

Aus dem

Department für Augenheilkunde Tübingen  
Universitäts-Augenklinik

**Die Rolle von p53 in primären retinalen RPE-Zellen**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Wolfrum, Peter**

**2023**

Dekan:	Professor Dr. B. Pichler
1. Berichterstatter:	Dr. S. Schnichels
2. Berichterstatter:	Professor Dr. nat. W. K. Aicher
Tag der Disputation:	19.09.2023

Meinen Eltern

## Inhaltsverzeichnis

I.	Tabellenverzeichnis	I
II.	Abbildungsverzeichnis	I
III.	Abkürzungsverzeichnis	III
1	Einleitung	1
1.1	Der hintere Augenabschnitt	1
1.1.1	Aufbau und Funktion der Netzhaut	2
1.1.2	Funktion des retinalen Pigmentepithels	3
1.2	Verlust retinaler Pigmentepithelzellen	4
1.2.1	Die altersbedingte Makuladegeneration	4
1.2.2	Retinitis pigmentosa (RP)	5
1.3	Das Tumorsupressorprotein p53	6
1.3.1	Aufbau und Struktur von p53	7
1.3.2	DNA-Bindung durch p53	8
1.3.3	Regulierung von p53	8
1.3.4	p53-Zielgene	10
1.3.5	Apoptoseregulierung durch p53	11
1.4	Krankheitsentstehung durch p53	14
1.5	Die unklare Funktion von p53 in der Pathogenese der AMD	14
1.6	Zielsetzung der Arbeit	16
2	Material und Methoden	17
2.1	Material	17
2.1.1	Verbrauchsmaterialien und Reagenzien	17
2.1.2	Assays und Kits	18
2.1.3	Antikörper	18
2.1.4	Primer	19
2.1.5	Geräte	20
2.1.6	Software/ Applikationen	20
2.1.7	Verwendete Plasmide	21
2.1.8	Verwendete Zellen	23

## Inhaltsverzeichnis

2.1.9	Lösungen	23
2.2	Methoden	25
2.2.1	BLAST® Proteinsequenzvergleich	25
2.2.2	Vorbereitung der Plasmide	26
2.2.3	Herstellung chemokompetenter Zellen	26
2.2.4	Bakterientransformation	27
2.2.5	Plasmidisolierung	28
2.2.6	Zellkultur und Kultivierung	28
2.2.7	Transfektion	32
2.2.8	Ablauf der Transfektionsetablierung	39
2.2.9	Zellstressetablierung	40
2.2.10	Durchflusszytometrie	41
2.2.11	Zellbasierte Assays	42
2.2.12	Quantitative PCR mit reverser Transkription (qRT-PCR)	45
2.2.13	Immunfluoreszenz-Färbung	48
2.2.14	Proteinnachweis mittels Western Blot	49
2.2.15	BCA-Assay	50
2.2.16	Statistische Auswertung	52
3	Ergebnisse	53
3.1	Hohe Übereinstimmung der humanen und porcinen p53-Proteinsequenzen	53
3.2	Ergebnisse der Transfektionsetablierung	54
3.2.1	Die Magnetofektion mit CombiMag und ViaFect™ als effizientestes Transfektionsverfahren der primären porcinen RPE-Zellen	54
3.2.2	FuGENE® HD als effizientestes Transfektionsverfahren bei Zellen der ARPE-19-Zelllinie	60
3.3	p53-Überexpression in ungestressten Zellen	69
3.3.1	Keine Apoptoseinduktion und kein Zellzyklusarrest durch eine p53-Überexpression in ungestressten primären RPE-Zellen	69
3.3.2	Keine Apoptoseinduktion und kein Zellzyklusarrest durch eine p53-Überexpression in ungestressten ARPE-19-Zellen	74
3.4	p53-Überexpression in gestressten Zellen	79

## Inhaltsverzeichnis

3.4.1	Zellstressetablierung mit Rückgang der Zellzahl und Zellviabilität unter Verwendung von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> und CoCl <sub>2</sub> _____	80
3.4.2	Keine Apoptoseinduktion in p53-überexprimierten und mit Zellstressoren co-behandelten primären RPE-Zellen _____	82
3.4.3	Keine Apoptoseinduktion in p53-überexprimierten und mit Zellstressoren co-behandelten ARPE-19 Zellen _____	84
4	Diskussion _____	88
4.1	Transfektionsetablierung der primären porcinen RPE-Zellen und der ARPE-19-Zellen _____	88
4.2	Folgen der p53-Überexpression in primären porcinen RPE-Zellen__	89
4.3	Folgen der p53-Überexpression in ARPE-19-Zellen _____	91
4.4	Schlussfolgerung und Aussicht _____	92
5	Zusammenfassung _____	94
6	Literaturverzeichnis _____	95
7	Erklärung zum Eigenanteil _____	100
8	Veröffentlichungen _____	101
9	Danksagung _____	102

## I. Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1:** Verwendete Verbrauchsmaterialien und Reagenzien
- Tabelle 2:** Verwendete Zellassays und Kits
- Tabelle 3:** Primärantikörper für Western Blot und Immunfluoreszenz
- Tabelle 4:** Sekundärantikörper für Western Blot und Immunfluoreszenz
- Tabelle 5:** Verwendete Primersequenzen der primären porcinen RPE-Zellen
- Tabelle 6:** Verwendete Primersequenzen der ARPE-19-Zellen
- Tabelle 7:** Verwendete Geräte
- Tabelle 8:** Verwendete Softwareanwendungen
- Tabelle 9:** BLAST® Ausgabewerte des Sequenzvergleichs
- Tabelle 10:** Zusammensetzung der Kulturmedien
- Tabelle 11:** Zellaussaat in den verschiedenen Kulturplatten
- Tabelle 12:** Transfektionsetablierungsansätze
- Tabelle 13:** Elektroporationsansätze
- Tabelle 14:** Ergebnisse des Proteinsequenzvergleichs
- Tabelle 15:** Transfektionsetablierungsergebnisse der primären RPE-Zellen
- Tabelle 16:** Transfektionsetablierungsergebnisse der ARPE-19-Zellen

## II. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Anatomie des hinteren Augenabschnittes
- Abbildung 2:** Übersicht der einzelnen Netzhautschichten
- Abbildung 3:** Überblick über die funktionalen Domänen des p53-Proteins
- Abbildung 4:** p53-DNA Komplex
- Abbildung 5:** p53-Aktivierungsmechanismus via Phosphorylierung
- Abbildung 6:** Zielgene und Funktionen von p53
- Abbildung 7:** Intrinsischer und extrinsischer Apoptose-Signalweg
- Abbildung 8:** Gen Map des p53-GFP-Plasmids (#11770)
- Abbildung 9:** Gen Map des pEGFP-N1-FLAG-Plasmids (#60360)
- Abbildung 10:** Isolierung primärer porciner RPE-Zellen
- Abbildung 11:** Übersicht über das Magnetofektions- und Elektroporationskit
- Abbildung 12:** Chemische Transfektionen mit ViaFect™ und FuGENE® HD
- Abbildung 13:** Magnetofektion™ mit PolyMAG und CombiMag

## Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 14:** Elektroporation mit dem Neon™ Transfection System
- Abbildung 15:** Ablauf der quantitativen-Echtzeit-PCR
- Abbildung 16:** Funktionsweise der Fluoreszenzfärbung
- Abbildung 17:** Funktionsweise des Western Blots
- Abbildung 18:** Darstellung der übereinstimmenden Sequenzen des humanen und des porcinen p53-Proteins
- Abbildung 19:** Fluoreszenzmikroskopischer Vergleich der verschiedenen Transfektionsetablierungsansätze bei primären porcinen RPE-Zellen
- Abbildung 20:** Durchflusszytometrie GFP- und p53-GFP-transfizierter primärer porciner RPE-Zellen
- Abbildung 21:** mRNA- und Protein-Nachweis der p53-Überexpression in primären RPE-Zellen
- Abbildung 22:** Fluoreszenzmikroskopischer Vergleich der verschiedenen Transfektionsetablierungsansätze bei ARPE-19-Zellen
- Abbildung 23:** Höhere Transfektionseffizienz ViaFect™ transfizierter ARPE-19-Zellen, im Vergleich zu FuGENE® HD transfizierten Zellen
- Abbildung 24:** Schnellere Expressionsabnahme ViaFect™ transfizierter ARPE-19-Zellen, im Vergleich zu FuGENE® HD
- Abbildung 25:** Erhöhte Toxizität ViaFect™ transfizierter ARPE-19-Zellen, im Vergleich zu FuGENE® HD
- Abbildung 26:** Durchflusszytometrie p53-GFP-transfizierten ARPE-19-Zellen
- Abbildung 27:** mRNA- und Protein-Nachweis der p53-Überexpression in ARPE-19-Zellen
- Abbildung 28:** Zeitpunkt der höchsten Genexpression primärer porciner RPE-Zellen, 24h nach Transfektion
- Abbildung 29:** Keine Apoptoseinduktion und kein Zellzyklusarrest in p53-überexprimierten primären RPE-Zellen in Zellassays feststellbar
- Abbildung 30:** Keine signifikanten Unterschiede in den gemessenen relativen Genexpressionen, transfizierter primärer RPE-Zellen

## Abkürzungsverzeichnis

- Abbildung 31:** Zeitpunkt der höchsten Genexpression in ARPE-19-Zellen, 24h nach Transfektion
- Abbildung 32:** Keine Apoptoseinduktion und kein Zellzyklusarrest in p53-überexprimierten ARPE-19-Zellen in Zellassays feststellbar
- Abbildung 33:** Erhöhte p21-Genexpression in p53-transfizierten ARPE-19-Zellen
- Abbildung 34:** Stresstablierungsergebnisse primärer RPE-Zellen nach 24h
- Abbildung 35:** Stresstablierungsergebnisse der ARPE-19 Zellen nach 24h
- Abbildung 36:** Keine erhöhte Apoptoseinduktion in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und CoCl<sub>2</sub> gestressten, p53-überexprimierten primären RPE-Zellen
- Abbildung 37:** Keine erhöhte Apoptoseinduktion in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und CoCl<sub>2</sub> gestressten, überexprimierten ARPE-19-Zellen

### III. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
10x	10-fach
Abb.	Abbildung
BCA	Bicinchoninsäure
BME	2-Mercaptoethanol
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
CoCl <sub>2</sub>	Cobalt(II)-chlorid
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
dnTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
FACS	Durchflusszytometrie (engl. „Fluorescence Activated Cell Sorting“)
GFP	Grün-fluoreszierende-Protein
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
Hsp70	Hitzeschockprotein 70

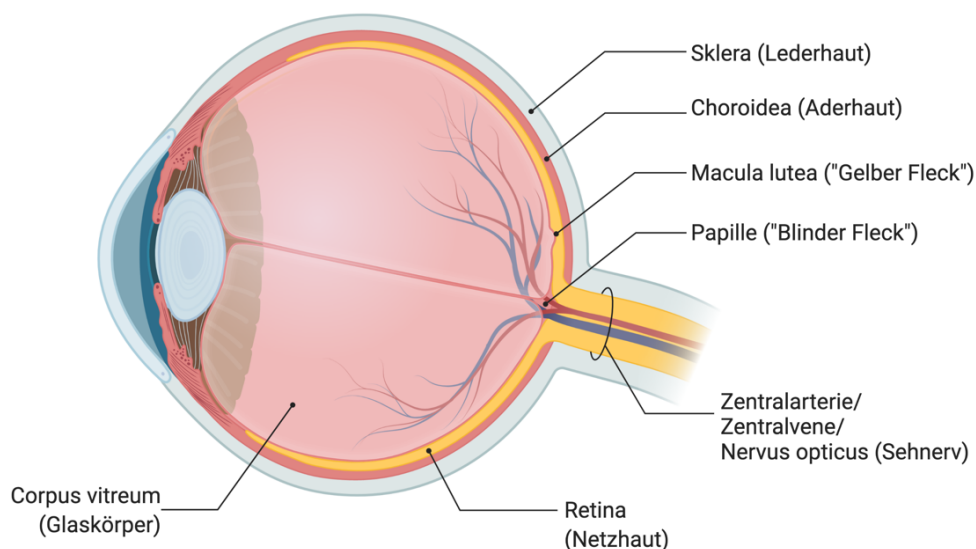
## Abkürzungsverzeichnis

LPS	Lipopolysaccharid
ml	Mililiter
mM	Millimol
n	Anzahl
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
p21	Tumorsuppressorprotein p21
p53	Tumorsuppressorprotein p53
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
RPE	Retinales Pigmentepithel
qRT-PCR	Quantitative PCR mit reverser Transkription
SDS	Natriumlaurylsulfat (engl. „Sodium Dodecyl Sulfate“)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
TBS	Tris gepufferte Salzlösung (engl. „Tris-buffered saline“)
TBS-T	TBS + Tween20
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar

## 1 Einleitung

### 1.1 Der hintere Augenabschnitt

Der hintere Augenabschnitt setzt sich aus dem *Corpus vitreum* (Glaskörper), der *Retina* (Netzhaut), der *Choroidea* (Aderhaut), der *Sklera* (Lederhaut) sowie dem *Nervus opticus* (Sehnerv) zusammen (Abbildung 1). Der zwischen Linse und Netzhaut liegende Glaskörper stabilisiert dabei das Auge und ermöglicht durch seine transparente Zusammensetzung den Durchtritt von Licht. Die dahinter angrenzende Netzhaut enthält lichtempfindliche Photorezeptoren, die Lichtreize in elektrische Impulse umwandeln und anschließend über den Sehnerv an die Sehrinde weiterleiten. Man unterscheidet hierbei die für das Hell-Dunkel-Sehen zuständigen Stäbchen von denen für das Farbsehen verantwortlichen Zapfen. Die Verteilung über die Netzhaut zeigt, dass die Dichte der Zapfen im Bereich der *Macula lutea* am größten ist und zur Peripherie hin abnimmt. Umgekehrt ist die Stäbchendichte im Bereich der *Macula lutea* gering und nimmt in Richtung der Peripherie zu [1]. Die Versorgung der inneren Netzhautschichten mit Sauerstoff erfolgt über Blutgefäße, die aus der Zentralarterie entspringen, die der äußeren Netzhautschichten per Diffusion aus der Aderhaut [1]. Die außen liegende Lederhaut stabilisiert das Auge und schützt es vor äußeren Einwirkungen.



**Abbildung 1: Anatomie des hinteren Augenabschnittes**

Übersicht über die wichtigsten makroskopischen Strukturen des hinteren Augenabschnittes (Erstellt mit BioRender.com).

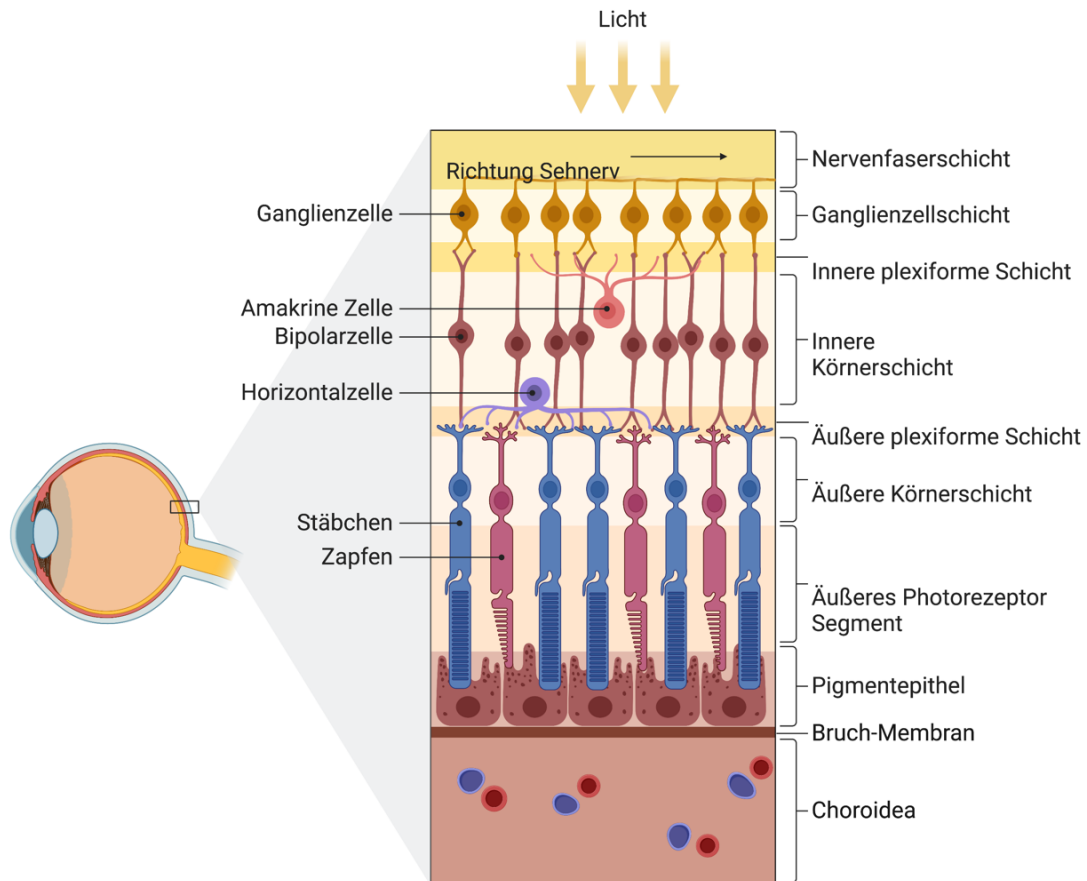
### 1.1.1 Aufbau und Funktion der Netzhaut

Die ca. 200 µm dicke Netzhaut lässt sich insgesamt in 10 unterschiedliche Schichten unterteilen (Abbildung 2). Vom Glaskörper ausgehend und in Richtung Choroidea betrachtet, bestehen diese aus der inneren Grenzmembran, der Nervenfaserschicht, der Ganglienzellschicht, der inneren plexiformen Schicht, der inneren Körnerschicht, der äußeren plexiformen Schicht, der äußeren Körnerschicht, der äußeren Grenzmembran, der Photorezeptorschicht und der retinalen Pigmentepithelschicht [1].

Der für das Sehen verantwortliche Teil der Netzhaut, die *Pars optica retinae*, besteht aus den ersten drei Neuronen der Sehbahn [1] [2]. Die Photorezeptorzellen stellen das 1. Neuron dar und wandeln Lichtreize in elektrische Signale um. Dieser erste Schritt wird als Phototransduktion bezeichnet. Abhängig von Stäbchen- oder Zapfenzellen werden hierbei unterschiedliche Sehpigmente aktiviert. Diese lichtempfindlichen Proteine werden auch als Opsine bezeichnet [3]. Durch den Einfall von Licht auf das in den Stäbchenzellen enthaltene Rhodopsin kommt es zur Isomerisation von 11-cis zu all-trans-Retinal [2]. Das dadurch gebildete Metarhodopsin 2 stellt die aktive Form des Rhodopsin dar und leitet anschließend das so entstandene Signal an das 2. Neuron, die Bipolarzellen, weiter. Dabei kommt es durch die vertikale Verschaltung mehrerer Photorezeptoren mit jeweils einer Bipolarzelle zunächst zur Verarbeitung der Informationen und anschließend zur Weiterleitung des daraus neu entstandenen Signals, an das 3. Neuron, die retinalen Ganglienzellen (RGZ). Durch die Horizontalzellen besteht zusätzlich auch eine laterale Verknüpfung der Stäbchen und Zapfen. Die Axone der RGZ verlaufen als Teil des Sehnerven und verlassen die Augenhöhle in Richtung der Sehrinde, in welcher schließlich die visuelle Wahrnehmung entsteht [1]. Die Phototransduktion der humanen Zapfenzellen verläuft ähnlich. Im Unterschied zu den Stäbchenzellen existieren drei verschiedene Zapfentypen, die Iodopsin als Sehpigment aufweisen [3]. Dabei werden die verschiedenen Zapfenzelltypen durch unterschiedliche Lichtwellenlängen angeregt [3]. Rotes Licht wird bei 565 nm absorbiert, während grünes Licht bei 535 nm und blaues

## Einleitung

Licht bei 440 nm absorbiert werden [4]. Durch die Übermittlung der jeweiligen Signale an das 2. und 3. Neuron kommt es so zur visuellen Wahrnehmung von Farben.



**Abbildung 2: Übersicht der einzelnen Netzhautschichten**

Der Choroidea und sich darüber befindenden Bruch Membran liegt zunächst das retinale Pigmentepithel an, gefolgt vom äußeren Photorezeptor Segment, der äußeren Körnerschicht, der äußeren plexiformen Schicht, der Inneren Körnerschicht sowie weiterhin der inneren plexiformen Schicht, der Ganglienzellschicht und schließlich der Nervenfaserschicht [1] (Erstellt mit BioRender.com).

### 1.1.2 Funktion des retinalen Pigmentepithels

Bei dem retinalen Pigmentepithel (RPE) handelt es sich um ein einschichtiges hexagonales Epithel, dessen Zellen auf Grund eines hohen Melaningehaltes schwarz pigmentiert sind [1]. Die mit den Photorezeptoren in Kontakt stehenden RPE-Zellen sind durch *Tight junctions* miteinander verbunden. Zusammen mit der darunterliegenden Bruch-Membran stellen sie eine selektive Abgrenzung zu den durchlässigen Kapillaren der Aderhaut dar und bilden somit den äußere Teil der Blut-Retina-Schranke (Abbildung 2) [5]. Weitere Funktionen der RPE-

## Einleitung

Zellen sind die Phagozytose abgestoßener Photorezeptorsegmente, die Regeneration des Sehpigmentes, die Entfernung freier Radikale, die Sekretion von ATP sowie Wachstums- und immunmodulatorischer Faktoren [6]. Auch kann durch die Pigmentierung der Zellen Streulicht absorbiert werden, wodurch die Auflösung des auf der Netzhaut entstandenen Bildes verbessert wird [6]. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das RPE eine essenzielle Rolle bei der Aufrechterhaltung der Photorezeptorfunktion einnimmt.

### **1.2 Verlust retinaler Pigmentepithelzellen**

Das RPE als Unterstützerstruktur der Photorezeptoren kann bei Funktionsstörungen oder Verlust sekundär zur Entstehung einer Photorezeptordegeneration führen. Diese Pathogenese ist charakteristisch für die Krankheit der altersbedingten Makuladegeneration (AMD) oder der Retinitis pigmentosa (RP) [7].

#### **1.2.1 Die altersbedingte Makuladegeneration**

Die AMD stellt die Hauptursache für einen fortschreitenden Sehkraftverlust und Sehbehinderungen in Industrieländern dar [8] [9]. Die Erkrankung führt dabei sekundär zu einem Untergang der Photorezeptoren im Bereich der Makula, der typischerweise im höheren Lebensalter eintritt [8] [10]. Während frühe Formen dabei oft asymptomatisch verlaufen oder sich durch eine eingeschränkte Lesefähigkeit bei schlechten Lichtverhältnissen manifestieren, treten bei fortgeschrittenen Formen zusätzlich Gesichtsfeldausfälle als Zeichen eines zentralen Sehkraftverlustes auf [8] [10]. Tabak, Alkohol, übermäßige Sonnenlichtexposition sowie eine genetische Prädisposition stellen bekannte Risikofaktoren für die Krankheitsentstehung dar [10]. Die genauen Zusammenhänge sind zwar noch nicht vollständig geklärt, jedoch nimmt man an, dass neben Bruch Membran und Choroidea, das RPE den Hauptausgangspunkt der Erkrankung darstellt [9] [10].

Pathogenetisch kommt es dabei zunächst zur Ablagerung von Lipiden im Bereich der Bruch Membran und der RPE-Zellen, was zu Funktionseinschränkungen und schließlich zum RPE-Zelltod führt [10]. Durch den RPE-Zellverlust kommt es im weiteren Verlauf zur eigentlichen Photorezeptordegeneration, die einen Sehkraftverlust zur Folge hat [9]. Die als „trocken“ beschriebene Form der AMD zeigt meist einen langsam verlaufenden Krankheitsprozess und führt in fortgeschrittenen Stadien zu einem als geographische Atrophie bezeichneten, großflächigen RPE-Zelluntergang mit ausgeprägtem Sehkraftverlust [8] [9]. Bei der feuchten Form der AMD kommt es im Verlauf zu Neovaskularisationen im Bereich der Makula [9]. Ausgelöst werden diese durch die Ausschüttung von - *Vascular Endothelial Growth Factors* (VEGF) – Wachstumsfaktoren, die zur Bildung flächiger Gefäßmembranen mit erhöhter Blutungsneigung und Flüssigkeitsansammlung führen [8] [9] [10]. Im Gegensatz zur trockenen Form weist die feuchte Form dabei meist einen deutlich schnelleren progredienten Verlust der Sehkraft auf.

### **1.2.2 Retinitis pigmentosa (RP)**

Bei der Erkrankung RP handelt es sich sowohl um spontane als auch hereditäre Formen der Netzhautdegeneration, die sich typischerweise erstmals im jugendlichen Alter bis spätestens Anfang 20 manifestieren [11]. Charakteristischerweise kommt es zunächst zur Degeneration, der für das Hell-Dunkel sehen verantwortlichen Stäbchenzellen, was wiederum zu der als *Nyctalopia* bezeichneten Nachtblindheit führt. Weitere Symptome sind die eingeschränkte Anpassungsfähigkeit an sich schnell ändernde Lichtverhältnisse sowie ein peripherer Sehkraftverlust, der als Tunnelblick bezeichnet wird [11] [12]. Dadurch, dass die Zapfenzellen erst in späteren Stadien betroffen sind, bleibt die zentrale Sehkraft und somit die Lesefähigkeit länger als beispielsweise bei der AMD erhalten [12]. Neben Mutationen, die die Funktionsweise der Photorezeptoren direkt beeinflussen, gibt es auch Mutationen in den RPE-Zellen, durch deren Funktionsverlust es zu einem sekundären Untergang der Photorezeptoren kommen kann [12] [13]. In den vergangenen Jahren wurden dabei bestimmte Gene, die für die

## Einleitung

Krankheitsentstehung verantwortlich sind, identifiziert [12]. Ein dabei häufig betroffenes Gen das in RPE-Zellen exprimiert wird und im physiologischem Zustand für die Regeneration der Opsine verantwortlich ist, ist das RPE65-Gen [14]. Mutationen in diesem Gen sind dabei für schätzungsweise 2 % aller autosomal-dominant vererbten RP-Erkrankungen verantwortlich [14]. Wie von Zobor and Zrenner [13] beschrieben ist, ist noch nicht vollständig geklärt, um welche Art des im RP beobachteten Zellunterganges es sich dabei handelt.

### 1.3 Das Tumorsupressorprotein p53

Der Transkriptionsfaktor p53 wurde erstmals 1979 in Verbindung mit dem viralen SV40 tumor virus antigen entdeckt [15] [16]. Namensgebend für dieses Protein ist seine Molekularmasse von 53 Kilodalton (kDa). Das Protein p53 ist ein Tumorsuppressor, was durch die Tatsache verdeutlicht wird, dass p53 in mehr als 50 % aller menschlichen Tumoren, durch Mutationen ausgelöst, in inaktiver Form vorliegt [17]. Neben seiner Funktion als Tumorsuppressor übernimmt p53 die Aufgabe der „Steuerzentrale“ in der Zelle und kann über die Transkription nachgeschalteter Zielproteine den Zellzyklus, die Apoptoseeinleitung sowie DNA-Reperaturprozesse regulieren [17] [18]. Über die Interaktion mit anderen Proteinen sowie posttranslationale Modifikationen wie die Phosphorylierung oder Acetylierung von p53 wird dessen Aktivität gesteuert [19]. Um mögliche toxische Folgen einer übermäßigen p53-Aktivität im physiologischen Zustand zu verhindern, ist die basale Konzentration von p53 gering [18]. Dabei fungiert das *ubiquitin-protein ligase Protein* MDM2 als p53-Antagonist und bewirkt den rapiden proteasomalen p53-Abbau [20]. Als Folge entstandener DNA-Schäden sowie aktiver Onkogene kommt es zu Modifikationen von p53, wodurch es folglich zu dessen Aktivierung und Stabilisierung kommt [17]. Durch die von p53 ausgelöste Transkription der entsprechenden Zielgene kann bei reparablen Schäden ein Zellzyklusarrest induziert werden, gefolgt von der Einleitung von Reperaturprozessen [18] [21]. Ist der Schaden irreparabel, wird durch p53 der programmierte Zelltod, die Apoptose, ausgelöst [18] [21]. Diese Funktionen verhindern die Akkumulationen von Zellschäden und dienen dem Schutz vor Krankheitsentstehung.

### 1.3.1 Aufbau und Struktur von p53

Das p53-Gen befindet sich auf dem Chromosom 17 (17p13.1). Es besteht aus 11 Exonen, die die insgesamt 393 Aminosäuren des Proteins kodieren [22] [23]. Das Protein lässt sich weiterhin in vier funktionale Domänen unterteilen, die zusammen für die Funktionen von p53 verantwortlich sind [18] [23]. Man unterscheidet die aminoterminal Domäne (NTD), die DNA-Bindedomäne (DBD), die Tetramerisierungsdomäne (TD) und die carboxyterminale regulatorische Domäne (RD) (Abbildung 3) [18] [24]. Die nicht gefaltete NTD besteht aus einer Transkriptionsaktivierungsregion und einer SH3-Zielsequenz [25]. Im inaktiven Zustand ist dabei MDM2 an die Transkriptionsaktivierungsregion gebunden und blockiert diese [26]. Kommt es zur Modifikation und Stabilisierung von p53, kann die Transkriptionsaktivierungsregion folglich mit an der Transkription beteiligten Enzymen der Transkriptionsmaschinerie, sowie verschiedenen Co-Faktoren interagieren und aktiviert diese [18] [24]. Die SH3-Zielsequenz ist für die Interaktion mit Proteinen, die eine SH3-Domäne aufweisen, verantwortlich und enthält weiterhin Aminosäuresequenzen, die für die p53 vermittelte Apoptose-Einleitung wichtig sind [18]. Die DBD ist für die Bindung der DNA verantwortlich und bei der Mehrzahl der mutationsbedingten Tumorerkrankungen betroffen [18]. Durch die TD entsteht die für die DNA-Bindungsfähigkeit wichtige tetramere Quartärstruktur des Proteins [18]. Die RD ist nicht gefaltet und übernimmt Aufgaben der positiven und negativen p53-Aktivitätsregulierung. So wird durch Interaktionen der RD und der DBD die tetramerische Proteinstruktur stabilisiert und folglich eine verstärkte DNA-Bindung und Transkriptionsaktivität bewirkt [18] [27].

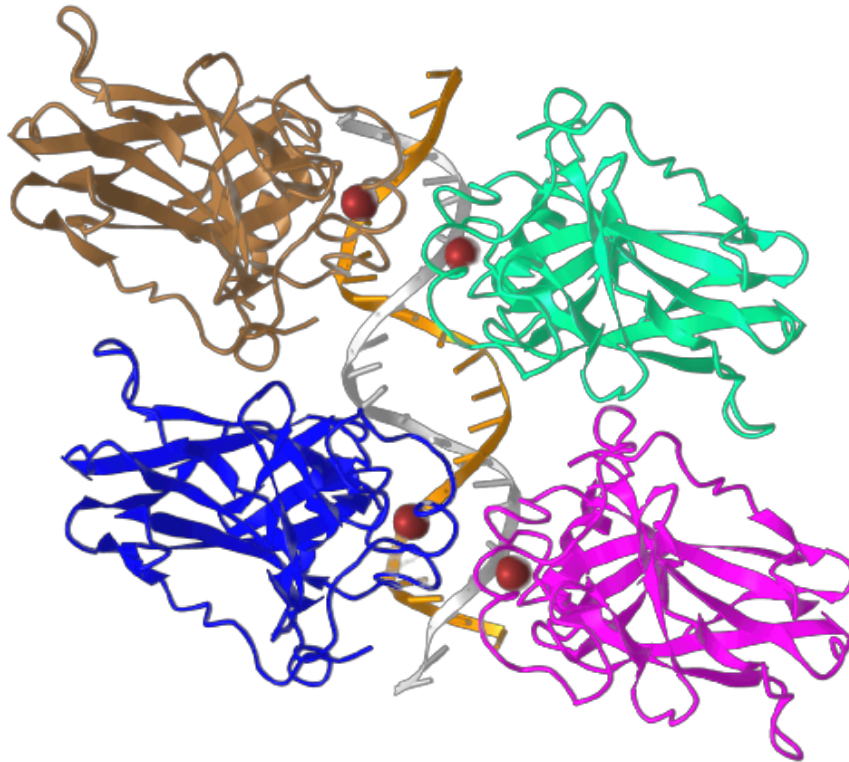


**Abbildung 3: Überblick über die funktionalen Domänen des p53-Proteins**

Von links nach rechts ist das p53-Gen aus der aminoterminalen-Domäne (Transaktivierungsregion und SH3-Zielsequenz), der DNA-Bindungsdomäne, der Tetramerisierungsdomäne sowie der regulatorischen-Domäne zusammengesetzt. Die Zahlen stehen für die Anzahl der dafür jeweils kodierenden Aminosäuren [18] (Erstellt mit BioRender.com).

### 1.3.2 DNA-Bindung durch p53

Wie zuvor beschrieben werden DNA-Bindungen sowohl über die DBD als auch die RD ermöglicht. Die DBD bindet dabei spezielle DNA-Promotor-Konsensus-Sequenzen [18] [25]. Diese bindungsspezifischen Sequenzen bestehen meist aus zwei „*Halfsites*“ und liegen bis zu dreizehn Basenpaare auseinander [18] [25]. Kristallstrukturanalysen zeigen, dass je zwei DBD Monomere eines Dimers an eine *Halfsite* binden. Durch die Bindung beider Dimere entsteht letztlich der tetramere p53-DNA-Komplex (Abbildung 4) [18] [25] [28]. Die carboxyterminale RD reguliert hauptsächlich die Bindungsfähigkeit der DBD, kann jedoch auch unspezifische DNA sowie Proteine binden und dadurch Konsensus-DNA-Bindungen beeinflussen [18].



**Abbildung 4: p53-DNA Komplex**

Dargestellt ist die Kristallstruktur der vier DNA-Bindedomänen des p53-Proteins, welche den in der Mitte abgebildeten DNA-Strang binden. MMDB ID: 111829 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/pdb/4HJE>), [29].

### 1.3.3 Regulierung von p53

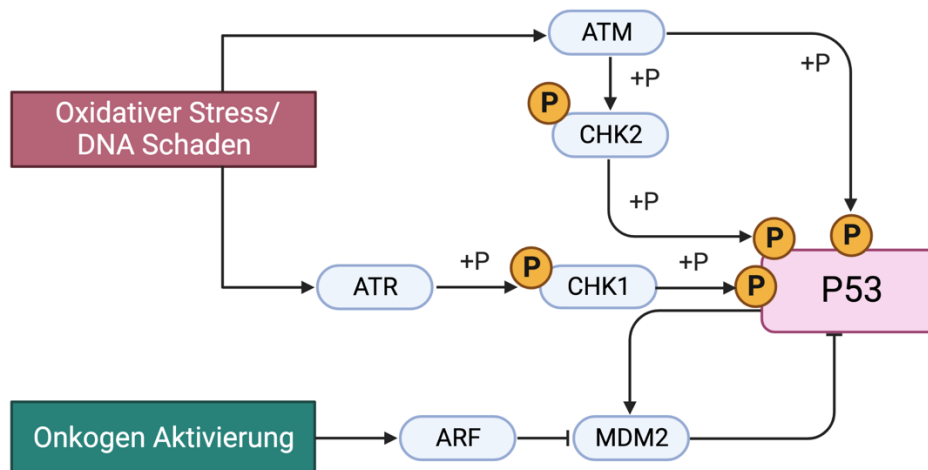
p53 wird über die Interaktion mit anderen Proteinen sowie verschiedene posttranslationale Modifikationen reguliert. Die im Normalzustand niedrige p53-

## Einleitung

Konzentration wird durch das MDM2-Protein über eine negative Rückkopplungsschleife bewirkt [21].

Durch deregulierte aktive Onkogene kann es zu einer Aktivierung des ARF-Tumorsuppressorproteins kommen, welches zu einer Inhibition von MDM2 führt und folglich die negative Rückkopplungsschleife außer Kraft setzt (Abbildung 5) [21].

Die Akkumulation von oxidativem Stress, z.B. durch UV-Licht verursacht, führt zur Entstehung von DNA-Schäden und kann p53-Modifikationen bewirken. Dadurch kann es über verschiedene Signaltransduktionswege, beispielsweise zur Phosphorylierung einer von 17 möglichen Stellen von p53, innerhalb der Aminoterminalen-, Tetramerisierungs- oder Regulatorischen-Domäne kommen. Initial wird durch die Serin-Proteinkinase ATM (*Ataxia Teleangiectasia Mutated*), welche selbst Serin-15 phosphoryliert, die nachgeschaltete Serin/Threonin-Proteinkinase CHK2 (*Checkpoint Kinase 2*) aktiviert, wodurch es weiterhin zur Phosphorylierung von Serin-20 kommt. Auch über die Proteinkinase ATR (*Ataxia Teleangiectasia and Rad3 Related*) wird die Serin/Threonin-Proteinkinase CHK1 (*Checkpoint Kinase 1*) aktiviert, was ebenfalls eine Phosphorylierung an verschiedenen Stellen von p53 herbeiführt [18] [21]. Durch diese Modifikationen kommt es folglich zu einem verminderten p53-Abbau sowie zu einer erhöhten Bindungsfähigkeit bestimmter Promotorsequenzen [18]. Weitere gängige p53-Modifikationen stellen die Acetylierung, Ubiquitinierung oder Sumoylierung dar, wodurch ebenfalls die p53-Transkriptionsaktivität und Halbwertszeit beeinflusst wird [18]. Die Folgen der Sumoylierung sind dabei noch nicht gänzlich geklärt [18].



