostase in RPE-Zellen erforderlich (Wimmers et al. 2007). Durch membranständige  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporter und  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen wird unter Energieaufwand kontinuierlich  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Zytosol in den Extrazellulärraum transportiert respektive durch die Calcium-ATPase des sarcoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums (SERCA) in intrazelluläre Speicher aufgenommen (Kennedy und Mangini 1996; Mangini et al. 1997). Demgegenüber steht ein kontinuierlicher basaler  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom, welcher durch TRPC-Kanäle vermittelt wird (Wimmers und Strauss 2007).

Wie bereits beschrieben, kann das verlängerte postmortale Zeitintervall vor Extraktion der RPE-Zellen aus den humanen Spenderaugen zu einer Veränderung der Regulation und Expression beispielsweise der o.g. Calcium-Transportproteine führen, was zu einer Erhöhung der basalen Calciumkonzentration  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  führen kann.

Im Verbund des Monolayers zeigen sich RPE-Zellen phänotypisch gleich, jedoch besteht eine große interzelluläre Heterogenität bezüglich des Gehaltes an Melanin und Lipofuszin, aber auch bezüglich der Proteinexpression, was in einer Variabilität der Zellfunktionalität resultiert (Burke und Hjelmeland 2005). Hierdurch

wären unterschiedliche Ruhekonzentrationen der  $[Ca^{2+}]_i$  zwischen den einzelnen Zellen erklärbar. Da aber in der Auswertung Mittelwerte der Messergebnisse aller Zellen gebildet wurden, erklärt sich die Diskrepanz zwischen den erhobenen Mittelwerten hierdurch nicht hinreichend.

Darüber hinaus unterliegt das Proteinexpressionsmuster der Zellen im Rahmen der Kultivierung einer Beeinflussung durch die Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien. In dieser Arbeit erfolgte die Kultivierung der humanen RPE-Zellen unter Einsatz eines serumfreien Kulturmediums. Halbach et al. setzten zur Herstellung der hRPE-Kulturen hingegen 10% fetales Kälberserum (FCS) ein (Halbach et al. 2015), was wiederum zu einer unterschiedlichen Proteinexpression führen und Diskrepanzen in den erhobenen Mittelwerten der basalen  $[Ca^{2+}]_i$  zur Folge haben kann.

### 5.2.3 Maximum

Die Applikation der erhitzten Perfusionslösung (56°C) führte in allen durchgeführten Messungen an ARPE-19- und hRPE-Zellen zu einem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  auf ein Maximum. Bei der statistischen Auswertung zeigte sich auch hier ein hochsignifikanter Unterschied der Mittelwerte der erzielten Absolutwerte: ARPE-19  $172,18 \pm 8,80$ nM, hRPE  $571,68 \pm 86,58$ nM. Um die Höhe der Maxima zu vergleichen, erfolgte eine prozentuale Auswertung der absoluten Werte in Bezug auf die basale Calciumkonzentration. Entsprechend betrug das Maximum der  $[Ca^{2+}]_i$  nach Hitzestimulation an ARPE-19-Zellen  $168,82 \pm 6,50\%$  sowie an hRPE-Zellen  $168,67 \pm 14,96\%$  der basalen Calciumkonzentration. Statistisch kann hier kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, was darauf hindeutet, dass die Hitzestimulation an ARPE-19- und hRPE-Zellen dieselben Mechanismen zur Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  aktiviert.

Das Zeitintervall zwischen Applikation der erhitzten Perfusionslösung und dem Beginn des Anstieges der  $[Ca^{2+}]_i$  konnte aus technischen Gründen nicht detailliert untersucht werden, da das kleinste Aufzeichnungsintervall des verwendeten Calcium-Imaging-Setups 0,5s betrug. Hierzu kann folgende Aussage getroffen werden: Die Applikation des Hitzestimulus führte in allen Fällen - sowohl an ARPE-19-Zellen, als auch an hRPE-Zellen - zu einem unmittelbaren Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$ .

#### 5.2.4 Minimum

Nach Erreichen des Maximums wurde in allen Messungen ein Abfallen der  $[Ca^{2+}]_i$  unter den Ausgangswert an ARPE-19- und hRPE-Zellen auf ein Minimum beobachtet. Bezüglich der absoluten Werte der  $[Ca^{2+}]_i$  ist hier ein hochsignifikanter Unterschied ersichtlich, aber auch die prozentuale Auswertung der absoluten Werte in Bezug auf die basale Calciumkonzentration weist einen signifikanten Unterschied auf. Zur Reduktion der  $[Ca^{2+}]_i$  stehen im RPE drei Mechanismen zur Verfügung, so kann Calcium sehr effektiv über den  $Na^+/Ca^{2+}$ -Antiporter vom NCX-1 Typ und von  $Ca^{2+}$ -ATPasen unter ATP-Hydrolyse aus der Zelle ausgeschleust, aber auch über die  $Ca^{2+}$ -ATPase des ER (SERCA) in intrazelluläre Speicher aufgenommen werden (Wimmers et al. 2007).

#### 5.2.5 Anstiegsdauer

Auch bei der Betrachtung der Anstiegsdauer zeigt sich ein hochsignifikanter Unterschied zwischen ARPE-19- (31s) und hRPE-Zellen (11s). Die beobachteten Unterschiede bezüglich der Quantität des Minimums, als auch bezüglich der Anstiegsdauer lassen eine unterschiedliche Expression der o.g. Calcium-Transportproteine in ARPE-19- und hRPE-Zellen vermuten.

#### 5.2.6 Endwert

Nach Erreichen des Minimums konnte ein konsekutiver Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  beobachtet werden, es stellte sich ein Endwert ein. Der Endwert wurde definitionsgemäß dann erreicht, wenn über einen Zeitraum von 50s kein weiterer Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  zu beobachten war. Es zeigte sich bezüglich der Endwerte zwischen ARPE-19-Zellen mit  $87,39 \pm 5,11\%$  und hRPE-Zellen mit  $97,35 \pm 0,91\%$  der initialen basalen Calciumkonzentration ein signifikanter Unterschied. Diese ermittelten Werte sind jedoch aus folgendem Grund nicht aussagekräftig und damit nicht verwertbar:

Die Geschwindigkeit des Wiederanstieges der  $[Ca^{2+}]_i$  zeigte sich in einer Abhängigkeit von dem Zeitpunkt, an dem die Reperfusion der Badkammer mit normothermer Perfusionslösung gestartet wurde. Entsprechend hätte die Reperfusion nach Ablauf eines festen Zeitintervalls nach Applikation des Hitzestimulus gestartet werden müssen, was bei der Durchführung der Messungen nicht berücksichtigt wurde, so wurde die Rollradpumpe nach ersichtlichem Wiederanstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  manuell zu unterschiedlichen Zeitpunkten gestartet.

### 5.2.7 Blockerwirksamkeit

Zur Untersuchung einer möglichen Beteiligung der TRP-Kanäle an dem hitzeinduzierten Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  erfolgte die Applikation des Hitzestimulus in weiteren Messungen an ARPE-19- und hRPE-Zellen in Anwesenheit der Blocker Lanthan ( $La^{3+}$ ) und Ruthenium Rot (RuR). Hierdurch gelang in allen Messungen, sowohl an ARPE-19- als auch an hRPE-Zellen, eine signifikante Reduktion des oben beschriebenen Effektes.  $La^{3+}$  ist ein relativ unspezifischer Blocker verschiedener Ionenkanäle und Transporter, in niedrigen Konzentrationen ist  $La^{3+}$  jedoch als wirksamer Blocker verschiedener TRP-Kanäle bekannt (Clapham et al. 2005; Mlinar und Enyeart 1993; Tytgat und Daenens 1997; Enyeart et al. 2002). Auch RuR ist als Blocker einer Vielzahl von TRP-Kanälen bekannt (Clapham et al. 2005). Die Aussagekraft dieser Ergebnisse wird trotz Verwendung relativ unspezifischer Inhibitoren aufgrund der hohen Spezifität des gewählten Stimulus – der Hitze – deutlich gestärkt. Derzeit sind 11 thermosensitive TRP-Kanäle der Familien TRPC (C5), TRPV (V1-4), TRPA (A1) und TRPM (M2-5, M8) beschrieben (Clapham et al. 2005; Clapham et al. 2003; Uchida et al. 2017; Wang 2017; Vriens und Voets 2018), wovon TRPV1-4 und TRPM3 im RPE exprimiert werden (Wimmers et al. 2007; Bollimuntha et al. 2005; Zhao et al. 2015; Cordeiro et al. 2010). Die Temperatur-Schwellenwerte von TRPV3 (32-39°C) sowie TRPV4 (27-35°C) liegen hierbei unterhalb, bzw. im Bereich der Temperatur der Badkammer von 37°C, was eine Beteiligung an der Entstehung des hitzeinduzierten Effektes ausschließt. Der Temperatur-Schwellenwert zur Aktivierung von TRPM3 wird in der Literatur mit 40°C angegeben (Held et al. 2015). TRPV1 und TRPV2 hingegen werden durch noxische Temperaturen von >42°C respektive >52°C aktiviert (Uchida et al. 2017; Clapham et al. 2003).

### 5.2.8 Capsaicin

Capsaicin ist ein spezifischer TRPV1-Aktivator (Caterina et al. 2000; Caterina et al. 1997; Vriens et al. 2009; Sugimoto et al. 2019). Die Applikation von Capsaicin in verschiedenen Konzentrationen (1, 10 und 100µM) führte jedoch weder an ARPE-19-, noch an hRPE-Zellen zu einem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$ . Das bedeutet, dass TRPV1-Kanäle in o.g. Zellen funktionell nicht präsent sind und nicht an der Entstehung des hitzeinduzierten Effektes beteiligt sind.

### 5.2.9 Hitzestimulation: Vergleich 45°C und 56°C

In einer weiteren Versuchsreihe erfolgte die Hitzestimulation nach bekanntem Protokoll, jedoch mit reduzierter Temperatur von 45°C, was einem eher physiologischen Wert nahekommt. Auch hierdurch konnte das bereits beschriebene Calciumsignal reproduzierbar induziert werden, das Maximum der  $[Ca^{2+}]_i$  zeigte sich jedoch im Vergleich zum Maximum bei 56°C signifikant niedriger. Da hier der in der Literatur beschriebene Schwellenwert von >52°C zur Aktivierung von TRPV2 unterschritten wird, wäre eine Beteiligung von TRPV1 mit einem Schwellenwert von >42°C denkbar (Clapham et al. 2003; Uchida et al. 2017). Da jedoch die Applikation des TRPV1-Aktivators Capsaicin keinen Effekt erzielte, scheint TRPV1 in ARPE-19- und hRPE-Zellen funktionell nicht präsent zu sein. Vielmehr könnte hier eine Beteiligung des TRPM3 vorliegen, dessen Schwellenwert zur Aktivierung in der Literatur mit 40°C angegeben wird (Held et al. 2015). Hier wäre eine Reevaluation der Ergebnisse unter Anwendung von anti-TRPM3-siRNA aufschlussreich.

