

Aus der Klinik für Augenheilkunde
der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

Dissertation

Der Einfluss der
Komplementkomponente C5a auf
die Calciumhämostasie in humanen
Hornhautkeratozyten

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Zohreh Jami
aus Buschehr

Datum der Promotion: 25.06.2023

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	7
Zusammenfassung	10
Abstract	12
1 Einleitung	14
1.1 Die menschliche Hornhaut	14
1.2 Die Wundheilung der Hornhaut	15
1.3 Die Physiologie der humanen Hornhautkeratozyten (HCK)	16
1.4 Das Komplementsystem	18
1.5 Ca^{2+} -Homöostase und transiente Rezeptorpotentialka- näle (TRPs)	19
1.6 Das Komplementsystem und TRPs	23
1.7 Genexpression von TRPs in HCK-Zellen	23
1.8 Fragestellung und Zielsetzung	25
2 Material und Methoden	26
2.1 Lösungen und Chemikalien	26
2.2 Zellkultur von humanen Hornhautkeratozyten (HCK) .	28
2.3 Fluorescence Calcium Imaging	29
2.4 Die planare Patch-Clamp-Technik	33
2.5 Datenanalyse und Statistik	36

3	Ergebnisse	38
3.1	Die Morphologie von HCK-Zellen	38
3.2	Fluoreszenzoptische Messungen	39
3.2.1	Funktionelle Calciumregulation in HCK-Zellen .	39
3.2.2	C5a erhöht die intrazelluläre Calciumkonzentration	40
3.2.3	C5L2 unterdrückt den C5a-induzierten Calciumeinstrom in HCK	43
3.3	Elektrophysiologische Untersuchungen der HCK-Zellen	43
3.3.1	Effekt von C5a mit und ohne La^{3+} auf die Ganzzellströme in HCK	43
3.4	Messungen mit Maus-C5a	45
3.4.1	Maus-C5a erhöhte die intrazelluläre Calciumkonzentration	45
3.4.2	La^{3+} unterdrückt den C5a-induzierten Calciumeinstrom in HCK	46
3.4.3	Effekt von Maus-C5a auf die Ganzzellströme . .	46
4	Diskussion	49
4.1	Evaluation der Zellmorphologie der HCK	50
4.2	Rolle von C5a in der Calciumregulation in HCK-Zellen	52
4.3	Rolle von C5L2 in der Calciumregulation in HCK-Zellen	53
4.4	Rolle von TRP-Kanälen in der C5a-regulierten Calciumhämose	55
4.5	Medizinische Relevanz	57
4.6	Schlussfolgerung	58
4.7	Limitationen der Studie	58
4.7.1	Zellkultur	58
4.7.2	Komplementkomponente C5a	59
4.7.3	TRPs und La^{3+}	59
4.7.4	Technische Limitationen	59
	Literaturverzeichnis	62

Eidesstattliche Versicherung	78
Lebenslauf	82
Danksagung	82

Abbildungsverzeichnis

1.1	Anatomie der Hornhaut	15
1.2	Die humanen Hornhautkeratozyten	17
1.3	Die Hornhautschichten	17
1.4	Das Komplementsystem	19
1.5	Strukturtopologie von TRP-Kanälen	21
1.6	TRP-Kanäle in humanen Hornhautzellen	22
1.7	TRPV1- und TRPM8-Genexpression in HCK-Zellen . .	24
2.1	Zellkulturlabor	28
2.2	Calcium Imaging	30
2.3	Fluoreszenzmikroskopische Augnahme von kultivierten HCK-Zellen beladen mit $1 \mu\text{M}$ Fura-2/AM	32
2.4	Planar-Patch-Clamp-System.	34
2.6	Die Vorbereitung des Port-a-Patch	34
2.5	Planar-Patch-Clamp-Setup	35
3.1	HCK-Zellen unter dem Lichtmikroskop	38
3.2	Effekt von Ca^{2+} -freier Lösung auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in HCK .	39
3.3	Effekt von verschiedenen Konzentrationen von C5a auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in HCK-Zellen	40
3.4	Darstellung einzelner Messungen mit dem Fluorescence Calcium Imaging (Fura-2/AM)	41
3.5	Effekt von C5a und C5L2 auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in HCK-Zellen	42
3.6	Ganzzellströme gemessen in HCK (Messungen mit hu- manem C5a)	44
3.7	Effekt von C5a und La^{3+} auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in HCK-Zellen	47