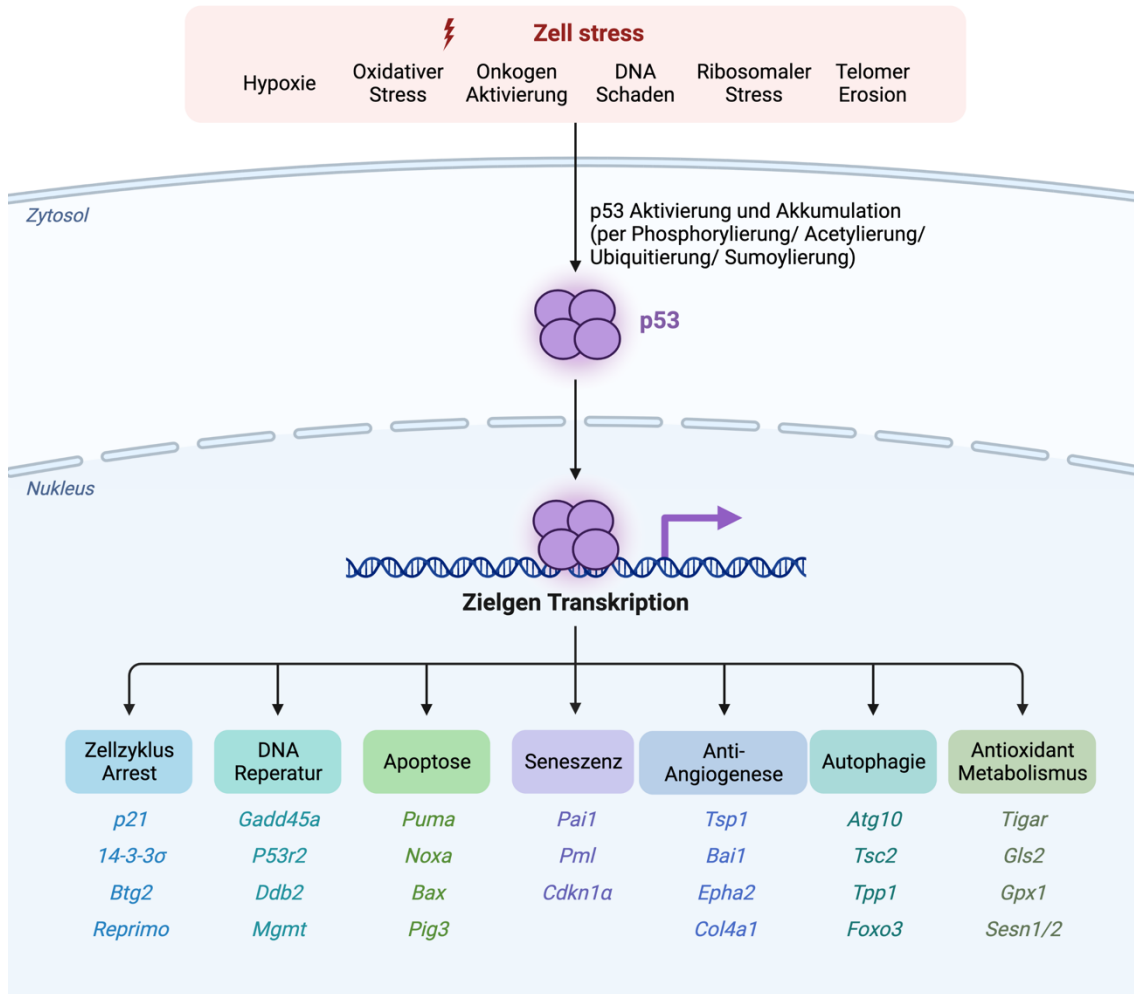
**Abbildung 5: p53-Aktivierungsmechanismus via Phosphorylierung**

Auftretende DNA-Schäden führen zu einer Phosphorylierung von p53, entweder über die ATM- und nachgeschaltete CHK2-Kinase oder die ATR- und CHK1-Kinase. Weiterhin kann durch aktive Onkogene die ARF Kinase aktiviert werden, was im weiteren Verlauf zur Hemmung der MDM2 gesteuerte negativen Rückkopplungsschleife von p53 führt [18] [21] (Erstellt mit BioRender.com).

### 1.3.4 p53-Zielgene

Über die p53-Bindung verschiedener DNA-Promotor Sequenzen und die sich daran anschließende Transkription wird die Expression verschiedener *downstream* Gene ermöglicht. Dadurch kann die Zelle Prozesse auslösen, welche die Folgen entstandener Zellschäden beheben oder den programmierten Zelltod einleiten. Folglich kann es so, p53 vermittelt, zum Zellzyklusarrest, zur Apoptose, Seneszenz, Autophagie, Anti-Angiogenese sowie bei mildem Stress zu DNA-Reperaturprozessen oder antioxidativen Metabolismus-Vorgängen kommen [30] (Abbildung 6). Aufgrund der Größe des p53-Proteins wird darüber hinaus vermutet, dass es noch weitere, aktuell unbekannte Zielgene gibt. Diese Frage ist daher Gegenstand der aktuellen Forschung [30].

## Einleitung



**Abbildung 6: Zielgene und Funktionen von p53**

Verschiedene Zelluläre-Stressoren führen über die Entstehung von DNA-Schäden zur p53-Aktivierung. Abhängig von den entstandenen Schäden werden verschiedene p53-target genes aktiviert, die dadurch einen Zellzyklusarrest, DNA-Reperatur Mechanismen, die Apoptose, Seneszenz, Anti-Angiogenese, Autophagie oder antioxidative Metabolismen bedingen können [31] [32] (Erstellt mit BioRender.com; Abbildung veröffentlicht in [33]).

### 1.3.5 Apoptoseregulierung durch p53

Es wird angenommen, dass die Apoptosefunktion für die Tumorsuppression maßgeblich ist [30]. Bei Säugetierzellen erfolgt die Apoptose hauptsächlich über zwei unterschiedliche Wege, den intrinsischen und den extrinsischen Weg (Abbildung 7) [34]. Während beim intrinsischen Weg über die Familie der Bcl-2 regulierten Zielgene die Apoptose aktiviert wird, wird beim extrinsischen Weg der Zelltod durch die Bindung eines Liganden an einen membranständigen Todesrezeptor (*death receptor*) ausgelöst [34]. p53 kann sowohl über die

## Einleitung

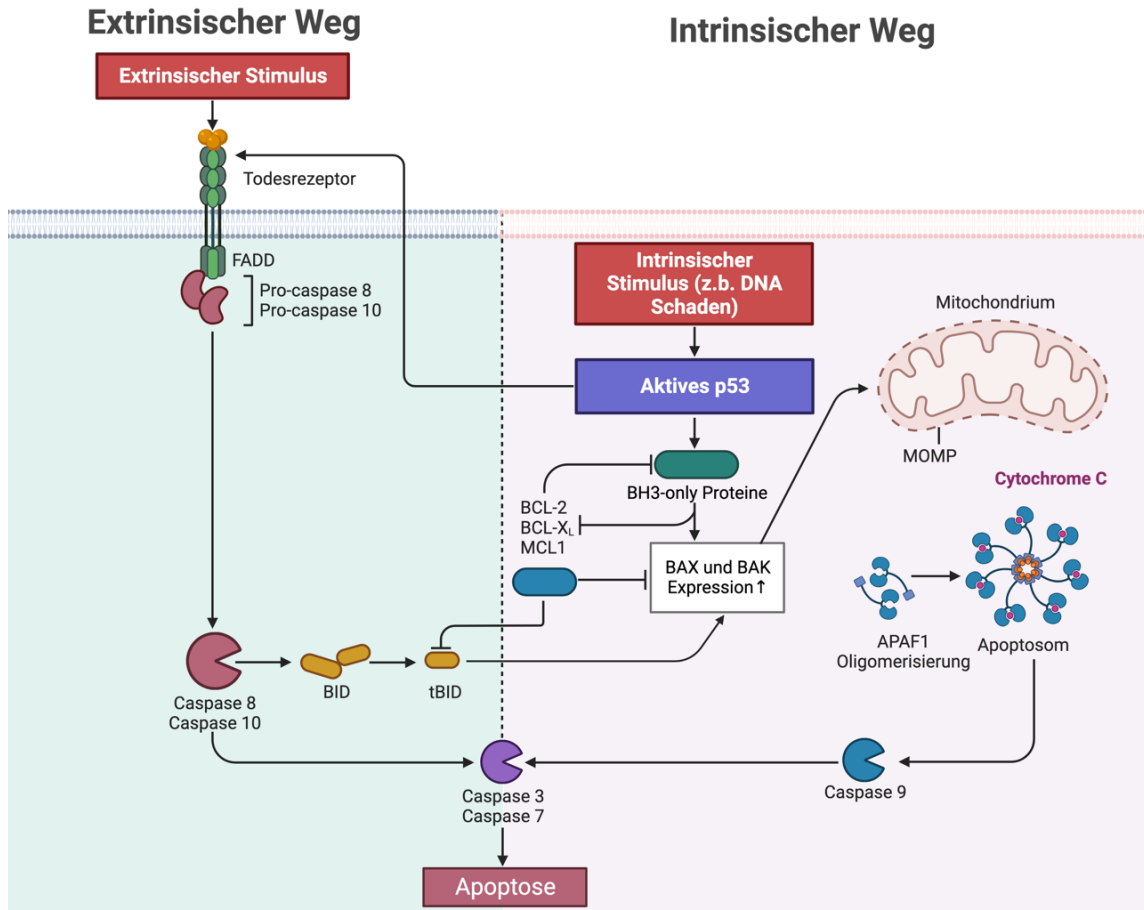
Hochregulierung der verschiedenen pro-apoptotischen BH3-only-Proteine als auch über die Hochregulierung der für die Bestandteile des Todesrezeptors transkribierenden Gene eine Apoptose induzieren.

Im Rahmen des intrinsischen Wegs kommt es dabei durch die Aktivierung und Akkumulierung von p53 zur gesteigerten Genexpression der pro-apoptotischen BH3-only Zielgene, wie beispielsweise *PUMA* oder *NOXA*, unter gleichzeitiger Inhibierung der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2, BCL-XL, MCL-1 [34]. Dadurch kommt es im weiteren Verlauf zur gesteigerten *BAX*- und *BAK*-Genexpression, die im nächsten Schritt die Permeabilisation der äußeren mitochondrialen Membran (*Mitochondrial outer membrane permeabilization* - MOMP) bewirken. In der Folge wird Cytochrom C aus dem Mitochondrium freigesetzt, es kommt zur Apoptosombildung und schließlich zur Aktivierung der Caspasen-Kaskade [35]. Dabei wird über die Caspase 9 die Endpunkt-Caspase 3 und 7 aktiviert, welche schlussendlich zum Zelltod führen [34].

p53 beeinflusst auch die extrinsische Apoptose, über die Hochregulierung der Anzahl der Todesrezeptoren, wie z.B. die des FAS-Rezeptors [34]. Folglich wird die Zelle für die entsprechenden Todes-Liganden (*Death ligands*) sensitiviert [34]. Durch die Bindung der entsprechenden Todes-Liganden, wie beispielsweise des Tumor Necrosis Factor (TNF) oder des Fas-Liganden, wird das Apoptosesignal induziert und anschließend in die Zelle transportiert. Im weiteren Verlauf kommt es dadurch zur erneuten Aktivierung einer Caspasen-Kaskade über zunächst die Caspase 8 und 10 und schlussendlich erneut zur Aktivierung der Endpunkt Caspasen 3 und 7, was zum Zelltod führt [34]. Weiterhin ist über das pro-apoptotische BH3 interacting domain death agonist (BID) Protein eine sekundäre Aktivierung des intrinsischen Apoptosewegs, nach Aktivierung der Caspasen 8 und 10 im Rahmen des extrinsischen Wegs möglich und führt erneut zu einer gesteigerten Expression von *BAX* und *BAK*.

Abgesehen von seinen direkten Auswirkungen auf den intrinsischen oder extrinsischen Apoptoseweg kann p53 zusätzlich durch die Expression weiterer

Gene, wie die der microRNA-Familie, die Apoptose auch indirekt beeinflussen [34]. So kommt es beispielsweise durch die miR-34 Induktion zu einer anti-BCL-2 Wirkung [34].



**Abbildung 7: Intrinsischer und extrinsischer Apoptose-Signalweg**

Die Aktivierung von p53 kann sowohl über den intrinsischen als auch den extrinsischen Weg die Apoptose induzieren. Beim intrinsischen Weg kommt es dabei über die gesteigerte Expression der BH3-only Proteine sowie dem daran anschließenden BAX und BAK zur Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran. Dies führt im weiteren Verlauf zur Freisetzung von Cytochrom C, der Apoptosombildung und schließlich zur Aktivierung einer Caspasen-Kaskade, wodurch die Apoptose induziert wird. Beim extrinsischen Weg entsteht über die p53 bedingte Hochregulierung der Todesrezeptordichte und dessen Aktivierung das Todessignal. Dieses wird in die Zelle transportiert, induziert im Verlauf erneut eine Caspasen-Kaskade und löst ebenfalls die Apoptose aus. Über das BID-Protein ist weiterhin eine sekundäre Aktivierung des intrinsischen Apoptosewegs, in Folge des extrinsischen Wegs, möglich [34] (Erstellt mit BioRender.com; Abbildung veröffentlicht in [33]).

### **1.4 Krankheitsentstehung durch p53**

p53 ist das am häufigsten mutierte Gen bei der Entstehung von Tumorerkrankungen [36]. Eine viel diskutierte Theorie, nach der es zu einem als *Loss of function* bezeichneten Funktionsausfall kommt, ist die von Carl Nordling und Alfred Knudson entdeckte *2-Hit-Hypothese* [37]. Dabei wird angenommen, dass die Folge mehrerer genetischer Veränderungen zur Krebsentstehung führt. Da der Mensch über einen diploiden Chromosomensatz verfügt, hat eine Mutation des ersten Allels dabei zunächst keine Folgen für die Funktion von p53. Erst der Verlust des zweiten Allels geht mit dem sogenannten *Loss of heterozygosity* und dem damit assoziierten Funktionsverlust des Tumorsuppressorproteins einher wodurch folglich die Tumorentstehung begünstigt wird [38].

Abgesehen von Krebserkrankungen können auch verschiedene weitere Krankheiten durch p53 verursacht werden. So wird beispielsweise bei der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen wie Alzheimer oder Parkinson ein Zusammenhang mit p53 diskutiert [36] [39]. Die Literatur deutet dabei darauf hin, dass der im Zuge der Neurodegeneration auftretende Zelltod p53-abhängig ist [40] [41]. Es wird vermutet, dass der Auslöser für die Krankheitsentstehung dabei auf eine p53-Über- oder Unterfunktionen zurückzuführen ist, infolgedessen es zum Verlust von Reperaturprozessen oder der übermäßigen Steigerung der Apoptosefunktion kommen kann [36].

### **1.5 Die unklare Funktion von p53 in der Pathogenese der AMD**

Die genaue Funktion von p53 im Auge konnte bisher noch nicht geklärt werden. Dabei zeigen Tierstudien zur embryologischen Entwicklung des Auges, dass ein p53-Gen-Silencing - abhängig von der Genetik der untersuchten Mäuse - bei manchen Arten zu Entwicklungsdefekten führt, während bei anderen Arten keine derartigen Entwicklungsstörungen auftreten [42]. Dennoch wurde eine p53-Genexpression im gesamten Auge, einschließlich verschiedener Netzhautschichten bereits festgestellt, was für eine grundlegende Funktion von p53 im Auge spricht [42] [43].

## Einleitung

Bei der AMD kommt es wie zuvor beschrieben zunächst zum Untergang von RPE-Zellen, gefolgt von der Photorezeptordegeneration. Auch bei dem mit der Krankheit assoziierten Zelltod, beider Zelltypen, ist die Rolle von p53 noch nicht geklärt. Dabei zeigen Tierversuche, in denen der Zusammenhang zwischen einer Lichtexposition und dem dadurch ausgelösten Photorezeptor-Zelltod untersucht wurde, dass die mit steigender Lichtexposition vermehrt auftretende Photorezeptor-Apoptose, p53-unabhängig ist [44] [45]. Demgegenüber wurde in lichtexponierten Zellen der ARPE-19-Zelllinie, unter dem gleichzeitigen Vorliegen des Alterspigments Lipofuszin, eine erhöhte p53-abhängige Apoptoserate beobachtet [46]. Weiterhin konnte auch bei der Untersuchung postmortal gespendeter humaner Augen, eine erhöhte p53-abhängige Apoptoserate, in gealterten RPE-Zellen, festgestellt werden [47]. Zusammenfassend könnte so, wie auch schon von Vuong et al. beschrieben wurde, die Annahme getroffen werden, dass der bei der AMD Pathogenese auftretende Zelltod nur in RPE-Zellen p53-abhängig ist [42].

### **1.6 Zielsetzung der Arbeit**

Bei Augenkrankheiten, wie der AMD oder der RP, kommt es zur Apoptose von RPE-Zellen, die im weiteren Verlauf zu einer Photorezeptordegeneration und einem progredienten Sehverlust führen. Die Therapiemöglichkeiten bestimmter Erkrankungsformen, wie beispielsweise der geographischen Atrophie, sind dabei unzureichend, was auf ein mangelndes Verständnis der dabei ablaufenden Pathogenese zurückzuführen ist [48]. Das bessere Verständnis und die Erforschung der besagten Pathomechanismen dient folglich als Grundlage für die Entwicklung neuer Therapieansätze.

p53 könnte im Zusammenhang mit dem Zelltod von RPE-Zellen stehen. In der Literatur gibt es dazu aktuell nur eine geringe Anzahl an Studien. Ziel dieser Arbeit ist es daher, die Funktion von p53 in RPE-Zellen zu evaluieren und zu untersuchen, ob der Zelltod retinaler Pigmentepithelzellen p53-abhängig ist.

Zur Überprüfung der These wird im Folgenden zunächst eine effiziente Transfektion primärer porciner RPE-Zellen etabliert. Anschließend wird durch die Transfektion eines p53-Plasmid eine p53-Überexpression induziert und nachfolgend die Apoptose, sowie weitere Zellzyklusmarker analysiert. Zur Überprüfung der Toxizität sowie eines möglichen auftretenden Zelltods werden zunächst verschiedene Zellassays durchgeführt. Weiterhin werden Proben für qRT-PCR und Western-Blot-Analysen gewonnen und auf verschiedene p53-Zielgen-Expressionen untersucht. Die jeweiligen Kontrollvektoren exprimieren das grün-fluoreszierende Protein (GFP).

Im weiteren Verlauf wird außerdem untersucht, ob eine zusätzliche Co-Behandlung mit Zellstressoren, p53-überexprimierter RPE-Zellen, Einfluss auf die Apoptoseinduktion in RPE-Zellen hat. Für den weiteren Vergleich werden neben den primären porcinen RPE-Zellen auch Zellen der humanen ARPE-19-Zelllinie im gleichen Ansatz behandelt und analysiert.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Verbrauchsmaterialien und Reagenzien

**Tabelle 1: Verwendete Verbrauchsmaterialien und Reagenzien**

<b>Materialien</b>	<b>Hersteller</b>
12-, 24-Well-Kulturplatte, Costar: 3513, 3524	Corning, USA
96-Well-Kulturplatte, Falcon: 353072	Corning, USA
96-Well-Kulturplatte, White/Clear Bottom: 165306	Thermo Scientific, UK
96-Well-Kulturplatte, White Immuno Plates: 436111	Thermo Scientific, UK
Bakterienfilter Millex-HA, 0,45 µm: SLHA033SS	Merck Millipore, GER
Cell Counting Slides: N5232100	Olympus, USA
Chamber Slide Nunc Lab-Tek II System: 154534	Thermo Scientific, UK
Cobaltchlorid 0,1 M -Lösung: 15862-1ML-F	Sigma-Aldrich, USA
CombiMag Transfection Reagent: 9006	Chemicell, GER
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), niedriger Glukosegehalt: 11885084	Gibco, USA
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), hoher Glukoseanteil: 11965084	Gibco, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline: SH30028.02	Sigma-Aldrich, USA
Einmalskalpelle: 15340827	B. Braun, GER
Safe-Lock Tubes 0,5ml/ 1,5ml/ 2ml, 5ml	Eppendorf Research, GER
Fetales Kälberserum, Hitze inaktiviert: 10082147	Gibco, USA
FuGENE® HD Transfektionsreagenz: E2311	Promega, USA
Gentamicin: 15710064	Gibco, USA
HEPES (1M): 15630056	Gibco, USA
Bisbenzimid H 33342: B2261-25MG	Sigma-Aldrich, USA
LB-Medium: X968.1	Carl Roth, GER
Mehrkanalpipette: 3125000044	Eppendorf Research, GER
MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100x): 11140050	Gibco, USA
Neurobasal Medium: 21103049	Gibco, USA
Pasteur Pipette, AR-glass: 200760	WU Mainz, GER
Penicillin-Streptomycin: 15140122	Gibco, USA
Petrischalen	Greiner Bio-one, Austria
Multipipette M4: 4982000012	Eppendorf Research, GER
Pipette research plus 10µl/ 20µl/ 100µl/ 200µl/ 1000µl	Eppendorf Research, GER
Pipettenspitzen, 10µl/ 20µl/ 100µl/ 200µl/ 1000µl	Greiner Bio-One, Austria
Pipettenspitzen Combitips advanced 2,5ml/ 5ml/ 10ml	Eppendorf, GER
Pipettierhilfe: 612-2625	Accu-jet, GER
Pipettierhilfe Pipetboy 2: 155066	Integra, Swiss
PolyMAG Transfection Reagent: 9003	Chemicell, GER
PVP-Iod: 9322531	Braunol, GER
Röhrchen 15 ml, 50 ml: 188261, 210261	CELLSTAR, Austria

## Material und Methoden

Serologische Pipetten 5ml/ 10ml/ 50ml	Costar, USA
Staurosporine 1 mg: ALX-380-014-M001	Enzo Life Science, GER
Trichostatin A, 5 mM in DMSO: T1952	Sigma-Aldrich, USA
Trisgepuffertes Saline mit Tween 20: 09-7510-100	Medicago, Canada
Tris Puffer: C4H11NO3	Sigma-Aldrich, USA
TritonX-100: 9002-93-1	Sigma-Aldrich, USA
Trizma-Base: T 1503-1KG	Sigma-Aldrich, USA
Trypsin-EDTA (0.25 %): 25200072	Gibco, USA
ViaFect™ Transfection Reagent: E4981	Promega, USA
Wasserstoffperoxid -30 % Lösung: H1009	Sigma-Aldrich, USA
Zellkulturflasche, 50 ML, 25 CM <sup>2</sup> : 690175	CELLSTAR®, Austria
Zellkulturflasche 250 ML, 75 CM <sup>2</sup> : 658170	CELLSTAR®, Austria

### 2.1.2 Assays und Kits

**Tabelle 2: Verwendete Zellassays und Kits**

Assay/Kit	Hersteller
BCA Protein Assay Kit: 23225	Thermo Scientific, UK
BrdU Cell Proliferation Assay Kit: QIA58	Merck Millipore, GER
Caspase-Glo 3/7 Assay Kit: G8091	Promega, USA
CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay: G3580	Promega, USA
DAPI-Färbelösung: A4099	Applichem, GER
Deep Well Block: 130-092-549	Miltenyi Biotec, GER
Kristallviolett-Lösung: HT901-8FOZ	Sigma-Aldrich, USA
MagnetoFACTOR-Platte 24: 9009	Chemicell, GER
MagnetoFACTOR-Platte 96: 9007	Chemicell, GER
Multi-8 Columns: 130-092-444	Miltenyi Biotec, GER
Multi-8 Filters and Frame: 130-092-548	Miltenyi Biotec, GER
MultiMACS cDNA Synthesis Kit: 130-094-410	Miltenyi Biotec, GER
Neon Transfection System 10 µL Kit: MPK1025	Thermo Scientific, UK
Plasmid Plus Midi Kit (25): 12943	QIAGEN, GER

### 2.1.3 Antikörper

**Tabelle 3: Primärantikörper für Western Blot und Immunfluoreszenz**

Primärantikörper	Spezies	Hersteller/ Art. Nr.	Lot
β-Aktin (7)	Maus	Cell Signaling, USA: 3700S	18
β-Aktin (8)	Hase	Cell Signaling, USA: 4970L	18
p53 (DO-1) (192)	Maus	Santa Cruz, USA: sc-126	E3019
p53 (9D3DE3) (306)	Maus	Abcam, UK: ab154036	GR3228223-4
p53 (Pab 240) (174)	Maus	Abcam, UK: ab26	GR3213177-1

**Tabelle 4: Sekundärantikörper für Western Blot und Immunfluoreszenz**

<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Farbstoff</b>	<b>Hersteller/ Art. Nr.</b>	<b>Lot</b>
anti-Maus (215)	IRDye 800 CW	LI-COR Biosciences, USA: 926-32210	C90917-25
anti-Hase (227)	IRDye 680 RD	LI-COR Biosciences, USA: 925-68071	D00819-05
anti-Maus (243)	Alexa Fluor 555	Thermo scientific, UK: A-21422	1837985

#### 2.1.4 Primer

**Tabelle 5: Verwendete Primersequenzen der primären porcinen RPE-Zellen; (\*House-Keeping-Gen)**

<b>Gen</b>	<b>Oligonukleotidsequenz (5'→3')</b>
*β-Aktin <i>for.</i>	CACGCCATCCTGCGTCTGGA
*β-Aktin <i>rev.</i>	AGCACCGTGTTGGCGTAGAG
p53 <i>for.</i>	TAGCGCTACCTCAGAT
p53 <i>rev.</i>	TCATCTGGACGTCTTC
p21 <i>for.</i>	GACCCTCAGAAGAGCCACAG
p21 <i>rev.</i>	GTCGAAGTTCATCGCTCTC
Hsp70 <i>for.</i>	ATGTCCGCTGCAAGAGAAGT
Hsp70 <i>rev.</i>	GGCGTCAAACACGGTATTCT
Bax <i>for.</i>	AAGCGCATTGGAGATGAACT
Bax <i>rev.</i>	AAAGTAGAAAAGCGCGACCA
Bcl-2 <i>for.</i>	AATTACCATCGGCGTAGTGC
Bcl-2 <i>rev.</i>	CGTTTCAGCCACCGTAAAT

**Tabelle 6: Verwendete Primersequenzen der ARPE-19-Zellen; (\*House-Keeping-Gen)**

<b>Gen</b>	<b>Oligonukleotidsequenz (5'→3')</b>
*β-Aktin <i>for.</i>	GGA CTTCGAGCAAGAGATGG
*β-Aktin <i>rev.</i>	AGCACTGTGTTGGCGTACAG
p53 <i>for.</i>	TAGCGCTACCTCAGAT
p53 <i>rev.</i>	TCATCTGGACGTCTTC
p21 <i>for.</i>	ATGAAATTCACCCCTTTCC
p21 <i>rev.</i>	CCCTAGGCTGTGCTCACTTC
Hsp70 <i>for.</i>	CTCAGGATTTGCCCTATCCA
Hsp70 <i>rev.</i>	TCCATTGGCTCCTCATTTTC
Bax <i>for.</i>	TTTGCTTCAGGGTTTCATCC
Bax <i>rev.</i>	CAGTTGAAGTTGCCGTCAGA
Bcl-2 <i>for.</i>	GGATGCCTTTGTGGA ACTGT
Bcl-2 <i>rev.</i>	AGCCTGCAGCTTTGTTTCAT

## 2.1.5 Geräte

**Tabelle 7: Verwendete Geräte**

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Aspirationssystem Vacusafe	Integra Biosciences, Swiss
Automatische Zellzähler	Olympus, USA
Durchflusszytometer CytoFLEX S	Beckman Coulter, USA
Elektrophoresis PowerPac HC Power Supply	Bio-Rad, USA
Fluoreszenzmikroskop Z1 Inverted	Zeiss, GER
Imaging System ODYSSEY Fc	LI-COR Biosciences, USA
Inverses Mikroskop Axiovert 135	Zeiss, USA
Laminar Flow Werkbank	Thermo Scientific, UK
Magnetrührer IKAMAG COMBIMAG RCT	IKA, GER
Mikroskop Axioskop 50	Zeiss, GER
Mikroskopkamera MRC	Zeiss, GER
Mikrozentrifuge Heraeus Megafuge 8R	Thermo Scientific, UK
Mikrozentrifuge Micro Star 17R, Avantor	Avantor, USA
Milli-Q Anlage Barnstead GenPure Pro	Thermo Scientific, UK
MultiMACS M96 Separator	Miltenyi Biotec, GER
Multimode-Platten-Reader Infinite M200	Tecan, Swiss
Multimode-Platten-Reader Spark 10M	Tecan, Swiss
Photometer Ultraspec 1000	Biotechm UK
Real-Time PCR Detection System CFX96	Bio-rad, USA
Thermoschüttler Cooling Thermal Shake Touch	VWR, USA
Tischzentrifuge Mega Star 3.0R	VWR, USA
Wasserbad VWB 18	VWR, USA
Zeiss Axio Oberver	Zeiss, GER
Zeiss AxioCam MRC, MRM, 506 mono	Zeiss, GER
Zellbrutschrank Heracell 150i	Thermo Scientific, UK

## 2.1.6 Software/ Applikationen

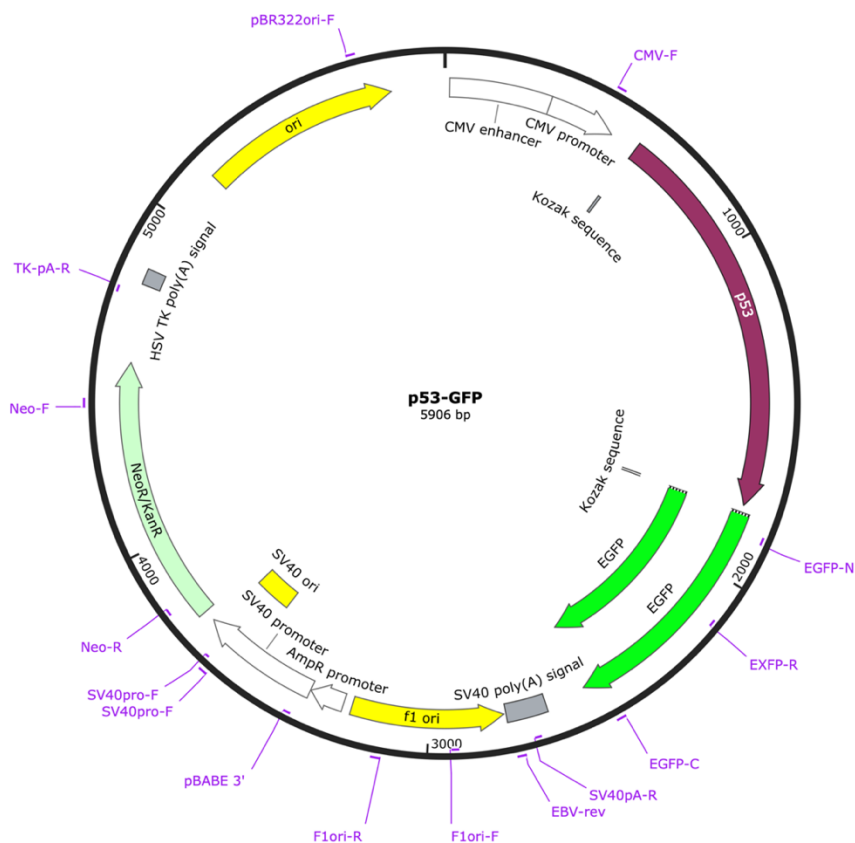
**Tabelle 8: Verwendete Softwareanwendungen**

<b>Anwendung</b>	<b>Version</b>
Biorender.com	Online-Applikation
Blast.com	Online-Applikation
Endnote	Version 20.1
FlowJo	Version 10.7.2
GraphPad Prism 8	Version 8.2.1
Image Studio Lite	Version 4.0
Microsoft Word; Powerpoint; Excel	Version 16.52
Snap Gene	Version 5.3.2
Tecan I-control	Version 1.6
ZEN Mikroskopsoftware	Version 2.6

## 2.1.7 Verwendete Plasmide

### 2.1.7.1 p53-GFP-Plasmid

Für die p53-Überexpression wurde das humane p53-GFP-Plasmid (Addgene plasmid #11770; <http://n2t.net/addgene:11770>; RRID: Addgene\_11770) verwendet (Abbildung 8). Dieses stammt von Prof. Geoffrey Wahl [49] und wurde über [addgene.com](http://addgene.com) erworben. Der Vektor-Backbone enthält einen humanen *cytomegalovirus immediate-early enhancer-Promotor* (CMV-Promoter), gefolgt von der humanen p53-Sequenz und einer EGFP-Sequenz, welche das grün fluoreszierende Protein kodiert.



**Abbildung 8: Gen Map des p53-GFP-Plasmids (#11770)**

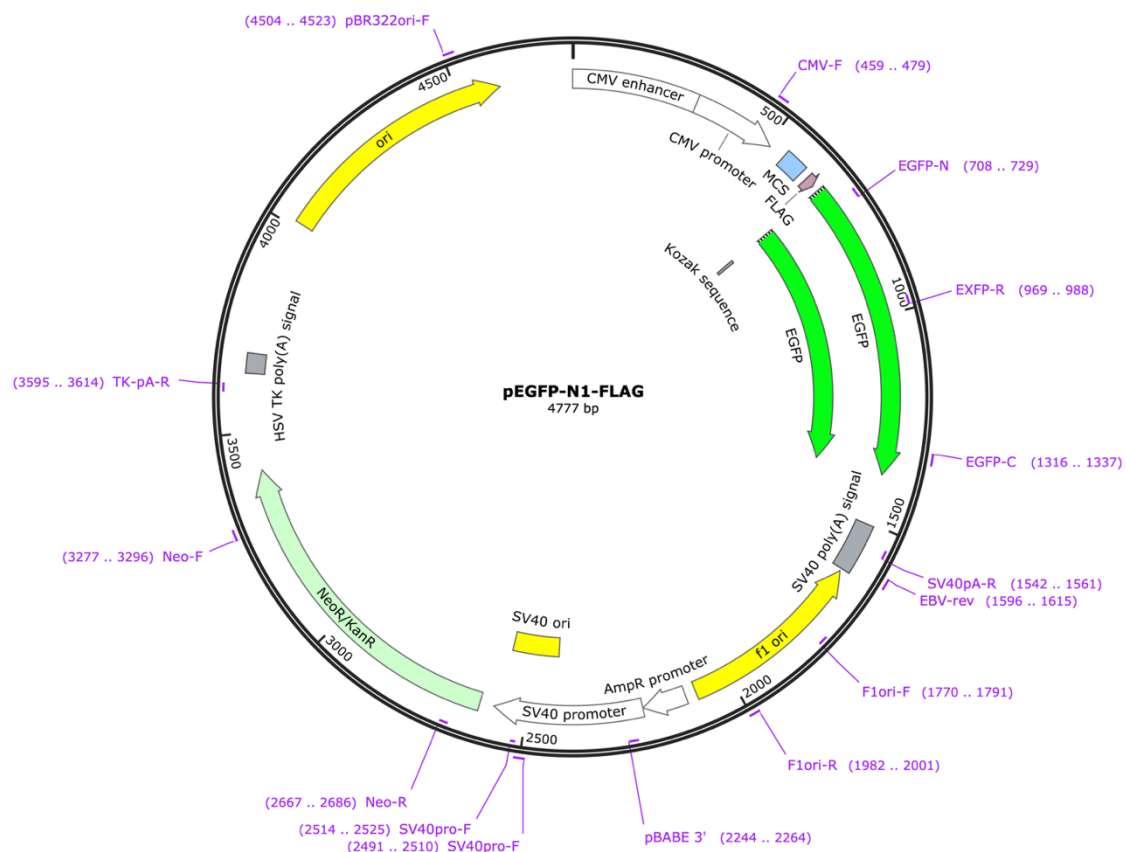
Dargestellt sind die verschiedenen Abschnitte des Plasmid #11770. Dabei folgt auf die für den Replikationsursprung enthaltene Sequenz „ori“ (gelb), die CMV-Promotor Region (weiß), anschließend das in die Multiple Cloning Site (MCS) eingebrachte p53-Gen (rot) sowie die für die Fluoreszenz verantwortliche EGFP-Sequenz. Das Plasmid enthält Sequenzen für Antibiotikaresistenzen gegen Kanamycin und Neomycin. Die weiteren Abschnitte sind Teil des Vektor-backbones. (Die Abbildung wurde mit SnapGene und der von <http://n2t.net/addgene:11770> verfügbaren Gen Bank Datei erstellt).

## Material und Methoden

Der enthaltene CMV-Promotor eignet sich sowohl für transiente als auch stabile Transfektionen und kann von Säugetierzellen aller Art abgelesen werden. Folglich kann das Plasmid gut für die Überexpression der porcinen primären RPE-Zellen als auch der humanen ARPE-19-Zellen verwendet werden [50].

### 2.1.7.2 pEGFP-N1-FLAG

Weiterhin wurde das pEGFP-N1-FLAG Plasmid (Addgene plasmid #60360; <http://n2t.net/addgene:60360>; RRID: Addgene\_60360) verwendet, (Abbildung 9), welches von Dr. Patrick Calsou hergestellt [51] und ebenfalls über [addgene.com](http://addgene.com) bezogen wurde.



**Abbildung 9: Gen Map des pEGFP-N1-FLAG-Plasmids (#60360)**

Dargestellt sind die verschiedenen Abschnitte des Plasmid #60360. Abgesehen von der p53-Gensequenz entspricht der Aufbau dabei dem wie unter 2.1.7.1 beschriebenen Plasmid #11770. Es folgt auf die für den Replikationsursprung enthaltene Sequenz „ori“ (gelb), die CMV-Promotor Region (weiß), die Multiple Cloning Site (MCS) (rot) sowie die für die Fluoreszenz verantwortliche EGFP-Sequenz. Das Plasmid enthält Sequenzen für Antibiotikaresistenzen gegen Kanamycin und Neomycin. Die weiteren Abschnitte sind Teil des Vektor-backbones. (Die Abbildung wurde mit SnapGene und der von <http://n2t.net/addgene:60360> verfügbaren Gen Bank Datei erstellt).