Darüber hinaus konnten Liu und Qin 2016 im Rahmen von Patch-Clamp-Untersuchungen eine temperaturabhängige Aktivierung des TRPV2 in einem Bereich von 31-55°C aufzeigen (Liu und Qin 2016), dieses könnte darauf hinweisen, dass die beobachteten Effekte nach Exposition mit 45°C respektive 56°C Ausdruck einer Reizstärke-Wirkungs-Beziehung im Rahmen der TRPV2-Aktivierung darstellen.

### 5.2.10 Weiterführende Untersuchungen

Die Erkenntnisse der Untersuchungen des hitzeinduzierten Effektes konnten wir in weiteren Versuchsreihen näher präzisieren, was zu der Veröffentlichung der Arbeit „Heat-Sensitive TRPV Channels in Retinal Pigment Epithelial Cells: Regulation of VEGF-A Secretion“ führte (Cordeiro et al. 2010).

Unter der Annahme, dass TRPV-Kanäle in den Signalweg der IGF-1 induzierten VEGF-A-Sekretion eingebunden sind, erfolgten weitere Untersuchungen der Sekretion unter Verwendung des TRP-Kanalblockers Ruthenium Rot. In Anwesenheit von RuR [20µM] zeigte sich die basale VEGF-A-Sekretion signifikant vermindert. Eine erneute Hitzestimulation der Zellen mit 56°C führte hingegen zu einem hochsignifikanten Anstieg der Sekretionsrate. Auch hier zeigte sich eine



Wirksamkeit von RuR, in Anwesenheit von RuR [20 $\mu$ M] konnte eine signifikante Reduktion der hitzeinduzierten VEGF-A-Sekretion beobachtet werden.

Zur Erlangung weiterer spezifischer Informationen über den Subtyp des TRP-Kanals erfolgte die Untersuchung weiterer TRPV-Agonisten. Die Applikation von 2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB) [3mM], Aktivator von TRPV1, V2 und V3 (Vriens et al. 2009), führte ebenfalls zu einem Anstieg der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. Unter Applikation des TRPV3-Aktivators Camphor [400 $\mu$ M] (Sherkheli et al. 2009) und des TRPV1-Aktivators Capsaicin [1 $\mu$ M] (Vriens et al. 2009) konnten hingegen keine Effekte beobachtet werden.

Die Untersuchungsergebnisse ließen eine Beteiligung von TRPV2-Kanälen vermuten. Unter Exposition von ARPE-19-Zellen mit anti-TRPV2-siRNA konnte in der quantitativen Echtzeit-PCR eine signifikante Reduktion der TRPV2-Expression im Vergleich zur Exposition mit unspezifischer siRNA erzielt werden. Dieses bewirkte eine hochsignifikante Reduktion der hitzeinduzierten Calciumsignale. Die Experimente hierzu wurden von S. Cordeiro durchgeführt.

Um nachzuweisen, dass der hitzeinduzierte Anstieg der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> durch hitzeabhängige Aktivierung von calciumleitenden Ionenkanälen vermittelt wird, erfolgten Patch-Clamp-Messungen in Whole-Cell-Konfiguration an ARPE-19-Zellen durch S. Cordeiro. Die Untersuchungsergebnisse zeigten, dass die Hitzestimulation der Zellen zur Aktivierung eines einwärtsgerichteten Ionenkanals führte.

Eine Exposition der Zellen mit IGF-1 [50ng/ml] führte zudem zu einem starken Anstieg der Membranleitfähigkeit der RPE-Zellen sowie zu einem Anstieg der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (Durchführung der Experimente durch S. Cordeiro).

### 5.3 Untersuchung laservermittelter Effekte

Die vorausgegangenen Experimente zur Hitzestimulation von RPE-Zellen und deren weitere Untersuchungen außerhalb dieser Arbeit (s.o.) ließen folgende Rückschlüsse zu:

- Eine Hitzestimulation von RPE-Zellen (ARPE-19 und hRPE) mit 45°C und 56°C führt verlässlich und reproduzierbar zur Induktion eines intrazellulären Calciumsignals.
- Das Calciumsignal wird durch einwärtsgerichtete calciumleitende Ionenkanäle vermittelt.
- Diese calciumleitenden Ionenkanäle weisen das pharmakologische Profil von TRPV2 auf.
- Suppression der TRPV2-Expression durch anti-TRPV2-siRNA führt zu einer hochsignifikanten Reduktion der hitzeinduzierten Calciumsignale (Cordeiro et al. 2010).
- Hitzeexposition mit 56°C führt zu einer hochsignifikanten Steigerung der VEGF-A-Sekretionsrate, hingegen führt der Einsatz des TRP-Kanalblockers Ruthenium Rot zu einer signifikanten Reduktion der VEGF-A-Sekretionsrate (Cordeiro et al. 2010).

Licht, welches in das Auge einfällt, wird in den pigmentierten Strukturen des Auges absorbiert und führt zu einem Temperaturanstieg im RPE-Chorioidea-Komplex auf Werte über 40°C (Parver et al. 1980). Noxische Hitzereize von 45°C und 56°C führen demnach zu einer Aktivierung von TRPV2-Kanälen mit konsekutivem Anstieg der Sekretionsrate von VEGF-A, dem Schlüsselfaktor der chorioidalen Neovaskularisation (Cordeiro et al. 2010). Während diese Temperaturbereiche normalerweise *in vivo* nicht erreicht werden, so kommt es im Rahmen von lasergestützten Verfahren zu einer Energiedeposition im RPE-Chorioidea-Komplex, wobei Temperaturen >45°C erzielt werden. Durch Laserlichtexposition beispielsweise im Rahmen der transpupillären Thermotherapie (TTT) kommt es zu einem Temperaturanstieg im RPE um etwa 10°C. Bei der konventionellen Lasertherapie zur Photokoagulation ist die Energiedeposition bei einem Anstieg von 40-60°C so groß, dass es in einem umschriebenen Bereich zu einer

Proteindenaturierung und damit zur Gewebekoagulation kommt (Mainster 1999; Mainster und Reichel 2000; Tsai et al. 2007).

Entsprechende laserinduzierte Temperaturspitzen wären somit zur Induktion des hitzeinduzierten Calciumsignals respektive zur TRPV2-Aktivierung geeignet gewesen, was in einem Modell zur Untersuchung der Effekte von Lasertherapien, welche bereits zur Behandlung der altersbedingten Makuladegeneration eingesetzt wurden, evaluiert werden sollte.

Hierzu wurde das bereits erprobte Setup unter Verwendung eines 810nm Diodenlasers erweitert und die Zellen (ARPE-19 und hRPE) einer Laserlichtexposition zugeführt. Begonnen wurde mit folgenden Laserparametern: Leistung 630mW, Spotsize 3mm, Expositionsdauer 2,5s. Leistung und Expositionsdauer wurden im Verlauf bei konstanter Spotsize kontinuierlich gesteigert (Maximum: Leistung 1200mW, Expositionsdauer 300s). Die Temperaturentwicklung in der Badkammer wurde mittels Digitalthermometer überwacht. Zur Durchführung der transpupillären Thermotheapie unter Verwendung eines 810nm Diodenlasers findet man in der Literatur folgende Angaben zur Parametereinstellung: Atarashi et al., Leistung 400mW, Spotsize 3mm, Expositionsdauer 60s (Atarashi et al. 2004); Newsom et al., Leistung 500-700mW, Spotsize 3mm, Expositionsdauer 60s (Newsom et al. 2001); Mainster und Reichel, Leistung 800mW, Spotsize 3mm, Expositionsdauer 60s (Mainster und Reichel 2000). Obwohl die Laserexposition in dieser Versuchsserie bezüglich der variablen Parameter im erprobten therapeutischen Bereich und sogar deutlich darüber lagen, konnten sowohl an ARPE-19-Zellen als auch an hRPE-Zellen keine Calciumsignale analog zu den Ergebnissen der Versuchsserie des hitzeinduzierten Calciumsignals beobachtet werden. Da der Diodenlaser mit einer Wellenlänge von 810nm prinzipiell geeignet ist, genügend Energie zu applizieren und die Hitzestimulationen mit 45°C bzw. 56°C zuverlässig und reproduzierbar zu einem intrazellulären Calciumsignal führten, muss angenommen werden, dass der Versuchsaufbau sowie die verwendeten Zellen nicht geeignet waren, Effekte einer Lasertherapie *in vitro* zu simulieren. Folgende Fehlerquellen werden angenommen:

Die Untersuchung fand an ARPE-19-Zellen und an humanen Primärkulturen statt. Die Absorption von Lichtenergie erfolgt in den pigmentierten Strukturen, wobei das

im RPE befindliche Melanin den höchsten Absorptions-Koeffizienten aufweist (Framme et al. 2008). ARPE-19-Zellen eignen sich aufgrund ihrer Eigenschaften hervorragend für zellbiologische, pathologische und pharmakologische RPE-Studien, jedoch weisen sie im Vergleich zu nativen RPE-Zellen einen deutlichen Mangel an Melanin auf (Hellinen et al. 2019). Es ist somit anzunehmen, dass der Pigmentationsgrad von ARPE-19-Zellen für eine adäquate Absorption der laservermittelten Energie nicht ausreicht. Die verwendeten hRPE-Zellen stammten aus Primärkulturen, welche im Vergleich zu frisch isolierten RPE-Zellen eine geringere Pigmentationsdichte aufweisen (Reichhart und Strauss 2014). Auch hierbei ist anzunehmen, dass der Pigmentationsgrad der hRPE-Zellen für eine ausreichende Energieabsorption zu gering war. Hier wäre eine Wiederholung der Versuchsserie unter Verwendung frisch isolierter RPE-Zellen aufschlussreich.

Zudem zeigte die kontinuierliche Überwachung der Badkammertemperatur stets eine Temperatur von 37°C, die auf die Zellen fokussiert applizierte Laserenergie wurde durch die in der Badkammer befindliche Lösung aufgefangen und konnte keinen Anstieg der Badkammertemperatur induzieren. Auch lässt der Versuchsaufbau keine adäquate Dosimetrie der applizierten Laserenergie auf zellulärer Ebene zu. Dieses ist auch eine relevante Problemstellung bei der klinischen Anwendung des Diodenlasers zur transpupillären Thermotherapie bei der Behandlung chorioidaler Neovaskularisationen im Rahmen der AMD. So ist eine Beurteilung der thermischen Wirkung bei fehlendem visuellen Effekt nicht möglich, lediglich sichtbare Farbveränderungen der Retina (Whitening) nach entsprechender Applikationsdauer lassen hierbei Rückschlüsse auf die Laserwirkung zu und werden in dieser Therapieform in der Regel als Abbruchkriterium definiert (Tsai et al. 2007; Newsom et al. 2001).