3.8	Darstellung einzelner Messungen mit dem Fluorescence Calcium Imaging (Fura-2/AM)	47
3.9	Ganzzellströme von HCK und Wirkungen von Maus-C5a.	48
4.1	Schematische Darstellung der Ca^{2+} -Regulation in HCK	49
4.2	Mikroskopische Aufnahmen von Kollagenase-isolierten Keratozyten unter verschiedenen Bedingungen	50
4.3	Morphologie von nicht transformierten HCK-Zellen und mit SV40 transformierten HCK-Zellen	51
4.4	HCK-Identifizierung	51
4.5	Ganzzellströme von HCEC-12	53
4.6	Decoy-Rezeptormodell von C5L2	54
4.7	$[Ca^{2+}]_i$ in RBL-Zellen mit C5L2	54
4.8	C5a-induzierte mechanische Sensibilisierung bei TRPV1	56

Abkürzungsverzeichnis

AMD	Altersbedingte Makuladegeneration
AMTB	N-(3-aminopropyl)-2-[(3-methylphenyl)methoxy]- N-(2-thienylmethyl)benzamide hydrochloride
BCTC	N-(4-tert-butylphenyl)-4-(3-chloropyridin-2- yl)tetrahydropyrazine-1(2H)-carboxamide
Ca²⁺	Calcium
[Ca²⁺]_i	Intracellular calcium concentration
CNV	Choroidal Neovascularization
DAPI	4', 6-diamidino-2-phenylindole
DMEM/HAM	Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham's nutrient mixture
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N, N, N',N'-tetraessigsäure
FBS	Fetal Bovine Serum
FCS	Fetal Calf Serum
Fura-2/AM	Fura-2/acetoxymethyl ester
HCEC-12	Human corneal endothelial cell line 12

HCK	Human corneal keratocyte
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
IF	Immunfluoreszenz
ICI	Icilin
KCS	Keratoconjunctivitis sicca
KTN	Anti-Keratocan
<i>La</i>³⁺	Lanthanum-III-chloride
LUM	Lumican
NGF	Nerve growth factor
NOMP	NOmechano-Potential
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
RBL	Rat Basophilic Leukemia cells
RCF	Relative centrifugal force
ROI	Regions of Interest
RPE	Retinal Pigment Epithel
SEM	Standard error mean
α-SMA	Alpha-Smooth-Muscle-Actin
TRP	Transient receptor potential
TRPA	Transient receptor potential channel ankyrin

TRPA1	Transient receptor potential channel ankyrin subtype 1 (previously named ANTKM1)
TRPC	Transient receptor potential channel canonical subfamily
TRPM	Transient receptor potential channel melastatin
TRPM8	Transient receptor potential channel melastatin subtype 8 (also known as CMR1)
TRPML	Transient receptor potential channel mucolipin subfamily
TRPN	Transient receptor potential channel NO-mechano-potential subfamily
TRPP	Transient receptor potential channel polycystin subfamily
TRPV	Transient receptor potential channel vanilloid
TRPV1	Transient receptor potential channel vanilloid subtype 1
TRPV2	Transient receptor potential channel vanilloid subtype 2
TRPV3	Transient receptor potential channel vanilloid subtype 3
TRPV4	Transient receptor potential channel vanilloid subtype 4