Da dieses Plasmid ebenso wie p53-GFP den entsprechenden pEGFP-N1-*Backbone* mit CMV Promotor enthält, eignet es sich sehr gut als Kontrollplasmid und kann ebenfalls in Zellen beider Spezies (porcin und human) abgelesen werden.

### **2.1.8 Verwendete Zellen**

#### **2.1.8.1 Primäre porcine RPE-Zellen**

Die Schweineaugen, die zur Isolierung der primären porcinen RPE-Zellen verwendet wurden, sind ein tierisches Nebenprodukt und stammen von einem lokalen Schlachthof aus Balingen. Die Genehmigungsnummer des Regierungspräsidiums Tübingen für die Verwendung der Augen lautet: DE 08 416 1123 21. Die Zellen wurden dabei, wie in Kapitel 2.2.6.2 beschrieben ist, isoliert.

#### **2.1.8.2 ARPE-19-Zelllinie**

Die humane ARPE-19-Zelllinie (ATCC CRL-2302) wurde über die American Type Culture Collection (Manassas, Virginia, USA) erworben. Bei den Zellen handelt es sich um spontan immortalisierte humane retinale Pigmentepithelzellen [52].

### **2.1.9 Lösungen**

#### **2.1.9.1 Lämmli 2x Ladepuffer (Western Blot)**

Der für den Western Blot angesetzte Ladepuffer war zusammengesetzt aus 4 % Natriumlaurylsulfat (engl.: *sodium lauryl sulfate*, SDS), 5 %  $\beta$ -Mercaptoethanol, 20 % Glycerin und 0,004 % Bromphenolblau. Dafür wurden zunächst 2 ml des 20 %-igen SDS, 500  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol, 2 ml Glycerin und 400  $\mu$ l Bromphenolblau zusammengemischt und mit 5,1 ml phosphatgepufferter Salzlösung (engl.: *phosphate-buffered saline*, PBS) aufgefüllt.

#### **2.1.9.2 Running Buffer (Western Blot)**

Im ersten Schritt wurde eine 10-fach konzentrierte Stock-Lösung (10x) angesetzt. Dafür wurden 15 g Tris-Base, 72 g Glycin und 5 g SDS mit 500 ml Milli-Q H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Die Chemikalien wurden unter Verwendung eines Magnetrührers so lange durchmischt, bis alles vollständig gelöst war. Vor Benutzung wurde die Lösung dann 1:10 verdünnt (900 ml Milli-Q H<sub>2</sub>O zu 100 ml der 10x Stock Lösung).

#### **2.1.9.3 Towbin Puffer (Western Blot)**

Zur Herstellung wurden im ersten Schritt 3 g Tris-Base Trizma und 14,4 g Glycin in 800 ml Milli-Q H<sub>2</sub>O aufgelöst. Anschließend wurden unter dem Abzug weitere 250 µl 20 %-iges SDS und 200 ml Methanol dazugegeben und mit einem Magnetrührer für zehn Minuten gerührt.

#### **2.1.9.4 TBS Lösung**

Zunächst wurde eine 10x Stock-Lösung angesetzt. Dabei wurden 60,57 g Tris-Base und 87,66 g NaCl in 900 ml gelöst und unter Zugabe von 25 %-igem Chlorwasserstoff (HCl) auf einen pH-Wert von 7,6 eingestellt. Nachdem diese Lösung auf 1000 ml aufgefüllt worden war, erfolgte eine erneute pH Kontrolle. Vor Benutzung wurde die so angesetzte 10x Stock-Lösung entsprechend 1:10 verdünnt (900 ml Milli-Q H<sub>2</sub>O zu 100 ml 10x Stock Lösung).

#### **2.1.9.5 TBS-T**

TBS-T wurde aus einer 1:10 Verdünnung der TBS 10x Stock-Lösung unter Zugabe von 0,1 % Tween 20 hergestellt.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 BLAST® Proteinsequenzvergleich

Das Basic Local Alignment Search Tool (BLAST®) des National Center for Biotechnology Information (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ist ein Suchalgorithmus, der von Altschul et. al 1990 [53] für den Vergleich und die Analyse von Nukleotid - und Aminosäuresequenzen entwickelt wurde. Dabei versucht das Programm über lokale *Sequenzalignments*, d.h. durch die Gegenüberstellung mit bereits bekannten und analysierten Sequenzen, gleiche Einheiten sowie deren Positionen auf den zu untersuchenden Nukleotid- oder Aminosäureketten zu bestimmen. Mit den in Tabelle 9 dargestellten Werten, die von BLAST® ausgegeben werden, lassen sich so Aussagen über die Gleichheit zwei miteinander verglichener Sequenzen treffen.

**Tabelle 9: BLAST® Ausgabewerte des Sequenzvergleichs**

<b>Abdeckung (Query cover)</b>	Der als <i>query cover</i> angegebene Wert beschreibt wie viele Sequenzabschnitte der abgefragten <i>Query</i> -Sequenz von der Zielsequenz abgedeckt sind. Wenn alle <i>Query</i> -Sequenzabschnitte sich dabei der Zielsequenz zuordnen lassen, entspricht dieser Wert 100 %.
<b>Aminosäurenübereinstimmung (Percent identity)</b>	Der Wert der <i>percent identity</i> gibt an, zu welchem Grad die jeweils übereinstimmenden Sequenzabschnitte die exakt gleichen Nukleotide bzw. Aminosäuren an der gleichen Stelle aufweisen.
<b>E-Wert</b>	Der E-Wert gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit das zustande gekommenen Sequenzalignment, zweier zufällig gewählter Sequenzen zustande gekommen wäre. Je niedriger der E-Wert ist, um so signifikanter ist die Übereinstimmung.

Um die Ähnlichkeit des porcinen und humanen p53-Proteins zu überprüfen, wurde die Aminosäuresequenz des humanen p53-Proteins (p53 [Homo sapiens]; GenBank: BAC16799.1) mit der des porcinen p53-Proteins (p53 [Sus scrofa]; GenBank: AAF04620.1), über die Blastp Applikation von BLAST®,

verglichen. Für den Vergleich wurde das porcine Protein als Vorlage (*Subject*) gewählt, das humane Protein als das abzufragende Protein (*Query*).

### 2.2.2 Vorbereitung der Plasmide

Um eine ausreichende Plasmidmenge für die geplanten Versuche zur Verfügung zu haben, wurde im ersten Schritt eine Transformation von *E.coli* Bakterien durchgeführt. Nach der Einschleusung des Plasmids, ist es möglich, per Klonierung die Bakterienkultur zunächst zu vervielfältigen und im Anschluss daran die Plasmide aus diesen zu isolieren.

### 2.2.3 Herstellung chemokompetenter Zellen

Bei der Herstellung chemokompetenter Zellen handelt es sich um ein Verfahren, durch das die Effizienz der DNA-Aufnahme von Bakterien gesteigert wird [54]. Mittels einer Kalziumchloridbehandlung ( $\text{CaCl}_2$ ) wird ein Überschuss an positiv geladenen Kalzium-Ionen erzeugt. Dieser wirkt sowohl anziehend auf den negativ geladenen *DNA-Backbone* als auch auf den negativ geladenen Teil der Lipopolysaccharide (LPS) in der Zellmembran, wodurch dessen Durchlässigkeit erhöht wird [55]. In die so vorbereiteten Zellen kann genetisches Fremdmaterial durch eine Transformation leichter eingebracht werden.

Zunächst wurde eine Vorkultur, bestehend aus 5 ml LB Medium und 2  $\mu\text{l}$  des zuvor aufgetauten *E.coli* Bakterienstocks, im Inkubator bei 37°C und 200 RPM über Nacht inkubiert. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Animpfung der Hauptkultur, indem 2  $\mu\text{l}$  der Vorkultur zu 50 ml LB Medium gegeben wurde. Danach wurde in regelmäßigen Abständen die Optische Dichte  $(\text{OD})_{600}$  gemessen, bis deren Wert im Bereich von 0,4-0,6 lag. Anschließend wurde die Zellsuspension insgesamt zweimal mit  $\text{CaCl}_2$  behandelt. Dafür wurde diese zunächst bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit zehn Minuten lang zentrifugiert, der Überstand abgenommen, verworfen und das Pellet in 50 ml eiskaltem  $\text{CaCl}_2$  resuspendiert. Nach dem zweiten Durchlauf der  $\text{CaCl}_2$

## Material und Methoden

Behandlung wurde ein weiteres Mal bei 4°C und 3000 RPM für zehn Minuten zentrifugiert. Das so entstandene Pellet wurde dann in 2 ml einer eiskalten Lösung, bestehend aus 50 Millimol (mM) CaCl<sub>2</sub> und 15 % Glycerol, resuspendiert, in 0,5 ml Eppendorfgefäßen aliquotiert und bei -80°C gelagert.

### **2.2.4 Bakterientransformation**

Eine der gängigsten Methoden zur Transformation von Bakterien ist die Hitzeschockbehandlung. Dabei entstehen in den vorbereiteten chemokompetenten Bakterien durch einen kurzen Hitzeschock Poren in der Zellmembran, durch die das Plasmid in die Zelle gelangen kann [56].

Im ersten Schritt wurden zunächst die eingefrorenen chemokompetenten Bakterien aufgetaut, sowie die Agarplatten mit dem Selektionsantibiotikum Kanamycin bei 37°C vorgewärmt. Anschließend wurden 5 µl des jeweiligen Plasmides zu je 100 µl kompetenten Zellen gegeben und diese Zell-DNA Mischung anschließend für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein 45 Sekunden langer Hitzeschock bei 42°C, indem das Gefäß mit dem darin enthaltenen Mix auf einen Heizblock gestellt wurde. Im Anschluss daran wurde die Mischung für zwei Minuten auf Eis gelagert und es wurde 1 ml SOC-Medium hinzugefügt. Es folgte eine Inkubation im Bakterieneschüttler für 60 Minuten bei 200 RPM und 37°C. Inzwischen wurden die Agarplatten durch Aufbringen von 100 µl des mitgelieferten puren Transformationsmixes weiter vorbereitet. Nach Beendigung der Inkubation wurde die Zell-DNA-Mischung abzentrifugiert, der Überstand bis auf 1-2 ml abgenommen und verworfen. Das Pellet im verbliebenen Rest wurde resuspendiert. Danach wurde das gesamte Volumen auf die vorbehandelten Agarplatten aufgetragen und diese anschließend bei 37°C über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurden dann 3-4 Klone entnommen, in 5 ml LB Medium gelöst und Kanamycin zugegeben. Es erfolgte bei 37°C eine weitere Inkubation über Nacht. Anschließend wurde eine Minipräparation durchgeführt mit je zweimal 2 ml der Vorkultur, wovon ein Glycerolstock angesetzt und bei -80°C gelagert wurde, der für die zukünftige Plasmidisolierung genutzt werden konnte.

### **2.2.5 Plasmidisolierung**

Zur Plasmidvermehrung werden aus den zuvor hergestellten Glycerolstocks die transformierten Bakterien angezüchtet. Im Anschluss daran können die Plasmide über ein Aufreinigungsverfahren aus den Bakterien isoliert werden. Im Zuge der Isolierung werden die Zellen zunächst lysiert und ein Binding-Buffer wird zugegeben. Dadurch werden die Plasmide in einem Filter gebunden und können vom restlichen Lysat getrennt werden. Über verschiedene Waschschrirte wird das Plasmid daraufhin aufgereinigt und schließlich aus den Filtern eluiert.

Nachdem die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefrorenen Glycerolstocks der jeweils zuvor transformierten Bakterien auf Eis aufgetaut wurden, wurden 100 ml des LB Mediums damit angeimpft. Anschließend erfolgte die Inkubation der Kultur bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 200 RPM im Bakterienschüttler über Nacht. Am nächsten Tag wurde die  $\text{OD}_{600}$  der angesetzten Kultur gemessen, welche im Bereich von 0,6-1,0 nm liegen sollte, bevor mit der eigentlichen Plasmidisolierung begonnen werden konnte. Zur anschließenden Aufreinigung wurde das Plasmid Plus Maxi Kit (25) der Firma QIAGEN nach Anleitung des Herstellers verwendet. Die jeweiligen Konzentrationen wurde mit Hilfe einer Tecan-Platte und eines Tecan-Multimode-Platten-Readers gemessen. Im letzten Schritt wurden die Plasmide auf eine Konzentration von 1000-1500 ng/ $\mu\text{l}$ , mit Hilfe des im QIAGEN mitgelieferten Elution Buffers, verdünnt.

### **2.2.6 Zellkultur und Kultivierung**

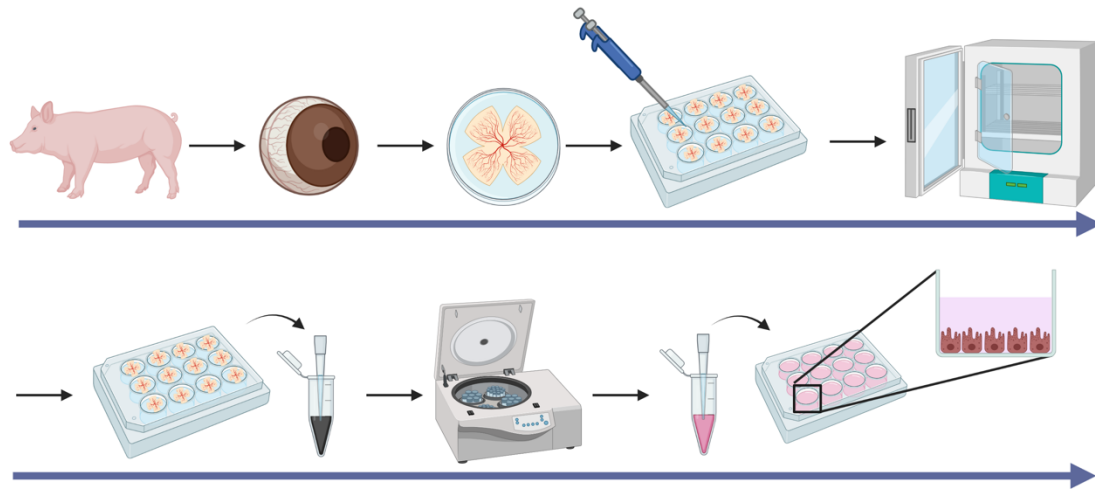
#### **2.2.6.1 Vorbereitung der Schweineaugen**

Die Schweineaugen aus einem lokalen Schlachthaus wurden am Morgen der Schlachtung, auf Eis gekühlt und direktem Weg, zur Augenklinik Tübingen transportiert. Zunächst wurde das überschüssige Muskelgewebe entfernt und die Augen in 5 %-iger Jodlösung für fünf Minuten desinfiziert. Um die Jodreste zu entfernen wurden die Augen anschließend zweimal in PBS gewaschen, bevor mit der eigentlichen Zellisolierung begonnen werden konnte.

### **2.2.6.2 Isolierung primärer porciner RPE-Zellen**

Die desinfizierten und gewaschenen Schweineaugen wurden im ersten Schritt in eine Petrischale überführt und 2mm unterhalb des Limbus Rings mit Hilfe eines Skalpells angeschnitten. Anschließend erfolgte mit einer Schere ein ringförmiger Schnitt um die Kornea, die dann zusammen mit der darunterliegenden Linse entfernt wurde. Der Glaskörper wurde durch vorsichtiges Rühren mit Hilfe einer Pinzette gelöst und entfernt. Dann wurde das Auge an vier Seiten so angeschnitten, dass es sich kleeblattförmig aufklappen ließ. Danach wurde das so präparierte Auge in eine zweite, zur Hälfte mit Neurobasal Medium gefüllte Petrischale, überführt. Unter Zuhilfenahme von zwei Pinzetten wurde die Netzhaut vorsichtig gelöst und entsorgt. Die so präparierten Augenbecher wurden in einer 12-Well-Kulturplatte gesammelt. Nachdem 12 Augen wie beschrieben vorbereitet und gesammelt worden waren, wurde 1 ml 0,25 % Trypsin + EDTA in die jeweiligen Augenbecher gegeben und die Kulturplatte anschließend für 45 Minuten bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>, sowie 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde durch die Zugabe von 1 ml RPE-Kulturmedium die weitere Reaktion durch das darin enthaltene FBS abgestoppt. Daraufhin wurde jeder Augenbecher gründlich resuspendiert, um die antrypsinisierten Zellen vollständig abzulösen. Diese wurden anschließend in einem 15 ml Falcon™ Zentrifugen Röhrchen gesammelt. Nachdem der gerade beschriebene Schritt an allen Augenbechern durchgeführt worden war, wurde bei 800 G für sieben Minuten zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das gewonnene Zellpellet im Verhältnis von 1 ml pro präpariertem Auge resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension zu je 1 ml pro Well in eine 12-Well-Kulturplatte ausgesät (Abbildung 10). Am darauffolgenden Tag wurde das Kulturmedium ausgetauscht. Zwei Tage nach der Isolierung wurden die Zellen erstmals in eine weitere 12-Well-Kulturplatte passagiert, um andere Zellarten, die eventuell mit aus dem Augenbecher gelöst worden waren, zu verlieren. Nachdem die Zellen circa fünf Tage später zu 90 % konfluent gewachsen waren, wurden immer vier Wells der 12-Well-Kulturplatte zusammen in eine

kleine T25 Kulturflasche überführt. Die sich so in Passage 2 befindenden Zellen wurden anschließend für Versuche verwendet.



**Abbildung 10: Isolierung primärer porciner RPE-Zellen**

Nachdem die frischen Schweineaugen präpariert und in einer 12-Well-Kulturplatte gesammelt wurden, wurden diese für 45 Minuten zusammen mit 1 ml Trypsin im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde die Zellsuspension zusammengeführt, zentrifugiert, das Pellet in frischem Kulturmedium resuspendiert und schließlich in einer 12-Well-Kulturplatte ausgesät (Erstellt mit Biorender.com).

### 2.2.6.3 Kultivierung primärer porciner RPE-/ ARPE-19-Zellen

Sowohl die primären porcinen RPE-Zellen als auch die Zellen der ARPE-19-Zelllinie wurden in entsprechendem Kulturmedium in Zellkulturflaschen im Inkubator bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>, sowie 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die verwendeten Kulturmedien wurden jede Woche frisch angesetzt und in den Kulturflaschen 3-mal in der Woche erneuert. Die Zusammensetzung der Kulturmedien ist in Tabelle 10 beschrieben.

**Tabelle 10: Zusammensetzung der Kulturmedien**

Primär porcine RPE-Zellen	ARPE-19-Zellen
DMEM, high glucose - Dulbecco's Modified Eagle Medium	DMEM, low glucose - Dulbecco's Modified Eagle Medium
10 % FBS	10 % FBS
1 % Pen-Strep®	1 % Pen-Strep®
1 % MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100X)	0,1 % Gentamicin
0,25 % Hapes (1M)	

Da das im Kulturmedium enthaltene Antibiotika die Transfektionseffizienz negativ beeinflussen kann [57], wurde vor deren Durchführung das Kulturmedium durch Transfektionsmedium ersetzt. Das Transfektionsmedium entsprach dabei den Zusammensetzungen der Kulturmedien ohne der Zugabe von Antibiotika. Sobald die Zellen in den Kulturflaschen 80–90 % konfluent gewachsen waren, wurden diese gesplittet. Die primären porcinen RPE-Zellen wurden von Passage 2 bis Passage 5 verwendet, bevor die Isolierung neuer Zellen erfolgte. Die Zellen der immortalisierten ARPE-19-Zelllinie wurden im Voraus mehrfach gesplittet und von Passage 20 bis 30 verwendet.

Um die Zellen zu Passagieren wurde zunächst das Medium abgesaugt und es erfolgte ein Waschschrift mit 3 ml PBS. Danach wurde 1 ml 0,25 % Trypsin + EDTA auf die Zellen gegeben und die Kulturplatte für drei bis fünf Minuten im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>, sowie 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Im Anschluss wurde die doppelte Menge an Kulturmedium zu den Zellen gegeben, um die Reaktion abzustoppen. Anschließend konnten die Zellen durch vorsichtiges Klopfen an der Seite der Kulturflasche abgelöst werden. Die vollständige Ablösung der Zellen wurde dabei lichtmikroskopisch überprüft, bevor die in einem Zentrifugenröhrchen gesammelte Zellsuspension bei 300 G und Raumtemperatur zentrifugiert wurde, der Zellüberstand abgesaugt wurde und das Zellpellet im entsprechenden Medium resuspendiert und wieder ausgesät wurde.

### **2.2.6.4 Aussaat von Zellen**

Um die Zellen für einen Versuch zu verwenden, erfolgte zunächst eine Auszählung im Olympus LS Zellzähler. Dabei wurden die Zellen wie in Kapitel 2.2.6.3 beschrieben zunächst gelöst und im Anschluss an das Zentrifugieren in 1 ml Kulturmedium resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurden dann jeweils 10 µl in die R1 Counting Slides pipettiert und es erfolgte die Messung. Im Anschluss wurde unter weiterer Zugabe von Kulturmedium die Zellsuspension, wie in Tabelle 11 beschrieben, entsprechend verdünnt und es erfolgte die Zellaussaat.

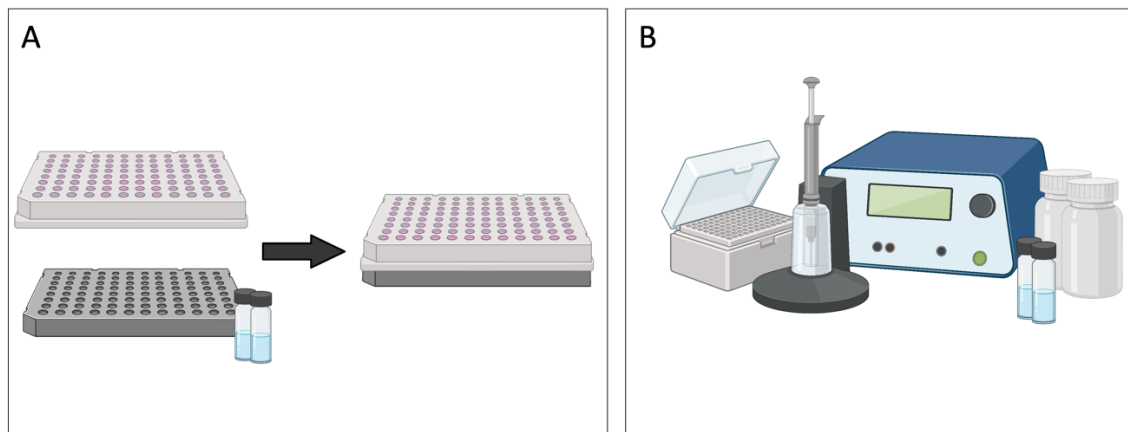
**Tabelle 11: Zellaussaat in den verschiedenen Kulturplatten**

Zellart	Kulturplatte	Zellzahl	Medium pro Well
Prim. RPE-Zellen	24-Well	$12,5 \cdot 10^4$	500 $\mu$ l
	96-Well	$2,5 \cdot 10^4$	100 $\mu$ l
ARPE-19-Zellen	24-Well	$5 \cdot 10^4$	500 $\mu$ l
	96-Well	$1,5 \cdot 10^4$	100 $\mu$ l

### 2.2.7 Transfektion

Die Transfektion ist eine Methode, die das Ziel hat, genetisches Fremdmaterial, wie beispielsweise Plasmide, in eukaryotische Zellen einzubringen. Durch die daran anschließende Transkription der eingebrachten Nukleinsäuren wird die (Über-)Expression der exogen induzierten Gensequenz ausgelöst. So ist es möglich, die Funktion und Wirkungsweise der entsprechenden Genprodukte zu untersuchen [58]. Man unterscheidet weiterhin die transiente und stabile Form der Transfektion. Die transiente Transfektion besteht nur vorübergehend, sodass es durch die Degradation der Nukleinsäuresequenz oder über die im Verlauf auftretende Zellteilung, zum Verlust des exogen induzierten Gens kommt [59]. Bei der stabilen Transfektion wird durch die Zugabe von z.B. Selektionsantibiotika ein Selektionsdruck auf die transfizierten Zellen ausgeübt. Dabei kommt es lediglich zum Anwachsen von Zellen, die das transfizierte Plasmid in ihr Genom eingebaut haben und durch die darauf enthaltene Antibiotikaresistenz unempfindlich gegenüber dem Selektionsantibiotikum sind. Dadurch kann eine längerfristige Genexpression erzielt werden [59]. Zur groben Unterscheidung lassen sich die verschiedenen Verfahren der Transfektionsmethoden in chemisch und nicht chemisch einteilen, wobei auch eine Kombination beider Verfahren möglich ist. Die Funktionsweisen der in dieser Arbeit verwendeten Transfektionsmethoden sind im Folgenden genauer dargestellt.

Für die Transfektionsetablierung wurden die chemischen Transfektionsreagenzien ViaFect™ und FuGENE® HD der Firma Promega, die PolyMAG und CombiMag Magnetofektion der Firma Chemicell (Abbildung 11, A) sowie die Elektroporation mit dem Neon Transfection System der Firma Thermo Scientific (Abbildung 11B), verwendet.



**Abbildung 11: Übersicht über das Magnetofektions- und Elektroporationskit**

(A) Bestandteile des Magnetofektionskits der Firma chemicell. Enthalten ist die passgenaue Magnetplatte sowie die Transfektionsreagenzien PolyMag und CombiMag ([http://www.chemicell.com/products/Magnetofection/Magnetofection\\_separation.html](http://www.chemicell.com/products/Magnetofection/Magnetofection_separation.html)).

(B) Bestandteile des Neon Transfection System der Firma Thermo Scientific. Enthalten ist das Neon-Elektroporationsgerät, die Elektroporations-Pipette mit dazugehöriger Pipettenstation und Pipettenspitzen sowie die für die Transfektion benötigten Transfektions-Pufferlösungen (<https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cell-culture/transfection/neon-transfection-system.html>) (Erstellt mit BioRender.com).

### **2.2.7.1 Vorbereitung der zu transfizierenden Zellen**

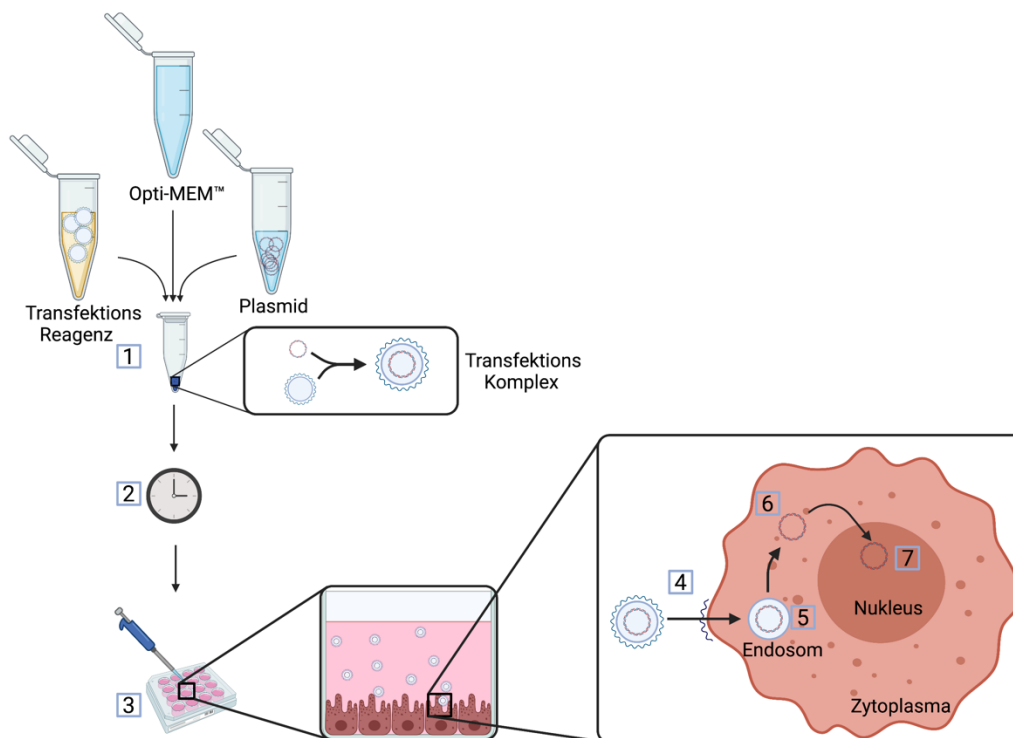
24 h vor Beginn der Transfektion wurden zunächst die jeweiligen primären RPE-Zellen/ ARPE-19-Zellen mit der in Kapitel 2.2.6.4, Tabelle 11 beschriebenen Zellzahl ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurde 1-2h vor Durchführung der Transfektion das Kulturmedium mit dem in Kapitel 2.2.6.3 beschriebenen Transfektionsmedium ausgetauscht.

### **2.2.7.2 Chemische Transfektionen mit ViaFect™ und FuGENE® HD**

Bei der liposomalen Transfektion mit ViaFect™ handelt es sich um ein Transfektionsreagenz, das sich aus kationischen Lipiden zusammensetzt [60]. Bei der Zugabe eines Plasmids entsteht eine Bindung zwischen den negativ geladenen Nukleinsäuren und den kationischen Lipidteilen des ViaFect™ Reagenzes [61]. Die so entstandenen Transfektionskomplexe weisen eine insgesamt positive Ladung auf und werden bei Zugabe zu den Zellen folglich von der negativ geladenen Zellmembran angezogen. Per Endozytose kann dabei die DNA in die Zelle aufgenommen werden [62] [63] [64].

## Material und Methoden

Die genauen Bestandteile des nicht-liposomalen Transfektionsreagenzes FuGENE® HD sind nicht bekannt. Dabei gibt der Hersteller Promega an, dass dieses unter anderem verschiedene Polymere enthalte, die ähnlich wie das liposomale ViaFect™ in der Lage sind, Transfektionskomplexe zusammen mit Nucleinsäuren zu bilden und wodurch die so entstandenen Komplexe folglich die Zellmembran passieren können [60] (Abbildung 12).



**Abbildung 12: Chemische Transfektionen mit ViaFect™ und FuGENE® HD**

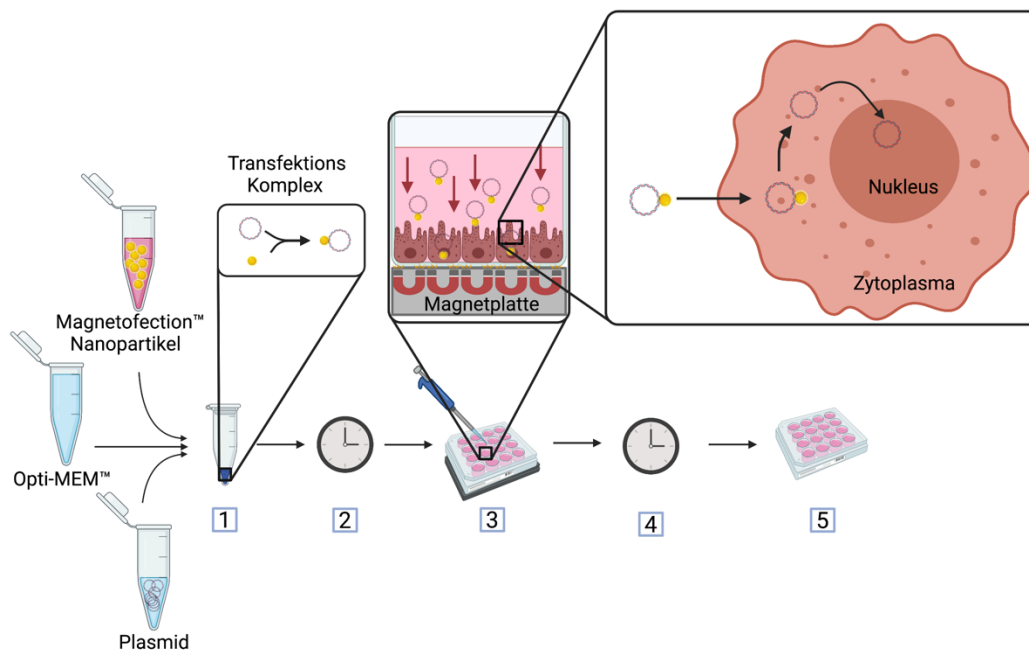
(1) Entstehung positiv geladener Transfektionskomplexe aus dem zugeführten Transfektionsreagenz und dem Plasmid; (2) 15 Minuten Inkubation zur vollständigen Bildung der Transfektionskomplexe; (3) Zugabe der gebildeten Transfektionskomplexe, zu den Zellen; (4) Anziehung der Transfektionskomplexe durch die negativ geladene Zellmembran; (5) Aufnahme per Endozytose; (6) Umbau des Endosoms und Freisetzung des Plasmids; (7) Transport des Plasmids in den Zellkern (Erstellt mit BioRender.com).

Für die Transfektion wurde in einem Eppendorfgefäß zunächst so viel Opti-MEM™ vorgelegt, dass nach Zugabe der Plasmide und des Transfektionsreagenz ViaFect™/ FuGENE® HD ein Volumen von 10 µl pro zu transfizierenden Well für die 96-Well-Kulturplatte entstand. Bei der 24-Well-Kulturplatte betrug das Endvolumen 50 µl/Well. Anschließend wurde der so angesetzte Transfektionsmastermix für 15 Minuten bei Raumtemperatur

inkubiert, bevor jeweils abhängig von der Größe der zu transfizierenden Kulturplatte 10 µl bzw. 50 µl in die entsprechenden Wells pipettiert wurden. Durch vorsichtiges Resuspendieren mit der Pipette wurde gewährleistet, dass die so entstandenen Transfektionkomplexe gleichmäßig im Well verteilen wurden.

### **2.2.7.3 Magnetofektion: PolyMAG, CombiMag**

Die Magnetofektion™ der Firma Chemicell ist ein Verfahren, das sich magnetische Kräfte für die Transfektion von Zellen, zu nutzte macht. Zum Einsatz kommen hierbei magnetische Nanopartikel, die in Kombination mit Nukleinsäuren Transfektionskomplexe bilden. Durch die Verwendung der mitgelieferten Magnetplatte, entsteht ein magnetisches Feld welches die magnetisch anziehbaren Komplexe direkt in bzw. auf die adhärenen Zellen zieht (Abbildung 13). Das Reagenz PolyMAG bindet dabei direkt Nukleinsäuren, wodurch die so entstandenen Komplexe durch die Anlage eines Magnetfeldes in die Zellen gezogen werden. CombiMag ist eine Erweiterung für chemischen Transfektionsreagenzien, wie zum Beispiel in Kapitel 2.2.7.2 beschrieben. Dabei wird zunächst ein Transfektionskomplex aus beispielsweise FuGENE® HD oder ViaFect™ und einem Plasmid gebildet. Das dann zugegebene CombiMag bindet im Anschluss an die zuvor entstandenen Verbindungen. Die dadurch neu gebildeten Komplexe sind magnetisch und kommen unter dem Einfluss eines magnetischen Feldes unweigerlich in Kontakt mit den adhärenen Zellen, am Boden der Kulturplatte. Die tatsächliche Aufnahme dieser Transfektionskomplexe wird dabei durch das chemische Reagenz ermöglicht [65].



**Abbildung 13: Magnetofektion™ mit PolyMAG und CombiMag**

(1) Ansetzen des Transfektionsmastermixes; (2) 15 Minuten Inkubation zur vollständigen Bildung der magnetischen Transfektionskomplexe; (3) Zugabe zu den Zellen sowie Platzierung der Kulturplatte auf der Magnetplatte; (4) 60 Minuten Inkubation auf der Magnetplatte; (5) Anschließende Entfernung der Magnetplatte (Erstellt mit BioRender.com).

Bei der Transfektion mit PolyMAG wurde zunächst ein Transfektionsmastermix, bestehend aus Opti-MEM™, den magnetischen Nanopartikeln und dem verwendeten Plasmid angesetzt, so dass sich auch hier ein Volumen von 10 µl pro zu transfizierendem Well in der 96-Well-Kulturplatte bzw. 50 µl in der 24-Well-Kulturplatte ergab. Der Mix wurde für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, auf die zuvor angewachsenen Zellen gegeben und vorsichtig resuspendiert. Dann wurde die Kulturplatte auf die von Chemicell mitgelieferte passgenaue Magnetplatte für 60 Minuten in den Inkubator gestellt. Nach Ablauf der Zeit wurde die Platte entfernt und die Zellen weiter kultiviert.

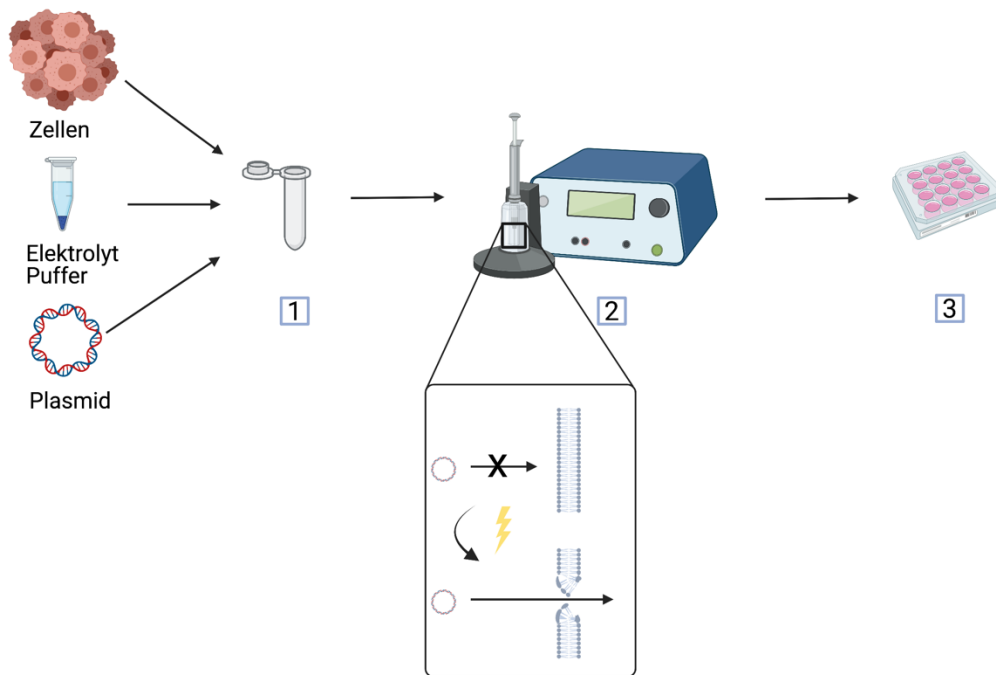
Beim CombiMag Verfahren wurde ebenfalls zunächst Opti-MEM™, das Plasmid und das entsprechende chemische Transfektionsreagenz ViaFect™ oder FuGENE® HD für 15 Minuten bei Raumtemperatur zusammen inkubiert. Anschließend wurde das CombiMag Reagenz hinzugefügt, so dass man abermals auf ein Volumen von 10 µl bzw. 50 µl - jeweils abhängig von der

Kulturplattengröße – pro zu transfizierendem Well - kam. Danach wurde der Mix für weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf die Zellen gegeben. Die Kulturplatte wurde danach ebenfalls auf die Magnetplatte im Inkubator für 60 Minuten gestellt.