## 5.4 Carbachol

Als Arzneistoff aus der Gruppe der direkten Parasympathomimetika findet Carbachol in der Ophthalmologie als Antiglaukomtherapeutikum Anwendung. Dattilo et al. konnten im Rahmen von Patch-Clamp-Untersuchungen eine carbacholinduzierte TRPC5-Aktivierung an HEK-293 Zellen beobachten (Dattilo et al. 2008, 2020). Die Applikation von Carbachol [100µM] führte in dieser Arbeit zur Induktion eines Calciumsignals, welches in der Konfiguration mit dem

hitzeinduzierten Signal vergleichbar ist. Die Untersuchung einer etwaigen Beteiligung von TRP-Kanälen erfolgte wiederum unter dem Einsatz der blockerhaltigen Lösungen mit  $\text{La}^{3+}$  [100 $\mu\text{M}$ ] und RuR [1 $\mu\text{M}$ ]. Hierdurch konnte keine signifikante Reduktion dieses Signals beobachtet werden. Nach Entleerung intrazellulärer Calciumspeicher durch den SERCA-Blocker Thapsigargin [1 $\mu\text{M}$ ] zeigte sich nach Carbacholexposition eine vollständige Inhibition des o.g. Signals, was darauf hindeutet, dass jenes Calciumsignal durch Calciumfreisetzung aus intrazellulären Calciumspeichern und nicht durch Calciumeinstrom aus dem Extrazellulärraum unter Beteiligung membranständiger (TRP-) Kanäle generiert wird. Bereits 1991 führte die Untersuchung des carbacholinduzierten Effektes an RPE-Zellen zu dem Ergebnis, dass Carbachol nach Bindung an dem muskarinischen Acetylcholinrezeptor M3 über Aktivierung des Phosphoinositol-Systems zu einer Calciumfreisetzung aus intrazellulären Calciumspeichern führt (Feldman et al. 1991). Jene Beobachtung wird durch die Ergebnisse dieser Versuchsreihe gestärkt. In der Literatur lassen sich darüber hinaus keine Angaben zur Expression von TRPC5 Kanälen in ARPE-19- oder hRPE-Zellen finden.

## 5.5 Koffein

Das psychoaktive Alkaloid Koffein stammt aus der Gruppe der Xanthine und besitzt eine stimulierende Wirkung (Li et al. 2011). Koffein induziert verschiedene pharmakologische Effekte, hauptsächlich jedoch die Antagonisierung von Adenosin am Adenosinrezeptor (Benowitz 1990). Bekanntermaßen wird Koffein zudem als Agonist des Ryanodin-Rezeptors zur Induktion einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Calciumspeichern eingesetzt (Kong et al. 2008). Die Exposition von ARPE-19-Zellen mit Koffein [50mM] führte zu einem Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , der Einsatz der blockerhaltigen Lösungen mit  $\text{La}^{3+}$  [100 $\mu\text{M}$ ] und RuR [1 $\mu\text{M}$ ] erbrachte keine signifikante Reduktion des induzierten Effektes. Nach Entleerung intrazellulärer Calciumspeicher durch den SERCA-Blocker Thapsigargin [1 $\mu\text{M}$ ] konnte das koffeininduzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal jedoch vollständig inhibiert werden. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass das koffeininduzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal auch hier der Ausdruck einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung aus intrazellulären Calciumspeichern darstellt, Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von  $\text{La}^{3+}$ - respektive RuR-sensitiver TRP-Kanäle an der Entstehung dieses Signals ergeben sich nicht. Das

bedeutet, dass der koffeininduzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg rein auf der Basis der Speicherentleerung beruht und kein Einstrom extrazellulären Calciums beteiligt ist.

## 5.6 VEGF-C

Bei der Regulation physiologischer, aber auch insbesondere bei pathologischer Angiogenese, nimmt der VEGF-A/VEGFR2 vermittelte Signalweg eine Schlüsselrolle ein (Simons et al. 2016). Neben der Expression von VEGF-A und VEGFR2 (Ford et al. 2011; Jia et al. 2017) konnte in humanen RPE-Zellen auch die VEGF-A-abhängige Expression von VEGF-C nachgewiesen werden (Zhao et al. 2006). Über den Stellenwert von VEGF-C im Rahmen der Angiogenese und damit auch der CNV ist bislang nicht viel bekannt, synergistische Effekte in Verbindung mit VEGF-A werden favorisiert (Zhao et al. 2006; Zhao et al. 2007). VEGF-C besitzt bekanntermaßen eine Affinität für die Rezeptoren VEGFR2 und VEGFR3 (Joukov et al. 1996).

Die Stimulation des VEGFR2 kann eine Vielzahl verschiedener intrazellulärer Signalwege auslösen, hierzu zählt auch die Phospholipase C-abhängige Hydrolyse von  $\text{PIP}_2$  (Phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphat) zu  $\text{IP}_3$  (Inositoltrisphosphat) und DAG (Diacylglycerol), die zur konsekutiven Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus intrazellulären Calciumspeichern führt (Matsumoto und Claesson-Welsh 2001).

Nach Exposition von ARPE-19-Zellen mit VEGF-C der Konzentrationen 5ng/ml und 50ng/ml konnten keine Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentration beobachtet werden, was auf eine fehlende VEGFR2/R3 Expression hindeutet. Hier wäre eine Reevaluation der Versuchsserie unter Verwendung frisch isolierter humaner RPE-Zellen aufschlussreich.

## 5.7 Dopamin

Diverse Studien konnten demonstrieren, dass eine Vielzahl retinaler Funktionen der Kontrolle des circadianen Rhythmus unterliegen (McMahon et al. 2014). Dieses betrifft auch eine essenzielle Funktion des retinalen Pigmentepithels, die Phagozytose abgestoßener Außensegmente der Photorezeptoren (LaVail 1980; Strauss 2005). Zur Aufrechterhaltung dieses Rhythmus wird den Neurotransmittern Dopamin und Melatonin eine zentrale Rolle beigemessen (Baba et al. 2017; Besharse und Spratt 1988; Besharse und McMahon 2016; Pierce und Besharse 1987; Pozdeyev et al. 2008; Strauss 2005). Derzeit sind 5 verschiedene

Dopamin-Rezeptoren (D1-D5) bekannt, welche aufgrund verschiedener intrazellulärer Signalwege in zwei Gruppen eingeteilt werden: die Gruppe der D1-ähnlichen (D1, D5) und die Gruppe der D2-ähnlichen (D2, D3, D4) Dopamin-Rezeptoren (Beaulieu und Gainetdinov 2011). Die Stimulation der D1-ähnlichen Dopaminrezeptoren (D1, D5) führt zu einer Aktivierung von G-Proteinen der  $G_{\alpha_s/oif}$ -Familie mit Stimulation der Adenylatcyclase und konsekutiver Induktion der Produktion von zyklischem AMP (cAMP) (Beaulieu und Gainetdinov 2011). Im Gegensatz dazu führt die Stimulation der D2-ähnlichen Dopaminrezeptoren (D2, D3, D4) zu einer Aktivierung von G-Proteinen der  $G_{\alpha_{i/o}}$ -Familie, dieses bewirkt hingegen eine Reduktion der cAMP-Produktion durch Inhibition der Adenylatcyclase (Beaulieu und Gainetdinov 2011). Verschiedene Arbeiten ergaben Hinweise auf die Expression verschiedener Dopaminrezeptoren in RPE-Zellen von Säugetieren (Masri et al. 1996; Versaux-Botteri et al. 1997; Baba et al. 2017) und Menschen (Dong et al. 2007; Guha et al. 2012). Lee et al. konnten 2004 demonstrieren, dass die Coaktivierung von D1- und D2-Rezeptoren via Phospholipase-Signalweg zur Entstehung eines intrazellulären Calciumsignals führt (Lee et al. 2004). Nach Applikation von Dopamin [0,5 $\mu$ M] und [1 $\mu$ M] (ARPE-19- Zellen) konnten in dieser Versuchsserie hingegen keine Veränderungen beobachtet werden, was darauf hindeutet, dass keine Expression von D1- bzw. D2-Rezeptoren vorliegt.

## 5.8 Relevanz / Ausblick

Die Aufgabe dieser Arbeit lag in der Untersuchung von TRP-Kanälen und deren Relevanz für die Regulation der Calciumhomöostase in Pigmentepithelzellen. In diesem Rahmen gelang zum ersten Mal der funktionelle Nachweis eines thermosensitiven  $Ca^{2+}$ -permeablen Kanals, dessen pharmakologisches Profil dem des TRPV2 entspricht. Weiterführende Untersuchungen deuteten darauf hin, dass diese Kanäle in die Regulation der VEGF-A-Sekretion in RPE-Zellen eingebunden sind und eine Stimulierung dieser zu einem Anstieg der VEGF-A-Sekretionsrate führt. Die Hauptkomplikation der AMD liegt in dem Übergang von der trockenen zur exsudativen Form unter Entwicklung einer CNV. Der therapeutische Goldstandard zur Therapie einer CNV liegt aktuell in der intravitrealen Applikation von VEGF-A-Inhibitoren, chirurgische und lasertherapeutische Verfahren sind jenem Verfahren deutlich unterlegen und stellen zur Behandlung der AMD keine

adäquate Therapiealternative dar, weshalb sie nur in ausgewählten Einzelfällen zur Anwendung kommen. Die thermische Aktivierung von TRPV2-Kanälen erfordert hohe Temperaturen, der entsprechende Threshold-Wert wird in der Literatur bei  $>52^{\circ}\text{C}$  angegeben. Da diese Temperaturen unter physiologischen Bedingungen nicht erreicht werden, ist es wahrscheinlich, dass die TRPV2-Aktivierung mit konsekutivem Anstieg der VEGF-A-Sekretionsrate auf einem anderen Mechanismus basiert, hier wird IGF-1 als Aktivator favorisiert (Cordeiro et al. 2010).

Anders ist es jedoch bei dem Einsatz therapeutischer Laser zur Behandlung der AMD, diese führen - in Abhängigkeit der Auswahl des Verfahrens - zu einem mehr oder weniger ausgedehnten Temperaturanstieg im RPE, was zur Aktivierung temperatursensitiver TRPV2-Kanäle und damit zum Anstieg der VEGF-A-Sekretionsrate führen kann, somit also die Entstehung einer CNV begünstigen könnte. Dieses könnte auch der relevante Mechanismus sein, der dem Tiermodell zur laserinduzierten CNV unterliegt (Lambert et al. 2013). 1998 führte die „Choroidal Neovascularization Prevention Trial Research Group“ eine prospektive Studie zur Untersuchung des Stellenwertes der Laserkoagulation von Drusen zur Behandlung der AMD durch, bereits hier ergaben sich Hinweise auf eine CNV-Induktion nach Laserapplikation (CNPTRG 1998a, 1998b). Bislang konnte keine Wirksamkeit retinaler Lasertherapien zur Behandlung der trockenen AMD nachgewiesen werden, weshalb aktuell keine Empfehlung zum Einsatz lasergestützter Verfahren in der Therapie der trockenen AMD vorliegt (BVA, DOG, RG 2019).