Zusammenfassung

Die Augenkrankheiten, die mit einem massiven Sehverlust einhergehen, sind häufig das Ergebnis einer fehlgeleiteten Regulation der Angiogenese und der Wundheilung. Während die Behandlung von vaskulären Augenerkrankungen mithilfe der Untersuchung der Pathomechanismen entscheidend verbessert werden könnte, gibt es keine kausalen therapeutischen Ansätze für die Behandlung von fibrotischen Augenerkrankungen. In diesem Zusammenhang ist die physiologische Wundheilung ein komplexer Gewebeprozess. Die Dysregulation von Entzündungsreaktionen durch einen fibrotischen Umbauprozess führt zu einer Ablagerung von Kollagen, Fibronectin und Matrixproteinen (Gewebeschäden). Zu diesem Zeitpunkt sind Myofibroblasten wichtige Mediatoren. Insbesondere besitzt die Hornhaut aufgrund ihrer fehlenden Vaskularität ein Immunprivileg. An diesem Punkt ist bekannt, dass das Komplementsystem beteiligt ist bei verschiedenen Augenerkrankungen wie Keratopathie.

Der Mechanismus der Wechselwirkung des Komplements mit den Keratozyten und die Bedeutung von Myofibroblasten ist jedoch bisher nicht geklärt. In Bezug auf die Wundheilung der Hornhaut ist es jedoch unklar, ob das Komplementsystem mit Myofibroblasten kommuniziert und welche Ionenkanäle, Wachstumsfaktoren und Rezeptoren daran beteiligt sein könnten. Bemerkenswert ist, dass verschiedene Transient-Rezeptor-Potential (TRP)-Kanäle in verschiedenen Hornhautzellschichten exprimiert sind und überwiegend an der Ca^{2+} -Regulation beteiligt sind.

Diese Studie wurde durchgeführt, um die Wirkung von C5a auf die Ca^{2+} -Regulation mit und ohne C5a-Bindungsprotein (C5L2) in humanen Hornhautkeratozyten zu untersuchen. Für in vitro elektrophysiologische Untersuchungen wurde ein etabliertes Zellmodell für humane Hornhautkeratozyten verwendet (Human corneal keratocyte (HCK)). Speziell wurde eine hochempfindliche

Methode wie Fluorescence Calcium Imaging verwendet, um Änderungen des Fluoreszenzratios (f340/f380) zu detektieren, das proportional zur intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) verläuft. Darüber hinaus wurde die planare Patch-Clamp-Technik verwendet, um Ganzzellströme zu messen. Im Ergebnis führte eine extrazelluläre Applikation von C5a zu einem Anstieg des Fluoreszenzratios und der Ganzzellströme. Dieser Effekt konnte in Gegenwart des C5a-Bindungsproteins (C5L2) und der TRP-Kanalblockers unterdrückt werden. Die Ergebnisse zeigen, dass das Proteinfragment C5a, welches als hoch-inflammatorisches Peptid agiert, in der intrazellulären Ca^{2+} -Regulation über den C5a-Rezeptor die TRP-Kanäle triggert und zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration führt. Dies könnte für eine neue Rolle von TRP-Kanälen in nicht-erregbaren Myofibroblasten relevant sein, da bekannt ist, dass die Aktivierung spezifischer TRP-Kanäle mit der Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen verbunden ist.

Abstract

Ocular diseases, which are along with massive vision loss are frequently the result of misdirected regulation of angiogenesis and wound healing. Whereas the treatment of vascular ocular diseases could be crucially improved with the help of the investigation of the pathomechanisms, there are no causal therapeutic approaches for the treatment of fibrotic ocular diseases. In this connection, the physiological wound healing is a complex tissue process. Dysregulation of inflammatory reactions due to the fibrotic remodeling process leads to a deposit of collagen, fibronectin, and matrix proteins (tissue damage). At this point, myofibroblasts are key mediators. Specifically, the cornea possesses an immune privilege due to its missing vascularity. At this point, it is known that the complement system is involved in different ocular diseases such as keratopathies.

However, the mechanism of the interaction of the complement with the keratocytes and the meaning of myofibroblasts is not elucidated so far. But recent studies highlighted the importance of C5a and other components of the complement system in inflammatory processes whereas the underlying mechanism remained unknown.