### **2.2.7.4 Elektroporation**

Die Elektroporation ist ein Transfektionsverfahren, das durch die kurze Anlage einer elektrischen Spannung die Zellmembran kurzzeitig permeabel macht [66]. Dafür wurde das Neon Transfection System der Firma Thermo Scientific™ verwendet. Dieses System besteht aus einer speziellen Pipette und dem dazugehörigen *Neon Transfection System* (Abbildung 11B). Sowohl die Zellen als auch das gewünschte Plasmid werden dabei in einer leitenden Lösung gelöst und mit Hilfe der speziellen Pipette aufgenommen. Im nächsten Schritt wird diese Pipette in das Gerät eingeführt, über das ein elektrischer Puls appliziert wird. Die Anlage eines elektrischen Feldes bewirkt eine Neuausrichtung der Molekül-Dipole. Dies führt dazu, dass die Kathodenseite der Zelle depolarisiert, während die Anodenseite hyperpolarisiert. Wenn das elektrische Feld dabei die Durchschlagfestigkeit der Membran überschreitet, führt dies dazu, dass sich Poren in der Zellmembran bilden, über die beispielsweise negativ geladene Plasmide in die Zelle gelangen können [66] [67]. Nach dem Ende des elektrischen Pulses verschließt sich die Zellmembran wieder [67] (Abbildung 14).

## Material und Methoden



**Abbildung 14: Elektroporation mit dem Neon™ Transfection System**

(1) Ansetzen des Transfektionsmastermixes, bestehend aus den zu transfizierenden Zellen, dem Elektrolyt Puffer und den eingesetzten Plasmiden; (2) Applikation des elektrischen Pulses; (3) Aussaat der transfizierten Zellen in die Kulturplatte (Erstellt mit BioRender.com).

Die Zellen, die im Rahmen der Elektroporation benutzt wurden, wurden zunächst so kultiviert, dass diese am Tag der Verwendung 70-90 % konfluent gewachsen waren. Das Kulturmedium wurde 1-2h vor Transfektionsbeginn durch das Transfektionsmedium ausgetauscht. Vor Beginn der Transfektion wurde zum Vorwärmen eine 96-Well-Kulturplatte lediglich mit Transfektionsmedium befüllt und bei 37°C inkubiert. Weiterhin wurde das *Neon Transfection System* mit Ethanol desinfiziert, unter der sterilen Werkbank zusammengebaut, angeschaltet und die *Neon™ Tube* mit 3 ml des mitgelieferten Elektrolyt Puffers befüllt. Nach der Vorbereitung wurden die Zellen im Anschluss abtrypsinisiert, abzentrifugiert und in PBS gewaschen. Im nächsten Schritt erfolgte eine Auszählung und eine Resuspension des Zellpellets mit dem im Kit mitgelieferten Puffer R, entsprechend der gewünschten Zellzahl. Für die unterschiedlichen Transfektionsansätze wurden die Zellen sowie das zu transfizierende Plasmid anschließend in einem Eppendorfgefäß so gemischt, dass ein Gesamtvolumen von 10 µl pro zu

transfizierendem Well entstand. Das Zell-Plasmid Gemisch wurde anschließend mit Hilfe der mitgelieferten 10 µl-Pipette aufgenommen, in die Pipettenstation des Elektroporationsgerätes eingeführt und entsprechend der Transfektionseinstellungen auf dem Display elektroporiert. Im Anschluss daran wurde die Zellsuspension in die Wells der vorgewärmten Kulturplatte pipettiert.

### 2.2.8 Ablauf der Transfektionsetablierung

Neben den verwendeten Reagenzien, Plasmiden und der gewählten Transfektionsart hat auch das Verhältnis aus Transfektionsreagenz zu Plasmid sowie die insgesamt Menge des verwendeten Plasmids einen maßgeblichen Einfluss auf die Transfektionseffizienz der zu transfizierenden Zellen. Der Einsatz einer hohen Menge an Plasmid bzw. einer hohen Menge an Transfektionsreagenz korreliert mit einer erhöhten Toxizität. Im ersten Schritt wurde daher maximal 0,5 µg Plasmid pro Well, in einer 96-Well-Kulturplatte, verwendet. Zusammen mit der zunächst festgelegten maximalen Menge an Plasmid wurden dabei absteigende Transfektionsreagenzmengen verwendet und die jeweiligen Transfektionseffizienzen anschließend miteinander verglichen (Tabelle 12). Die Etablierung erfolgte in einer 96-Well-Kulturplatte unter Verwendung des GFP-Kontroll-Plasmids. Dabei wurde die Fluoreszenz des grün fluoreszierenden Proteins 24h nach erfolgreicher Transfektion und Expression beobachtet.

**Tabelle 12: Transfektionsetablierungsansätze**

<b>Transfektionsreagenzien</b>	<b>Plasmidmenge</b>	<b>Plasmid: Reagenz</b>
ViaFect™	0,5 µg	1:6; 1:4; 1:3; 1:2
FuGENE® HD	0,5 µg	1:6; 1:4; 1:3; 1:2
PolyMAG	0,5 µg	1:6; 1:4; 1:3; 1:2
ViaFect™ + CombiMag	0,5 µg	1:6:1,5; 1:4:1,5; 1:3:1,5; 1:3:1,25
FuGENE® HD+ CombiMag	0,5 µg	1:6:1,5; 1:4:1,5; 1:3:1,5; 1:2:1,25

## Material und Methoden

Bei der Elektroporation ist der Einsatz einer erhöhten elektrischen Spannung, einer erhöhten Anzahl und Länge elektrischer Impulse, sowie einer hohen Menge an Plasmid mit einer entsprechend hohen Toxizität verbunden. Die von Prof. Thumann verwendeten Elektroporationsvoreinstellungen wurden dabei als Ausgangsansatz verwendet [68]. Davon ausgehend wurde die Transfektionseffizienz anhand verschiedener Zellzahlen und unterschiedlicher Stromstärken untersucht (Tabelle 13).

**Tabelle 13: Elektroporationsansätze;** \*Ansatz nach dem von Thumann et al. verwendeten Protokoll [68]

Plasmidkonzentration	Zellzahl	Pulsanzahl	Pulslänge	Stromstärke
0,5 µg*	50.000*; 40.000; 30.000; 20.000	2*	20ms*	1,100V*; 1200V; 1350V

Im zweiten Schritt wurde bei den zuvor erfolgreichen Transfektionsansätzen die eingesetzte Plasmidmenge reduziert. Ziel war es dabei die Toxizität möglichst gering zu halten und die minimale Plasmidkonzentration festzustellen, bei der keine wesentliche Abnahme der Transfektionseffizienz beobachtet werden konnte.

Für die Transfektion in einer 24-Well-Kulturplatte wurde die dreifache Menge an Plasmid, bei gleichem Reagenzverhältnis verwendet.

### 2.2.9 Zellstressetablierung

Für die Zellstressversuche wurden die transfizierten Zellen zusätzlich mit den Zellstress-verursachenden Stoffen Cobaltchlorid ( $\text{CoCl}_2$ ) und Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) behandelt.

Die chemische Verbindung  $\text{CoCl}_2$  wirkt hypoxie-mimetisch über die Stabilisierung der für die Hypoxie verantwortlichen Haupttranskriptionsfaktoren, HIF-1 $\alpha$  (*hypoxia-inducible factor-1*) und HIF-2 $\alpha$  (*hypoxia-inducible factor-2*) [69, 70] [71]. Durch den Einsatz von  $\text{H}_2\text{O}_2$  werden Hydroxyl-Radikale gebildet, die für oxidativen Zellstress verantwortlich sind [72] [73].

Für die Etablierung wurden primäre RPE-Zellen sowie ARPE-19-Zellen ausgesät und für 24h kultiviert. Anschließend wurde zu den Zellen  $\text{CoCl}_2$  beziehungsweise  $\text{H}_2\text{O}_2$  in verschiedenen Konzentrationen zugegeben. Nachdem die so behandelten Zellen für weitere 24h kultiviert worden waren, wurde die Zellviabilität und -zahl gemessen. Aus den daraus erhobenen Daten wurde die minimale Konzentration bestimmt, unter der ein signifikanter Rückgang der Zellzahl beobachtet werden konnte. Mit den so festgelegten  $\text{CoCl}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$  Konzentrationen erfolgte anschließend die Co-Behandlung der p53-transfizierten Zellen sowie deren erneute Untersuchung im Verlauf.

### **2.2.10 Durchflusszytometrie**

Bei der Durchflusszytometrie (engl.: *Fluorescence Activated Cell Sorting - FACS*) werden die Zellen zunächst vereinzelt und dann per hydrodynamischer Fokussierung, vereinzelt verlaufend, mit einem Laserstrahl angestrahlt. Das dabei erzeugte Streulicht wird gemessen, wodurch Zellpopulationen charakterisiert werden können sowie Rückschlüsse auf deren physikalischen Eigenschaften möglich sind [74]. Auch die Fluoreszenz des GFP kann vom Gerät detektiert werden, wodurch die Transfektionseffizienz bestimmt werden kann.

24h nach der Transfektion wurden die Zellen zunächst abtrypsiniert, die Reaktion abgestoppt, die Zellen abzentrifugiert und anschließend zweimal in PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen erneut in PBS resuspendiert und bis zur Messung auf Eis gekühlt gelagert. Die Durchflusszytometrie zur Bestimmung der genauen Zahl der transfizierten Zellen erfolgte anschließend in der FACS Core Facility, in Tübingen. Unter Verwendung des *Forward-Scatter/Sideward-Scatter*, wurde dabei die Größe und Granularität der Zellen ermittelt. Die angeregten Fluorochrome des GFP-Proteins, die dabei Licht emittieren, wurden über den FITC Kanal der Software aufgezeichnet. Nachdem die Zellpopulation durch Festlegung der jeweiligen *Gates* bestimmt wurden, konnte so der genaue Anteil an transfizierten Zellen bestimmt werden. Zur Visualisierung wurde die Software FlowJo verwendet.

### **2.2.11 Zellbasierte Assays**

Um die Toxizität der durchgeführten Transfektionen zu überprüfen sowie einen möglichen Effekt der p53-Überexpression zu untersuchen wurden zellbasierte Assays in 96-Well-Kulturplatten durchgeführt. Es wurde dabei die Zellviabilität anhand eines MTS-Assays (Promega), die Zellzahl durch die Kristallviolett-Färbung (Sigma-Aldrich), sowie die Caspasenaktivität anhand eines Caspase-3/7-Assays (Promega) bestimmt. Weiterhin wurde zur Untersuchung des Zellzyklus ein Bromdesoxyuridin (BrdU)-Assay (Merck Millipore) durchgeführt.

#### **2.2.11.1 MTS-Assay**

Der MTS-Assay gibt Aufschluss über die Viabilität der Zellen. Die MTS-Tetrazolium Verbindung wird dabei von vitalen Zellen zu Formazan verstoffwechselt, wodurch es zu einem Farbumschlag kommt. Dieser kann mit Hilfe eines Tecan-Readers gemessen werden. Da nur vitale Zellen als Zwischenverbindung in diesem Schritt die dabei entstehenden Reduktionsäquivalente NADH und NADPH bilden können, kann über den gemessenen Farbumschlag auf die mitochondriale Aktivität und Viabilität der Zellen geschlossen werden.

Nach Zugabe von 20 µl MTS-Lösung zu den bereits mit 100 µl Kulturmedium bedeckten Zellen, wurden die Platten für 90 Minuten im Inkubator bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>, sowie 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Danach wurde die Absorption im Tecan-Multimode-Platten-Reader mit dem Programm i-control gemessen. Die gemessene Wellenlänge betrug dabei 490 nm mit einer Referenz von 690 nm.

Im Anschluss an den durchgeführten MTS-Assay wurden die Zellen nach vorsichtigem Ausklopfen der Kulturplatte mit 4 %-igem Paraformaldehyd (PFA) für 15 Minuten bei Raumtemperatur fixiert, um anschließend die Zellzahl mittels Kristallviolettfärbung bestimmen zu können.

#### **2.2.11.2 Kristallviolettfärbung**

Die Kristallviolettfärbung wurde zur Quantifizierung der lebenden Zellen verwendet und erfolgte im Anschluss an den zuvor durchgeführten MTS-Assay.

Kristallviolett ist ein violetter Triphenylmethanfarbstoff der an Proteine und DNA lebendiger Zellen bindet. Durch die Zugabe der Kristallviolettlösung werden zunächst alle Zellen angefärbt. Da nur vitale Zellen am Boden der Wellplatte anhaften, werden durch die darauffolgenden Waschschriffe alle nicht vitalen Zellen herausgewaschen. Die verbleibenden, gefärbten Zellen können über eine anschließende Absorptionsmessung quantifiziert werden.

Die zuvor fixierten Zellen wurden mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend erfolgte die Zugabe von 100 µl Kristallviolettlösung. Die Färbung wurde dann für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 5 Waschschriffe durch die Zugabe von jeweils 200 µl destilliertem Wasser durchgeführt. Zuletzt wurden die Zellen mit 100 µl 1 %-iger SDS Lösung für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm im Tecan-Multimode-Platten-Reader gemessen.

### **2.2.11.3 Caspase-3/7-Assay**

Die Effektor Caspasen 3 und 7, die als nachgeschaltete Signalproteine sowohl im intrinsischen als auch extrinsischen Apoptose Signalwegs vorkommen, geben Rückschlüsse über eine mögliche Apoptoseinduktion [75] [76]. Durch Verwendung des Caspase-Glo® 3/7-Assay Kits der Firma Promega können Rückschlüsse auf eine toxische Wirkung der Transfektionsreagenzien bzw. einer mögliche Apoptoseinduktion in Folge der p53-Überexpression gezogen werden. Das lytische Reagenz setzt dabei die enthaltenen Caspasen frei, welche Aminoluziferin vom ebenfalls enthaltenen Z-DEVD-Aminoluziferin abspalten. Die Luziferase setzt das abgespaltene Aminoluziferin um. Dieser Prozess kann quantitativ mittels Lumineszenzmessung erfasst werden.

Nachdem das Kit bei Raumtemperatur aufgetaut wurde, wurde das Caspase-Glo®-3/7-Substrate mit dem im Kit beiliegenden Caspase-Glo®-3/7-Puffer gelöst. Danach wurden je 100 µl der angesetzten Mischung in die einzelnen Wells der Kulturplatte gegeben und die Platte für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die anschließende Messung der Lumineszenz

erfolgte am Tecan-Multimode-Platten-Reader, unter Verwendung des Programms SparkControl.

### **2.2.11.4 BrdU-Assay**

Das BrdU Cell Proliferation Assay Kit der Firma Merck Millipore kann für die Untersuchung eines möglichen Zellzyklusarrest eingesetzt werden. Dabei wird zu den Zellen in der Kulturplatte Bromodeoxyuridin, ein Analog zum Nukleosid Thymidin, gegeben und für 12h-48h zusammen mit den Zellen kultiviert. In der S-Phase des Zellzyklus kann dabei BrdU anstelle des Nukleotids Desoxythymidintriphosphat (dTTP) von den Zellen aufgenommen und in phosphorylierter Form als Marker in die neu synthetisierte DNA eingebaut werden. Im nächsten Schritt werden die Zellen fixiert und es erfolgt eine Antikörperzugabe. Über eine daran anschließenden Fluoreszenzmessung lässt sich eine Aussage über den Zellzyklus der Zellen treffen.

Nach Transfektion der Zellen wurden diese zusammen mit Bromodeoxyuridin für 20h im Inkubator bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> sowie 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Danach wurden die Zellen mit der beiliegenden Fixierlösung zunächst fixiert und es wurden 100 µl des zuvor verdünnten, im Kit enthaltenen Anti-BrdU Antikörpers zugegeben. Anschließend wurde dies für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte ein Waschschrift mit dem im Kit enthaltenen Waschpuffer, bevor dann 100 µl des im Kit ebenfalls beiliegenden Konjugates den einzelnen Wells zugeführt wurde. Anschließend erfolgte eine erneute Inkubation bei Raumtemperatur für weitere 30 Minuten. Danach wurden die Wells ein weiteres Mal mit dem Waschpuffer sowie einmal mit destilliertem Wasser gewaschen. Im letzten Schritt wurde 100 µl der Substratlösung zugegeben und die Platte ein weiteres Mal bei Raumtemperatur im Dunklen für 15 Minuten inkubiert. Die daran anschließende Messung der Fluoreszenz erfolgt am Tecan-Multimode-Platten-Reader, bei einer Wellenlänge von 450 nm sowie einer Referenzlänge von 595 nm.

### 2.2.12 Quantitative PCR mit reverser Transkription (qRT-PCR)

Anhand einer qRT-PCR kann die Expression unterschiedlicher Gene untersucht werden. Dabei erfolgt zunächst eine reverse Transkription, der sich in der Zelle befindenden RNA zu cDNA, gefolgt von einer quantitativen-Echtzeit-PCR. Neben dem p53-Protein wurde der CDK-Inhibitor 1 (p21), *Hsp70*, das Verhältnis aus dem pro-apoptotischen *Bax* zum anti-apoptotischem *Bcl-2* (*Bax/Bcl-2*) sowie das Housekeeping-Gen *beta-Aktin* gemessen.

#### 2.2.12.1 cDNA Synthese

Bevor die Genexpression der Zellen untersucht werden kann, muss zunächst die cDNA Synthese, mittels reverser Transkription, als Abschrift der sich in der Zelle befindenden RNA, erfolgen. Das cDNA Synthese Kit der Firma MultiMACS wurde hierfür zusammen mit dem MultiMACSTM M96 Thermo Separator eingesetzt. Das Kit verwendet dabei magnetische  $\mu$ MACS Oligo (dT) MicroBeads, um die mRNA zu binden und mit einer magnetischen Multi-8-Säule vom restlichen Zelllysat zu trennen, bevor die zugeführte reverse Transkriptase diese zu cDNA umschreibt.

Die gewünschten Zellen wurden 24h nach Transfektion zunächst per enzymatischer Verdauung mit 0,25 % Trypsin + EDTA abgelöst, die Reaktion mit Kulturmedium abgestoppt, die Zellen in ein Eppendorfgefäß überführt und bei 2000 RPM für drei Minuten zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Zellen einmal in PBS gewaschen und das gewonnene Zellpellet in 800  $\mu$ l Lyse Binding Buffer lysiert. Mit Hilfe einer 1 ml Pipette folgte eine 2-minütige manuelle Resuspendierung, um eine Lyse der Zellen sicherzustellen, bevor die Proben ein weiteres Mal bei 2000 RPM für drei Minuten zentrifugiert wurden und der Überstand schließlich in ein neues Eppendorfgefäß überführt wurde. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe der  $\mu$ MACS Oligo(dT) MicroBeads, zur magnetischen Markierung der mRNA. Die Proben wurden anschließend auf die MACS-Säulen gegeben, die sich im Magnetfeld des ThermoMACS-Separators befinden. Anschließend wurde insgesamt viermal jeweils 100  $\mu$ l Wash Buffer zugeführt sowie zweimalig je 100  $\mu$ l Equilibration/Wash Buffer. Nachdem je 20

µl des cDNA Synthese Mix dazugegeben worden war, erfolgte eine einstündige Inkubation bei 42°C. Nach zwei weiteren Waschschritten mit je 100 µl Wash Buffer, wurden 20 µl cDNA Release Solution hinzugefügt, bevor eine weitere Inkubation bei 42°C für zehn Minuten erfolgte. Im letzten Schritt wurde durch die Zugabe von insgesamt 60 µl Elution Buffer die cDNA gewonnen und in 1 ml Eppendorfgefäße überführt. Diese wurden bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

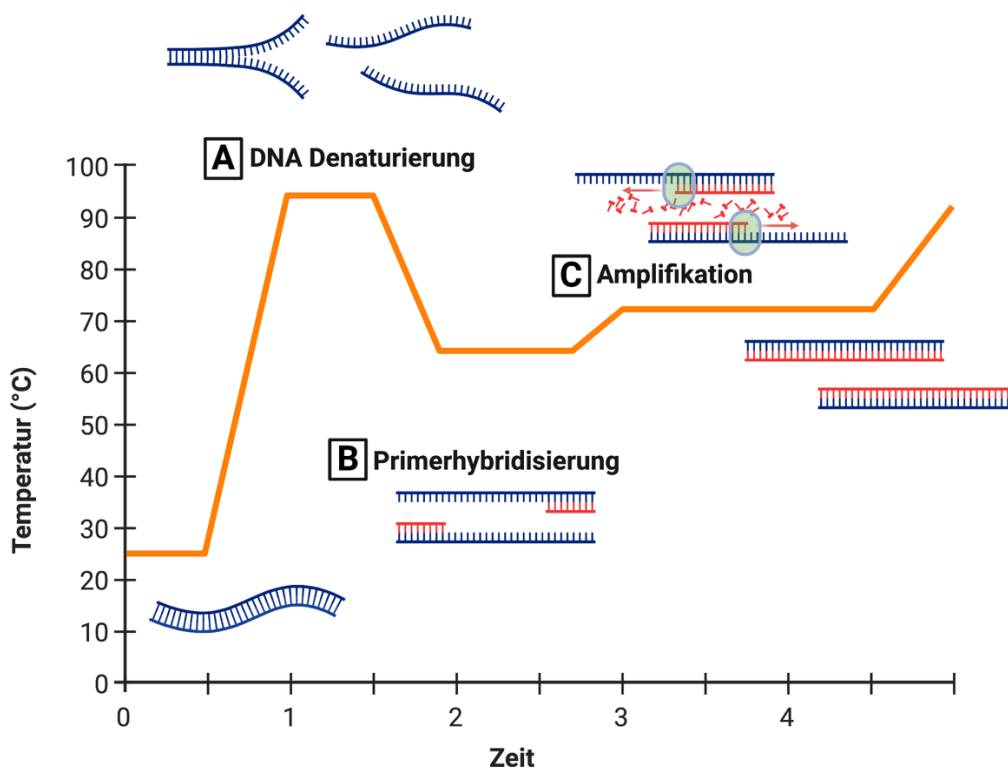
### **2.2.12.2 Konzentrationmessung der cDNA**

Im Anschluss an die cDNA-Synthese erfolgte eine Konzentrations- und Reinheitsbestimmung in einer NanoQuant Plate™, die im Tecan-Reader gemessen wurde. Die Leerwertmessung erfolgte zunächst mit 2 µl Elution Buffer, bevor im Anschluss jeweils 2 µl der Probe aufgetragen wurden und bei einer Wellenlänge von 260 nm und einer Referenzwellenlänge von 280 nm gemessen wurden. Danach wurden die cDNA-Proben auf eine Konzentration von 1ng/µl verdünnt.

### **2.2.12.3 Quantitative Echtzeit-PCR**

Die quantitativen Echtzeit-PCR beruht auf dem gängigen Polymerase-Kettenreaktions-Verfahren (Abbildung 15). Diese ermöglicht eine Quantifizierung der zu untersuchenden Genexpressionen anhand der zuvor gewonnenen cDNA-Proben. Dabei erfolgt zunächst die Denaturierung der cDNA-Nukleinsäuren: die PCR-Platte wird dabei auf 95°C Grad erhitzt, wodurch sich die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den DNA-Strängen lösen. Die so erhaltenen Einzelstränge dienen im Folgenden als Vorlage zur Vervielfältigung bestimmter Genabschnitte. Als nächstes wird die Primerhybridisierung durchgeführt, bei der die Platte auf 65°C abgekühlt wird. Die dazugegebene Primer der zu untersuchenden Gene, lagern sich an die jeweiligen Genabschnitte an, nach dem Prinzip der komplementären Basenpaarung. Im dritten Schritt erfolgt eine erneute Erhitzung auf ca. 70°C, was der optimalen Arbeitstemperatur der DNA-Polymerase entspricht. Diese

fügt die jeweils passenden Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) an die zuvor gebundenen Primer an, so dass ein neuer DNA-Strang entsteht. Die Fluoreszenzstrahlung wird im Anschluss vom Gerät gemessen. Der oben beschriebene Zyklus wird dabei insgesamt 40-mal durchlaufen. Da bei jedem weiteren Zyklus sowohl die neu entstandenen als auch die zuvor bereits vorliegenden DNA-Stränge als Vorlage verwendet werden, handelt es sich hierbei um einen exponentiellen Anstieg der Vermehrung. Sobald die gemessene Fluoreszenz einen bestimmten Schwellenwert überschreitet, wird dieser anhand des Zeitpunktes als Ct-Wert bestimmt. Zusammen mit dem Ct-Wert des gemessenen Housekeeping Gens *beta-Aktin* sowie im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, erfolgt im Anschluss eine genaue Auswertung nach der Methode von Pfaffi [77], um die Menge der in der Probe vorliegenden mRNA zu bestimmen.



**Abbildung 15: Ablauf der quantitativen-Echtzeit-PCR**

(A) Denaturierung des DNA-Doppelstrangs bei 95°C Grad; (B) Primeranlagerung bei 65°C Grad; (C) Amplifikation der neuen DNA-Stränge durch die DNA-Polymerase bei 70°C (Erstellt mit BioRender.com).

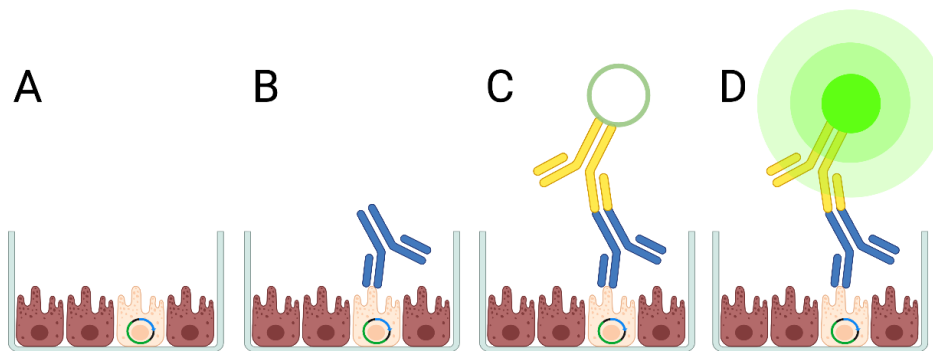
## Material und Methoden

Für die Untersuchung der einzelnen Gene wurde zunächst immer ein frischer Reaktionsmix, bestehend aus 1 µl Milli-Q H<sub>2</sub>O, 2 µl Forward Primer, 2 µl Reverse Primer sowie 10 µl SYBR® Green Mastermix angesetzt, sodass ein Gesamtvolumen von 15 µl pro Well vorlag. Der SYBR® Green Mastermix beinhaltet dabei die dnTPs, Puffer, DNA-Polymerasen und den Farbstoff SYBR™ Green. Die 15 µl Reaktionsmix wurden dann zusammen mit 5 µl verdünnter cDNA zusammen in eine PCR-Platte pipettiert, welche im Anschluss mit Abdeckfolie versiegelt wurde. Diese wurde für eine Minute bei 5000 RPM zentrifugiert, bevor im Anschluss die qRT-PCR gestartet wurde. Jede Probe wurde doppelt gemessen und anschließend ein Mittelwert errechnet, mit einem n=4 pro Ansatz.

### **2.2.13 Immunfluoreszenz-Färbung**

Die primären porcinen RPE-Zellen wurden in einer 96-Well-Kulturplatte angefärbt, während für die Immunfluoreszenz-Färbung der ARPE-19-Zellen ein 8-Kammerobjektträger der Firma Thermo Scientific™ verwendet wurde. Zunächst wurden die Zellen in 100 µl 4 %-igem PFA für fünf Minuten fixiert. Danach wurde das PFA abgenommen und es erfolgten 3 Waschschrte mit je 100 µl PBS. Für die Permeabilisierung wurde im Anschluss eine Lösung bestehend aus 0,1 % Triton X-100 in 0,1 % Natriumcitrat verwendet. Dabei wurden je 100 µl der Permeabilisierungslösung in die Wells der anzufärbenden Zellen gegeben und die Kulturplatte bzw. der Kammerobjektträger für zwei Minuten auf Eis gelagert. Danach erfolgten drei weitere Waschschrte mit je 100 µl PBS, gefolgt vom Blocking, für welches je 100 µl 10 %-iges bovines Serumalbumin (BSA) für eine halbe Stunde auf die Zellen gegeben wurde. Der primäre Antikörper, der anschließend dazugegeben wurde, wurde im Verhältnis von 1:100 in 5 %-igem BSA angemischt. Von dieser Mischung wurden dann je 100 µl auf die Zellen gegeben und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen dann zunächst drei Mal mit je 100 µl TBST gewaschen, bevor 100 µl des sekundären Antikörpers, auf die Zellen gegeben wurden. Dieser wurde im Verhältnis von 1:1000 in 5 %-igem BSA verdünnt. Die Platten wurden dann für eine Stunde im Dunkeln inkubiert und anschließend wieder drei Mal

mit je 100  $\mu\text{l}$  TBST gewaschen. Zuletzt wurden die Zellen mit, in PBS im Verhältnis 1:20 verdünntem DAPI, angefärbt und für weitere fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Zellen noch zweimal mit je 100  $\mu\text{l}$  TBS sowie ein weiteres Mal mit destilliertem Wasser gewaschen, bevor diese unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht wurden (Abbildung 16).

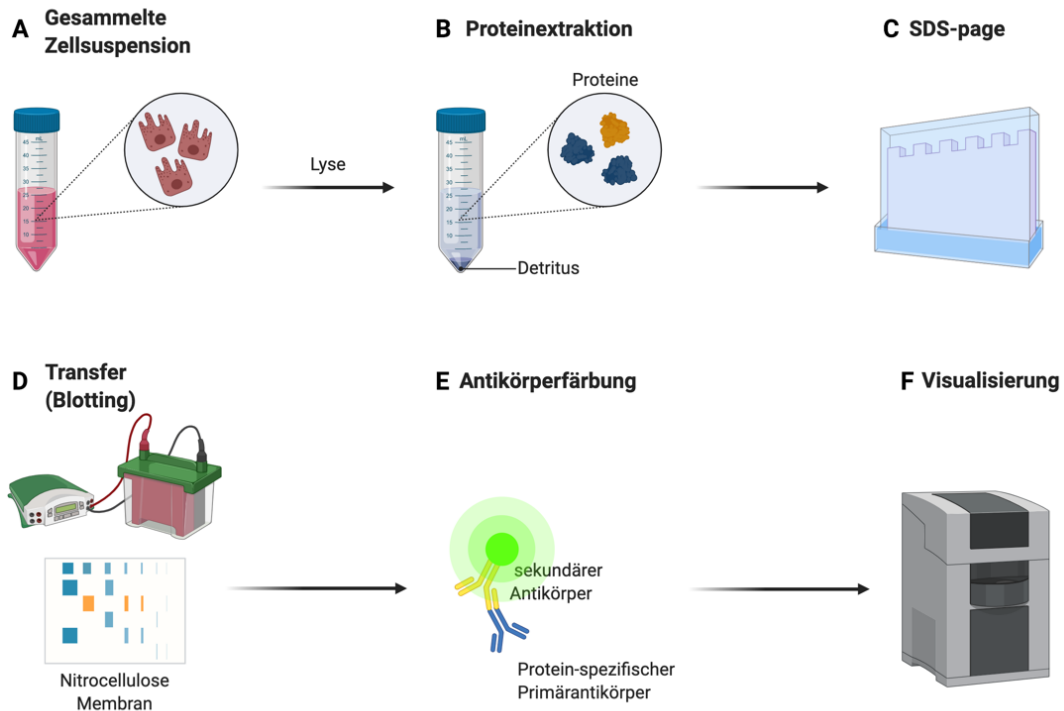


**Abbildung 16: Funktionsweise der Fluoreszenzfärbung**

(A) Die im Bild als hell dargestellte Zelle wurde zuvor erfolgreich transfiziert und exprimiert das eingebrachte Gen; (B) Bindung des primären spezifischen Antikörpers; (C) Bindung des sekundären Antikörpers; (D) Unter Bestrahlung der Zellen mit der entsprechenden Wellenlänge fluoresziert der gebundene Sekundärantikörper (Erstellt mit Biorender.com).

### 2.2.14 Proteinnachweis mittels Western Blot

Um sowohl die Menge des endogenen p53 als auch die durch die p53-GFP-Transfektion überexprimierte p53-Menge auf Proteinebene zu untersuchen, wurden Western Blots durchgeführt. Bei der Western Blot Methode werden die Proteine zunächst durch eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl.: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE) aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembranen übertragen. Unter Verwendung von Antikörpern können so die entsprechenden Proteine dargestellt werden (Abbildung 17).



**Abbildung 17: Funktionsweise des Western Blots**

(A) Zusammenführung der zu untersuchenden Zellen; (B) Proteinextraktion/ BCA-Assay; (C) Proteinauftrennung durch eine SDS-Page; (D) Transfer der Proteinbanden auf eine Nitrocellulose Membran; (E) Antikörperfärbung; (F) Visualisierung mit dem Odyssey Reader (Erstellt mit BioRender.com).

### 2.2.15 BCA-Assay

Vor der Western Blot Durchführung müssen die Proteine der zu untersuchenden Zellen zunächst isoliert und quantifiziert werden. Pro Versuchsgruppe wurden je drei Proben erstellt. Die zu untersuchenden Zellen wurden zunächst gelöst und in einem Eppendorfgefäß zusammengeführt, so dass mindestens 400.000 Zellen pro Probe vorlagen. Als nächstes wurde der Lysepuffer, bestehend aus dem Cell Extraction Buffer der Firma Invitrogen (FNN0011), sowie 1 % des Protease Inhibitors der Firma Merck (539134-1SET) und 1 % einer 0,1M PMSF Lösung vorbereitet. Die zuvor gesammelten Zellen wurden dann mit PBS gewaschen, in 100 µl des Lysepuffers vorsichtig resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden die Eppendorfgefäße jeweils bei 4°C und 13.000 RPM für vier Minuten zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Als nächstes wurde der Proteingehalt der einzelnen Proben mit Hilfe des Pierce™ BCA Protein Assay Kits, nach Anweisung des Herstellers Thermo Scientific™, bestimmt. Im

Anschluss wurden die zuvor gewonnenen Proben so auf eine Konzentration von 15 ng/ $\mu$ l verdünnt.

### **2.2.15.1      *Ablauf des Western Blot***

Im ersten Schritt erfolgt die Denaturierung der Proteine. Nachdem 10  $\mu$ l der zuvor verdünnten jeweiligen Probe zusammen mit 10  $\mu$ l 2x Lämmli-Ladepuffer bei 95°C Grad für fünf Minuten inkubiert wurden, wurden diese in die Taschen der 10 % Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gele pipettiert. Weiterhin wurde in eine der beiden randständigen Geltaschen 6  $\mu$ l der PageRuler™ Prestained Protein Ladder als Marker aufgetragen. Dann wurden die Gele in die Kammer eingebaut, die mit Running Buffer gefüllt wurde. Für 45 Minuten wurde eine Spannung von 200 V angelegt. Durch die Anlage eines elektrischen Feldes laufen dabei kleinere Proteine weiter in Richtung Anode, verglichen zu größeren Proteinen. Im Anschluss wurden die zum Blotting verwendete Nitrozellulosemembran zugeschnitten und im Wet/Tank Blotting Systems der Firma Bio-Rad Laboratories mit dem zuvor gelaufenen Gel zusammengebaut. In dem mit Towbin-Puffer gefüllten Kammer-System erfolgte dabei unter Zugabe eines Kühlelements für 60 Minuten und bei 350 mA der Proteinbanden-Transfer auf die anliegende Nitrozellulosemembran. Diese wurde danach für eine Stunde mit 5 %-igem BSA in TBST-T geblockt. Anschließend konnte ein primärer Antikörper gegen *beta-Aktin*, das als Haushaltsgen benutzt wurde, sowie gegen p53 auf die Membran gegeben werden und es erfolgte eine Inkubation bei 4°C über Nacht. Am darauffolgenden Tag wurden zunächst drei Waschschrte mit TBS-T durchgeführt und es erfolgte anschließend die Applikation des Sekundärantikörpers, welcher für weitere 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Nach drei weiteren Waschschrten mit TBS-T war der Western Blot abgeschlossen und es konnten mit dem Odyssey Reader, unter Verwendung des Programms Image Studio, die entsprechenden Banden dargestellt werden.