Die Ergebnisse dieser Arbeit erbringen einen neuen Aspekt zur Evaluation lasergestützter Therapien im Rahmen der Behandlung der AMD und stützen die Theorie zur laserinduzierten CNV. Darüber hinaus stellt der TRPV2-Kanal ein neues mögliches Ziel zur weiteren Entwicklung und Verbesserung von VEGF-Inhibitoren in der Behandlung der exsudativen AMD dar.



## 6 Zusammenfassung

Eine Vielzahl von Funktionen des retinalen Pigmentepithels werden über Änderungen der freien zytosolischen Calciumkonzentration reguliert. In humanen Zellen des retinalen Pigmentepithels konnte die Expression der calciumpermeablen TRP-Kanäle TRPC1, C4, C7, TRPM1, M3, M7 und TRPV1-6 nachgewiesen werden. TRP-Kanäle werden polymodal aktiviert, TRPV1-4 und TRPM3 sind zudem thermosensitiv. Das Ziel dieser Arbeit lag in der Untersuchung der Bedeutung der TRP-Kanäle für die Regulation der Calciumhomöostase und deren Implikationen für RPE-Zellfunktionen. Die Messung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration erfolgte unter Einsatz des  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2 an humanen RPE-Primärkulturen und ARPE-19-Zellen. Zur Induktion intrazellulärer Calciumsignale wurden verschiedene Agonisten appliziert, unter Einsatz verschiedener TRP-sensitiver Blockersubstanzen eine Beteiligung von TRP-Kanälen untersucht. Während durch die Applikation von Dopamin, VEGF-C und Capsaicin keine Calciumsignale induziert werden konnten, führte die Applikation von Carbachol und Koffein zu einem raschen Anstieg des zytosolischen Calciums. Weiterführende Untersuchungen ergaben keinen Hinweis auf eine Beteiligung von TRP-Kanälen an der Entstehung dieser Signale. Durch Hitzestimulationen konnten hingegen reproduzierbare Calciumsignale ausgelöst werden, der Einsatz von Blockersubstanzen führte zu einer signifikanten Reduktion dieser Signale. Die Untersuchungsergebnisse zeigten, dass TRPV2-Kanäle diese hitzeinduzierten Signale vermitteln. Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von TRPV2 zu einem Anstieg der VEGF-A-Sekretion - dem Schlüsselfaktor der chorioidalen Neovaskularisation - führt. Diese Erkenntnisse sollten in einem *in vitro* Laserexpositionsmodell hinsichtlich der Bedeutung für retinale Lasertherapien untersucht werden, die Etablierung eines solchen Modells gelang jedoch nicht. In dieser Arbeit konnte die funktionelle Präsenz thermosensitiver TRPV2-Kanäle in humanen Pigmentepithelzellen zum ersten Mal nachgewiesen werden. Dieser Nachweis erbringt einen neuen Aspekt zur Evaluation lasergestützter Therapien im Rahmen der Behandlung der AMD und stützt die Theorie zur laserinduzierten CNV. Die Relevanz des TRPV2 für die VEGF-A-Sekretion stellt einen neuen Ansatzpunkt zur weiteren Entwicklung und Verbesserung von VEGF-Inhibitoren in der Behandlung der exsudativen AMD dar.

## Abstract

A variety of functions of the retinal pigment epithelium are regulated by changes in intracellular free cytosolic calcium concentration. In human cells of the retinal pigment epithelium, the expression of the calcium permeable TRP channels TRPC1, C4, C7, TRPM1, M3, M7 and TRPV1-6 was detected. TRP channels are polymodal activated, TRPV1-4 and TRPM3 are also thermosensitive. The aim of this study was to analyze the importance of TRP channels for the regulation of calcium homeostasis and its possible implications for RPE cell functions. The measurement of the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration was carried out using the  $\text{Ca}^{2+}$  dependent fluorescent dye Fura-2 on human RPE primary cultures and ARPE-19 cells. For the induction of intracellular calcium signals, various agonists were applied, using a panel of TRP-sensitive blocker substances participating TRP channels were identified. While no calcium signals could be induced by the administration of dopamine, VEGF-C and capsaicin, the application of carbachol and caffeine led to a rapid increase in cytosolic calcium. Further investigations did not indicate that TRP channels were involved in the formation of these signals. By heat stimulation, however, reproducible calcium signals could be triggered, the use of blocker substances led to a significant reduction of these signals. The results showed that TRPV2 channels convey these heat-induced signals. Based on the results of this study, further investigations showed that stimulation of TRPV2 leads to an increase in VEGF-A secretion - the key factor of choroidal neovascularization. These findings led to investigation of an *in vitro* laser exposure model with regard to the importance of retinal laser therapies, establishing such a model, however, did not succeed.

In this study, the functional presence of thermosensitive TRPV2 channels in human pigment epithelial cells could be detected for the first time. This evidence provides a new aspect for the evaluation of laser-assisted therapies in the context of the treatment of AMD and supports the theory of laser-induced CNV. In the context of VEGF-A secretion, TRPV2 represents a new target for the further development and improvement of VEGF inhibitors in the treatment of exudative AMD.

## 7 Appendix

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Intrazelluläre Calciumkonzentration
2-APB	2-Aminoethoxydiphenylborat
ADP	Adenosindiphosphat
AMD	Altersbedingte Makuladegeneration
AREDS	Age-Related Eye Disease Study
ARPE-19	Adult Retinal Pigment Epithelial Cell Line-19
ATP	Adenosintriphosphat
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CBD	Cannabidiol
CCD	Charged-Coupled Device
Cch	Carbachol
CICR	Calcium-Induced Calcium Release
CNV	Chorioidale Neovaskularisation
CTRL	Control
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
D-PBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
ED	Expositionsdauer
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERG	Elektroretinogramm
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'- tetraessigsäure
FCS	Fetales Kälberserum
Fura-2AM	Fura-2-acetoxymethylester
HCl	Chlorwasserstoff
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hRPE	Human Retinal Pigment Epithelium

---

Ig	Immunglobulin
IGF-1	Insulin-Like Growth Factor 1
IP <sub>3</sub>	Inositoltrisphosphat
K <sup>+</sup>	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
KHS	Krebs-Henseleit Solution
L	Leistung
La <sup>3+</sup>	Lanthan
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
Na <sup>+</sup>	Natrium
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Natriumsulfat
NaCl	Natriumchlorid
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NCX	Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> -Exchanger
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDT	Photodynamische Therapie
PEDF	Pigment Epithelium-Derived Factor
PIGF	Placental Growth Factor
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PMCA	Plasma Membrane Ca <sup>2+</sup> -ATPase
ROI	Region Of Interest
RPE	Retinal Pigment Epithelium
RuR	Ruthenium Rot
SEM	Standard Error Of The Mean
SERCA	Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase
SOCE	Store-Operated Calcium Entry
SpS	Spotsize
SRT	Selektive Retinatherapie
STIM-1	Stromal Interacting Molecule-1
TRP	Transient Receptor Potential

---

TRPA	Transient Receptor Potential Ankyrin
TRPC	Transient Receptor Potential Canonical
TRPM	Transient Receptor Potential Melastatin
TRPML	Transient Receptor Potential Mucolipin
TRPN	Transient Receptor Potential No Mechanoreceptor Potential C
TRPP	Transient Receptor Potential Polycystin
TRPV	Transient Receptor Potential Vanilloid
TTT	Transpupilläre Thermotheapie
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
Zn <sup>2+</sup>	Zink

## 7.2 Danksagung

Zunächst bedanke ich mich ausdrücklich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Olaf Strauß für die Überlassung des Themas, die stets freundliche und motivierende Anleitung zur Untersuchung der Fragestellung und die hervorragende Betreuung, zunächst in der Experimentellen Ophthalmologie der Augenlinik des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, später überregional aus der Augenlinik des Universitätsklinikum Regensburg und zuletzt aus der Experimentellen Ophthalmologie der Augenlinik der Berliner Charité, Campus Virchow Klinikum.

Mein besonderer Dank gilt zudem Frau Privatdozentin Dr. med. Andrea Hassenstein für die Übernahme der Betreuung am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf und damit der Möglichkeit zur Fortsetzung der Promotionsarbeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Dr. rer. nat. Sönke Cordeiro, Herrn Dr. rer. nat. Rudgar Neussert und Herrn Lars Schlichting für die freundschaftliche Integration in die Arbeitsgruppe und den kollegialen Austausch bedanken.

Frau Stefanie Schlichting danke ich für die Einweisung in den Bereich der Zellkultur und ihre stetige Unterstützung.

Ein besonderer Dank gebührt darüber hinaus meiner Familie, die mit geduldiger, verständnisvoller Unterstützung maßgeblich an dem Gelingen dieser Arbeit beteiligt war.

## 7.3 Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

## 8 Literaturverzeichnis

- Abu Khamidakh, A. E.; Juuti-Uusitalo, K.; Larsson, K.; Skottman, H.; Hyttinen, J. (2013): Intercellular Ca(2+) wave propagation in human retinal pigment epithelium cells induced by mechanical stimulation. In: *Experimental eye research* 108, S. 129–139.
- Amadio, Marialaura; Govoni, Stefano; Pascale, Alessia (2016): Targeting VEGF in eye neovascularization: What's new?: A comprehensive review on current therapies and oligonucleotide-based interventions under development. In: *Pharmacological research* 103, S. 253–269.
- Ambati, Jayakrishna; Fowler, Benjamin J. (2012): Mechanisms of age-related macular degeneration. In: *Neuron* 75 (1), S. 26–39.
- Arredondo Zamarripa, David; Noguez Imm, Ramsés; Bautista Cortés, Ana María; Vázquez Ruíz, Osvaldo; Bernardini, Michela; Fiorio Pla, Alessandra et al. (2017): Dual contribution of TRPV4 antagonism in the regulatory effect of vaso-inhibitors on blood-retinal barrier permeability: diabetic milieu makes a difference. In: *Scientific reports* 7 (1), S. 13094.
- Atarashi, T.; Tamaki, Y.; Inoue, Y.; Obata, R.; Muranaka, K.; Yanagi, Y. (2004): Transpupillary thermotherapy for treatment of exudative age-related macular degeneration in Japanese patients. In: *Eye (London, England)* 18 (6), S. 615–618.
- Baba, Kenkichi; DeBruyne, Jason P.; Tosini, Gianluca (2017): Dopamine 2 Receptor Activation Entrain Circadian Clocks in Mouse Retinal Pigment Epithelium. In: *Scientific reports* 7 (1), S. 5103.
- Baehr, Wolfgang; Wu, Samuel M.; Bird, Alan C.; Palczewski, Krzysztof (2003): The retinoid cycle and retina disease. In: *Vision Research* 43 (28), S. 2957–2958.
- Beaulieu, Jean-Martin; Gainetdinov, Raul R. (2011): The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. In: *Pharmacological reviews* 63 (1), S. 182–217.
- Bennett, Thomas M.; Mackay, Donna S.; Siegfried, Carla J.; Shiels, Alan (2014): Mutation of the melastatin-related cation channel, TRPM3, underlies inherited cataract and glaucoma. In: *PloS one* 9 (8), e104000.
- Benowitz, N. L. (1990): Clinical pharmacology of caffeine. In: *Annual review of medicine* 41, S. 277–288.
- Berridge, M. J.; Lipp, P.; Bootman, M. D. (2000): The versatility and universality of calcium signalling. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 1 (1), S. 11–21.
- Berridge, Michael J.; Bootman, Martin D.; Roderick, H. Llewelyn (2003): Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 4 (7), S. 517–529.