Regarding corneal wound healing, it is also unclear how the complement system communicates with myofibroblasts and whether ion channels, growth factors, and receptors could be involved. Notable, transient receptor potential channels (TRPs) are expressed in different. Corneal cell layers and predominantly involved in intracellular Ca^{2+} -regulation. Therefore, this study was undertaken to investigate the effect of C5a on Ca^{2+} -regulation with and without the C5a binding protein (C5L2) in HCK. For in vitro electrophysiological investigations, an established cell model for HCK

was used. Specifically, a high sensitive method such as fluorescence calcium imaging was used to detect changes of the fluorescence ratio (f_{340} / f_{380}), which is proportional to the intracellular Ca^{2+} -concentration ($[Ca^{2+}]_i$). In addition, the planar patch-clamp technique was used to measure whole-cell currents. As a result, extracellular application of C5a led to an increase of the fluorescence ratio and whole-cell currents. This effect could be suppressed in the presence of the C5a binding protein (C5L2) and the TRP channel blocker. In conclusion, C5a acting as a highly inflammatory peptide is involved in intracellular Ca^{2+} -regulation via TRPs. This may be relevant for a novel role of TRPs in non-excitabile myofibroblasts since it is known that activation of specific TRPs are linked with the release of proinflammatory cytokines.

Einleitung

1.1 Die menschliche Hornhaut

Die menschliche Hornhaut ist ein hochkomplexes Zellgewebe mit fünf verschiedenen transparenten Schichten: Von anterior nach posterior sind dies Hornhautepithel, Bowman-Membran, Stroma, Descemet-Membran und Hornhautendothel (Abb. 1.1) [1]. Die Funktionen der Hornhaut sind für das normale Sehen von entscheidender Bedeutung und umfassen Barrierschutz, Lichtbrechung und UV-Lichtfiltration [2].

Das Hornhautstroma ist die mittlere Schicht der Hornhaut und macht ca. 90% der gesamten Hornhautdicke aus. Es besteht aus einem Kollagenfasergitter, das mit Keratozyten durchsetzt ist sowie spezialisierten Fibroblasten, die aus Zellen des Nervenkamms stammen. Das Hornhautendothel ist dagegen nur eine einzelne Zellschicht, die den Fluss von gelösten Stoffen und Wasser zwischen Hornhaut und Augenvorderkammer reguliert. Das Hornhautendothel hat daher eine Pump- und Barrierefunktion [4, 5]. Humane Hornhautkeratozyten (HCK) fungieren als Reparatur- und Erhaltungszellen und halten die Transparenz aufrecht. Außerdem heilen sie durch Zellmigration Wunden ab und bauen Hornhautgewebe wieder auf. Sie werden unter Entzündungsbedingungen aktiviert und überexprimieren extrazelluläre Matrixproteine [5, 6, 7].

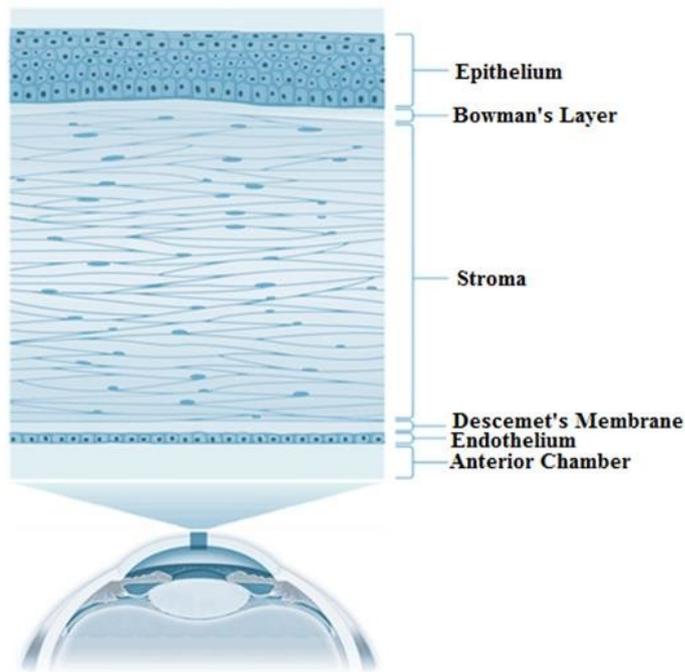


Abb. 1.1 Anatomie der Hornhaut (Abbildung modifiziert nach Al-Fahdawi et al., 2015 [3]).