### **2.2.16 Statistische Auswertung**

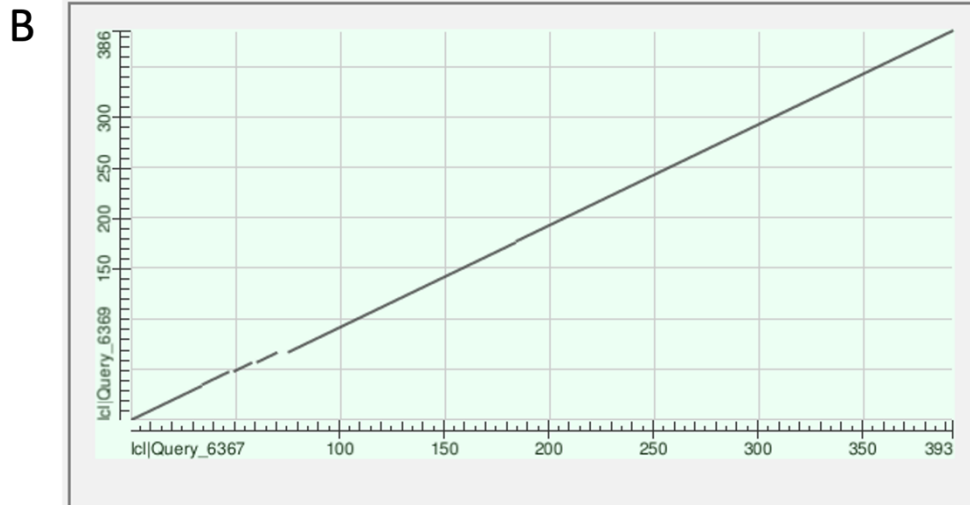
Im Rahmen der statistischen Analyse wurden zunächst die Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Messungen berechnet. Die Darstellung und Auswertung erfolgte anschließend mit GraphPad, Prism 8. Dabei wurde auf Unterschiede der zu vergleichenden Gruppen mittels ANOVA, Dunnett und Tukey-Test, geprüft. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  festgelegt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Hohe Übereinstimmung der humanen und porcinen p53-Proteinsequenzen

**A**

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
609 bits(1571)	0.0	Compositional matrix adjust.	321/395(81%)	341/395(86%)	11/395(2%)
Query 1	MEEPQSDPSVEPPLSQETFSDLWKLLPENNVLSP-LPSQAMDDLMLSPDDIEQWFTEDPG				59
Sbjct 1	MEE QS+ VEPPLSQETFSDLWKLLPENN+LS L A++DL+LSP + W E+P				57
Query 60	PDEAPRMPEAAPRVAPAPAAPTPAAPAPAPSWPLSSSVPSQKTYQGSYGFRLGFLHSGTA				119
Sbjct 58	-DDASRVPAAP-----AATAPAPAPAPATSWPLSSFVPSQKTYPGSYDFRLGFLHSGTA				111
Query 120	KSVTCTYSPALNKMFCQLAKTCPVQLWVDSTPPPGRVTRAMAIYKQSQHMTEVVRRCPHH				179
Sbjct 112	KSVTCTYSPALNK+FCQLAKTCPVQLWV S PPPGRVTRAMAIYK+S++MTEVVRRCPHH				171
Query 180	ERCSD-SDGLAPPQHLIRVEGNLRVEYLDDRNTFRHSVVVPEPPEVGSDCCTTIHYNMC				238
Sbjct 172	ER SD SDGLAPPQHLIRVEGNLR EYLDDRNTFRHSVVVPEPPEVGSDCCTTIHYNFMC				231
Query 239	NSSCMGMNRRPILTIITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCACAGRDRRTEENLRKKGEPHHE				298
Sbjct 232	NSSCMGMNRRPILTIITLED+SGNLLGRNSFEVRVCAC GRDRRTEEN KKG+ E				291
Query 299	LPPGSTRKRALPNNTSSSPQPKKPLDGEYFTLQIRGRERFEMFRELNEALELKDAQAGKE				358
Sbjct 292	PPGSTRKRALP +TSSSP KKKPLDGEYFTLQIRGRERFEMFRELN+ALELKDAQ +E				351
Query 359	PGGSRAHSSHLKSKKGQSTSRHKKLMFKTEGPDSD			393	
Sbjct 352	G +RAHSSHLKSKKGQS SRHKK MFK EGPDSD			386	



**Abbildung 18: Darstellung der übereinstimmenden Sequenzen des humanen und des porcinen p53-Proteins**

(A) Gegenüberstellung der Aminosäuresequenzen, Query: Humanes-p53 (*Homo sapiens*), Subject: Porcines-p53 (*Sus scrofa*). Die mittlere Zeile zwischen Query und Subject stellt dabei die Qualität des jeweiligen Alignments dar: Buchstabe = identische Aminosäure, + = konservativer Austausch einer Aminosäure mit ähnlichen biochemischen Eigenschaften, Leerzeichen = neutral oder negativer Match, - = Lücke. (B) Dot Blot zur bildlichen Darstellung der übereinstimmenden Sequenzen, X-Achse: Humanes-p53 (*Homo sapiens*), Y-Achse: Porcines-p53 (*Sus scrofa*). (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

## Ergebnisse

Da für die p53-Überexpression in den humanen ARPE-19-Zellen als auch in den primären porcinen RPE-Zellen, das humane p53-Protein verwendet wurde, musste im Vorfeld die Homologie des menschlichen und des Schweine p53-Proteins überprüft werden.

**Tabelle 14: Ergebnisse des Proteinsequenzvergleichs**

Query: Schweine-p53 ( <i>Sus scrofa</i> ), Subject: Menschliches-p53 ( <i>Homo sapiens</i> )	
<b>Abdeckung (<i>Query cover</i>)</b>	100 %
<b>Aminosäureübereinstimmung (<i>Percent identity</i>)</b>	81,01 %
<b>E-Wert</b>	0,0

Der zuvor beschriebene Sequenzvergleich über BLAST® (Kapitel 2.2.1) zeigte, dass alle Abschnitte der humanen p53-Proteinsequenz den porcinen p53-Sequenzen zugeordnet werden konnten, was einer Abdeckung (*Query cover*) von 100 % entspricht. Weiterhin liegen bei insgesamt 81,08 % jeweils die identischen Aminosäuren, in beiden Proteinen vor (*Percent identity*). Der E-Wert liegt bei 0,0. (Abbildung 18, Tabelle 14,). Anhand dieser signifikanten Übereinstimmung, der beiden Proteinsequenzen, konnte von einer ausreichenden Ähnlichkeit ausgegangen werden, weshalb im weiteren Verlauf das humane p53-Plasmid auch zur Transfektion der primären porcinen RPE-Zellen verwendet wurde.

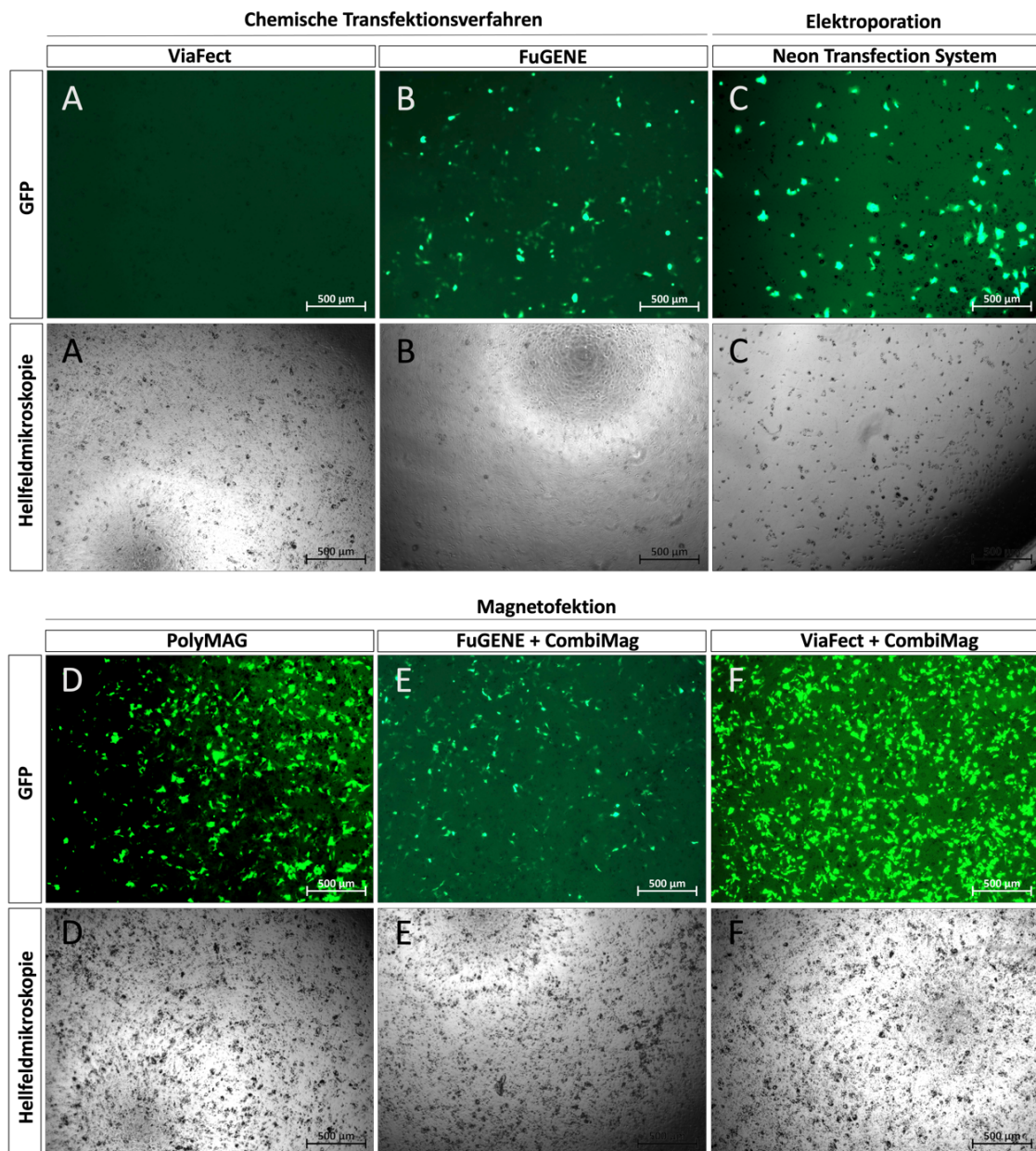
## 3.2 Ergebnisse der Transfektionsetablierung

### 3.2.1 Die Magnetofektion mit CombiMag und ViaFect™ als effizientestes Transfektionsverfahren der primären porcinen RPE-Zellen

Nachdem eine entsprechend große Homologie des menschlichen- und des Schweine-p53-Proteins nachgewiesen wurde, erfolgte im Anschluss zunächst die Etablierung der Transfektion der primären RPE-Zellen. Dies geschah unter Verwendung des GFP-Plasmids, nach dem zuvor beschriebenen Vorgehen (Kapitel 2.2.8). Im ersten Schritt wurden dabei die Fluoreszenzsignale der einzelnen Transfektionsansätze jeweils 24h nach der durchgeführten Transfektion dokumentiert und miteinander verglichen. Im Folgenden werden

## Ergebnisse

die erfolgreichsten Ansätze der verschiedenen Verfahren dargestellt (Abbildung 19, Tabelle 15).



**Abbildung 19: Fluoreszenzmikroskopischer Vergleich der verschiedenen Transfektionsetablierungsansätze bei primären porcinen RPE-Zellen**

Die Übersicht zeigt die Fluoreszenzsignale (entsprechend GFP-exprimierter Zellen), der verschiedenen Transfektionsverfahren. A: Viafect™, B: FuGENE® HD, C: Neon Transfection System, D: PolyMag, E: FuGENE® HD + CombiMag, F: Viafect™ + CombiMag. Die Aufnahmen wurden jeweils 24h nach der durchgeführten Transfektion, unter Verwendung von jeweils 0,5 µg des GFP-Plasmids, aufgenommen. Dabei wies die Magnetofektion deutlich bessere Transfektionseffizienzen im Vergleich zur rein chemischen Transfektion und der Elektroporation auf. Die höchste Transfektionseffizienz wurde dabei durch die Kombination von ViaFect™ und CombiMag erzielt.

## Ergebnisse

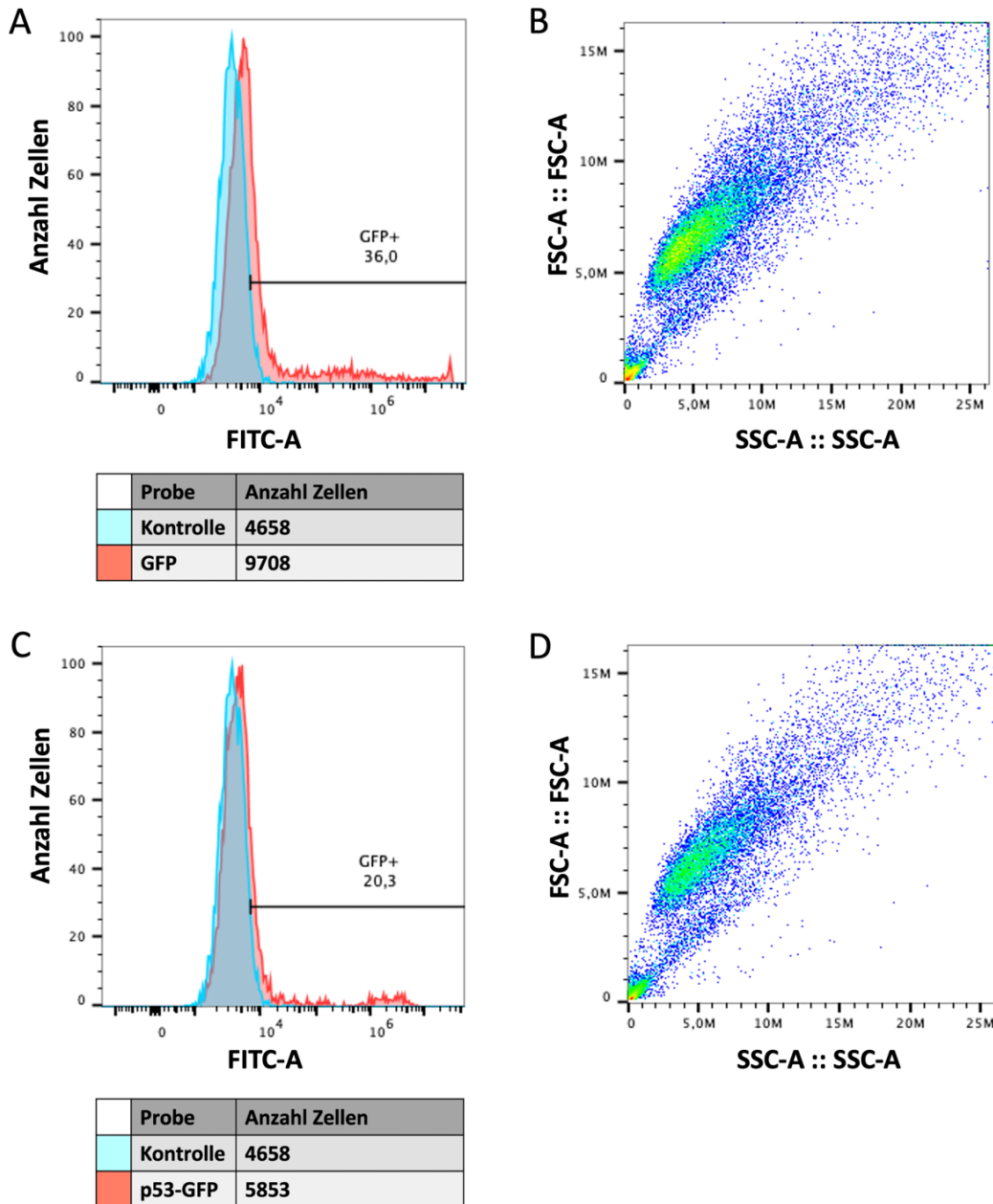
**Tabelle 15: Transfektionsetablierungsergebnisse der primären RPE-Zellen;**  
#Effizienzbestimmung in Durchflusszytometrie; ##Effizienzbestimmung per Auszählung

Transfektionsverfahren	Erfolgreichster Ansatz (Plasmid:Reagenz:Reagenz)	Effizienz
CombiMag + ViaFect™	1:3:1,25	36 % # (Abb. 20)
PolyMag	1:3	~10-15 % ##
CombiMag + FuGENE® HD	1:3:1,25	~ 10 % ##
Elektroporation	In Tabelle 13 mit * markiert	~5 - 10 % ##
FuGENE® HD	1:6	<5 % ##
ViaFect™	/	0 % ##

Im direkten Vergleich der verschiedenen Verfahren wurde festgestellt, dass die Magnetofektion im Verhältnis von 1:3:1,25 (Plasmid: ViaFect™: CombiMag) und dem Einsatz von 0,5 µg Plasmid pro Well, die höchste Transfektionseffizienz bei primären RPE-Zellen aufwies. Die Inkubationszeit auf der Magnetplatte betrug dabei 60 Minuten. Die Menge an Plasmid konnte im weiteren Verlauf auf 0,2 µg pro Well gesenkt werden, ohne einen Schwund der Transfektionseffizienz im Fluoreszenzmikroskop zu beobachten. Das hierbei festgestellte Verhältnis wurde für alle späteren Transfektionen primärer RPE-Zellen verwendet.

Im nächsten Schritt wurde neben dem GFP-Plasmid das p53-GFP-Plasmid im gleichen Verhältnis eingesetzt und es wurde eine Durchflusszytometrie, zur genauen Bestimmung der Transfektionseffizienzen, durchgeführt. Unter Verwendung des GFP-Plasmids lag die Transfektionseffizienz dabei bei 36 %, demgegenüber die Transfektionseffizienz des p53-GFP-Plasmids bei 20,3 % (Abbildung 20). Weiterhin wurde die p53-Überexpression sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene, anhand einer Immunfluoreszenzfärbung, eines Western Blots und einer qRT-PCR, nachgewiesen (Abbildung 21).

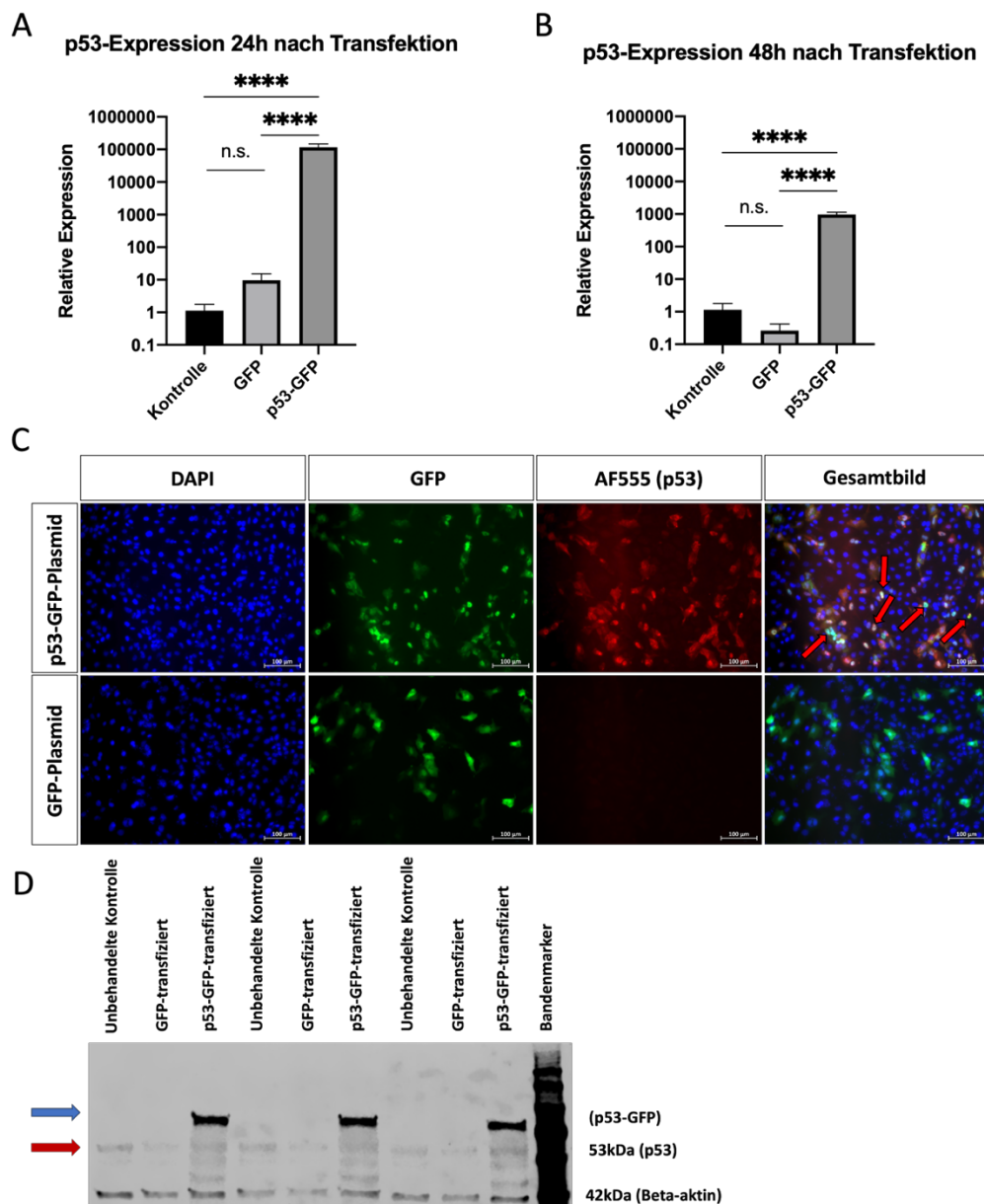
## Ergebnisse



### Abbildung 20: Durchflusszytometrie GFP- und p53-GFP-transfizierter primärer porciner RPE-Zellen

Durchflusszytometrie zur Transfektionseffizienzbestimmung der primären porcinen RPE-Zellen, 24h nach Transfektion. (A) Histogramm der GFP-transfizierten RPE-Zellen. (B) Populationsverteilung der GFP-transfizierten RPE-Zellen. (C) Histogramm der p53-GFP-transfizierten RPE-Zellen. (D) Populationsverteilung der p53-GFP-transfizierten RPE-Zellen. Die Transfektionseffizienz der GFP-transfizierten Zellen betrug 36 %, die der p53-GFP-transfizierten Zellen 20,3 %. Bei den fluoreszierenden Populationen im unteren linken Bereich der Populationsverteilungen (B, D) handelt es um kaputte Zellen und Zellbestandteile, zu denen es in Folge der Transfektion kommt. Die vitale Population der transfizierten Zellen kann davon eindeutig abgegrenzt werden.

## Ergebnisse



**Abbildung 21: mRNA- und Protein-Nachweis der p53-Überexpression in primären RPE-Zellen**

(A, B) Die in der qRT-PCR gemessene p53-mRNA-Expression war sowohl 24h als auch 48h nach Transfektion signifikant erhöht, im Vergleich zu den GFP-transfizierten Zellen sowie der unbehandelten Kontrolle. Weiterhin zeigt sich weder nach 24h noch nach 48h eine signifikant erhöhte p53-Genexpression GFP-transfizierter Zellen gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Für die Darstellung der Y-Achse wurde eine Logarithmuskala zur Basis 10 gewählt. N=4; One-way ANOVA Test; Darstellung der Daten als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. \* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\* =  $p \leq 0,0001$  signifikant unterschiedlich; n.s. = nicht signifikant. (C) Immunfluoreszenzfärbung transfizierter primärer porciner RPE-Zellen. Im Gesamtbild (rote Pfeile) kann durch die Überlagerung des exprimierten GFP-Signals, der DAPI-Färbung sowie der p53-Antikörperfärbung auf das Vorliegen von p53 im Zellkern geschlossen werden. (D) Western Blot des endogenen p53-Proteins (roter Pfeil) sowie des p53-GFP-transfizierten Proteins, dass durch den GFP-Tag eine erhöhte Molekularmasse aufweist (blauer Pfeil).

## Ergebnisse

Die analysierten mRNA-Expressionen der p53-transfizierten Zellen waren sowohl nach 24h als auch nach 48h deutlich und signifikant erhöht ( $p \leq 0,0001$ ), gegenüber den GFP-transfizierten Zellen und den unbehandelten Kontrollen. Die Transfektion mit dem GFP-Plasmid wurde dabei als Behandlungskontrolle verwendet, wobei dessen p53-Expression dabei im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen nicht signifikant erhöht war. Dies beweist, dass die veränderte Genexpression auf das transfizierte p53-GFP-Plasmid zurückzuführen ist und nicht durch das Transfektionsreagenz induziert wurde. Weiterhin lässt sich im Vergleich der Expressionen 24h bis 48h, bei den p53-GFP-transfizierten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, eine Abnahme der p53-Expression um den Faktor 116 beobachten (116.000-fache Expression nach 24h, 1.000-fache Expression nach 48h) (Abbildung 21A, B).

Durch die Kolokalisierung des p53-GFP-Signals, der p53-Antikörperfärbung und der nur den Zellkern anfärbenden DAPI-Färbung konnte weiterhin festgestellt werden, dass sich das transfizierte p53-GFP-Protein im Zellkern befindet (Abbildung 21C, p53-GFP-Plasmid, Gesamtbild, rote Pfeile). In der Immunfluoreszenzaufnahme der Kontroll-GFP-transfizierten Zellen gab es dabei keine Anfärbung durch den verwendeten p53-Antikörper. Außerdem lokalisierte das Signal, des zur Kontrolle eingesetzten Kontroll-GFP-Plasmids vor allem im Zytoplasma der Zellen (Abbildung 21C, GFP-Plasmid, Gesamtbild), was abermals auf die spezifische Lokalisierung des p53-Proteins hinweist.

Das im Western Blot dargestellte, durch die Transfektion exprimierte, p53-GFP-Protein war insgesamt größer als die zu erwartende Größe von 53 kDa (Abbildung 21D, blauer Pfeil). Dies lässt sich durch den GFP-Tag erklären, der an das p53-Protein gekoppelt ist und folglich zu einer erhöhten Proteinmasse führt.

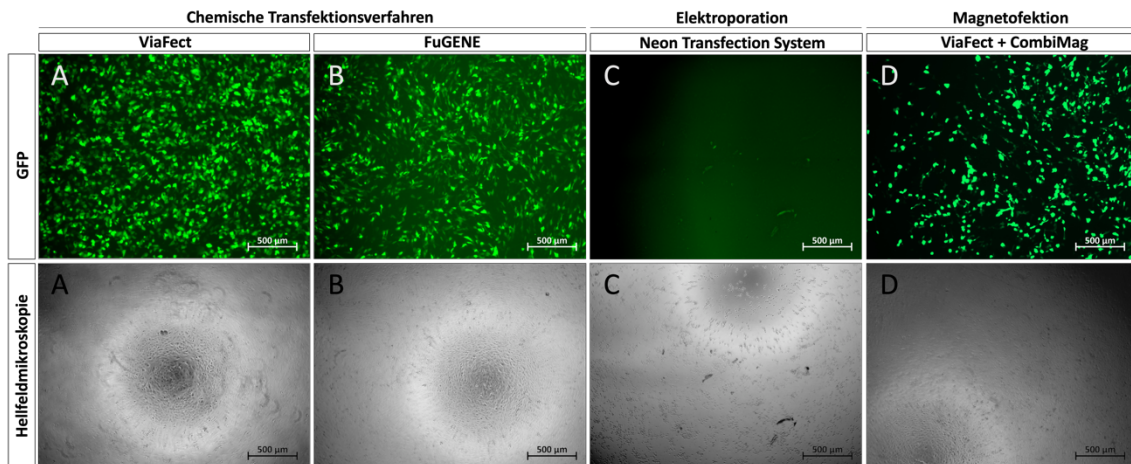
Weiterhin konnte in allen Proben eine leichte Bande auf Höhe von 53 kDa beobachten werden, was das endogen exprimierte p53-Protein darstellt und so

## Ergebnisse

dessen Expression in primären porcinen RPE-Zellen beweist (Abbildung 21D, roter Pfeil).

### 3.2.2 FuGENE® HD als effizientestes Transfektionsverfahren bei Zellen der ARPE-19-Zelllinie

Im Anschluss an die Transfektionsetablierung der primären porcinen RPE-Zellen folgte die Transfektionsetablierung bei Zellen der humanen ARPE-19-Zelllinie.



**Abbildung 22: Fluoreszenzmikroskopischer Vergleich der verschiedenen Transfektionsetablierungsansätze bei ARPE-19-Zellen**

Die Übersicht zeigt die Fluoreszenzsignale (entsprechend GFP-exprimierter Zellen), der verschiedenen Transfektionsverfahren. A: Viafect™, B: FuGENE® HD, C: Neon Transfection System, D: ViaFect™ + CombiMag. Die Aufnahmen wurden jeweils 24h nach der durchgeführten Transfektion, unter Verwendung von jeweils 0,5 µg des GFP-Plasmids, aufgenommen. Dabei wiesen sowohl ViaFect™, als auch FuGENE® HD die besten Transfektionseffizienzen auf.

Dabei wurde die Etablierung erneut nach dem zuvor verwendeten Verfahren (Kapitel 2.2.8) durchgeführt, wobei ViaFect™, FuGENE® HD, die Elektroporation mit dem Neon™ Transfections System und die Magnetfektion, unter Verwendung von ViaFect™ und CombiMag, eingesetzt wurden. Auch hierbei wurde im ersten Schritt das GFP-Plasmid zusammen mit den verschiedenen Transfektionsreagenzien verwendet und nach 24h die Anzahl der GFP-exprimierenden Zellen jeweils miteinander verglichen (Abbildung 22, Tabelle 16).

## Ergebnisse

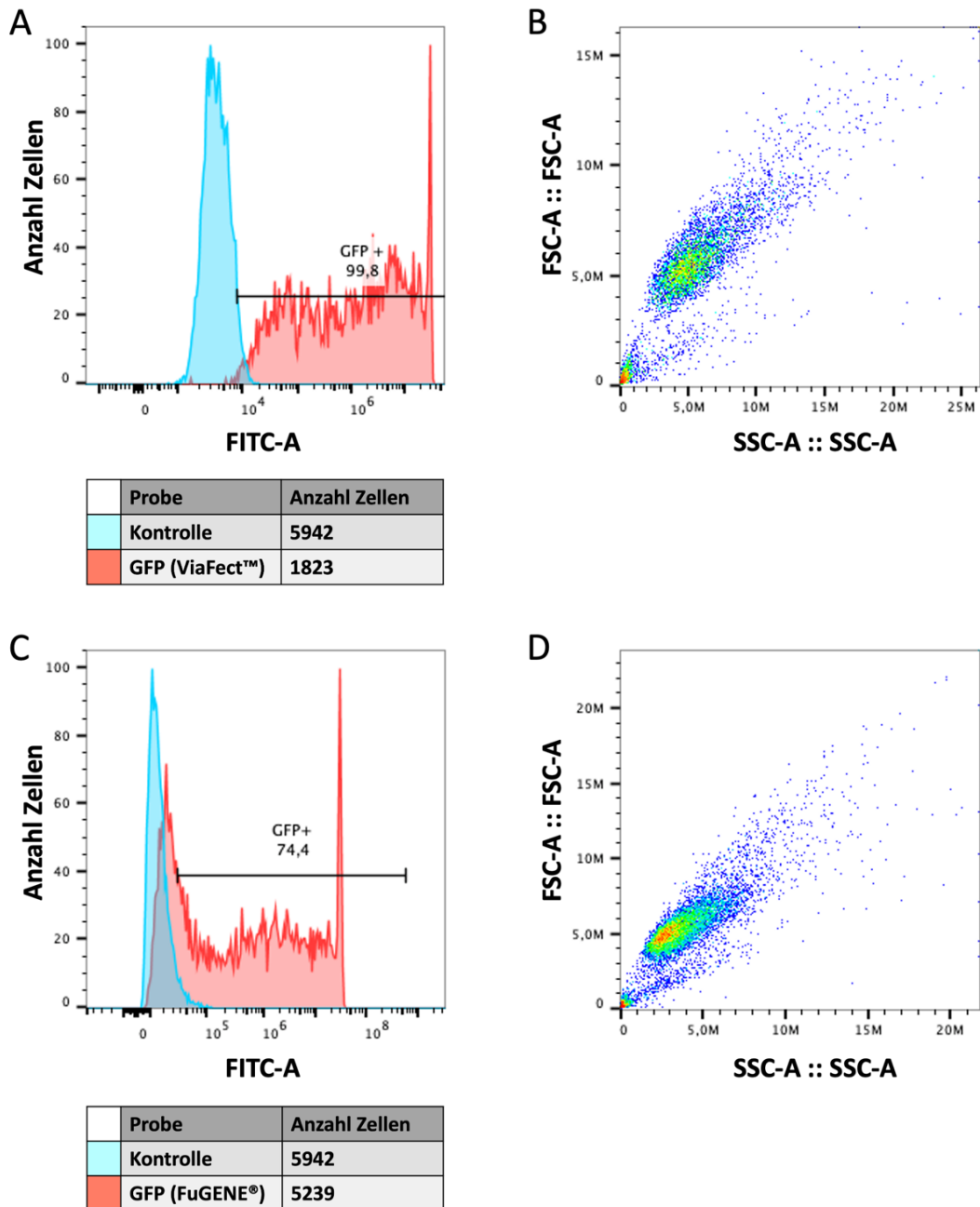
**Tabelle 16: Transfektionsetablierungsergebnisse der ARPE-19-Zellen;**  
#Effizienzbestimmung in Durchflusszytometrie; ##Effizienzbestimmung per Auszählung

<b>Transfektionsverfahren</b>	<b>Erfolgreichster Ansatz (Plasmid:Reagenz:Reagenz)</b>	<b>Effizienz</b>
ViaFect™	1:3	>99 % # (Abb. 23)
FuGENE® HD	1:3	75 % # (Abb. 23)
CombiMag + ViaFect™	1:6:1,25	15-20 % ##
Elektroporation	In Tabelle 13 mit * markiert	<5 % ##

Im direkten Vergleich waren die Transfektionsreagenzien ViaFect™ und FuGENE® HD bei den ARPE-19-Zellen erfolgreich. Diese wurden dabei in der 96-Well-Kulturplatte jeweils im Verhältnis von 1:3 (Plasmid: Reagenz) und einer Komplex-Inkubationszeit von 15 Minuten eingesetzt. Weiterhin konnte auch hier die Plasmidmenge auf 0,2 µg pro Well reduziert werden, ohne eine Verringerung der Transfektionseffizienzen zu beobachten.

Da zunächst beide Reagenzien eine hohe Transfektionseffizienz unter dem Fluoreszenzmikroskop aufwiesen, wurden die beiden Transfektionsreagenzien im nächsten Schritt unter der erneuten Verwendung des GFP-Plasmids genauer untersucht. Im weiteren Verlauf wurde eine Durchflusszytometrie (Abbildung 23), eine Untersuchung der Fluoreszenzen über 72h (Abbildung 24) sowie eine Zellassay basierte Toxikologieprüfung (Abbildung 25) durchgeführt, um das effizientere, weniger toxische Reagenz zu bestimmen.

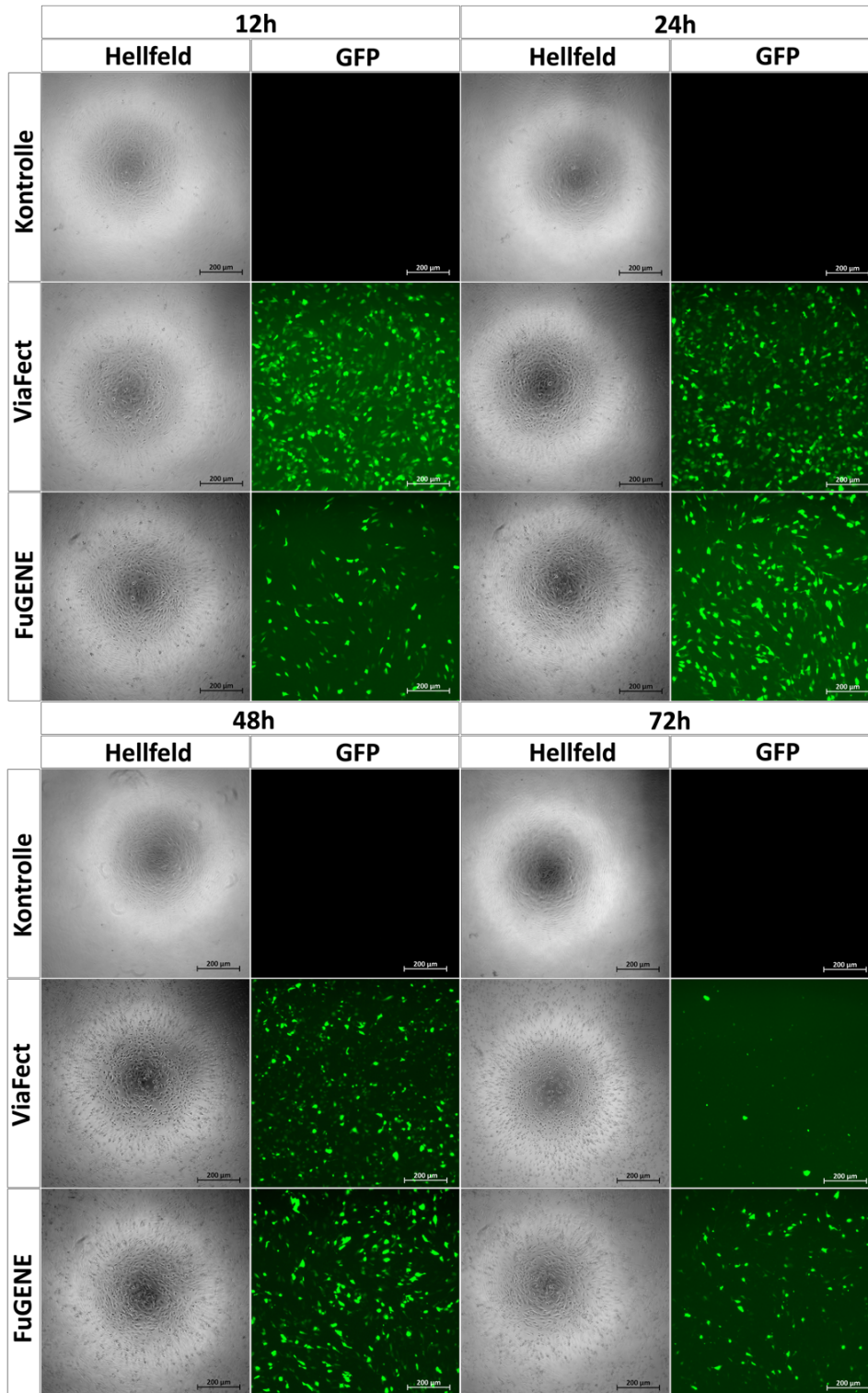
## Ergebnisse



**Abbildung 23: Höhere Transfektionseffizienz ViaFect™ transfizierter ARPE-19-Zellen, im Vergleich zu FuGENE® HD transfizierten Zellen**

Durchflusszytometrie zur Transfektionseffizienzbestimmung, ViaFect™ und FuGENE® HD, GFP-transfizierter ARPE-19-Zellen, 24h nach Transfektion. (A) Histogramm der mit ViaFect™ GFP-transfizierten ARPE-19-Zellen. (B) Populationsverteilung der mit ViaFect™ GFP-transfizierten ARPE-19-Zellen. (C) Histogramm der mit FuGENE® HD GFP-transfizierten ARPE-19-Zellen. (D) Populationsverteilung der mit FuGENE® HD GFP-transfizierten ARPE-19-Zellen. Die Transfektionseffizienz unter Verwendung von ViaFect™ betrug 99,8 %, die der mit FuGENE® HD transfizierten Zellen 74,4 %. Bei den fluoreszierenden Populationen im unteren linken Bereich der Populationsverteilungen (B, D) handelt es um kaputte Zellen und Zellbestandteile, zu denen es in Folge der Transfektion kommt. Die vitale Population der transfizierten Zellen kann davon eindeutig abgegrenzt werden.