- Besch, Dorothea; Jäggle, Herbert; Scholl, Hendrik P.N.; Seeliger, Mathias W.; Zrenner, Eberhart (2003): Inherited multifocal RPE-diseases: mechanisms for local dysfunction in global retinoid cycle gene defects. In: *Vision Research* 43 (28), S. 3095–3108.
- Besharse, J. C.; Spratt, G. (1988): Excitatory amino acids and rod photoreceptor disc shedding: analysis using specific agonists. In: *Experimental eye research* 47 (4), S. 609–620.
- Besharse, Joseph C.; McMahon, Douglas G. (2016): The Retina and Other Light-sensitive Ocular Clocks. In: *Journal of biological rhythms* 31 (3), S. 223–243.
- Bibb, Carol; Young, Richard W. (1974): Renewal of fatty acids in the membranes of visual cell outer segments. In: *The Journal of Cell Biology* 61 (2), S. 327–343.
- Blaauwgeers, Harriët G. T.; Holtkamp, Gertjan M.; Rutten, Hugo; Witmer, Antonella N.; Koolwijk, Pieter; Partanen, Taina A. et al. (1999): Polarized Vascular Endothelial Growth Factor Secretion by Human Retinal Pigment Epithelium and Localization of Vascular Endothelial Growth Factor Receptors on the Inner Choriocapillaris : Evidence for a Trophic Paracrine Relation. In: *The American Journal of Pathology* 155 (2), S. 421–428.
- Bok, D. (1993): The retinal pigment epithelium: a versatile partner in vision. In: *Journal of cell science. Supplement* 17, S. 189–195.
- Bollimuntha, Sunitha; Cornatzer, Eric; Singh, Brij B. (2005): Plasma membrane localization and function of TRPC1 is dependent on its interaction with beta-tubulin in retinal epithelium cells. In: *Visual neuroscience* 22 (2), S. 163–170.
- Boulton, M.; Dayhaw-Barker, P. (2001): The role of the retinal pigment epithelium: topographical variation and ageing changes. In: *Eye (London, England)* 15 (Pt 3), S. 384–389.
- Bressler, Neil M.; Bressler, Susan B.; Fine, Stuart L. (1988): Age-related macular degeneration. In: *Survey of ophthalmology* 32 (6), S. 375–413.
- Brown, David M.; Kaiser, Peter K.; Michels, Mark; Soubrane, Gisele; Heier, Jeffrey S.; Kim, Robert Y. et al. (2006): Ranibizumab versus verteporfin for neovascular age-related macular degeneration. In: *The New England journal of medicine* 355 (14), S. 1432–1444.
- Burke, Janice M.; Hjelmeland, Leonard M. (2005): Mosaicism of the retinal pigment epithelium: seeing the small picture. In: *Molecular interventions* 5 (4), S. 241–249.
- BVA, DOG, RG (2017): Stellungnahme des BVA, der DOG und der RG zur Lasertherapie von Drusen bei altersabhängiger Makuladegeneration (AMD) : Stand August 2017. In: *Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft* 114 (11), S. 1008–1014.
- BVA, DOG, RG (2018): Stellungnahme des BVA, der DOG und der RG zur Therapie chorioidaler Neovaskularisationen bei anderen Erkrankungen als der neovaskulären altersabhängigen Makuladegeneration : Stand Oktober 2017. In: *Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft* 115 (4), S. 293–301.

- BVA, DOG, RG (2019): Ergänzende Stellungnahme des BVA, der DOG und der RG zur Lasertherapie von Drusen bei altersabhängiger Makuladegeneration (AMD) : Stand Oktober 2018. In: *Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft* 116 (2), S. 138–143.
- Carafoli, Ernesto (2005a): Calcium--a universal carrier of biological signals. Delivered on 3 July 2003 at the Special FEBS Meeting in Brussels. In: *The FEBS journal* 272 (5), S. 1073–1089.
- Carafoli, Ernesto (2005b): The Symposia on Calcium Binding Proteins and Calcium Function in Health and Disease: an historical account, and an appraisal of their role in spreading the calcium message. In: *Cell calcium* 37 (4), S. 279–281.
- Carafoli, Ernesto; Krebs, Joachim (2016): Why Calcium? How Calcium Became the Best Communicator. In: *The Journal of biological chemistry* 291 (40), S. 20849–20857.
- Caterina, M. J.; Leffler, A.; Malmberg, A. B.; Martin, W. J.; Trafton, J.; Petersen-Zeitz, K. R. et al. (2000): Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. In: *Science (New York, N.Y.)* 288 (5464), S. 306–313.
- Caterina, M. J.; Schumacher, M. A.; Tominaga, M.; Rosen, T. A.; Levine, J. D.; Julius, D. (1997): The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. In: *Nature* 389 (6653), S. 816–824.
- Cehade, Luke; Chidlow, Glyn; Wood, John; Casson, Robert J. (2016): Short-pulse duration retinal lasers: a review. In: *Clinical & experimental ophthalmology* 44 (8), S. 714–721.
- Clapham, D. E.; Runnels, L. W.; Strübing, C. (2001): The TRP ion channel family. In: *Nature reviews. Neuroscience* 2 (6), S. 387–396.
- Clapham, David E. (2007): Calcium signaling. In: *Cell* 131 (6), S. 1047–1058.
- Clapham, David E.; Julius, David; Montell, Craig; Schultz, Günter (2005): International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels. In: *Pharmacological reviews* 57 (4), S. 427–450.
- Clapham, David E.; Montell, Craig; Schultz, Guenter; Julius, David (2003): International Union of Pharmacology. XLIII. Compendium of voltage-gated ion channels: transient receptor potential channels. In: *Pharmacological reviews* 55 (4), S. 591–596.
- CNPTRG (1998a): Choroidal neovascularization in the choroidal neovascularization prevention trial. In: *Ophthalmology* 105 (8), S. 1364–1372.
- CNPTRG (1998b): Laser treatment in eyes with large drusen. Short-term effects seen in a pilot randomized clinical trial. Choroidal Neovascularization Prevention Trial Research Group. In: *Ophthalmology* 105 (1), S. 11–23.
- Colijn, Johanna M.; Buitendijk, Gabriëlle H.S.; Prokofyeva, Elena; Alves, Dalila; Cachulo, Maria L.; Khawaja, Anthony P. et al. (2017): Prevalence of Age-Related Macular Degeneration in Europe: The Past and the Future. In: *Ophthalmology* 124 (12), S. 1753–1763.

- Cordeiro, Sönke; Seyler, Sebastian; Stindl, Julia; Milenkovic, Vladimir M.; Strauss, Olaf (2010): Heat-sensitive TRPV channels in retinal pigment epithelial cells: regulation of VEGF-A secretion. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 51 (11), S. 6001–6008.
- Cordeiro, Sönke; Strauss, Olaf (2011): Expression of Orai genes and I(CRAC) activation in the human retinal pigment epithelium. In: *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie* 249 (1), S. 47–54.
- Cosens, D. J.; Manning, A. (1969): Abnormal electroretinogram from a Drosophila mutant. In: *Nature* 224 (5216), S. 285–287.
- Dattilo, Michael; Penington, Nicholas J.; Williams, Keith (2008): Inhibition of TRPC5 channels by intracellular ATP. In: *Molecular pharmacology* 73 (1), S. 42–49.
- Dattilo, Michael; Penington, Nicholas J.; Williams, Keith (2020): Regulation of TRPC5 currents by intracellular ATP: Single channel studies. In: *Journal of cellular physiology*.
- Dietrich, Alexander; Fahlbusch, Meike; Gudermann, Thomas (2014): Classical Transient Receptor Potential 1 (TRPC1): Channel or Channel Regulator? In: *Cells* 3 (4), S. 939–962.
- Dong, Feng; An, Jian-hong; Ren, Yue-ping; Yan, Dong-sheng; Zhou, Xiang-tian; Lü, Fan et al. (2007): Expression of dopamine receptor D2 and adenosine receptor A2A in human retinal pigment epithelium. In: *[Zhonghua yan ke za zhi] Chinese journal of ophthalmology* 43 (12), S. 1110–1113.
- Dorin, Giorgio (2003): Subthreshold and micropulse diode laser photocoagulation. In: *Seminars in ophthalmology* 18 (3), S. 147–153.
- Duncan, L. M.; Deeds, J.; Hunter, J.; Shao, J.; Holmgren, L. M.; Woolf, E. A. et al. (1998): Down-regulation of the novel gene melastatin correlates with potential for melanoma metastasis. In: *Cancer research* 58 (7), S. 1515–1520.
- Dunn, K. C.; Aotaki-Keen, A. E.; Putkey, F. R.; Hjelmeland, L. M. (1996): ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. In: *Experimental eye research* 62 (2), S. 155–169.
- Enyeart, John J.; Xu, Lin; Enyeart, Judith A. (2002): Dual actions of lanthanides on ACTH-inhibited leak K(+) channels. In: *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 282 (6), E1255-66.
- Feldman, E. L.; Randolph, A. E.; Johnston, G. C.; DelMonte, M. A.; Greene, D. A. (1991): Receptor-coupled phosphoinositide hydrolysis in human retinal pigment epithelium. In: *Journal of neurochemistry* 56 (6), S. 2094–2100.
- Ferris, Frederick L.; Wilkinson, C. P.; Bird, Alan; Chakravarthy, Usha; Chew, Emily; Csaky, Karl; Sadda, Srinivas R. (2013): Clinical classification of age-related macular degeneration. In: *Ophthalmology* 120 (4), S. 844–851.