1.2 Die Wundheilung der Hornhaut

Das normale Sehen hängt von der Fähigkeit der Hornhaut ab, transparent zu bleiben und zusammen mit der Augenlinse das auf die Netzhaut einfallende Licht angemessen zu brechen [8]. Bei fehlender Angiogenese und fehlgeleiteter Wundheilung der Hornhaut können Hornhautverletzungen zur starken visuellen Einschränkung führen. Im Gegensatz zur normalen Haut, bei der die Wundheilung mit der Bildung fibrotischer Narben verbunden ist, muss die Heilung von Hornhautwunden ohne fibrotische Veränderungen und Narben erfolgen, wenn die Transparenz und Form des Gewebes erhalten bleiben soll [9]. Die Rekonstruktion der verletzten Hornhautoberfläche ist ein komplexer multifaktorieller Prozess, der durch zelluläre Mechanismen reguliert wird, an denen Signalmoleküle (Alarmine, Wachstumsfaktoren und Zytokine) beteiligt sind, die aus dem restlichen Hornhautepithel und den Stromazellen freigesetzt werden. Insgesamt beinhaltet der Hornhautwundheilungsmechanismus unterschiedliche dynamische Prozesse, beginnend mit Entzündungen

(einschließlich Gewebedebridement, Gewebewundausschneidung und dynamischen Veränderungen der Zelladhäsion), gefolgt von Re-epithelialisierung (einschließlich Zellmigration und Proliferation) und endend mit globaler Gewebemodellierung [10]. Die Wechselwirkung von Keratozyten mit extrazellulären Matrixkomponenten spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Transparenz und Form der Hornhaut sowie bei der Heilung von Hornhautwunden [9].

1.3 Die Physiologie der humanen Hornhautkeratozyten (HCK)

Das Stroma ist der größte Teil der humanen Hornhaut und enthält Kollagen, insbesondere Typ I, Proteoglykane, Wasser sowie Hornhautkeratozyten (HCK), die an der Regulation der spezifischen extrazellulären Matrix beteiligt sind (Abb. 1.2 und Abb. 1.3 [11]). Die Keratozyten sind humane Zellen mit dendritischer Morphologie, die im gesunden Zustand ruhig bleiben. Sie füllen extrazelluläre Matrix-Proteine wie Kollagen-I und Proteoglycane wie Keratocan und Lumican auf, die auch als Biomarker für die Identifikation von HCK verwendet werden [12, 13].

Die HCKs reagieren empfindlich auf ihre Umgebung. Sowohl im Ruhezustand als auch im aktiven Zustand benötigen sie einen konstanten Flüssigkeitsumsatz aus dem Kammerwasser der Augenvorderkammer, der durch eine Hydratationsbarriere der Hornhautendothelzellen und der Descemet-Membran reguliert wird. Dieses System behält die Stroma-Struktur bei und ein klar regulierter Flüssigkeitszufluss kann zu einer Schwellung der Hornhaut und einer erhöhten Opazität der Hornhaut führen [14].