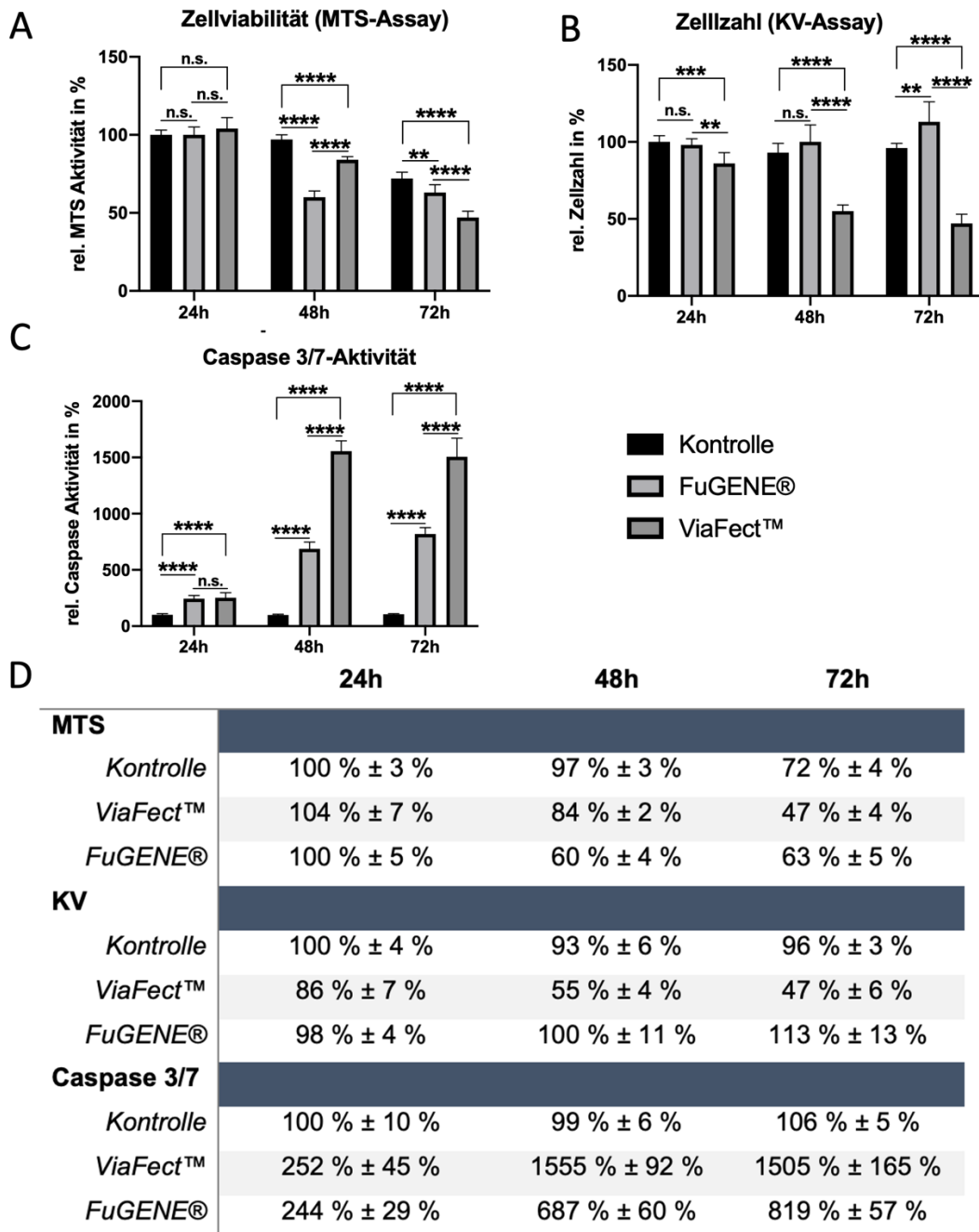
# Ergebnisse



**Abbildung 24: Schnellere Expressionsabnahme ViaFect™ transfizierter ARPE-19-Zellen, im Vergleich zu FuGENE® HD**

Fluoreszenz- und hellfeldmikroskopischer Vergleich der Genexpressionen, ViaFect™ und FuGENE® HD, GFP-transfizierter ARPE-19-Zellen über 72h. Dabei ist eine deutlich reduzierte Anzahl GFP-exprimierender Zellen in der ViaFect™ Gruppe, nach 48h und 72h, im Vergleich zur FuGENE® HD-Gruppe, zu erkennen.

## Ergebnisse



**Abbildung 25: Erhöhte Toxizität ViaFect™ transfizierter ARPE-19-Zellen, im Vergleich zu FuGENE® HD**

Toxikologischer Vergleich, ViaFect™ und FuGENE® HD, GFP-transfizierter ARPE-19-Zellen über 72h. (A) MTS-Assay. (B) Kristallviolett-Färbung. (C) Caspase-3/7-Assay. (D) Übersicht der Werte aus A, B & C. Die mit ViaFect™ transfizierten Zellen weisen eine deutlich erhöhte Toxizität auf im Vergleich zu den mit FuGENE® HD transfizierten Zellen, feststellbar an der fast doppelt so hohen Caspaseaktivität, nach 72h (C). Weiterhin deutlich reduzierte Zellzahl der mit ViaFect™ transfizierten Zellen, gegenüber der FuGENE® HD transfizierten Zellen, nach 72h (B). Darstellung der Daten relativ zur jeweiligen 24h Kontrolle als Mittelwert ± Standardabweichung. N = 6, One-way ANOVA Test; \* = p ≤ 0,05; \*\* = p ≤ 0,01; \*\*\* = p ≤ 0,001; \*\*\*\* = p ≤ 0,0001 signifikant unterschiedlich zwischen den jeweiligen Gruppen; n.s. = nicht signifikant.

## Ergebnisse

Die Transfektionseffizienz unter Verwendung des GFP-Plasmids betrug mit ViaFect™ 99,8 % (Abbildung 23A). Unter Einsatz von FuGENE® HD lag die Effizienz bei 74,4 % (Abbildung 23C). Der Zeitpunkt der höchsten Plasmidexpression lag sowohl bei den mit ViaFect™ als auch mit FuGENE® HD transfizierten ARPE-19-Zellen bei 24h (Abbildung 24). Nach dem 24h Zeitpunkt ließ sich bei beiden Reagenzien ein Expressionsrückgang beobachten, wobei bei den mit ViaFect™ transfizierten Zellen nach 72h nahezu keine Expression mehr vorhanden war.

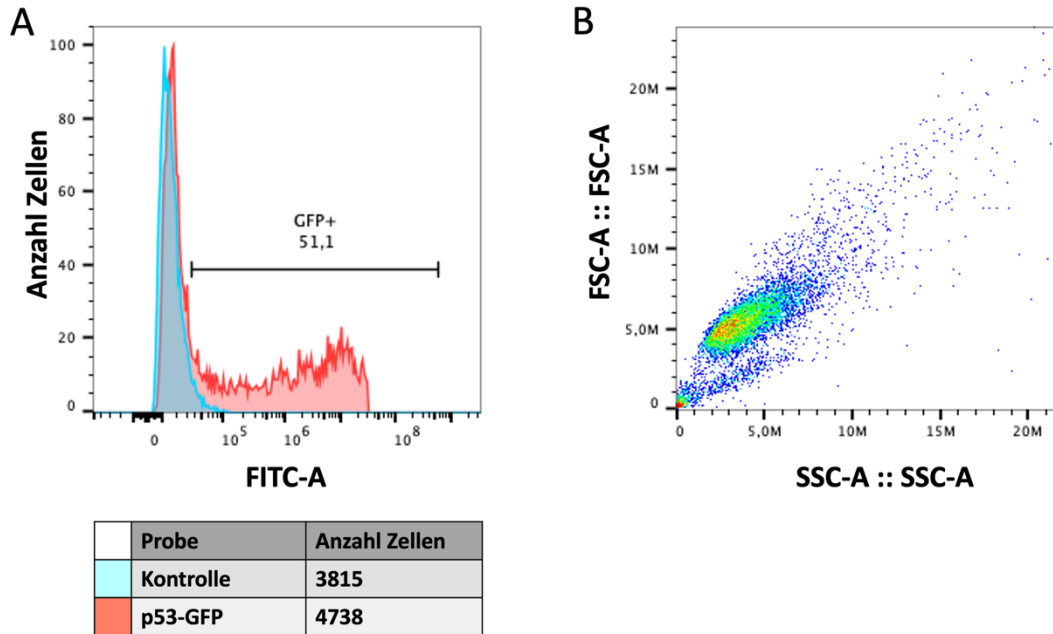
Die MTS-Messung verzeichnete nach 72h eine Abnahme in allen drei Gruppen, wobei die Viabilität der ViaFect™ transfizierten Zellen mit einer Messung von  $47 \% \pm 4 \%$  am niedrigsten lag (Abbildung 25A). Weiterhin zeigte sich bei den mit ViaFect™ transfizierten Zellen eine deutliche Reduktion der Zellzahl 48h und 72h nach Transfektion, im Vergleich zur Kontrolle ( $55 \% \pm 4 \%$  und  $47 \% \pm 6 \%$ ) (Abbildung 25B). Adäquat dazu war die Caspase-3/7-Aktivität bei den mit ViaFect™ transfizierten Zellen, gegenüber den mit FuGENE® HD transfizierten Zellen, 48h nach Transfektion, um den Faktor 2,2 erhöht ( $1555 \% \pm 92 \%$  zu  $687 \% \pm 60 \%$ ), nach 72h um den Faktor 1,8 ( $1505 \% \pm 165 \%$  zu  $819 \% \pm 57 \%$ ) (Abbildung 25C, D).

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass bei der Transfektion von ARPE-19-Zellen ViaFect™ als Transfektionsreagenz zwar zu einer erhöhten Transfektionsrate führte, das Reagenz jedoch auch eine deutlich erhöhte Toxizität gegenüber FuGENE® HD aufwies. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde die Apoptose als ein wichtiger Indikator für eine mögliche p53-Zielgen Induktion untersucht, weshalb folglich FuGENE® HD als Transfektionsreagenz für die ARPE-19-Zellen, in dem zuvor beschriebenen Reagenzverhältnis von 1:3 (Plasmid: Reagenz), bestimmt wurde.

Anschließend an die Etablierung wurden ARPE-19-Zellen erstmals mit dem p53-GFP-Plasmid im zuvor etablierten Verhältnis transfiziert und es erfolgte eine erneute Durchflusszytometrie, zur Bestimmung der Transfektionseffizienz,

## Ergebnisse

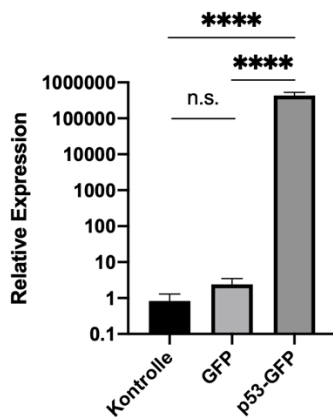
des p53-GFP-Plasmids. Außerdem erfolgte ebenfalls, wie bei den primären RPE-Zellen zuvor, der Nachweis der p53-Überexpression auf Gen- und Proteinebene, anhand einer Immunfluoreszenzfärbung, eines Western Blots und einer qRT-PCR (Abbildung 26, 27).



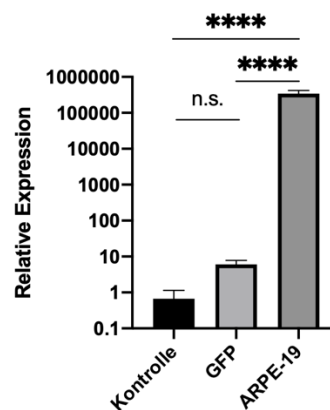
**Abbildung 26: Durchflusszytometrie p53-GFP-transfizierter ARPE-19-Zellen**

Durchflusszytometrie zur Transfektionseffizienzbestimmung p53-GFP-transfizierter ARPE-19-Zellen, 24h nach Transfektion. (A) Histogramm p53-GFP-transfizierter ARPE-19-Zellen. (B) Populationsverteilung der p53-GFP-transfizierten ARPE-19-Zellen. Unter Verwendung des p53-GFP-Plasmids betrug die Transfektionseffizienz 51,1 %. (B) Die vitale Population der transfizierten Zellen kann davon eindeutig abgegrenzt werden.

**A p53-Expression 24h nach Transfektion**



**B p53-Expression 48h nach Transfektion**





## Ergebnisse

Die Transfektionseffizienz unter Einsatz des p53-GFP-Plasmids lag bei 51,1 % (Abbildung 26A), wobei auch hier die transfizierte Zellpopulation eindeutig von nicht transfizierten und abgestorbenen Zellen abgegrenzt werden konnte. Wie zuvor bestimmt, lag die Transfektionseffizienz des adäquaten GFP-Plasmids bei 74,4 % (Abbildung 23C).

Die in der qRT-PCR gemessenen, p53-GFP-transfizierten ARPE-19-Zellen, wiesen sowohl nach 24h als auch nach 48h eine signifikant erhöhte p53-Genexpression ( $p \leq 0,0001$ ), gegenüber den mit GFP-transfizierten Zellen sowie den unbehandelten Zellen auf. Der Vergleich der GFP-transfizierten Zellen und der unbehandelten Zellen ergab keinen signifikanten p53-Expressionsunterschied, so dass auch bei den ARPE-19-Zellen bewiesen wurde, dass die p53-Expression durch das transfizierte Plasmid und nicht durch das verwendete Transfektionsreagenz induziert wurde. Während bei den primären RPE-Zellen die Expression des p53-Proteins im Zeitraum von 24h bis 48h nach der Transfektion um mehr als den Faktor 100 abgenommen hatte, ist diese bei den ARPE-19-Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nur geringfügig zurückgegangen (430.000-fache Expression nach 24h, 350.000-fache Expression nach 48h) (Abbildung 27A, B).

Wie bei den primären RPE-Zellen konnte auch bei den ARPE-19-Zellen eine Kolokalisation des p53-GFP-Signals, der p53-Antikörper- und DAPI-Färbung festgestellt werden (Abbildung 27C, p53-GFP-Plasmid, Gesamtbild, rote Pfeile). Dies zeigt abermals, dass sich das transfizierte p53-Protein, wie bereits bei den primären Zellen, im Zellkern befindet.

Weiterhin konnte im Western-Blot die p53-Überexpression auf Proteinebene bestätigt werden, wobei auch hier die Bande oberhalb der 53 kDa Bande verläuft. Dies ist dabei abermals auf das gekoppelte GFP-Protein zurückzuführen (Abbildung 27D, erste Aufnahme, blauer Pfeil). In einer weiteren Aufnahme desselben Western Blots (Abbildung 27D, zweite Aufnahme, roter Pfeil) ist das endogene p53-Protein, das erst nach einer verlängerten Belichtungszeit sichtbar wird, dargestellt und lässt folglich auf eine sehr geringe Menge, an endogenem p53-Protein, in ARPE-19-Zellen schließen.

### **3.3 p53-Überexpression in ungestressten Zellen**

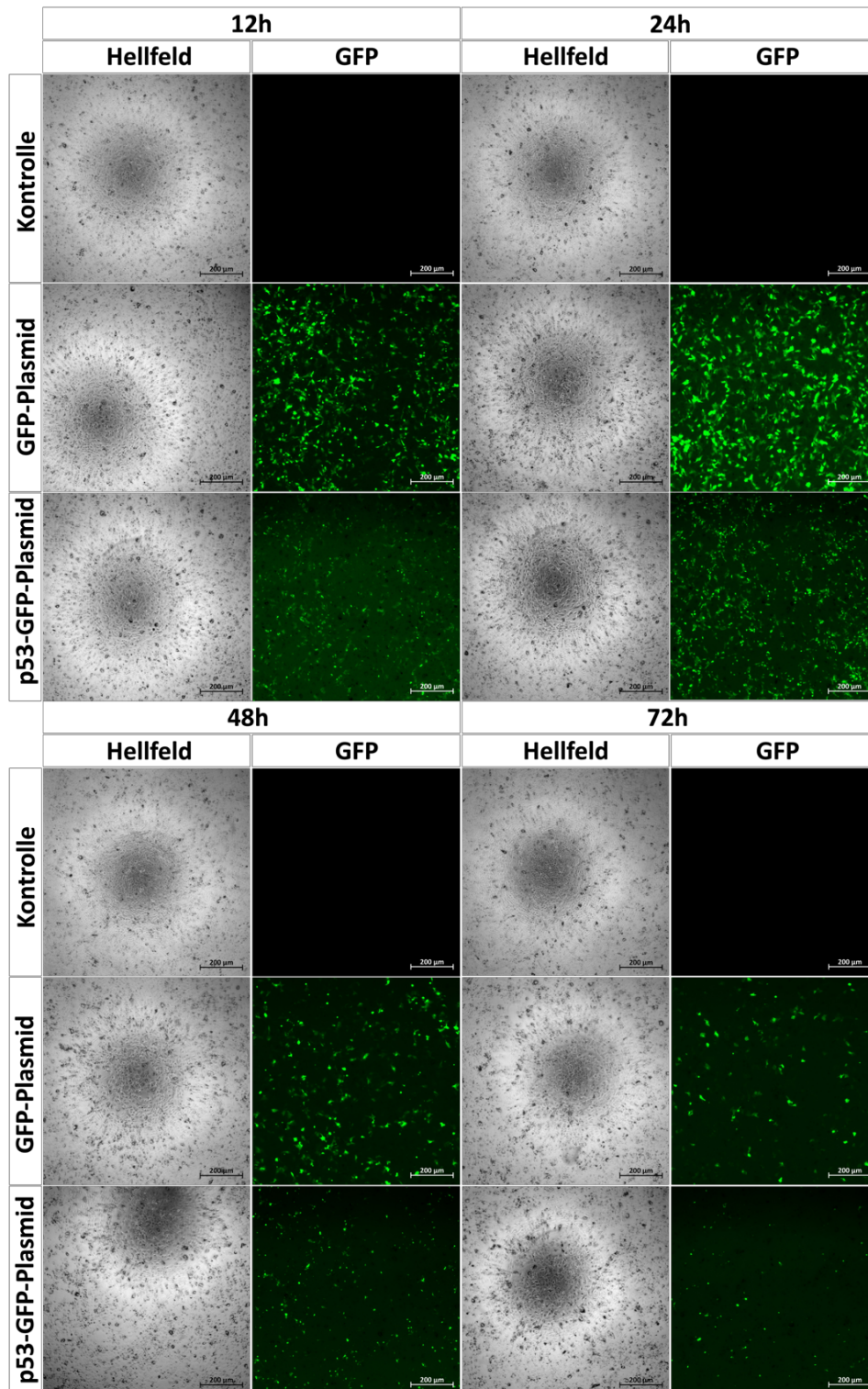
#### **3.3.1 Keine Apoptoseinduktion und kein Zellzyklusarrest durch eine p53-Überexpression in ungestressten primären RPE-Zellen**

Nachdem zuvor eine ausführliche Transfektionsetablierung beider Zellarten erfolgt war, wurden anschließend die Folgen der p53-Überexpression untersucht. Dies geschah zunächst ohne die Co-Behandlung Zellstress verursachender Reagenzien. Da wie zu erwarten, zuvor festgestellt wurde (Kapitel 3.2), dass die Transfektion eine gewisse toxische Wirkung hat, wurde im Folgenden immer der direkte Vergleich zwischen den p53-GFP-transfizierten Zellen und den GFP-transfizierten Zellen durchgeführt, wobei die GFP-transfizierten Zellen als Behandlungskontrolle dienten. Falls die p53-GFP-transfizierten Zellen dabei eine erhöhte Apoptose gegenüber den GFP-transfizierten Zellen aufweisen würden, würde dies für eine Induktion der Apoptose durch p53 sprechen.

Zunächst erfolgte eine Beobachtung der transfizierten primären RPE-Zellen im Fluoreszenz- und Hellfeldmikroskop über 72h, um den Zeitpunkt der höchsten Genexpression festzustellen. Dieser Zeitpunkt lag dabei bei 24h nach der Transfektion (Abbildung 28).

Um Effekte der p53-Überexpression zu evaluieren, wurden im darauffolgenden Schritt Zellassays der transfizierten primären RPE-Zellen 24h, 48h und 72h nach der Transfektion durchgeführt (Abbildung 29). Dabei erfolgte eine Messung der Zellviabilität (MTS-Assay), eine Bestimmung der Zellzahl (Kristallviolett-Färbung), eine Bestimmung der Aktivität der p53-Endpunkt-Caspasen-3 und -7 sowie eine Untersuchung der Zellproliferation, welche ebenfalls durch p53 beeinflusst werden kann, anhand eines BrdU-Assays.

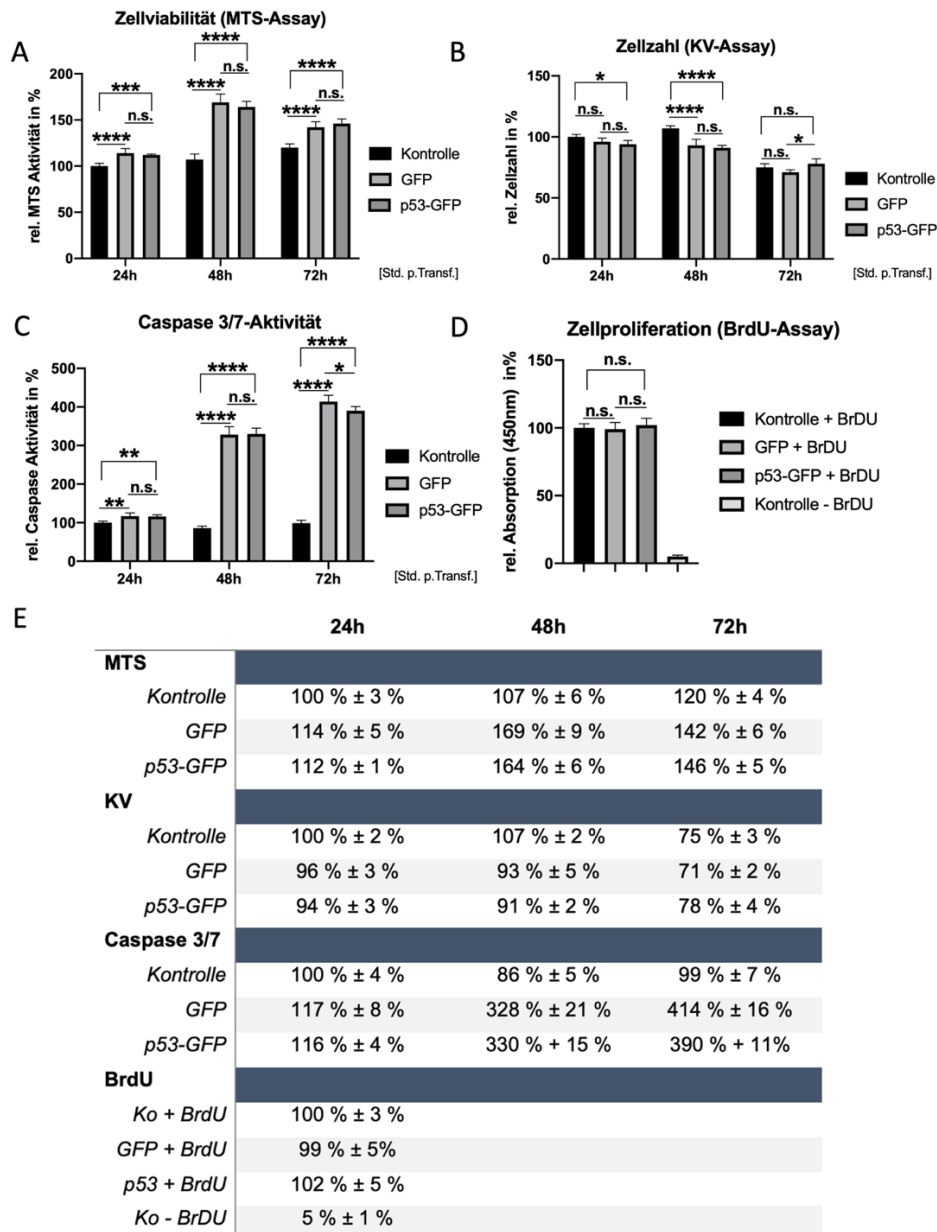
## Ergebnisse



**Abbildung 28: Zeitpunkt der höchsten Genexpression primärer porciner RPE-Zellen, 24h nach Transfektion**

Beobachtung und Vergleich der Genexpressionen p53-GFP- und GFP-transfizierter Zellen über 72h. In beiden transfizierten Gruppen zeigte sich eine Zunahme der Plasmidexpression bis 24h nach der Transfektion. Dies stellt den Zeitpunkt der höchsten Genexpression dar. Anschließend lässt sich sowohl in den p53-GFP als auch den GFP-transfizierten Zellen eine Abnahme der Fluoreszenzen erkennen.

## Ergebnisse



**Abbildung 29: Keine Apoptoseinduktion und kein Zellzyklusarrest in p53-überexprimierten primären RPE-Zellen in Zellassays feststellbar**

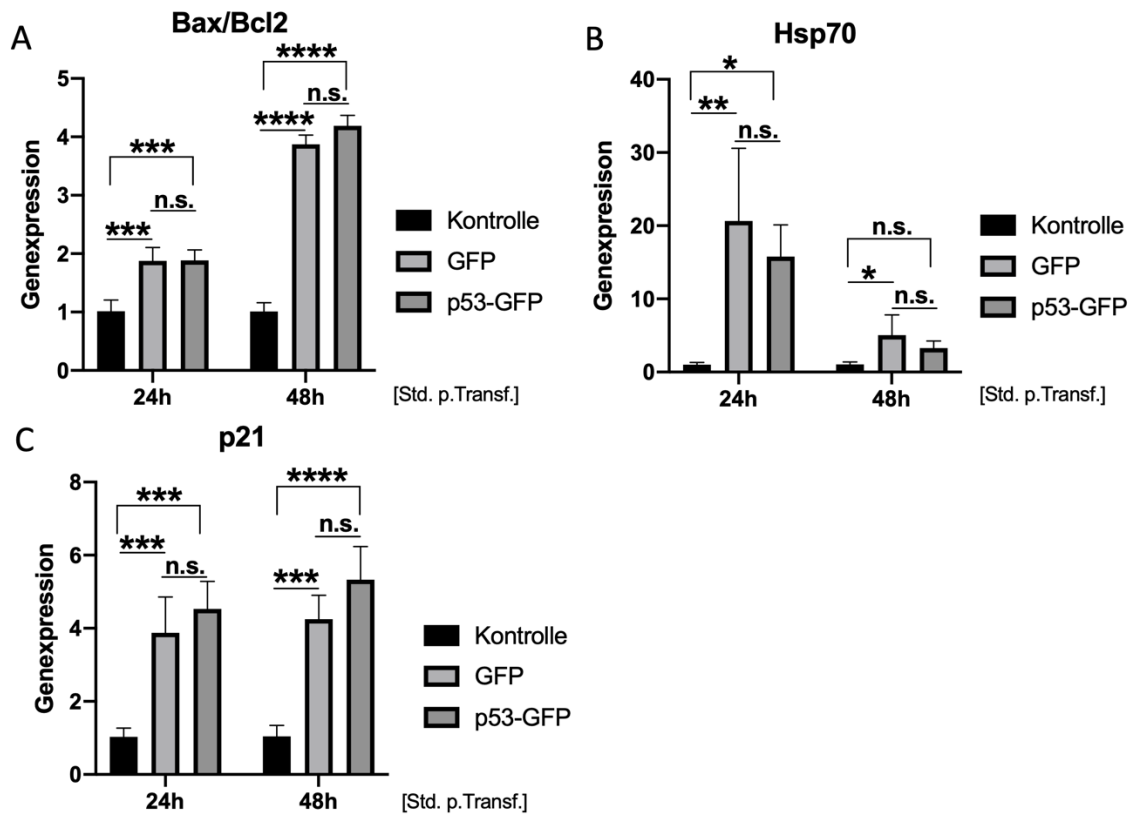
Zellassay Untersuchung p53-GFP und GFP-transfizierter primärer RPE-Zellen über 72h. (A) MTS-Assay. (B) Kristallviolettffärbung. (C) Caspase-3/7-Assay. (D) BrdU-Assay. (E) Übersichtstabelle der Werte aus A-D. Im MTS-Assay gab es zu keinem Zeitpunkt Unterschiede in der gemessenen Zellviabilität zwischen p53-GFP- und GFP-transfizierter Zellen. Weiterhin ließ sich nach 72h eine leichte Verringerung der im Kristallviolettffärbung gemessenen Zellzahl bei den GFP-transfizierten Zellen, im Vergleich zu den p53-GFP-transfizierten Zellen, feststellen ( $p \leq 0,05$ ). Keine gesteigerte Caspaseaktivität 24h oder 48h nach Transfektion. Nach 72h zeigte sich eine leicht erhöhte Caspaseaktivität, der GFP-transfizierten Zellen, gegenüber den p53-GFP-transfizierten Zellen ( $p \leq 0,05$ ). Im BrdU-Assay konnte kein Zellzyklusarrest, ausgelöst durch die p53-Überexpression, beobachtet werden. Darstellung der Daten relativ zur jeweiligen 24h Kontrolle als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. N = 5, One-way ANOVA Test; \* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\* =  $p \leq 0,0001$  signifikant unterschiedlich zwischen den jeweiligen Gruppen; n.s. = nicht signifikant.

## Ergebnisse

In der Viabilitätsbestimmung (MTS-Assay), zeigte sich 48h nach der Transfektion, gegenüber der unbehandelten Kontrolle, ein Anstieg in beiden transfizierten Gruppen (GFP: 1,7-fach; p53-GFP: 1,6-fach), welcher bis zum 72h Zeitpunkt wieder leicht rückläufig war. Zwischen den p53-GFP-transfizierten Zellen und den GFP-transfizierten Zellen gab es hierbei keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 29A). Auch kam es im Verlauf von 72h zu keinem p53-abhängigen Zellzahlverlust, im Vergleich zu den GFP-transfizierten Zellen (Abbildung 29B). Dies stellt dabei einen Indikator für eine fehlende Apoptoseinduktion dar. In den Caspase-3/7 Messungen wurde eine Zunahme der Aktivität in beiden transfizierten Gruppen über 72h, gegenüber der Kontrolle, beobachtet (48h: 3,3-fache Zunahme beider transfizierter Gruppen; 72h: 4,1-fache Zunahme (GFP) bzw. 3,9-fache Zunahme (p53-GFP)) (Abbildung 29C). Es ließ sich auch dabei keine p53-abhängige Apoptoseinduktion feststellen. Folglich ist die erhöhte Caspaseaktivität, die in beiden Gruppen gemessen wurde, auf den Transsfektionsprozess zurückzuführen. Der durchgeführte BrdU-Assay, mit dem die Teilungsfähigkeit der Zellen untersucht wird, wies weiterhin keine Unterschiede zwischen beiden transfizierten Gruppen auf (Abbildung 29D). Folglich war es daher auch zu keinem Zellzyklusarrest gekommen.

Zur weiteren Überprüfung eines fehlenden p53-Effekts wurde im nächsten Schritt die Genexpression des Hitzeschockproteins (*Hsp70*), das Verhältnis des pro-apoptotischen *Bax*- und des anti-apoptotischen *Bcl-2* Proteins (*Bax/Bcl-2*), sowie von p21, anhand von qRT-PCRs bestimmt (Abbildung 30).

## Ergebnisse



**Abbildung 30: Keine signifikanten Unterschiede in den gemessenen relativen Genexpressionen, transfizierter primärer RPE-Zellen**

Messung der relativen *Bax/Bcl2*, *Hsp70* und *p21*-Genexpression in der qRT-PCR, 24h und 48h nach der Transfektion, primärer RPE-Zellen. (A) *Bax/Bcl2*-Genexpression. (B) *Hsp70*-Genexpression. (C) *p21*-Genexpression. In keiner der drei gemessenen relativen Genexpressionen konnte ein signifikanter Unterschied, zwischen den GFP- und den p53-GFP-transfizierten Zellen festgestellt werden. Darstellung der Daten als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; N=4; One-way ANOVA Test; \* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\* =  $p \leq 0,0001$  signifikant unterschiedlich zwischen den jeweiligen Gruppen; n.s. = nicht signifikant.

Adäquat zu den Caspase-Assay-Messungen, wies auch das in den qRT-PCR Untersuchungen gemessene Verhältnis, des pro-apoptotischen *Bax* und des anti-apoptotischen *Bcl-2*-Proteins, keine signifikanten Unterschiede in der Apoptoseinduktion in Folge einer p53-Überexpression auf (Abbildung 30A). Gegenüber der Kontrolle war dabei die Messung des *Bax/Bcl-2* Verhältnisses in beiden transfizierten Gruppen, 24h nach Transfektion, 1,9-fach erhöht, 48h nach Transfektion 3,9-fach (GFP) bzw. 4,2-fach (p53-GFP). Das *Hsp70*-Protein, das als Zellstressmarker verwendet werden kann, stieg 24h nach der Transfektion zunächst in beiden transfizierten Gruppen im Vergleich zur Kontrolle deutlich an (GFP: 20-fache Expression, p53-GFP: 15-fache

## Ergebnisse

Expression), gefolgt von einer Abnahme bis zum 48h Zeitpunkt (Abbildung 30B). Die erhöhten *Bax/Bcl2*- sowie *Hsp70*-Expressionen sind demnach auf den Transfektionsprozess zurückzuführen. Weiterhin kam es auch zu keiner p21-Induktion, in Folge der p53-Überexpression (Abbildung 30C).

Zusammenfassend lassen die durchgeführten Messungen darauf schließen, dass es zu keiner Apoptoseinduktion durch die p53-Überexpression gekommen war. Die gegenüber der unbehandelten Kontrolle erhöhte Apoptoserate sowie rückläufige Zellzahl in beiden transfizierten Gruppen, ist demnach auf die Toxizität des Transfektionsreagenzes zurückzuführen. Weiterhin war es auch zu keinem p53-vermittelten Zellzyklusarrest oder einer p21-Induktion gekommen.

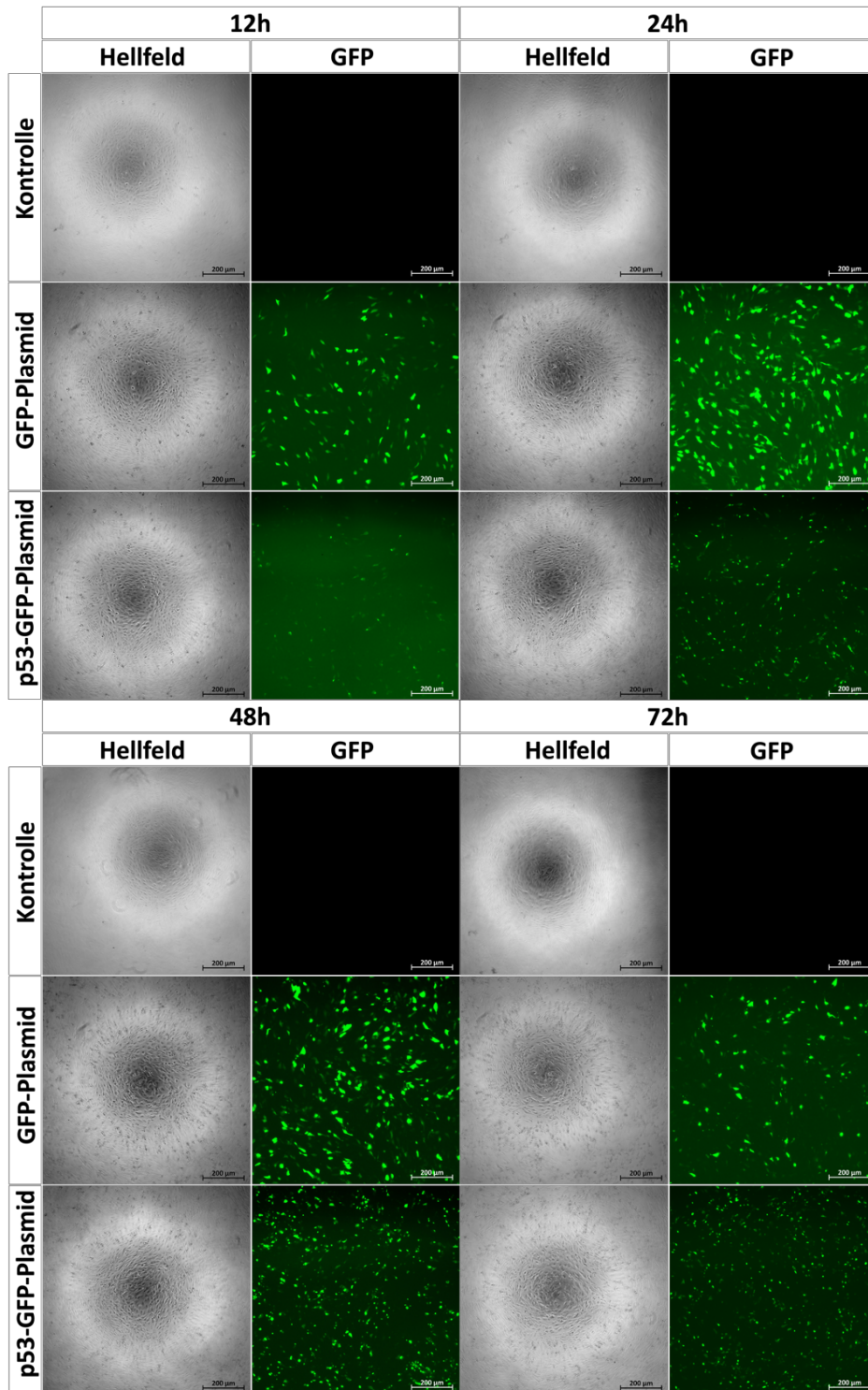
### **3.3.2 Keine Apoptoseinduktion und kein Zellzyklusarrest durch eine p53-Überexpression in ungestressten ARPE-19-Zellen**

Im Anschluss an die primären RPE-Zellen wurde im gleichen Ansatz die Untersuchung einer p53-Überexpression in Zellen der ARPE-19-Zelllinie durchgeführt.