- Ford, Knatokie M.; Saint-Geniez, Magali; Walshe, Tony; Zahr, Alisar; D'Amore, Patricia A. (2011): Expression and role of VEGF in the adult retinal pigment epithelium. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 52 (13), S. 9478–9487.
- Framme, C.; Roider, J.; Brinkmann, R.; Birngruber, R.; Gabel, V-P (2008): Grundlagen und klinische Anwendung der Lasertherapie an der Netzhaut. In: *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde* 225 (4), S. 259–268.
- Frank, R. N. (1997): Growth factors in age-related macular degeneration: pathogenic and therapeutic implications. In: *Ophthalmic research* 29 (5), S. 341–353.
- Friedman, David S.; O'Colmain, Benita J.; Muñoz, Beatriz; Tomany, Sandra C.; McCarty, Cathy; Jong, Paulus T. V. M. de et al. (2004): Prevalence of age-related macular degeneration in the United States. In: *Arch Ophthalmol* 122 (4), S. 564–572.
- Gees, Maarten; Owsianik, Grzegorz; Nilius, Bernd; Voets, Thomas (2012): TRP channels. In: *Comprehensive Physiology* 2 (1), S. 563–608.
- Grehn, Franz (2012): Augenheilkunde. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Grehn, Franz (2019): Augenheilkunde. 32nd ed. 2019.
- Grynkiewicz, G.; Poenie, M.; Tsien, R. Y. (1985): A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. In: *The Journal of biological chemistry* 260 (6), S. 3440–3450.
- Guha, Sonia; Baltazar, Gabriel C.; Tu, Leigh-Anne; Liu, Ji; Lim, Jason C.; Lu, Wennan et al. (2012): Stimulation of the D5 dopamine receptor acidifies the lysosomal pH of retinal pigmented epithelial cells and decreases accumulation of autofluorescent photoreceptor debris. In: *Journal of neurochemistry* 122 (4), S. 823–833.
- Haas, A.; Feigl, B.; Weger, M. (2003): Transpupilläre Thermotherapie bei exsudativer altersabhängiger Makuladegeneration. In: *Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft* 100 (2), S. 111–114.
- Hageman, Gregory S.; Johnson, Lincoln V. (1991): Chapter 9 Structure, composition and function of the retinal interphotoreceptor matrix. In: *Progress in Retinal Research* 10, S. 207–249.
- Halbach, Patrick; Pillers, De-Ann M.; York, Nathaniel; Asuma, Matti P.; Chiu, Michelle A.; Luo, Wenxiang et al. (2015): Oxytocin Expression and Function in the Posterior Retina: A Novel Signaling Pathway. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 56 (2), S. 751–760.
- Haustrate, Aurélien; Prevarskaya, Natalia; Lehen'kyi, V'yacheslav (2020): Role of the TRPV Channels in the Endoplasmic Reticulum Calcium Homeostasis. In: *Cells* 9 (2).
- Held, Katharina; Voets, Thomas; Vriens, Joris (2015): TRPM3 in temperature sensing and beyond. In: *Temperature: Multidisciplinary Biomedical Journal* 2 (2), S. 201–213.

- Hellinen, Laura; Hagström, Marja; Knuutila, Heidi; Ruponen, Marika; Urtti, Arto; Reinisalo, Mika (2019): Characterization of artificially re-pigmented ARPE-19 retinal pigment epithelial cell model. In: *Scientific reports* 9 (1), S. 13761.
- Himpens, B.; Stalmans, P.; Gomez, P.; Malfait, M.; Vereecke, J. (1999): Intra- and intercellular Ca<sup>2+</sup> signaling in retinal pigment epithelial cells during mechanical stimulation. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 13 Suppl, S63-8.
- Huang, Yihe; Fliegert, Ralf; Guse, Andreas H.; Lü, Wei; Du, Juan (2020): A structural overview of the ion channels of the TRPM family. In: *Cell calcium* 85, S. 102111.
- Ikura, Mitsuhiko (1996): Calcium binding and conformational response in EF-hand proteins. In: *Trends in Biochemical Sciences* 21 (1), S. 14–17.
- Ishida, Kazuhiro; Panjwani, Noorjahan; Cao, Zhiyi; Streilein, J. Wayne (2003): 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. In: *Ocular immunology and inflammation* 11 (2), S. 91–105.
- Jabbarpoor Bonyadi, Mohammad Hossein; Yaseri, Mehdi; Nikkhah, Homayoun; Bonyadi, Mortaza; Soheilian, Masoud (2018): Association of risk genotypes of ARMS2/LOC387715 A69S and CFH Y402H with age-related macular degeneration with and without reticular pseudodrusen: a meta-analysis. In: *Acta ophthalmologica* 96 (2), 105-110.
- Jia, Xin; Zhao, Chen; Chen, Qishan; Du, Yuxiang; Huang, Lijuan; Ye, Zhimin et al. (2017): JAM-C maintains VEGFR2 expression to promote retinal pigment epithelium cell survival under oxidative stress. In: *Thrombosis and haemostasis* 117 (4), S. 750–757.
- Joukov, V.; Pajusola, K.; Kaipainen, A.; Chilov, D.; Lahtinen, I.; Kukk, E. et al. (1996): A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. In: *The EMBO Journal* 15 (2), S. 290–298.
- Jovancevic, Nikolina; Khalfaoui, Soumaya; Weinrich, Markus; Weidinger, Daniel; Simon, Annika; Kalbe, Benjamin et al. (2017): Odorant Receptor 51E2 Agonist  $\beta$ -ionone Regulates RPE Cell Migration and Proliferation. In: *Frontiers in physiology* 8, S. 888.
- Kennedy, B. G.; Mangini, N. J. (1996): Plasma membrane calcium-ATPase in cultured human retinal pigment epithelium. In: *Experimental eye research* 63 (5), S. 547–556.
- Kennedy, Brian G.; Torabi, Asad J.; Kurzawa, Rafal; Echtenkamp, Stephen F.; Mangini, Nancy J. (2010): Expression of transient receptor potential vanilloid channels TRPV5 and TRPV6 in retinal pigment epithelium. In: *Molecular Vision* 16, S. 665–675.
- Khan, J. C.; Thurlby, D. A.; Shahid, H.; Clayton, D. G.; Yates, J. R. W.; Bradley, M. et al. (2006): Smoking and age related macular degeneration: the number of pack years of cigarette smoking is a major determinant of risk for both geographic atrophy and choroidal neovascularisation. In: *The British Journal of Ophthalmology* 90 (1), S. 75–80.

- Klein, Ronald; Klein, Barbara E.K.; Linton, Kathryn L.P. (1992): Prevalence of Age-related Maculopathy. In: *Ophthalmology* 99 (6), S. 933–943.
- Kong, Huihui; Jones, Peter P.; Koop, Andrea; Zhang, Lin; Duff, Henry J.; Wayne Chen, S. R. (2008): Caffeine Induces Ca<sup>2+</sup> Release by Reducing The Threshold for Luminal Ca<sup>2+</sup> Activation of the Ryanodine Receptor. In: *The Biochemical journal* 414 (3), S. 441–452.
- Kraft, Robert; Harteneck, Christian (2005): The mammalian melastatin-related transient receptor potential cation channels: an overview. In: *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 451 (1), S. 204–211.
- La Dornonville de Cour, M. (1993): Ion transport in the retinal pigment epithelium. A study with double barrelled ion-selective microelectrodes. In: *Acta ophthalmologica. Supplement* (209), S. 1–32.
- Lambert, Vincent; Lecomte, Julie; Hansen, Sylvain; Blacher, Silvia; Gonzalez, Maria-Luz Alvarez; Struman, Ingrid et al. (2013): Laser-induced choroidal neovascularization model to study age-related macular degeneration in mice. In: *Nature protocols* 8 (11), S. 2197–2211.
- LaVail, M. M. (1980): Circadian nature of rod outer segment disc shedding in the rat. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 19 (4), S. 407–411.
- Lee, Samuel P.; So, Christopher H.; Rashid, Asim J.; Varghese, George; Cheng, Regina; Lança, A. José et al. (2004): Dopamine D1 and D2 receptor Co-activation generates a novel phospholipase C-mediated calcium signal. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (34), S. 35671–35678.
- Li, Hongyu (2017): TRP Channel Classification. In: *Advances in experimental medicine and biology* 976, S. 1–8.
- Li, Mao; Wang, Min; Guo, Wenyi; Wang, Jiajian; Sun, Xinghuai (2011): The effect of caffeine on intraocular pressure: a systematic review and meta-analysis. In: *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 249 (3), S. 435–442.
- Liu, Beiyang; Qin, Feng (2016): Use Dependence of Heat Sensitivity of Vanilloid Receptor TRPV2. In: *Biophysical journal* 110 (7), S. 1523–1537.
- Liu, Lu; Gu, Lijuan; Chen, Manli; Zheng, Yueying; Xiong, Xiaoxing; Zhu, Shengmei (2020): Novel Targets for Stroke Therapy: Special Focus on TRPC Channels and TRPC6. In: *Frontiers in aging neuroscience* 12, S. 70.
- Lytton, J.; Westlin, M.; Hanley, M. R. (1991): Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. In: *The Journal of biological chemistry* 266 (26), S. 17067–17071.
- Mainster, M. A. (1999): Decreasing retinal photocoagulation damage: principles and techniques. In: *Seminars in ophthalmology* 14 (4), S. 200–209.

- Mainster, M. A.; Reichel, E. (2000): Transpupillary thermotherapy for age-related macular degeneration: long-pulse photocoagulation, apoptosis, and heat shock proteins. In: *Ophthalmic surgery and lasers* 31 (5), S. 359–373.
- Mangini, N. J.; Haugh-Scheidt, L.; Valle, J. E.; Cragoe, E. J.; Ripps, H.; Kennedy, B. G. (1997): Sodium-calcium exchanger in cultured human retinal pigment epithelium. In: *Experimental eye research* 65 (6), S. 821–834.
- Marmor, M. F. (1975): Structure and function of the retinal pigment epithelium. In: *International ophthalmology clinics* 15 (1), S. 115–130.
- Marmor, Michael F. (1999): Mechanisms of fluid accumulation in retinal edema. In: *Documenta Ophthalmologica* 97 (3/4), S. 239–249.
- Marmorstein, A. D. (2001): The polarity of the retinal pigment epithelium. In: *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 2 (12), S. 867–872.
- Marquioni-Ramella, Melisa D.; Suburo, Angela M. (2015): Photo-damage, photo-protection and age-related macular degeneration. In: *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 14 (9), S. 1560–1577.
- Marshall, J.; Mellerio, J. (1967): Pathological development of retinal laser photocoagulations. In: *Experimental eye research* 6 (4), 303-IN5.
- Masri, H.; Goureau, O.; Hecquet, C.; Simon, A.; Nguyen-Legros, J. (1996): La dopamine ralentit la phagocytose des bâtonnets par l'épithélium pigmentaire de boeuf in vitro grâce à un récepteur D1. In: *Comptes rendus de l'Academie des sciences. Serie III, Sciences de la vie* 319 (8), S. 687–691.
- Matsumoto, T.; Claesson-Welsh, L. (2001): VEGF receptor signal transduction. In: *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2001 (112), re21.
- Matušková, Veronika; Zeman, Tomáš; Ewerlingová, Laura; Hlinomazová, Zuzana; Souček, Jan; Vlková, Eva et al. (2020): An association of neovascular age-related macular degeneration with polymorphisms of CFH, ARMS2, HTRA1 and C3 genes in Czech population. In: *Acta ophthalmologica* 98 (6), e691-e699.
- McMahon, Douglas G.; Iuvone, P. Michael; Tosini, Gianluca (2014): Circadian organization of the mammalian retina: from gene regulation to physiology and diseases. In: *Progress in Retinal and Eye Research* 39, S. 58–76.
- Mederos Y Schnitzler, Michael; Gudermann, Thomas; Storch, Ursula (2018): Emerging Roles of Diacylglycerol-Sensitive TRPC4/5 Channels. In: *Cells* 7 (11).
- Meyer-Schicklerath, G. (1954): Lichtkoagulation; eine Methode zur Behandlung und Verhütung der Netzhautablösung. In: *Albrecht von Graefe's Archiv für Ophthalmologie* 156 (1), S. 2–34.
- Meyer-Schwickerath, G. R. (1989): The history of photocoagulation. In: *Australian and New Zealand journal of ophthalmology* 17 (4), S. 427–434.