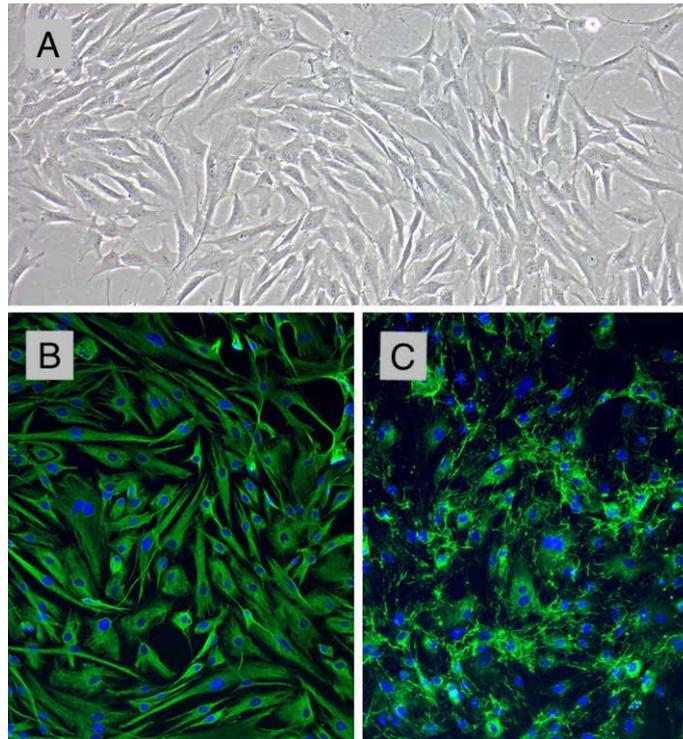


Abb. 1.2 Die humanen Hornhautkeratozyten. Die kultivierten humanen Hornhautkeratozyten (HCK) können sich unter den empfohlenen Bedingungen auf 10 Populationsverdopplungen vermehren. (A) Lichtmikroskopische Aufnahme von HCKs (B) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von HCKs immungefärbt für Vimentin (grün) (C) Fibronektin (grün), Kerne wurden mit 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) angefärbt (Abbildung aus <https://cellapplications.com/human-corneal-keratocytes-hck>).

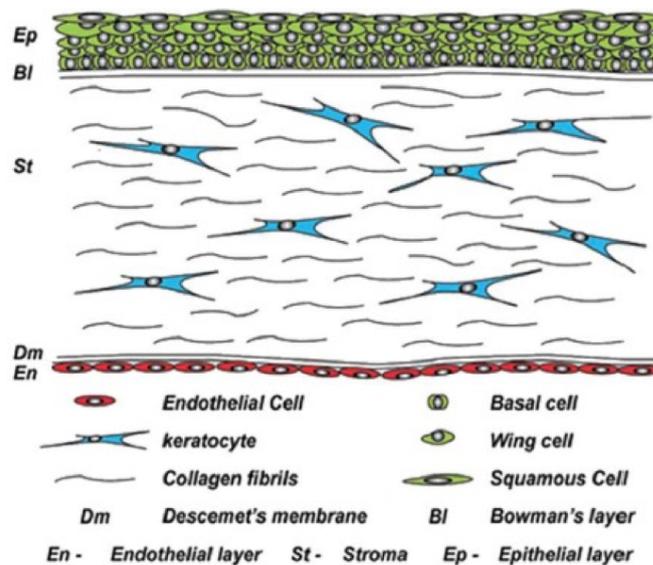


Abb. 1.3 Die Hornhautschichten. Das anatomische Schema, das alle fünf Zellschichten in der Hornhaut zeigt, mit den Hornhautkeratozyten (HCK) im Stroma (blau gefüllte Zellen) (Abbildung modifiziert nach Stuard et al., 2020 [11]).

1.4 Das Komplementsystem

Das Komplementsystem ist ein System einer Proteinkaskade aus der Leber und ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunität. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Erkennung und Beseitigung von Krankheitserregern. Es besteht aus 30 löslichen und membrangebundenen Proteinen, die durch eine Kaskade enzymatischer Reaktionen schnell mobilisiert werden. Diese Proteine sind an der Abwehr des Wirts durch eine Reihe von Mechanismen, einschließlich direkter Abtötung von Bakterien, Erleichterung der Phagozytose, Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen, Vasodilatation und eine Erhöhung der Gefäß-permeabilität beteiligt (Abb. 1.4) [15]. Durch physikalische oder chemische Verletzungen kann das Komplementfragment beschädigt werden [16, 17, 18]. Das Komplementsystem ist bei verschiedenen Augenerkrankungen wie Keratopathie beteiligt [19]. Das Komplementfragment C5a ist ein proinflammatorisches Polypeptid mit 74 Resten, das während der Aktivierung der Komplementkaskade von Serumproteinen als Reaktion auf fremde Oberflächen wie Mikroorganismen und Gewebe hergestellt wird. C5a erzeugt eine thermische Hyperalgesie über die Signalübertragung von Makrophagen zu Nozizeptoren. Diese erfordern einen Nervenwachstumsfaktor (NGF) und die Aktivierung des transienten Rezeptor Potential Vanilloidrezeptor 1 (TRPV1) Kanals. (TRPV1 ist auch als Capsaicinrezeptor) bekannt [15]. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind weitgehend unbekannt. Der klassische Rezeptor für C5a (c5aR) ist ein Mitglied der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren [20]. Der Rezeptor C5L2 (auch bekannt als gpr77), der 35% Aminoidentität mit C5aR (auch bekannt als CD88) teilt, ist ein promiskuitives Komplementfragment-bindendes Protein. C5L2 bindet C5a mit hoher Affinität. Es hat eine 10-fach höhere Affinität für C5a desArg als C5aR. Es wurde gezeigt, dass C5L2 physikalisch sowohl mit C5aR als auch mit β -arestin interagiert, um die C5aR-Signalübertragung in Richtung einer