Dabei erfolgte zunächst wieder eine Fluoreszenz- und hellfeldmikroskopische Beobachtung über 72h, wobei wie bei den primären RPE-Zellen, auch bei den ARPE-19-Zellen, die höchste Genexpression 24h nach der Transfektion beobachtet wurde (Abbildung 31).

Als nächstes wurde auch wie zuvor, die Zellviabilität, Zellzahl und Caspaseaktivität p53-überexprimierter Zellen, im Vergleich zu GFP-transfizierter Zellen, anhand von Zellassays ermittelt (Abbildung 32).

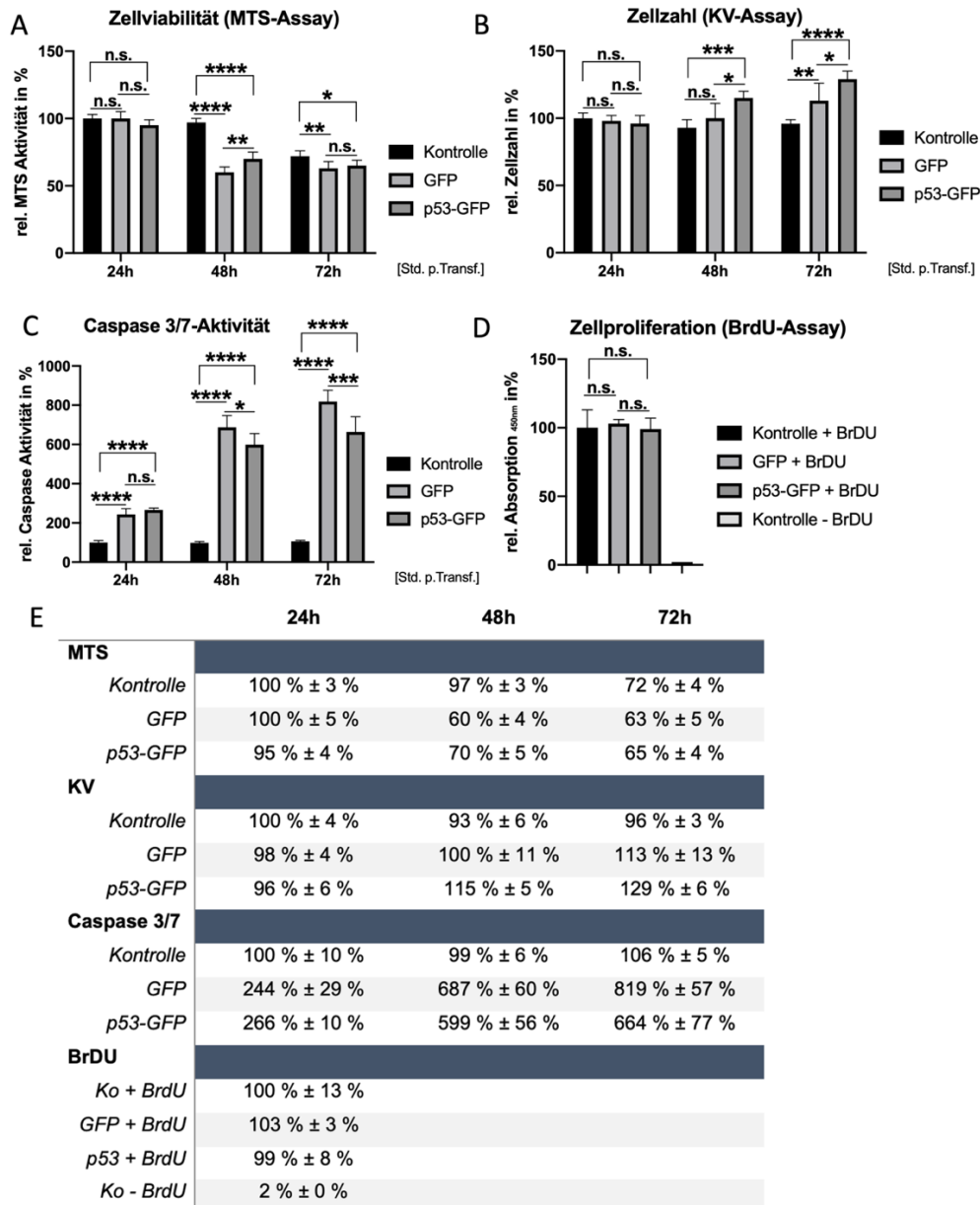
## Ergebnisse



**Abbildung 31: Zeitpunkt der höchsten Genexpression in ARPE-19-Zellen, 24h nach Transfektion**

Beobachtung und Vergleich der Genexpressionen p53-GFP- und GFP-transfizierter Zellen über 72h. Im direkten Vergleich zeigt sich sowohl in den GFP- als auch den p53-GFP-transfizierten Zellen eine eindeutige Zunahme der Plasmidexpression bis 24h nach der Transfektion. Dies stellt dabei den Zeitpunkt der höchsten Genexpression dar. Anschließend lässt sich sowohl in den p53-GFP als auch den GFP-transfizierten Zellen eine Abnahme der Fluoreszenzen erkennen.

## Ergebnisse



**Abbildung 32: Keine Apoptoseinduktion und kein Zellzyklusarrest in p53-überexprimierten ARPE-19-Zellen in Zellassays feststellbar**

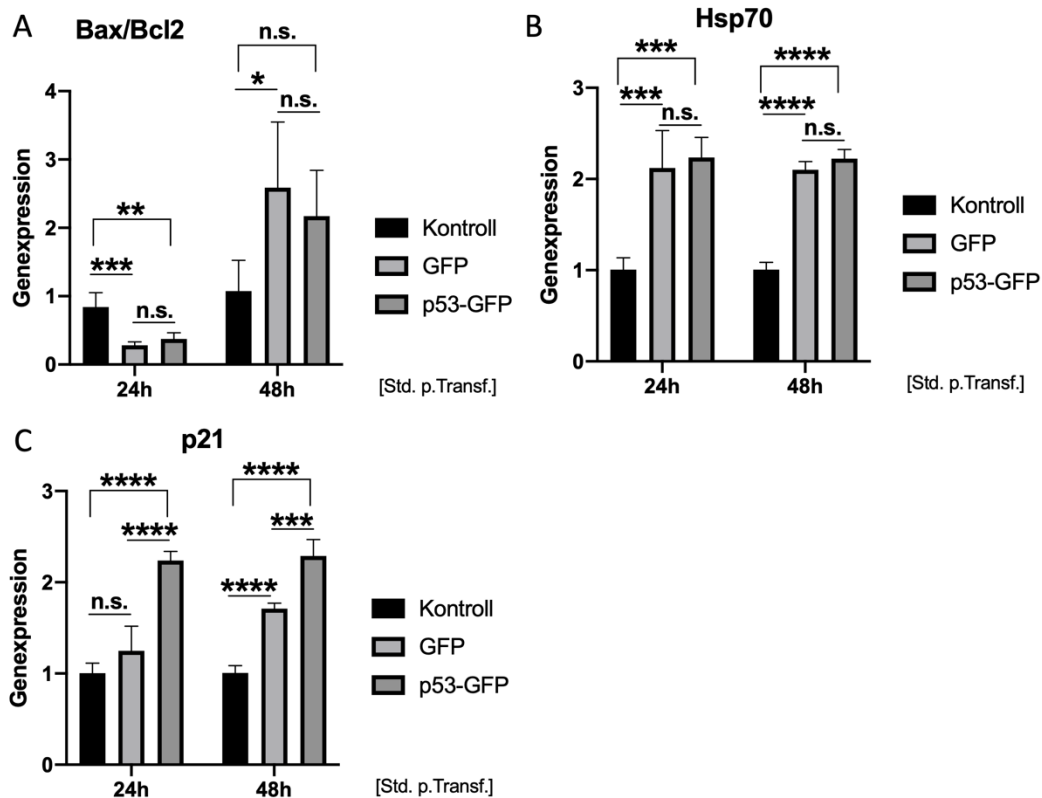
Zellassay Untersuchung p53-GFP- und GFP-transfizierter ARPE-19-Zellen über 72h. (A) MTS-Assay. (B) Kristallviolett-färbung. (C) Caspase-3/7-Assay. (D) BrdU-Assay. (E) Übersichtstabelle der Werte aus A-D. Im MTS-Assay gab es nach 72h keinen Unterschied, in der gemessenen Viabilität, zwischen den GFP- und den p53-GFP-transfizierten Zellen. Leichte Verminderung der Zellzahl, bei den GFP-transfizierten Zellen, gegenüber den p53-GFP-transfizierten Zellen, nach 48h und 72h ( $p \leq 0,05$ ). Die Caspaseaktivität war nach 24h bei den p53-überexprimierten Zellen nicht erhöht. Die gemessene Caspaseaktivität der GFP-transfizierten Zelle lag nach 48h ( $p \leq 0,05$ ) und 72h ( $p \leq 0,001$ ) über der Aktivität der p53-GFP-transfizierten Zellen. Des Weiteren konnte auch im BrdU-Assay kein Zellzyklusarrest, ausgelöst durch die p53-Überexpression, beobachtet werden. Darstellung der Daten relativ zur jeweiligen 24h Kontrolle als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. N = 5, One-way ANOVA Test; \* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\* =  $p \leq 0,0001$  signifikant unterschiedlich zwischen den jeweiligen Gruppen; n.s. = nicht signifikant.

## Ergebnisse

Es zeigte sich nach 72h kein Unterschied in der Zellviabilität zwischen den beiden transfizierten Gruppen, was erneut auf eine fehlende p53-vermittelte Apoptose hindeutet (GFP Gruppe: 63 %  $\pm$  5 %, p53-GFP Gruppe: 65 %  $\pm$  4 %) (Abbildung 32A). Nach 72h wiesen beide transfizierten Gruppen eine leicht erhöhte Zellzahl gegenüber der unbehandelten Kontrolle auf (GFP Gruppe: 1,1-fache Zellzahl, p53-GFP Gruppe 1,3-fache Zellzahl), wobei dies durch das Nachwachsen der sich schnell teilenden immortalisierten Zellen, in Folge des durch den Transfektionsprozesses entstandenen Zellverlusts, zu erklären ist (Abbildung 32B). Die Caspase-3/7-Aktivität stieg sowohl bei den p53-GFP- als auch den GFP-transfizierten Zellen, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, über den Verlauf von 48h und 72h deutlich an (GFP Gruppe: 6,8-fach- bzw. 8,2-fach; p53-GFP Gruppe: 6-fach bzw. 6,6-fach). Dabei lag die Caspaseaktivität der GFP-transfizierten Zellen über der Aktivität der p53-GFP-transfizierten Zellen, zu den Zeitpunkten 48h ( $p \leq 0,05$ ) und 72h ( $p \leq 0,001$ ) (Abbildung 32C). Dies zeigt, dass es wie zuvor, bei den primären RPE-Zellen, erneut zu keiner p53-abhängigen Caspaseinduktion gekommen war, wobei die erhöhten Caspasemessungen abermals auf den Transfektionsprozess zurückzuführen sind. Im BrdU-Assay konnte kein Unterschied zwischen den p53-GFP- und den GFP-transfizierten Zellen festgestellt werden, wodurch geschlussfolgert werden kann, dass es zu keinem Zellzyklusarrest gekommen war (Abbildung 32D).

Danach erfolgte ebenfalls, wie bereits bei den primären RPE-Zellen, die Messung der Genexpressionen, des pro-apoptotischen *Bax*- und des anti-apoptotischen *Bcl-2* Proteins (*Bax/Bcl-2*), des Hitzeschockproteins (*Hsp70*) sowie von p21 (Abbildung 33).

## Ergebnisse



**Abbildung 33: Erhöhte p21-Genexpression in p53-transfizierten ARPE-19-Zellen**

Messung der relativen Bax/Bcl2-, Hsp70- und p21-Genexpression in der qRT-PCR, 24h und 48h nach der Transfektion von ARPE-19-Zellen. (A) Bax/Bcl2-Genexpression. (B) Hsp70-Genexpression. (C) p21-Genexpression. In den relativen Genexpressionen des Bax/Bcl2- Quotienten sowie Hsp70 zeigte sich kein Unterschied zwischen den beiden transfizierten Gruppen. Die p21-Genexpression war in der Gruppe der p53-GFP-transfizierten Zellen nach 24h ( $p \leq 0,0001$ ), sowie nach 48h ( $p \leq 0,001$ ) erhöht. Darstellung der Daten als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; N=4; One-way ANOVA Test; \* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\* =  $p \leq 0,0001$  signifikant unterschiedlich zwischen den jeweiligen Gruppen; n.s. = nicht signifikant.

Die Analyse der Genexpressionen bestätigte die zuvor gemachte Beobachtung einer fehlenden p53-vermittelten Apoptoseinduktion. Das dabei bestimmte Verhältnis aus *Bax/Bcl-2* wies nach 24h und 48h keine Unterschiede zwischen den beiden transfizierten Gruppen auf, wobei sich gegenüber der unbehandelten Kontrolle auch hier nach 48h eine erhöhte pro-apoptotische Aktivität in beiden Gruppen zeigte (GFP Gruppe: 2,6-fach erhöht; p53-GFP Gruppe: 2,1-fach erhöht) (Abbildung 33A). Die *Hsp70*-Genexpression war in beiden transfizierten Gruppen, im Vergleich zur Kontrolle, sowohl nach 24h als auch nach 48h gleichermaßen erhöht (GFP Gruppe: 2,1-fach erhöht; p53-GFP:

## Ergebnisse

2,3-fach erhöht), was vermutlich erneut auf den Transfektionsprozess zurückzuführen ist (Abbildung 33B).

Trotz eines im BrdU-Assay zuvor festgestellten ausbleibenden Zellzyklusarrests, konnte in der qRT-PCR in der p53-GFP Gruppe eine signifikant erhöhte p21-Genexpression nach 24h ( $p \leq 0,0001$ ), als auch nach 48h ( $p \leq 0,001$ ), gegenüber der GFP Gruppe, beobachtet werden (nach 24h: 1,8-fach erhöht, nach 48h 1,3-fach erhöht) (Abbildung 33C).

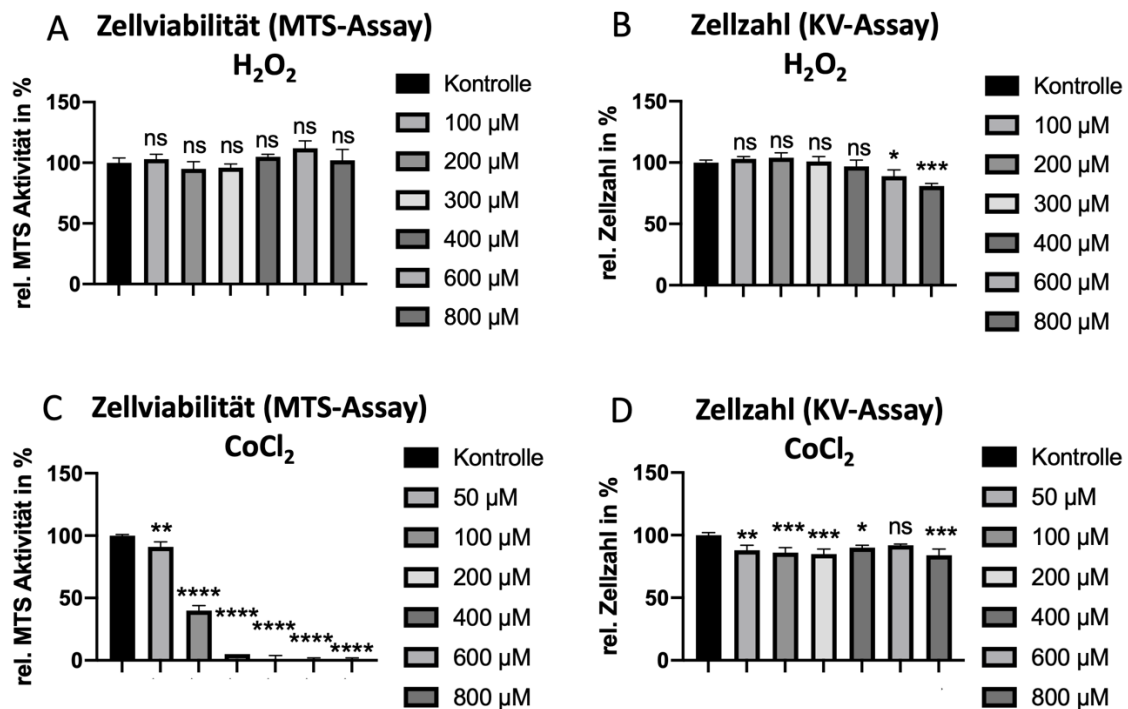
Zusammenfassend wurde auch bei den ARPE-19-Zellen keine p53-abhängige Apoptoseinduktion, in Folge der p53-Überexpression, festgestellt. Die im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle abermals festgestellten Unterschiede der transfizierten Zellen sind dabei erneut auf den Transfektionsprozess zurückzuführen. Weiterhin konnte eine erhöhte p21-Genexpression, in den p53-überexprimierten Zellen beobachtet werden, ohne das Auftreten eines Zellzyklusarrestes.

### **3.4 p53-Überexpression in gestressten Zellen**

Nachdem zuvor bei sowohl den primären RPE-Zellen als auch der ARPE-19-Zelllinie keine Apoptoseinduktion durch die alleinige p53-Überexpression beobachtet werden konnte, wurden die Zellen im nächsten Schritt zusätzlich mit verschiedenen Zellstressoren co-behandelt. Dafür wurde Cobaltchlorid ( $\text{CoCl}_2$ ) und Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) verwendet. Da die Zellen lediglich gestresst werden sollten, ohne die Apoptose durch die verwendeten Reagenzien zu induzieren, erfolgte im ersten Schritt eine Etablierung der Stresskonzentrationen, bevor anschließend transfizierte Zellen gestresst und untersucht wurden.

### 3.4.1 Zellstresstablierung mit Rückgang der Zellzahl und Zellviabilität unter Verwendung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und CoCl<sub>2</sub>

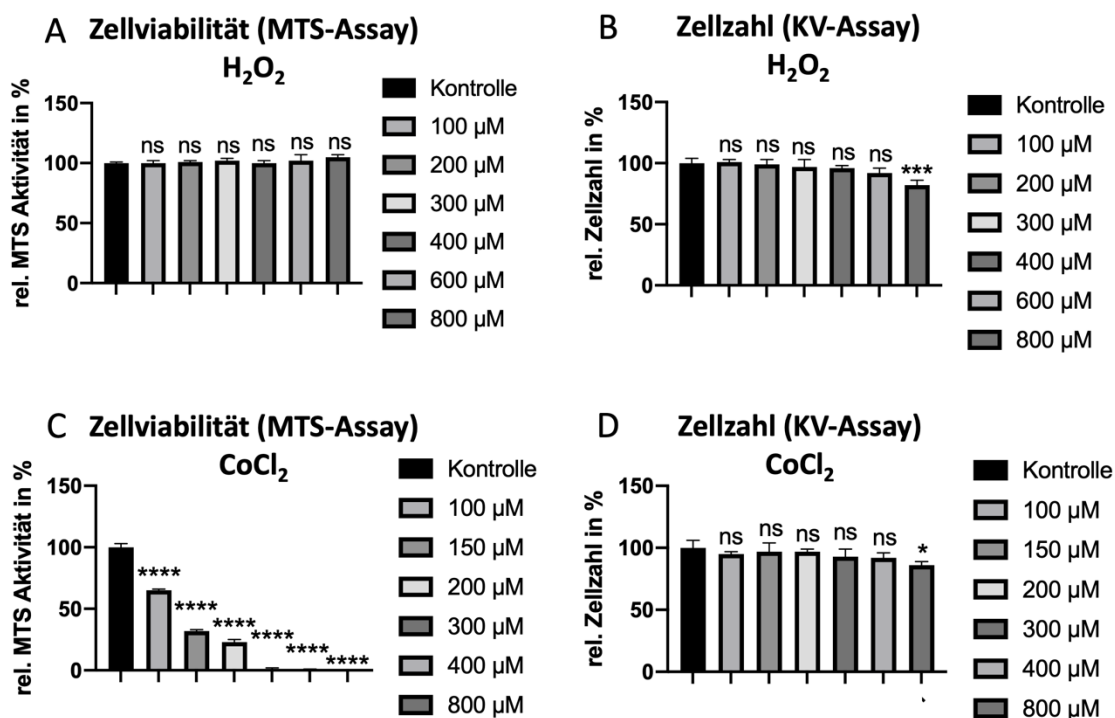
Für die Etablierung der Zellstresskonzentrationen wurden wie in Kapitel 2.2.9 beschrieben, nicht transfizierte Zellen beider Zellarten mit CoCl<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt, für 24h kultiviert und anschließend die Zellviabilität und -zahl mit Hilfe von Zellassays untersucht. Anschließend wurden die Konzentrationen bestimmt, bei denen erstmals signifikante Unterschiede im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle beobachtet werden konnten (Abbildung 34, 35).



**Abbildung 34: Stresstablierungsergebnisse primärer RPE-Zellen nach 24h**

MTS-Assay und Kristallviolett-färbung nach 24h Co-Kultivierung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (A, B) und CoCl<sub>2</sub> (C, D). Unter Einsatz von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zeigte sich erstmals bei einer Konzentration von 600 µM eine signifikante Reduktion der Zellzahl ( $p \leq 0,05$ ) (B), wobei keine signifikanten Unterschiede in der Zellviabilität festgestellt werden konnten (A). Unter Verwendung von CoCl<sub>2</sub> wurde bereits unter 50 µM eine signifikante Reduktion der Zellzahl ( $p \leq 0,01$ ) (D), sowie der Zellviabilität ( $p \leq 0,01$ ) festgestellt (A). N=4; One-way ANOVA Test; Darstellung der Daten relativ zur Kontrolle, als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. \* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\* =  $p \leq 0,0001$  signifikant unterschiedlich im Vergleich zur Kontrollgruppe; ns = nicht signifikant.

## Ergebnisse



**Abbildung 35: Stresstablierungsergebnisse der ARPE-19 Zellen nach 24h**

MTS-Assay und Kristallviolett färbung nach 24h Co-Kultivierung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (A, B) und CoCl<sub>2</sub> (C, D). Der Einsatz von 800 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führte dabei erstmals zu einer signifikanten Reduktion der Zellzahl ( $p \leq 0,001$ ) (B), wobei keine signifikanten Unterschiede in der Zellviabilität festgestellt werden konnten (A). Unter CoCl<sub>2</sub> zeigte sich bei 100 µM eine signifikante Reduktion der Zellviabilität ( $p \leq 0,0001$ ) (C), wobei erst unter Verwendung von 800 µM eine signifikante Reduktion der Zellzahl auftrat ( $p \leq 0,05$ ) (D). N=4; One-way ANOVA Test; Darstellung der Daten relativ zur Kontrolle, als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. \* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\* =  $p \leq 0,0001$  signifikant unterschiedlich im Vergleich zur Kontrollgruppe; ns = nicht signifikant.

Durch die Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konnte weder bei den primären RPE-Zellen noch bei den Zellen der ARPE-19-Zelllinie ein signifikanter Unterschied in der Zellviabilität, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, festgestellt werden (Abbildung 34A, 35A). Die in der Kristallviolett färbung gemessene Zellzahl war dabei bei den primären RPE-Zellen erstmals unter dem Einsatz von 600 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, signifikant vermindert ( $p \leq 0,05$ ) (Abbildung 34B). Bei den ARPE-19-Zellen war die Zellzahl erstmals bei einer Konzentration von 800 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $p \leq 0,001$ ) signifikant vermindert (Abbildung 35B). Durch die Zugabe von 50 µM CoCl<sub>2</sub> bei primären RPE-Zellen, bzw. 100 µM bei ARPE-19-Zellen konnte eine Abnahme der Zellviabilität beobachtet werden (Abbildung 34C, 35C). Auch eine Verringerung der Zellzahl bei primären RPE-Zellen konnte unter dem Einsatz

## Ergebnisse

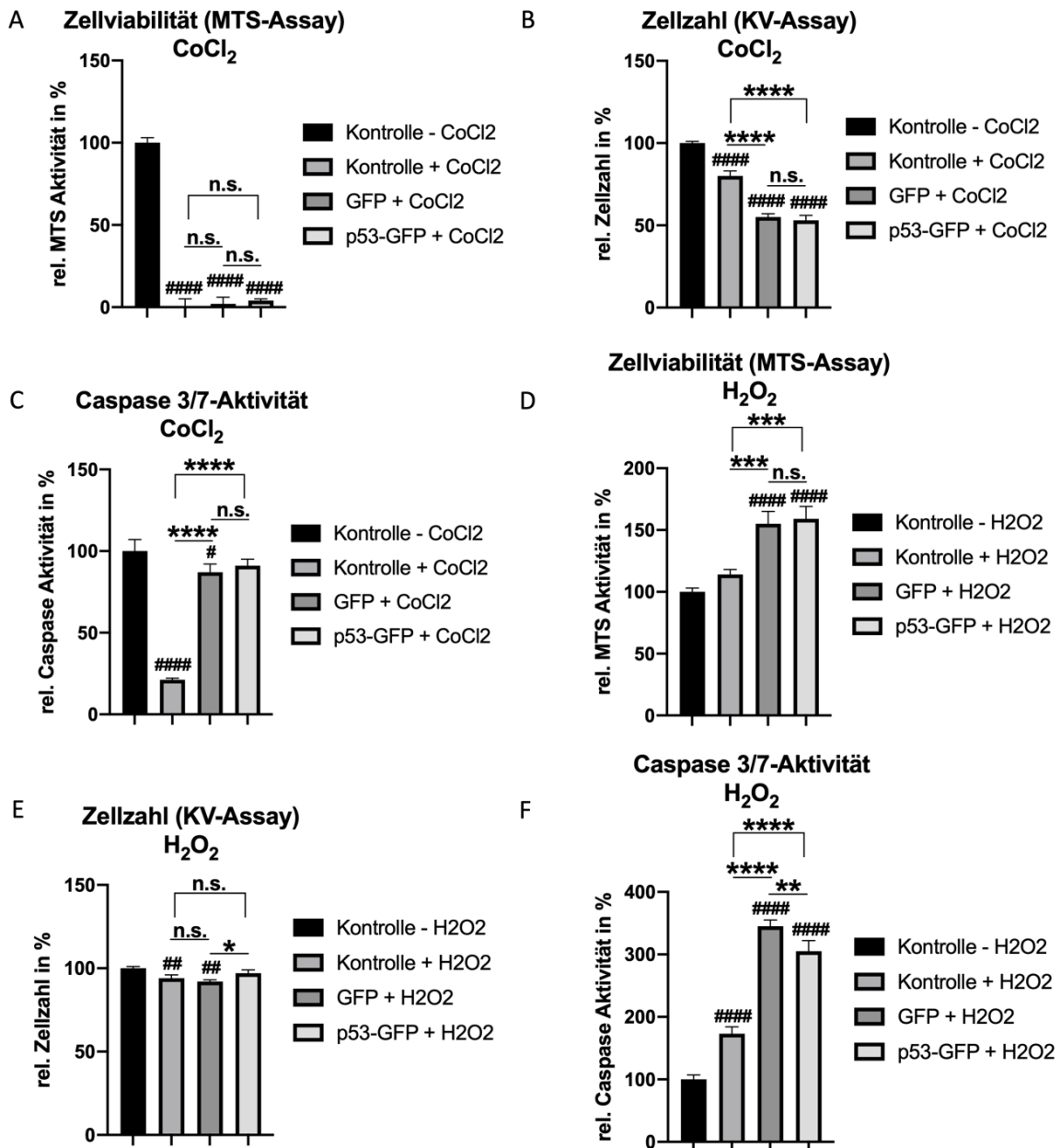
von 50  $\mu\text{M}$  festgestellt werden ( $p \leq 0,01$ ), wohingegen die ARPE-19-Zellen erst bei einer Konzentration von 800  $\mu\text{M}$  signifikant ( $p \leq 0,05$ ) reduziert waren (Abbildung 34D, 35D).

Basierend auf den Zellstressversuchen wurde so für die anschließende Co-Behandlung transfizierter primärer RPE-Zellen, eine  $\text{H}_2\text{O}_2$  Konzentration von 600  $\mu\text{M}$  sowie 50  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  festgelegt. Für die Zellen der ARPE-19-Zelllinie wurde eine  $\text{H}_2\text{O}_2$  Konzentration von 800  $\mu\text{M}$  gewählt, sowie 800  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$ .

### **3.4.2 Keine Apoptoseinduktion in p53-überexprimierten und mit Zellstressoren co-behandelten primären RPE-Zellen**

Mit den zuvor bestimmten  $\text{H}_2\text{O}_2$ - und  $\text{CoCl}_2$ -Konzentrationen wurden die Zellen zum Zeitpunkt der höchsten Genexpression, 24h nach der Transfektion, behandelt und für 24h weiter kultiviert, bevor die Zellviabilität, -zahl und Caspase-3/7-Aktivität mit Hilfe von Zellassays bestimmt wurde. Um eine mögliche p53-Induktion festzustellen, erfolgte dabei wie zuvor, ein Vergleich zwischen den p53-GFP- und Kontroll-GFP-transfizierten Zellen, wobei erneut die GFP-transfizierten Zellen als Behandlungskontrolle dienten. Zunächst erfolgte die Untersuchung in primären RPE-Zellen (Abbildung 36).

## Ergebnisse



**Abbildung 36: Keine erhöhte Apoptoseinduktion in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und CoCl<sub>2</sub> gestressten, p53-überexprimierten primären RPE-Zellen**

Zellassay-Untersuchung p53-GFP- und GFP-transfizierter, gestresster primärer RPE-Zellen nach 24h. (A, D) Zellviabilität, (B, E) Zellzahl, (C, F) Caspase-3/7-Aktivität. Keine signifikanten Unterschiede zwischen den p53-GFP- und den GFP-transfizierten Zellen unter Einsatz von CoCl<sub>2</sub> (A, B, C). Unter der Verwendung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zeigte sich im MTS-Assay auch kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden transfizierten Gruppen (D), eine erhöhte Zellzahl der p53-GFP-transfizierten Zellen im Vergleich zu den GFP-transfizierten Zellen ( $p \leq 0,05$ ) (E), sowie eine erhöhte Caspase-3/7-Aktivität der GFP-transfizierten Zellen, gegenüber der p53-GFP-transfizierten Zellen ( $p \leq 0,01$ ) (F). N=4; One-way ANOVA Test; Darstellung der Daten relativ zur unbehandelten Kontrolle, als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. \* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\* =  $p \leq 0,0001$  signifikant unterschiedlich zwischen den jeweiligen Gruppen; n.s. = nicht signifikant. # =  $p \leq 0,05$ ; ## =  $p \leq 0,01$ ; ### =  $p \leq 0,001$ ; #### =  $p \leq 0,0001$  signifikant unterschiedlich im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe.

## Ergebnisse

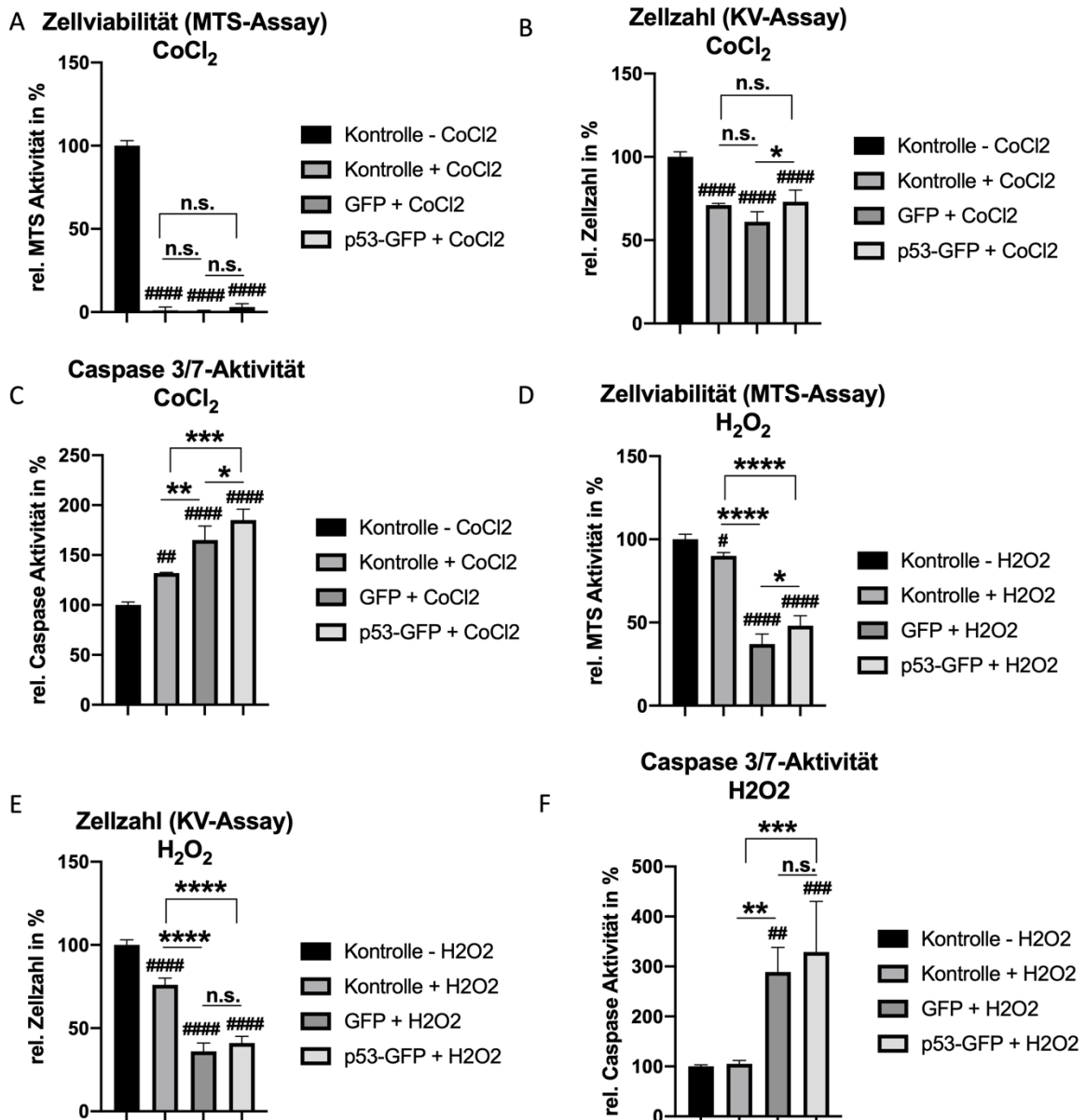
Durch die Behandlung der Zellen mit  $\text{CoCl}_2$  kam es sowohl in den transfizierten Gruppen als auch der nicht transfizierten  $\text{CoCl}_2$  Kontrollgruppe zu einer fast kompletten Reduktion der Zellviabilität ohne signifikante Unterschiede zwischen den GFP und p53-GFP transfizierten Zellen (Abbildung 36A). Weiterhin konnte dabei eine Halbierung der Zellzahl in beiden transfizierten Gruppen, verglichen zur unbehandelten Kontrolle, beobachtet werden. Die  $\text{CoCl}_2$  Kontrollgruppe wies dabei lediglich eine Reduktion der Zellzahl um 20%, verglichen zur unbehandelten Kontrolle, auf ( $80 \% \pm 3 \%$ ) (Abbildung 36B). Adäquat dazu war die Caspase-3/7-Aktivität der transfizierten Gruppen im Vergleich zur  $\text{CoCl}_2$  Kontrollgruppe um das 4,5-fache erhöht (Abbildung 36C). Zwischen den p53-GFP- und GFP-transfizierten Zellen ergab sich dabei kein signifikanter Unterschied, sodass es zu keiner p53-abhängigen Apoptoseinduktion in Folge der Überexpression gekommen war.

Bei den  $\text{H}_2\text{O}_2$  behandelten primären RPE-Zellen war die Zellviabilität der transfizierten Gruppen, gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe um das 1,5-fache erhöht, die der  $\text{H}_2\text{O}_2$  behandelten Kontrollgruppe um das 1,15-fache (Abbildung 36D). Weiterhin zeigte sich im KV-Assay eine leicht erhöhte Zellzahl der p53-GFP-transfizierten Zellen, gegenüber der GFP-transfizierten Zellen ( $p \leq 0,05$ ) (Abbildung 36E). Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle war die Caspase-3/7-Aktivität der  $\text{H}_2\text{O}_2$  behandelten Kontrollgruppe um das 1,7-fache erhöht, die Aktivität der GFP transfizierten Zellen um das 3,4-fache sowie die der p53-GFP transfizierten Zellen um das 3-fache. Dabei konnten keine p53-abhängige Apoptoseinduktion festgestellt werden (Abbildung 36F).

### **3.4.3 Keine Apoptoseinduktion in p53-überexprimierten und mit Zellstressoren co-behandelten ARPE-19 Zellen**

Im Anschluss erfolgte dieselbe Untersuchung in ARPE-19-Zellen (Abbildung 37).