- Miller, Arlo J.; Du, Jinyan; Rowan, Sheldon; Hershey, Christine L.; Widlund, Hans R.; Fisher, David E. (2004): Transcriptional regulation of the melanoma prognostic marker melastatin (TRPM1) by MITF in melanocytes and melanoma. In: *Cancer research* 64 (2), S. 509–516.
- Miller, S. S.; Edelman, J. L. (1990): Active ion transport pathways in the bovine retinal pigment epithelium. In: *The Journal of physiology* 424, S. 283–300.
- Mlinar, B.; Enyeart, J. J. (1993): Block of current through T-type calcium channels by trivalent metal cations and nickel in neural rat and human cells. In: *The Journal of physiology* 469, S. 639–652.
- Montell, Craig; Birnbaumer, Lutz; Flockerzi, Veit (2002): The TRP Channels, a Remarkably Functional Family. In: *Cell* 108 (5), S. 595–598.
- Montell, Craig; Rubin, Gerald M. (1989): Molecular characterization of the drosophila trp locus: A putative integral membrane protein required for phototransduction. In: *Neuron* 2 (4), S. 1313–1323.
- Nagasawa, Masahiro; Kojima, Itaru (2015): Translocation of TRPV2 channel induced by focal administration of mechanical stress. In: *Physiological reports* 3 (2).
- National Eye Institute (2001): A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report no. 8. In: *Arch Ophthalmol* 119 (10), S. 1417–1436.
- Newsom, R. S.; McAlister, J. C.; Saeed, M.; McHugh, J. D. (2001): Transpupillary thermotherapy (TTT) for the treatment of choroidal neovascularisation. In: *The British Journal of Ophthalmology* 85 (2), S. 173–178.
- Nilius, Bernd; Owsianik, Grzegorz (2010): Transient receptor potential channelopathies. In: *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 460 (2), S. 437–450.
- Nilius, Bernd; Owsianik, Grzegorz (2011): The transient receptor potential family of ion channels. In: *Genome biology* 12 (3), S. 218.
- Nilius, Bernd; Szallasi, Arpad (2014): Transient receptor potential channels as drug targets: from the science of basic research to the art of medicine. In: *Pharmacological reviews* 66 (3), S. 676–814.
- Ozawa, Terutaka (2010): Modulation of ryanodine receptor Ca<sup>2+</sup> channels (Review). In: *Molecular medicine reports* 3 (2), S. 199–204.
- Palanisamy, Karthikka; Karunakaran, Coral; Raman, Rajiv; Chidambaram, Subbulakshmi (2019): Optimization of an in vitro bilayer model for studying the functional interplay between human primary retinal pigment epithelial and choroidal endothelial cells isolated from donor eyes. In: *BMC research notes* 12 (1), S. 307.



- Parekh, Anant B.; Putney, James W. (2005): Store-operated calcium channels. In: *Physiological reviews* 85 (2), S. 757–810.
- Parver, L. M.; Aufer, C.; Carpenter, D. O. (1980): Choroidal blood flow as a heat dissipating mechanism in the macula. In: *American journal of ophthalmology* 89 (5), S. 641–646.
- Patricia Becerra, S.; Fariss, Robert N.; Wu, Yan Q.; Montuenga, Luis M.; Wong, Paul; Pfeffer, Bruce A. (2004): Pigment epithelium-derived factor in the monkey retinal pigment epithelium and interphotoreceptor matrix: apical secretion and distribution. In: *Experimental eye research* 78 (2), S. 223–234.
- Peterson, Ward M.; Meggyesy, Chris; Yu, Kefu; Miller, Sheldon S. (1997): Extracellular ATP Activates Calcium Signaling, Ion, and Fluid Transport in Retinal Pigment Epithelium. In: *J. Neurosci.* 17 (7), S. 2324–2337.
- Pierce, Mary E.; Besharse, Joseph C. (1987): Melatonin and rhythmic photoreceptor metabolism: melatonin-induced cone elongation is blocked at high light intensity. In: *Brain Research* 405 (2), S. 400–404.
- Pozdveyev, Nikita; Tosini, Gianluca; Li, Li; Ali, Fatima; Rozov, Stanislav; Lee, Rehwa H.; Iuvone, P. Michael (2008): Dopamine modulates diurnal and circadian rhythms of protein phosphorylation in photoreceptor cells of mouse retina. In: *The European journal of neuroscience* 27 (10), S. 2691–2700.
- Ramsey, I. Scott; Delling, Markus; Clapham, David E. (2006): An introduction to TRP channels. In: *Annual review of physiology* 68, S. 619–647.
- Ratnapriya, R.; Chew, E. Y. (2013): Age-related macular degeneration – clinical review and genetics update. In: *Clinical Genetics* 84 (2), S. 160–166.
- Reichel, Elias; Berrocal, Audina M.; Ip, Michael; Kroll, Arnold J.; Desai, Vinay; Duker, Jay S.; Puliafito, Carmen A. (1999): Transpupillary thermotherapy of occult subfoveal choroidal neovascularization in patients with age-related macular degeneration. In: *Ophthalmology* 106 (10), S. 1908–1914.
- Reichenbach, Andreas; Bringmann, Andreas (2016): Purinergic signaling in retinal degeneration and regeneration. In: *Neuropharmacology* 104, S. 194–211.
- Reichhart, Nadine; Keckeis, Susanne; Fried, Frederik; Fels, Gabriele; Strauss, Olaf (2015): Regulation of surface expression of TRPV2 channels in the retinal pigment epithelium. In: *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie* 253 (6), S. 865–874.
- Reichhart, Nadine; Strauss, Olaf (2014): Ion channels and transporters of the retinal pigment epithelium. In: *Experimental eye research* 126, S. 27–37.
- Reigada, David; Lu, Wennan; Zhang, Xiulan; Friedman, Constantine; Pendrak, Klara; McGlinn, Alice et al. (2005): Degradation of extracellular ATP by the retinal pigment epithelium. In: *American journal of physiology. Cell physiology* 289 (3), C617-24.

- Rizzolo, L. J. (1997): Polarity and the development of the outer blood-retinal barrier. In: *Histology and histopathology* 12 (4), S. 1057–1067.
- Rodriguez de Turco, Elena B.; Parkins, Nilda; Ershov, Alexey V.; Bazan, Nicolas G. (1999): Selective retinal pigment epithelial cell lipid metabolism and remodeling conserves photoreceptor docosahexaenoic acid following phagocytosis. In: *J. Neurosci. Res.* 57 (4), S. 479–486.
- Rogers, T. B.; Inesi, G.; Wade, R.; Lederer, W. J. (1995): Use of thapsigargin to study Ca<sup>2+</sup> homeostasis in cardiac cells. In: *Bioscience reports* 15 (5), S. 341–349.
- Rosenbaum, Tamara; Benítez-Angeles, Miguel; Sánchez-Hernández, Raúl; Morales-Lázaro, Sara Luz; Hiriart, Marcia; Morales-Buenrostro, Luis Eduardo; Torres-Quiroz, Francisco (2020): TRPV4: A Physio and Pathophysiologically Significant Ion Channel. In: *International Journal of Molecular Sciences* 21 (11).
- Rosenfeld, Philip J.; Brown, David M.; Heier, Jeffrey S.; Boyer, David S.; Kaiser, Peter K.; Chung, Carol Y.; Kim, Robert Y. (2006): Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. In: *The New England journal of medicine* 355 (14), S. 1419–1431.
- Rosenthal, Rita; Heimann, Heinrich; Agostini, Hansjürgen; Martin, Gottfried; Hansen, Lutz Lothar; Strauss, Olaf (2007): Ca<sup>2+</sup> channels in retinal pigment epithelial cells regulate vascular endothelial growth factor secretion rates in health and disease. In: *Molecular Vision* 13, S. 443–456.
- Rosenthal, Rita; Strauss, Olaf (2002): Ca<sup>2+</sup>-channels in the RPE. In: *Advances in experimental medicine and biology* 514, S. 225–235.
- Samanta, Amrita; Hughes, Taylor E. T.; Moiseenkova-Bell, Vera Y. (2018): Transient Receptor Potential (TRP) Channels. In: *Sub-cellular biochemistry* 87, S. 141–165.
- Samuel, William; Jaworski, Cynthia; Postnikova, Olga. A.; Kutty, R. Krishnan; Duncan, Todd; Tan, Li Xuan et al. (2017): Appropriately differentiated ARPE-19 cells regain phenotype and gene expression profiles similar to those of native RPE cells. In: *Molecular Vision* 23, S. 60–89.
- Santulli, Gaetano; Marks, Andrew R. (2015): Essential Roles of Intracellular Calcium Release Channels in Muscle, Brain, Metabolism, and Aging. In: *Current molecular pharmacology* 8 (2), S. 206–222.
- Schargus, M. (2015): Verlaufsformen der altersbedingten Makuladegeneration. In: *Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft* 112 (4), 373-85; quiz 386.
- Seddon, Johanna M.; Cote, Jennifer; Davis, Nancy; Rosner, Bernard (2003): Progression of age-related macular degeneration: association with body mass index, waist circumference, and waist-hip ratio. In: *Arch Ophthalmol* 121 (6), S. 785–792.