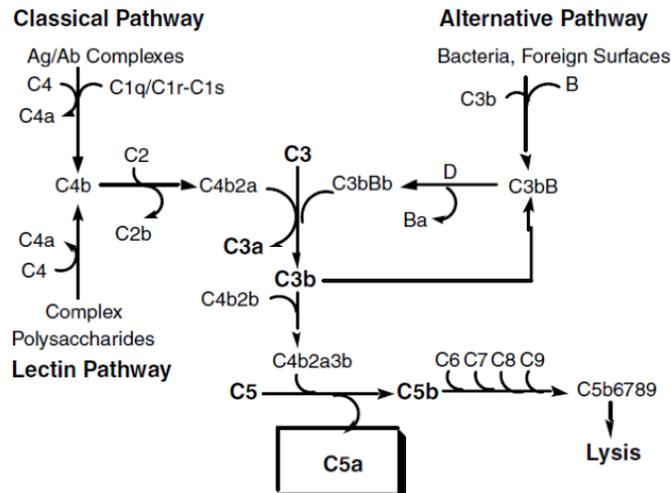


Abb. 1.4 Das Komplementsystem. Drei Wege zur Komplementaktivierung (Abbildung modifiziert nach Monk et al., 2007 [16]).

entzündungshemmenden Wirkung negativ zu regulieren [21, 22, 23].

1.5 Ca^{2+} -Homöostase und transiente Rezeptorpotentialkanäle (TRPs)

Es wird angenommen, dass Ca^{2+} sehr früh in der Entwicklung von Säugetierzellen bei ersten Signalereignissen integriert wurde, indem ein sehr energieaufwendiger, aber kritischer elektrochemischer Gradient zwischen inneren und äußeren Kompartimenten der Zelle hergestellt wurde [24]. Da Calcium sehr früh in der Evolution genutzt und gut konserviert wurde, führte seine weit verbreitete Präsenz dazu, dass Ca^{2+} in zahlreiche regulierende Netzwerke integriert wurde. Die Eigenschaften von Zellen einschließlich Augenzellen werden durch Ca^{2+} -abhängige zelluläre Mechanismen reguliert. In diesem Zusammenhang sind TRPs wesentlich an der Ca^{2+} -Regulierung beteiligt. Ca^{2+} ist ein primärer und sekundärer Botenstoff und an der Aufrechterhaltung der Lebensfähigkeit von Zellen beteiligt. Erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen können ab einer bestimmten Höhe immense irreversible Zellschäden verursachen oder Apoptose induzieren. Unter normalen Bedingungen