## Ergebnisse



**Abbildung 37: Keine erhöhte Apoptoseinduktion in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und CoCl<sub>2</sub> gestressten, überexprimierten ARPE-19-Zellen**

Zellassay Untersuchung p53-GFP- und GFP-transfizierter, gestresster ARPE-19-Zellen nach 24h. (A, D) Zellviabilität, (B, E) Zellzahl, (C, F) Caspase-3/7-Aktivität. Keine signifikanten Unterschiede in der Zellviabilität, CoCl<sub>2</sub> gestresster Zellen, zwischen den beiden transfizierten Gruppen feststellbar (A). Gegenüber der GFP-transfizierten Zellen, leicht erhöhte Zellzahl ( $p \leq 0,05$ ) (B), sowie leicht erhöhte Caspaseaktivität ( $p \leq 0,05$ ) (C), der p53-überexprimierten Zellen. Unter Verwendung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurde im MTS-Assay eine erhöhte Zellviabilität der p53-GFP-transfizierten Zellen, gegenüber der GFP-transfizierten Zellen festgestellt ( $p \leq 0,05$ ) (D), während bei der Zellzahl und der Caspase-3/7-Aktivität keine signifikanten Unterschiede gemessen wurden (E, F). N=4; One-way ANOVA Test; Darstellung der Daten relativ zur Kontrolle, als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. \* =  $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\* =  $p \leq 0,0001$  signifikant unterschiedlich zwischen den jeweiligen Gruppen; n.s. = nicht signifikant. # =  $p \leq 0,05$ ; ## =  $p \leq 0,01$ ; ### =  $p \leq 0,001$ ; #### =  $p \leq 0,0001$  signifikant unterschiedlich im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe.

## Ergebnisse

Auch bei den mit  $\text{CoCl}_2$  behandelten ARPE-19-Zellen wurde im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine fast vollständige Abnahme der Zellviabilität beobachtet. Dabei wiesen die p53-GFP- und GFP-transfizierten Zellen erneut keine signifikanten Unterschiede im direkten Vergleich zueinander auf (Abbildung 37A). Die gemessene Zellzahl im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle war bei allen drei  $\text{CoCl}_2$  behandelten Gruppen reduziert. Es zeigte sich mit einer relativen Zellzahl von  $73 \% \pm 7 \%$ , eine signifikant erhöhte Zellzahl, der p53-GFP Gruppe, gegenüber der GFP Gruppe, in welcher eine relative Zellzahl von  $61 \% \pm 6 \%$  gemessen wurde (Abbildung 37B). Im Caspase-3/7-Assay konnte eine erhöhte Aktivität bei allen  $\text{CoCl}_2$  behandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle festgestellt werden ( $\text{CoCl}_2$  Kontrollgruppe: 1,3-fach erhöht; GFP Gruppe: 1,6-fach erhöht; p53-GFP Gruppe: 1,8-fach, jeweils gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe) (Abbildung 37C). Es zeigte sich, dass die Caspaseaktivität der p53-GFP transfizierten Zellen dabei schwach signifikant erhöht war ( $p \leq 0,05$ ), in Zusammenschau mit der in der Zellzahlmessung nicht aufgetretenen Zellzahlreduktion, dies dennoch nicht auf eine p53-vermittelte Apoptoseinduktion hindeutet.

In der MTS-Messung der  $\text{H}_2\text{O}_2$  behandelten Zellen zeigte sich eine reduzierte Aktivität beider transfizierter Gruppen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Mit einer relativen Viabilität von  $48 \% \pm 6 \%$  war die p53-GFP Gruppe dabei signifikant ( $p \leq 0,05$ ) erhöht, gegenüber der GFP Gruppe, in welcher eine Viabilität von  $37 \% \pm 7 \%$  gemessen wurde (Abbildung 37D). In der KV-Messung zeigte sich eine Reduktion der Zellzahl in allen  $\text{H}_2\text{O}_2$  behandelten Gruppen. Dabei wies die p53-GFP Gruppe eine relative Zellzahl von  $41 \% \pm 4 \%$ , die der GFP Gruppe von  $36 \% \pm 6 \%$ , im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle auf. Es lagen keine signifikanten Unterschiede zwischen der p53-GFP Gruppe und GFP Gruppe vor (Abbildung 37E). Während die Caspaseaktivität der  $\text{H}_2\text{O}_2$  Kontrollgruppe nur geringfügig erhöht war gegenüber der unbehandelten Kontrolle (1,05-fach), wurde in der p53-GFP Gruppe eine 3,3-fach erhöhte Caspase-3/7-Aktivität gemessen, sowie in der

## Ergebnisse

GFP Gruppe eine 2,9-fache Aktivität, ohne signifikante Unterschiede zwischen den beiden transfizierten Gruppen (Abbildung 37F).

Zusammenfassend ließ sich weder in primären RPE-Zellen noch in ARPE-19-Zellen eine Apoptoseinduktion in Folge einer p53-Überexpression und Zellstress Co-Behandlung feststellen.

## 4 Diskussion

### 4.1 Transfektionsetablierung der primären porcinen RPE-Zellen und der ARPE-19-Zellen

Die Transfektion stellt ein gängiges *in vitro* Verfahren zur Untersuchung von Genen und deren Funktion in Zellen dar [58]. Neben der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Funktion von p53 in RPE-Zellen, können die hierfür etablierten und angewandten Transfektionsmethoden der primären porcinen RPE-Zellen sowie der ARPE-19-Zellen auch in Zukunft zur Untersuchung weiterer Gene eingesetzt werden.

Primäre Zellen werden häufig als schwierig zu transfizieren eingestuft. Dies hängt mutmaßlich mit verschiedenen Faktoren zusammen, wie beispielsweise einer erhöhten Fragilität sowie einer langsameren Zellteilungsrate im Vergleich zu Zelllinien [78] [79]. Dies wurde auch in der vorliegenden Arbeit anhand der Reihe an Transfektionsverfahren, die bei der Transfektionsetablierung der primären porcinen RPE-Zellen durchgeführt wurden, beobachtet. Die Magnetofektion, die in der Literatur bereits bei primären Neuronen als geeignetes Transfektionsverfahren beschrieben wurde, konnte auch in dieser Arbeit als das effizienteste Verfahren für die primären RPE-Zellen etabliert werden [80]. Demgegenüber wiesen die ARPE-19-Zellen bereits unter Verwendung rein chemischer Transfektionsreagenzien wie ViaFect™ und FuGENE® HD sehr gute Transfektionseffizienzen auf, wobei im direkten Vergleich FuGENE® HD, aufgrund der geringeren Toxizität, schließlich als das geeignetere Transfektionsreagenz bestimmt wurde.

Bei der durchflusszytometrischen Bestimmung der genauen Transfektionseffizienzen zeigte sich sowohl bei den primären RPE-Zellen als auch den ARPE-19-Zellen, dass die Transfektion des GFP-Plasmids, welches in den späteren Messungen immer als Behandlungskontrolle verwendet wurde, stets höhere Transfektionseffizienzen aufwies, als die des transfizierten p53-GFP-Plasmids (Abbildung 20, 23, 26). Dies ist auf die unterschiedliche Größe der beiden Plasmide zurückzuführen, wobei größere Plasmide grundsätzlich mit

## Diskussion

einer geringeren Transfektionseffizienz vergesellschaftet sind [81] [82]. Bei identischem Vektor-*Backbone* war dabei das verwendete p53-GFP-Plasmid - durch das darauf enthaltene p53-Gen - insgesamt circa 20kB größer als das GFP-Plasmid [83].

Vergleicht man die MTS-, Kristallviolett- und Caspase-3/7-Messungen GFP-transfizierter Zellen mit den jeweils unbehandelten Kontrollen, so fällt weiterhin auf, dass es in beiden Zellarten abseits einer p53-Überexpression bereits zu einer gewissen Apoptoseinduktion gekommen ist (Abbildung 29, 32). Dass das Einbringen von genetischem Fremdmaterial in die Zelle immer einer gewissen Toxizität gegenübersteht, musste von Anfang an mit bedacht werden. Deshalb wurden bei den Untersuchungen der p53-Überexpression immer GFP-transfizierte Zellen als Behandlungskontrolle verwendet. Weiterhin wurde, wie bereits zuvor beschrieben, auch im Rahmen der Transfektionsetablierung darauf geachtet, einen Ansatz mit einer möglichst geringen Toxizität zu etablieren (Kapitel 2.2.8).

Im Zuge der darauffolgenden p53-Überexpressionsnachweise konnten bereits einige Beobachtungen gemacht werden. So wurde im Western Blot sowohl bei den primären RPE-Zellen als auch den ARPE-19-Zellen, das Vorliegen einer geringen Menge an endogenem p53 festgestellt, was grundsätzlich für eine Funktion des Proteins in RPE-Zellen spricht (Abbildung 21D, 27D). Weiterhin konnte in der ebenfalls durchgeführten Immunfluoreszenz beobachtet werden, dass sich das durch die Transfektion überexprimierte p53-Protein im Zellkern befand (Abbildung 21C, 27C). Da das p53-Protein einen Transkriptionsfaktor darstellt, ist die Lokalisation im Zellkern dabei essentiell für einen Großteil der Funktionen des Proteins [84].

### **4.2 Folgen der p53-Überexpression in primären porcinen RPE-Zellen**

Bei den Messungen der relativen p53-Genexpressionen überexprimierter primärer RPE-Zellen zeigte sich im Verlauf von 24h-48h ein Rückgang der Genexpression um den Faktor 116 (Abbildung 21A, B). Weiterhin konnte auch

## Diskussion

in den anschließend durchgeführten Zellassay-Messungen sowie qRT-PCR Untersuchungen weder bei nicht-gestressten noch bei gestressten, p53-überexprimierten primären RPE-Zellen eine Apoptoseinduktion festgestellt werden. Dies lässt sich sowohl durch das Ausbleiben einer erhöhten Caspase-3/7-Aktivität, das Fehlen eines erhöhten *Bax/Bcl2*-Quotienten sowie einer nicht signifikant reduzierten Zellzahl der jeweils p53-überexprimierten Zellen, im Vergleich zu den GFP-transfizierten Zellen, erkennen (Abbildung 28-30, 36). Auch die Induktion eines Zellzyklusarrestes blieb aus, was im durchgeführten BrdU-Assay sowie anhand der fehlenden p21-Induktion festgestellt wurde (Abbildung 29D, 30C).

Die Zusammenschau der zuvor beschriebenen Ergebnisse lässt darauf schließen, dass die primären RPE-Zellen das überexprimierte p53-Protein abgebaut haben, ohne die Apoptose oder den Zellzyklusarrest zu induzieren. In der Literatur wird beschrieben, dass es in der Zelle, ohne das simultane Vorliegen von Stresstimuli, typischerweise zu einem p53-Abbau kommt, was eine fehlende Reaktion bei ungestressten p53-überexprimierten Zellen erklären würde [34] [85]. Dennoch zeigten auch die co-behandelten Zellen unter Einsatz von  $\text{CoCl}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$  keine Apoptoseinduktion, weshalb eine andere Ursache anzunehmen ist. Bei den primären RPE-Zellen handelt es sich um porcine Zellen, die mit einem humanen p53-Plasmid transfiziert wurden. Daher erfolgte zu Beginn der Arbeit eine Untersuchung der Gleichheit der p53-Proteine beider Spezies, wobei eine signifikante Übereinstimmung der dabei analysierten Aminosäuresequenzen festgestellt werden konnte (Abbildung 18).

Neben der Möglichkeit einer generell fehlenden Apoptoseinduktion durch p53, könnte der dennoch bestehende Unterschied der nicht komplett identischen p53-Proteine beider Spezies, einen Grund für den schnellen p53-Abbau sowie die fehlenden Apoptoseinduktion in den überexprimierten RPE-Zellen darstellen.

## Diskussion

Die Abweichungen des porcinen p53-Proteins gegenüber des humanen p53-Proteins, liegen vor allem in dem für die NTD kodierenden Sequenzbereichen (Abbildung 3, 18). Dabei weist das porcine p53-Protein an den Aminosäurepositionen 48-49, 59-60 und 71-75 jeweils eine Lücke auf (Abbildung 18). Diese befinden sich in den Sequenzbereichen der Transaktivierungsregion (Aminosäure 1-50), dem Teil einer nicht funktionalen Domäne (Aminosäure 59-60) sowie der SH3-Zielsequenz (Aminosäure 71-75). Weiterhin hat das porcine p53-Protein jeweils eine zusätzliche Aminosäure an der Stelle 35 sowie 185, was ebenfalls im kodierenden Bereich der Transaktivierungsregion (Aminosäure 1-50) sowie der DNA-Bindedomäne (Aminosäure 102-292) liegt (Abbildung 18). Folglich ist es möglich, dass diese Unterschiede zu einer in porcinen Zellen, funktionell veränderten Transkriptionsaktivierung, Protein-Interaktion sowie Beeinflussung von DNA-Bindungen, führen können und dadurch für einen Ausbleibenden p53-Effekt, in Folge der Überexpression, verantwortlich sind.

### **4.3 Folgen der p53-Überexpression in ARPE-19-Zellen**

Im Vergleich zu den primären RPE-Zellen kam es bei den ARPE-19-Zellen im Zeitraum von 24h-48h nach Transfektion zu keiner wesentlichen Abnahme der relativen p53-Genexpression (Abbildung 27A, B). Folglich unterstützt diese Beobachtung die in Kapitel 4.2 beschriebene Vermutung eines relevanten Speziesunterschiedes, der in den primären porcinen RPE-Zellen für das Fehlen eines p53-Effekts, in Folge der Überexpression, verantwortlich sein könnte.

Auch die ARPE-19-Zellen wiesen keine Apoptoseinduktion in Folge der p53-Überexpression, ungeachtet einer Zellstress Co-Behandlung, auf (Abbildung 31-33, 37). Weiterhin zeigte sich eine geringe p21-Induktion in der qRT-PCR, ohne dass im BrdU-Assay ein Zellzyklusarrest beobachtet werden konnte (Abbildung 32D, 33C). Abgesehen von der bereits erwähnten Möglichkeit, einer generell fehlenden Funktion von p53 in RPE-Zellen, könnten diese Ergebnisse aber auch durch das Fehlen anderer Co-Faktoren, sowie auch auf die verwendeten ARPE-19-Zellen, zurückzuführen sein.

In der eingangs zitierten Studie von Westlund et al. konnte eine erhöhte p53-abhängige Apoptoserate in lichtexponierten ARPE-19-Zellen festgestellt werden [46]. Statt eine p53-Überexpression per Transfektion zu induzieren, wurden dabei Zellen mit einem künstlich synthetisierten Lipofuszin Fluorophon co-behandelt und anschließend mit Blaulicht bestrahlt, worunter eine erhöhte p53-Expression und anschließende Apoptose festgestellt wurde. Das dabei verwendete A2E Fluorophon ist dafür bekannt, in der AMD-Pathogenese einen großen Bestandteil des sich akkumulierenden Lipofuszins auszumachen [86]. Aufgrund des Ausbleibens der Apoptoseinduktion, in der im Rahmen dieser Arbeit, durchgeführten ARPE-19 Versuche, kann daher geschlussfolgert werden, dass eine alleinige p53-Überexpression nicht zur Apoptoseinduktion in RPE-Zellen führt. Weiterhin kann vermutet werden, dass das A2E Fluorophon für den p53-vermittelten Zelltod in RPE-Zellen bedeutsam ist.

Das Auftreten einer p21-Induktion ohne simultane Induktion des Zellzyklusarrestes könnte durch Signalwegveränderungen der immortalisierten ARPE-19-Zellen bedingt sein. Dabei handelt es sich bei den verwendeten ARPE-19-Zellen um eine spontan entstandene humane Zelllinie, deren Ursache für die Immortalisierung der Zellen ungeklärt ist [52]. Oftmals liegen bei Zelllinien Veränderungen, die mit Zellzyklusregulator-Genen und Signalwegen in Zusammenhang stehen, vor [87] [88] [89]. Neben Mutationen im p53- und p21-Protein können dabei auch viele andersartige Veränderungen zur Störung der assoziierten Signalwege führen [87] [90]. Es ist daher möglich, dass für das fehlende Auftreten des Zellzyklusarrests trotz p21-Induktion, Signalwegveränderungen im Zuge der vorliegenden Immortalisierung verantwortlich sind.

#### **4.4 Schlussfolgerung und Aussicht**

Wie in der Einleitung dieser Arbeit erwähnt, wurde in der Literatur zuvor eine p53-Genexpression in verschiedenen Netzhautschichten nachgewiesen. Auch konnte bereits eine erhöhte p53-abhängige Apoptoserate in gealterten humanen RPE-Zellen beobachtet werden.

## Diskussion

Während in den Versuchen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, keine p53-abhängige Apoptoseinduktion beobachtet werden konnte, erscheint es trotzdem wahrscheinlich, dass p53 für die Apoptoseinduktion in RPE-Zellen mitverantwortlich ist. Die Gründe für das Fehlen einer Apoptoseinduktion in den hierbei durchgeführten Experimenten wurden dabei ausführlich erläutert (Kapitel 4.2, 4.3). Auch ein endogen exprimiertes p53-Protein konnte in beiden untersuchten Zellarten nachgewiesen werden, was weiterhin die These einer p53-Funktion in RPE-Zellen stützt.

In Zukunft könnte eine Untersuchung primärer humaner RPE-Zellen mit simultanen Versuchsaufbau sowie zusätzlicher A2E Co-Behandlung weitere Aufschlüsse zur Rolle von p53 in RPE-Zellen bieten.

## 5 Zusammenfassung

Die Erforschung des p53-abhängigen Zelltods retinaler Pigmentepithelzellen stellt eine wichtige Fragestellung in der Pathophysiologie weit verbreiteter Erkrankungen, wie beispielsweise der altersbedingten Makuladegeneration, dar. Vorausgegangene Arbeiten zur Untersuchung des RPE-Zelltods lassen einen Zusammenhang von p53 und der dabei auftretenden Apoptose vermuten. Im Rahmen dieser Arbeit konnten zwei zuvor noch nicht beschriebene Transfektionsansätze für primäre porcine RPE-Zellen und Zellen der ARPE-19-Zelllinie erarbeitet werden. Diese Transfektionsmethoden können dabei auch in Zukunft in der Untersuchung weiterer Gene Anwendung finden.

In den p53-überexprimierten Zellen zeigte sich keine Apoptoseinduktion in beiden Zellarten, auch unter der Co-Behandlung mit Zellstress verursachenden Reagenzien. Auch ein Zellzyklusarrest konnte in Folge der p53-Überexpression nicht beobachtet werden. Dennoch konnte im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen eine endogene p53-Expression in beiden Zellarten festgestellt werden.

Zwar konnte in dieser Arbeit keine p53-abhängige Apoptoseinduktion in RPE gezeigt werden, eine Rolle von p53 beim Zelltod retinaler Pigmentepithelzellen ist jedoch weiterhin möglich. So kann nun davon ausgegangen werden, dass trotz signifikanter Übereinstimmung der humanen und porcinen p53-Proteinsequenzen dennoch ein relevanter Unterschied zwischen den Proteinen der beiden Spezies vorliegt, der im Fall dieser Arbeit für das Ausbleiben eines p53-Effekts, sowie eines rapiden Abbaus des p53-Proteins, in den primären porcinen RPE-Zellen, mitverantwortlich war. Weiterhin ist anzunehmen, dass keine alleinige p53-Überexpression in RPE-Zellen zum Zelltod führt, sondern vielmehr entsprechende Co-Faktoren, wie das Vorliegen des Alterspigments Lipofuszin zur p53-abhängigen Apoptoseinduktion notwendig sind. Auch Signalwegveränderungen in ARPE-19-Zellen sind im Rahmen der Immortalisierung denkbar, welche weiterhin bestimmte Gene und Funktionen in der Zelle beeinflussen können. Eine erneute Untersuchung in primären humanen RPE-Zellen könnte in Zukunft weitere Aufschlüsse zur Rolle von p53 in RPE-Zellen bieten.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Lüllmann-Rauch R, A.E., *Taschenlehrbuch Histologie*. 2019: Thieme.
2. Barrett, K.E., and William F. Ganong, *Ganong's review of medical physiology*. 2012: McGraw-Hill Medical.
3. Lamb, T.D., *Evolution of phototransduction, vertebrate photoreceptors and retina*. *Prog Retin Eye Res*, 2013. **36**: p. 52-119.
4. Mannu, G.S., *Retinal phototransduction*. *Neurosciences (Riyadh)*, 2014. **19**(4): p. 275-80.
5. Cunha-Vaz, J., R. Bernardes, and C. Lobo, *Blood-retinal barrier*. *Eur J Ophthalmol*, 2011. **21 Suppl 6**: p. S3-9.
6. Mescher, A.L., , Anthony L. Mescher, and Luiz Carlos Uchôa Junqueira., *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas*. 2016: McGraw-Hill Education.
7. Mead, B., et al., *Stem cell treatment of degenerative eye disease*. *Stem Cell Res*, 2015. **14**(3): p. 243-57.
8. Gheorghe, A., L. Mahdi, and O. Musat, *Age-Related Macular Degeneration*. *Rom J Ophthalmol*, 2015. **59**(2): p. 74-7.
9. McLeod, D.S., et al., *Relationship between RPE and choriocapillaris in age-related macular degeneration*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009. **50**(10): p. 4982-91.
10. Mitchell, P., et al., *Age-related macular degeneration*. *Lancet*, 2018. **392**(10153): p. 1147-1159.
11. Ayton, L.N., et al., *An update on retinal prostheses*. *Clin Neurophysiol*, 2020. **131**(6): p. 1383-1398.
12. Verbakel, S.K., et al., *Non-syndromic retinitis pigmentosa*. *Prog Retin Eye Res*, 2018. **66**: p. 157-186.
13. Zobor, D. and E. Zrenner, *[Retinitis pigmentosa - a review. Pathogenesis, guidelines for diagnostics and perspectives]*. *Ophthalmologie*, 2012. **109**(5): p. 501-14;quiz 515.
14. Tsang, S.H. and T. Sharma, *Retinitis Pigmentosa (Non-syndromic)*. *Adv Exp Med Biol*, 2018. **1085**: p. 125-130.
15. Lane, D.P. and L.V. Crawford, *T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells*. *Nature*, 1979. **278**(5701): p. 261-3.
16. Toufektchan, E. and F. Toledo, *The Guardian of the Genome Revisited: p53 Downregulates Genes Required for Telomere Maintenance, DNA Repair, and Centromere Structure*. *Cancers (Basel)*, 2018. **10**(5).
17. Parrales, A. and T. Iwakuma, *Targeting Oncogenic Mutant p53 for Cancer Therapy*. *Front Oncol*, 2015. **5**: p. 288.
18. Romer, L., et al., *p53--a natural cancer killer: structural insights and therapeutic concepts*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2006. **45**(39): p. 6440-60.
19. Kitayner, M., et al., *Structural basis of DNA recognition by p53 tetramers*. *Mol Cell*, 2006. **22**(6): p. 741-753.
20. Chao, C.C., *Mechanisms of p53 degradation*. *Clin Chim Acta*, 2015. **438**: p. 139-47.

21. Kasthuber, E.R. and S.W. Lowe, *Putting p53 in Context*. Cell, 2017. **170**(6): p. 1062-1078.
22. Smith, N.D., et al., *The p53 tumor suppressor gene and nuclear protein: basic science review and relevance in the management of bladder cancer*. J Urol, 2003. **169**(4): p. 1219-28.
23. May, P. and E. May, *Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein*. Oncogene, 1999. **18**(53): p. 7621-36.
24. Kanapathipillai, M., *Treating p53 Mutant Aggregation-Associated Cancer*. Cancers (Basel), 2018. **10**(6).
25. Joerger, A.C. and A.R. Fersht, *Structural biology of the tumor suppressor p53*. Annu Rev Biochem, 2008. **77**: p. 557-82.
26. Shangary, S. and S. Wang, *Targeting the MDM2-p53 interaction for cancer therapy*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(17): p. 5318-24.
27. Retzlaff, M., et al., *The regulatory domain stabilizes the p53 tetramer by intersubunit contacts with the DNA binding domain*. J Mol Biol, 2013. **425**(1): p. 144-55.
28. McLure, K.G. and P.W. Lee, *How p53 binds DNA as a tetramer*. EMBO J, 1998. **17**(12): p. 3342-50.
29. Chen, Y., et al., *Structure of p53 binding to the BAX response element reveals DNA unwinding and compression to accommodate base-pair insertion*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(17): p. 8368-76.
30. Shu, K.X., B. Li, and L.X. Wu, *The p53 network: p53 and its downstream genes*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2007. **55**(1): p. 10-8.
31. Ryan, K.M., A.C. Phillips, and K.H. Vousden, *Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein*. Curr Opin Cell Biol, 2001. **13**(3): p. 332-7.
32. Rozan, L.M. and W.S. El-Deiry, *p53 downstream target genes and tumor suppression: a classical view in evolution*. Cell Death Differ, 2007. **14**(1): p. 3-9.
33. Wolfrum, P., et al., *The function of p53 and its role in Alzheimer's and Parkinson's disease compared to age-related macular degeneration*. Front Neurosci, 2022. **16**: p. 1029473.
34. Aubrey, B.J., et al., *How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression?* Cell Death Differ, 2018. **25**(1): p. 104-113.
35. Vaseva, A.V. and U.M. Moll, *The mitochondrial p53 pathway*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1787**(5): p. 414-20.
36. Royds, J.A. and B. Iacopetta, *p53 and disease: when the guardian angel fails*. Cell Death Differ, 2006. **13**(6): p. 1017-26.
37. Miller, M., et al., *The Evolution of TP53 Mutations: From Loss-of-Function to Separation-of-Function Mutants*. J Cancer Biol Res, 2016. **4**(4).
38. Hino, O. and T. Kobayashi, *Mourning Dr. Alfred G. Knudson: the two-hit hypothesis, tumor suppressor genes, and the tuberous sclerosis complex*. Cancer Sci, 2017. **108**(1): p. 5-11.
39. Checler, F. and C. Alves da Costa, *p53 in neurodegenerative diseases and brain cancers*. Pharmacol Ther, 2014. **142**(1): p. 99-113.

40. Mogi, M., et al., *p53 protein, interferon-gamma, and NF-kappaB levels are elevated in the parkinsonian brain*. *Neurosci Lett*, 2007. **414**(1): p. 94-7.
41. Kitamura, Y., et al., *Changes of p53 in the brains of patients with Alzheimer's disease*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997. **232**(2): p. 418-21.
42. Vuong, L., S.M. Conley, and M.R. Al-Ubaidi, *Expression and role of p53 in the retina*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012. **53**(3): p. 1362-71.
43. Shin, D.H., et al., *In situ localization of p53, bcl-2 and bax mRNAs in rat ocular tissue*. *Neuroreport*, 1999. **10**(10): p. 2165-7.
44. Marti, A., et al., *Light-induced cell death of retinal photoreceptors in the absence of p53*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1998. **39**(5): p. 846-9.
45. Lansel, N., et al., *The mouse ERG before and after light damage is independent of p53*. *Doc Ophthalmol*, 1998. **96**(4): p. 311-20.
46. Westlund, B.S., et al., *Involvement of c-Abl, p53 and the MAP kinase JNK in the cell death program initiated in A2E-laden ARPE-19 cells by exposure to blue light*. *Apoptosis*, 2009. **14**(1): p. 31-41.
47. Bhattacharya, S., et al., *Age-related susceptibility to apoptosis in human retinal pigment epithelial cells is triggered by disruption of p53-Mdm2 association*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012. **53**(13): p. 8350-66.
48. Kim, J.B. and E.M. Lad, *Therapeutic Options Under Development for Nonneovascular Age-Related Macular Degeneration and Geographic Atrophy*. *Drugs Aging*, 2021. **38**(1): p. 17-27.
49. Stommel, J.M., et al., *A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking*. *EMBO J*, 1999. **18**(6): p. 1660-72.
50. Rita Costa, A., et al., *Guidelines to cell engineering for monoclonal antibody production*. *Eur J Pharm Biopharm*, 2010. **74**(2): p. 127-38.
51. Britton, S., et al., *DNA damage triggers SAF-A and RNA biogenesis factors exclusion from chromatin coupled to R-loops removal*. *Nucleic Acids Res*, 2014. **42**(14): p. 9047-62.
52. Dunn, K.C., et al., *ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties*. *Exp Eye Res*, 1996. **62**(2): p. 155-69.
53. Altschul, S.F., et al., *Basic local alignment search tool*. *J Mol Biol*, 1990. **215**(3): p. 403-10.
54. Nakata, Y., X. Tang, and K.K. Yokoyama, *Preparation of competent cells for high-efficiency plasmid transformation of Escherichia coli*. *Methods Mol Biol*, 1997. **69**: p. 129-37.
55. Dagert, M. and S.D. Ehrlich, *Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of Escherichia coli cells*. *Gene*, 1979. **6**(1): p. 23-8.
56. Froger, A. and J.E. Hall, *Transformation of plasmid DNA into E. coli using the heat shock method*. *J Vis Exp*, 2007(6): p. 253.
57. Thermo Fisher Scientific. *Factors Influencing Transfection Efficiency*. abgerufen am 20.09.2021; Available from: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/references/gibco-cell-culture-basics/transfection-basics/factors-influencing-transfection-efficiency.html>.

58. Fus-Kujawa, A., et al., *An Overview of Methods and Tools for Transfection of Eukaryotic Cells in vitro*. Front Bioeng Biotechnol, 2021. **9**: p. 701031.
59. Chong, Z.X., S.K. Yeap, and W.Y. Ho, *Transfection types, methods and strategies: a technical review*. PeerJ, 2021. **9**: p. e11165.
60. Promega. *An Introduction to Transfection*. abgerufen am 20.09.21; Available from: <https://www.promega.de/resources/guides/cell-biology/transfection/>.
61. Kabanov, A.V. and V.A. Kabanov, *DNA complexes with polycations for the delivery of genetic material into cells*. Bioconjug Chem, 1995. **6**(1): p. 7-20.
62. Kim, T.K. and J.H. Eberwine, *Mammalian cell transfection: the present and the future*. Anal Bioanal Chem, 2010. **397**(8): p. 3173-8.
63. Friend, D.S., D. Papahadjopoulos, and R.J. Debs, *Endocytosis and intracellular processing accompanying transfection mediated by cationic liposomes*. Biochim Biophys Acta, 1996. **1278**(1): p. 41-50.
64. Gao, X. and L. Huang, *Cationic liposome-mediated gene transfer*. Gene Ther, 1995. **2**(10): p. 710-22.
65. chemicell. *Magnetofection™*. abgerufen am 21.09.21; Available from: [http://www.chemicell.com/products/Magnetofection/Magnetofection\\_separation.html](http://www.chemicell.com/products/Magnetofection/Magnetofection_separation.html).
66. Young, J.L. and D.A. Dean, *Electroporation-mediated gene delivery*. Adv Genet, 2015. **89**: p. 49-88.
67. Gehl, J., *Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research*. Acta Physiol Scand, 2003. **177**(4): p. 437-47.
68. Thumann, G., et al., *High efficiency non-viral transfection of retinal and iris pigment epithelial cells with pigment epithelium-derived factor*. Gene Ther, 2010. **17**(2): p. 181-9.
69. Wu, D. and P. Yotnda, *Induction and testing of hypoxia in cell culture*. J Vis Exp, 2011(54).
70. Munoz-Sanchez, J. and M.E. Chanez-Cardenas, *The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model*. J Appl Toxicol, 2019. **39**(4): p. 556-570.
71. Piret, J.P., et al., *CoCl<sub>2</sub>, a chemical inducer of hypoxia-inducible factor-1, and hypoxia reduce apoptotic cell death in hepatoma cell line HepG2*. Ann N Y Acad Sci, 2002. **973**: p. 443-7.
72. Nindl, G., et al., *Effect of hydrogen peroxide on proliferation, apoptosis and interleukin-2 production of Jurkat T cells*. Biomed Sci Instrum, 2004. **40**: p. 123-8.
73. Ransy, C., et al., *Use of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to Cause Oxidative Stress, the Catalase Issue*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(23).
74. McKinnon, K.M., *Flow Cytometry: An Overview*. Curr Protoc Immunol, 2018. **120**: p. 5 1 1-5 1 11.
75. Julien, O. and J.A. Wells, *Caspases and their substrates*. Cell Death Differ, 2017. **24**(8): p. 1380-1389.
76. Harris, S.L. and A.J. Levine, *The p53 pathway: positive and negative feedback loops*. Oncogene, 2005. **24**(17): p. 2899-908.

77. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. *Nucleic Acids Res*, 2001. **29**(9): p. e45.
78. Gresch, O., et al., *New non-viral method for gene transfer into primary cells*. *Methods*, 2004. **33**(2): p. 151-63.
79. Gresch, O. and L. Altrogge, *Transfection of difficult-to-transfect primary mammalian cells*. *Methods Mol Biol*, 2012. **801**: p. 65-74.
80. Plank, C., O. Zelphati, and O. Mykhaylyk, *Magnetically enhanced nucleic acid delivery. Ten years of magnetofection-progress and prospects*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2011. **63**(14-15): p. 1300-31.
81. Janich, C., et al., *Efficient Transfection of Large Plasmids Encoding HIV-1 into Human Cells-A High Potential Transfection System Based on a Peptide Mimicking Cationic Lipid*. *Pharmaceutics*, 2020. **12**(9).
82. Lesueur, L.L., L.M. Mir, and F.M. Andre, *Overcoming the Specific Toxicity of Large Plasmids Electrotransfer in Primary Cells In Vitro*. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2016. **5**: p. e291.
83. Bazrafshani, M.R., et al., *Deletion/duplication mutation screening of TP53 gene in patients with transitional cell carcinoma of urinary bladder using multiplex ligation-dependent probe amplification*. *Cancer Med*, 2016. **5**(2): p. 145-52.
84. Li, Q. and J.D. Martinez, *P53 is transported into the nucleus via an Hsf1-dependent nuclear localization mechanism*. *Mol Carcinog*, 2011. **50**(2): p. 143-52.
85. Lavin, M.F. and N. Gueven, *The complexity of p53 stabilization and activation*. *Cell Death Differ*, 2006. **13**(6): p. 941-50.
86. Parmar, V.M., et al., *A2E-associated cell death and inflammation in retinal pigmented epithelial cells from human induced pluripotent stem cells*. *Stem Cell Res*, 2018. **27**: p. 95-104.
87. Fridman, A.L. and M.A. Tainsky, *Critical pathways in cellular senescence and immortalization revealed by gene expression profiling*. *Oncogene*, 2008. **27**(46): p. 5975-87.
88. Katakura, Y., S. Alam, and S. Shirahata, *Immortalization by gene transfection*. *Methods Cell Biol*, 1998. **57**: p. 69-91.
89. Millau, J.F., et al., *p53 functions and cell lines: have we learned the lessons from the past?* *Bioessays*, 2010. **32**(5): p. 392-400.
90. Momand, J., et al., *The MDM2 gene amplification database*. *Nucleic Acids Res*, 1998. **26**(15): p. 3453-9.

## **7 Erklärung zum Eigenanteil**

Die Arbeit wurde an der Universitätsaugenklinik Tübingen unter Betreuung von Dr. rer. nat. Sven Schnichels durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Dr. rer. nat. Sven Schnichels (Arbeitsgruppenleiter), Dr. rer. nat. José Hurst (Postdoktorandin) und Agnes Fietz, M.Sc. (PhD Kandidatin).

Die Vorbereitung der chemokompetenten Zellen sowie die Plasmidtransformation wurden durch Heidi Mühl, M.Sc. (Technische Assistenten) durchgeführt. Die Durchflusszytometrie erfolgte unter Anleitung und Aufsicht von Pietro De Angeli, M.Sc. (PhD Kandidat), in der FACS Core Facility in Tübingen.

Sämtliche Versuche wurden (nach Einarbeitung durch Dr. rer. nat. Sven Schnichels, Dr. rer. nat. José Hurst, Agnes Fietz, M.Sc. und Heidi Mühl, M.Sc.) in eigenständiger Regie durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig nach Anleitung durch Agnes Fietz, M.Sc. durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

---

Peter Wolfrum

## 8 Veröffentlichungen

Veröffentlicht im Fachjournal Frontiers in Neuroscience:

**Wolfrum, P.**, Fietz, A., Schnichels, S., & Hurst, J. (2022). The function of p53 and its role in Alzheimer's and Parkinson's disease compared to age-related macular degeneration. *Frontiers in Neuroscience*, 16. doi:10.3389/fnins.2022.1029473

Posterpräsentation mit Ergebnissen aus dieser Arbeit:

**Wolfrum, P.**, Fietz, A., Schnichels, S., Hurst, J. Die Rolle von p53 in primären retinalen RPE Zellen. 121 Kongress der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft (DOG), Berlin, Deutschland 28.09 - 01.10.2023

## **9 Danksagung**

Ich danke Herrn Prof. Dr. Karl-Ulrich Bartz-Schmidt, dem Ärztlichen Direktor der Universitäts-Augenklinik Tübingen, für die Möglichkeit meine Promotionsarbeit in seiner Klinik durchführen zu können.

Ein besonderer Dank gilt meinem Betreuer, Herrn Dr. rer. nat. Sven Schnichels, für die Vergabe des Forschungsthemas, der Möglichkeit die Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können sowie einer exzellenten Betreuung bei der Umsetzung der Doktorarbeit.

Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei Frau Dr. rer. nat. José Hurst sowie Agnes Fietz für die Unterstützung in allen Phasen meiner Doktorarbeit bedanken. Ohne Ihre kontinuierliche Hilfe wäre meine Dissertation nicht möglich gewesen.

Weiterhin möchte ich mich bei Pietro De Angeli (Wissinger Lab), Heidi Mühl und Katharina Rasp sowie allen weiteren Labormitgliedern des Schnichels Lab für die kollegiale Zusammenarbeit und gegenseitige Unterstützung im Labor bedanken.

Zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern, meinen Geschwistern Sophie, Max und Robert sowie meiner Freundin Jaqueline die mir stets Rückhalt, Motivation und Unterstützung geboten haben.