- Seddon, Johanna M.; Cote, Jennifer; Page, William F.; Aggen, Steven H.; Neale, Michael C. (2005): The US twin study of age-related macular degeneration: relative roles of genetic and environmental influences. In: *Arch Ophthalmol* 123 (3), S. 321–327.
- Shen, Yin; Rampino, Melissa Ann F.; Carroll, Reed C.; Nawy, Scott (2012): G-protein-mediated inhibition of the Trp channel TRPM1 requires the G $\beta$  $\gamma$  dimer. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (22), S. 8752–8757.
- Sherkheli, Muhammad Azhar; Benecke, Heike; Doerner, Julia Franca; Kletke, Olaf; Vogt-Eisele, A. K.; Gisselmann, Guenter; Hatt, Hanns (2009): Monoterpenoids induce agonist-specific desensitization of transient receptor potential vanilloid-3 (TRPV3) ion channels. In: *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques* 12 (1), S. 116–128.
- Sigelman, Jesse (1991): Foveal Drusen Resorption One Year after Perifoveal Laser Photocoagulation. In: *Ophthalmology* 98 (9), S. 1379–1383.
- Simons, Michael; Gordon, Emma; Claesson-Welsh, Lena (2016): Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 17 (10), S. 611–625.
- Smith, G. D.; Gunthorpe, M. J.; Kelsell, R. E.; Hayes, P. D.; Reilly, P.; Facer, P. et al. (2002): TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. In: *Nature* 418 (6894), S. 186–190.
- So, Choon Leng; Milevskiy, Michael J. G.; Monteith, Gregory R. (2020): Transient receptor potential cation channel subfamily V and breast cancer. In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 100 (2), S. 199–206.
- Stalmans, P.; Himpens, B. (1997): Confocal imaging of Ca<sup>2+</sup> signaling in cultured rat retinal pigment epithelial cells during mechanical and pharmacologic stimulation. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 38 (1), S. 176–187.
- Steele, F. R.; Chader, G. J.; Johnson, L. V.; Tombran-Tink, J. (1993): Pigment epithelium-derived factor: neurotrophic activity and identification as a member of the serine protease inhibitor gene family. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (4), S. 1526–1530.
- Steinberg, R. H. (1985a): Interactions between the retinal pigment epithelium and the neural retina. In: *Documenta Ophthalmologica* 60 (4), S. 327–346.
- Steinberg, R. H. (1985b): Interactions between the retinal pigment epithelium and the neural retina. In: *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology* 60 (4), S. 327–346.
- Steinberg, R. H.; Wood, I.; Hogan, M. J. (1977): Pigment epithelial ensheathment and phagocytosis of extrafoveal cones in human retina. In: *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 277 (958), S. 459–474.

- Stone, Edwin M. (2006): A very effective treatment for neovascular macular degeneration. In: *The New England journal of medicine* 355 (14), S. 1493–1495.
- Storch, Ursula; Forst, Anna-Lena; Philipp, Maximilian; Gudermann, Thomas; Mederos Y Schnitzler, Michael (2012): Transient receptor potential channel 1 (TRPC1) reduces calcium permeability in heteromeric channel complexes. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (5), S. 3530–3540.
- Strachwitz, C. N. von (2013): Trockene altersabhängige Makuladegeneration. In: *Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft* 110 (6), 555-65; quiz 566-7.
- Strauss, O. (2016): Die Wirkung der VEGF-A-Antagonisten auf molekularer und zellulärer Ebene. In: *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde* 232 (3), S. 266–270.
- Strauss, Olaf (2005): The retinal pigment epithelium in visual function. In: *Physiological reviews* 85 (3), S. 845–881.
- Streilein, J.Wayne; Ma, Naili; Wenkel, Hartmut; Fong Ng, Tat; Zamiri, Parisa (2002): Immunobiology and privilege of neuronal retina and pigment epithelium transplants. In: *Vision Research* 42 (4), S. 487–495.
- Sugimoto, Naotoshi; Matsuzaki, Kentaro; Katakura, Masanori; Nakamura, Hiroyuki; Ueda, Yoshibumi; Yachie, Akihiro; Shido, Osamu (2019): Heat attenuates sensitivity of mammalian cells to capsaicin. In: *Journal of biochemical and molecular toxicology* 33 (5), e22288.
- Thompson, Debra A.; Gal, Andreas (2003): Vitamin A metabolism in the retinal pigment epithelium: genes, mutations, and diseases. In: *Progress in Retinal and Eye Research* 22 (5), S. 683–703.
- Tsai, T-H; Yang, C-M; Yang, C-H; Ho, T-C; Huang, J-S; Chen, M-S (2007): Transpupillary thermotherapy for the treatment of choroidal neovascularization in age-related macular degeneration in Taiwan. In: *Eye (London, England)* 21 (6), S. 721–726.
- Tytgat, Jan; Daenens, Paul (1997): Effect of lanthanum on voltage-dependent gating of a cloned mammalian neuronal potassium channel. In: *Brain Research* 749 (2), S. 232–237.
- Uchida, Kunitoshi; Dezaki, Katsuya; Yoneshiro, Takeshi; Watanabe, Tatsuo; Yamazaki, Jun; Saito, Masayuki et al. (2017): Involvement of thermosensitive TRP channels in energy metabolism. In: *The journal of physiological sciences : JPS* 67 (5), S. 549–560.
- van Genderen, Maria M.; Bijveld, Mieke M. C.; Claassen, Yvonne B.; Florijn, Ralph J.; Pearing, Jillian N.; Meire, Françoise M. et al. (2009): Mutations in TRPM1 are a common cause of complete congenital stationary night blindness. In: *American journal of human genetics* 85 (5), S. 730–736.

- van Lookeren Campagne, Menno; LeCouter, Jennifer; Yaspan, Brian L.; Ye, Weilan (2014): Mechanisms of age-related macular degeneration and therapeutic opportunities. In: *The Journal of pathology* 232 (2), S. 151–164.
- Venkatachalam, Kartik; Montell, Craig (2007): TRP channels. In: *Annual review of biochemistry* 76, S. 387–417.
- Versaux-Botteri, C.; Gibert, J. M.; Nguyen-Legros, J.; Vernier, P. (1997): Molecular identification of a dopamine D1b receptor in bovine retinal pigment epithelium. In: *Neuroscience letters* 237 (1), S. 9–12.
- Vingerling, Johannes R.; Dielemans, Ida; Hofman, Albert; Grobbee, Diederick E.; Hijmering, Michel; Kramer, Constantijn F.L.; Jong, Paulus T.V.M. de (1995): The Prevalence of Age-related Maculopathy in the Rotterdam Study. In: *Ophthalmology* 102 (2), S. 205–210.
- Votruba, M.; Gregor, Z. (2001): Neovascular age-related macular degeneration: present and future treatment options. In: *Eye (London, England)* 15 (Pt 3), S. 424–429.
- Vriens, Joris; Appendino, Giovanni; Nilius, Bernd (2009): Pharmacology of vanilloid transient receptor potential cation channels. In: *Molecular pharmacology* 75 (6), S. 1262–1279.
- Vriens, Joris; Voets, Thomas (2018): Sensing the heat with TRPM3. In: *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 470 (5), S. 799–807.
- Wang, Hongbo; Cheng, Xiaoding; Tian, Jinbin; Xiao, Yuling; Tian, Tian; Xu, Fuchun et al. (2020): TRPC channels: Structure, function, regulation and recent advances in small molecular probes. In: *Pharmacology & therapeutics* 209, S. 107497.
- Wang, Yafeng; Wang, Mingxu; Han, Yue; Zhang, Rui; Le Ma (2016): ABCA1 rs1883025 polymorphism and risk of age-related macular degeneration. In: *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 254 (2), S. 323–332.
- Wang, Yizheng (2017): Transient Receptor Potential Canonical Channels and Brain Diseases. Dordrecht: Springer Netherlands (Advances in Experimental Medicine and Biology, v.976).
- Wetzig, P. C. (1988): Treatment of drusen-related aging macular degeneration by photocoagulation. In: *Transactions of the American Ophthalmological Society* 86, S. 276–290.
- Williams, Rebecca A. (1998): The Psychosocial Impact of Macular Degeneration. In: *Arch Ophthalmol* 116 (4), S. 514.
- Wimmers, Sönke; Coeppicus, Linn; Rosenthal, Rita; Strauss, Olaf (2008): Expression profile of voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel subunits in the human retinal pigment epithelium. In: *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 246 (5), S. 685–692.

- Wimmers, Sönke; Karl, Mike O.; Strauss, Olaf (2007): Ion channels in the RPE. In: *Progress in Retinal and Eye Research* 26 (3), S. 263–301.
- Wimmers, Sönke; Strauss, Olaf (2007): Basal calcium entry in retinal pigment epithelial cells is mediated by TRPC channels. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 48 (12), S. 5767–5772.
- Wu, Long-Jun; Sweet, Tara-Beth; Clapham, David E. (2010): International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current progress in the mammalian TRP ion channel family. In: *Pharmacological reviews* 62 (3), S. 381–404.
- Yang, Dongli; Elnér, Susan G.; Clark, Andrea J.; Hughes, Bret A.; Petty, Howard R.; Elnér, Victor M. (2011): Activation of P2X receptors induces apoptosis in human retinal pigment epithelium. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 52 (3), S. 1522–1530.
- Young, Richard W.; Bok, Dean (1969): Participation of the retinal pigment epithelium in the rod outer segment renewal process. In: *The Journal of Cell Biology* 42 (2), S. 392–403.
- Zhang, L.; Hui, Y-N; Wang, Y-S; Ma, J-X; Wang, J-B; Ma, L-N (2011): Calcium overload is associated with lipofuscin formation in human retinal pigment epithelial cells fed with photoreceptor outer segments. In: *Eye (London, England)* 25 (4), S. 519–527.
- Zhang, Xuexin; Spinelli, Amy M.; Masiello, Timothy; Trebak, Mohamed (2016): Transient Receptor Potential Canonical 7 (TRPC7), a Calcium (Ca<sup>2+</sup>) Permeable Non-selective Cation Channel. In: *Advances in experimental medicine and biology* 898, S. 251–264.
- Zhao, B.; Ma, A.; Cai, J.; Boulton, M. (2006): VEGF-A regulates the expression of VEGF-C in human retinal pigment epithelial cells. In: *The British Journal of Ophthalmology* 90 (8), S. 1052–1059.
- Zhao, Bojun; Smith, Gill; Cai, Jun; Ma, Aihua; Boulton, Mike (2007): Vascular endothelial growth factor C promotes survival of retinal vascular endothelial cells via vascular endothelial growth factor receptor-2. In: *The British Journal of Ophthalmology* 91 (4), S. 538–545.
- Zhao, Peter Y.; Gan, Geliang; Peng, Shaomin; Wang, Shao-Bin; Chen, Bo; Adelman, Ron A.; Rizzolo, Lawrence J. (2015): TRP Channels Localize to Subdomains of the Apical Plasma Membrane in Human Fetal Retinal Pigment Epithelium. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 56 (3), S. 1916–1923.
- Zhu, M.; Provis, J. M.; Penfold, P. L. (1998): Isolation, culture and characteristics of human foetal and adult retinal pigment epithelium. In: *Australian and New Zealand journal of ophthalmology* 26 Suppl 1, S50-2.

## 9 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift:  .....