besteht in Zellen ein elektrochemischer Konzentrationsgradient von extrazellulärem Ca^{2+} zu intrazellulärem Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) im Verhältnis von 1:10.000 [25, 26, 27]. Die TRPs wurden erstmals in einer Mutante der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckt, deren Photorezeptoren im Gegensatz zu den im Wildtyp beobachteten anhaltenden Strömen mit einem vorübergehenden (transienten) Membranstrom auf Lichtreize reagierten [28, 29, 30, 31]. Die TRP-Kanäle sind Mitglieder einer großen Familie von nicht-selektiven Kationenkanälen. In Säugetierzellen gibt es sechs Untergruppen mit Unterschieden in ihren Aminosäuresequenzen, Aktivierungsfaktoren und Modulationsmechanismen [32, 33]. Die TRPs bilden eine Familie, die in sieben Unterfamilien unterteilt werden. Es gibt nämlich TRPC (kanonisch), TRPV (Vanilloid), TRPM (Melastatin), TRPP (Polycystin), TRPML (Mucolipin), TRPA (Ankyrin) und TRPN (NOMP = NOmechano-Potential, bei Säugetieren nicht vorhanden). Einige TRP-Kanäle können bei einer bestimmten Temperatur aktiviert werden ($> 43^\circ\text{C}$ für TRPV1, $> 52^\circ\text{C}$ für TRPV2, $> \text{ca. } 34\text{-}38^\circ\text{C}$ für TRPV3, $> \text{ca. } 27\text{-}35^\circ\text{C}$ für TRPV4, $< \text{ca. } 25\text{-}28^\circ\text{C}$ für TRPM8, und $< 17^\circ\text{C}$ für TRPA1) [34, 35, 36]. Die TRP-Proteine spielen eine klassische Rolle in der sensorischen Physiologie wie beispielsweise Sehen, Geschmack, Geruch, Hören, Berühren sowie Temperatur und Osmolarität. Jeder TRP-Kanal enthält sechs Transmembranuntereinheiten (S1-S6) mit einer porenbildenden Schleife zwischen S5 und S6 und intrazellulär lokalisierten NH_2^- und $COOH$ -Termini (Abb. 1.5) [37].

Es wird angenommen, dass chemisch verwandte TRP-Subtypen Homo- und Heteromultimere bilden, wenn sie in derselben Zelle co-exprimiert werden. Eine solche Kombination von TRP-Kanalproteinen kann eine große Vielfalt von Kanälen mit zahlreichen Wechselwirkungen, biologischen Funktionen und physikalischen Eigenschaften bilden. Viele dieser TRP-Kanal-Subtypen werden im Auge sowohl auf neuronalen als auch auf nicht-neuronalen Zellen exprimiert, wo sie eine Vielzahl von stressinduzierten regulatorischen

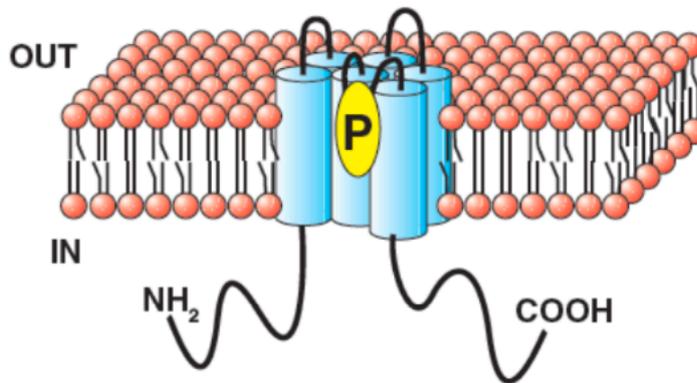


Abb. 1.5 Strukturtopologie von TRP-Kanälen. Alle TRP-Kanäle enthalten sechs Transmembransegmente (S1 bis S6) mit einer mutmaßlichen Porenregion (P) zwischen S5 und S6. Amino- und Carboxyltermini sind unterschiedlich lang und enthalten unterschiedliche Domänensätze (Abbildung modifiziert nach Nilius and Owsianik, 2011 [37]).

Reaktionen beeinflussen. Diese sind für die normale Aufrechterhaltung des Sehvermögens von wesentlicher Bedeutung (Abb. 1.6) [38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45].

TRPM8 ist als Kälte- oder Mentholrezeptor bekannt und ist einer von acht Subtypen der TRP-Melastatinfamilie. TRPM8 ist ein Calciumkanal, der durch moderates Abkühlen ($< 28\text{ }^{\circ}\text{C}$) und Einwirkung von kühlenden Substanzen wie Menthol, Eukalyptol und insbesondere Icilin (ICI), einem Superagonisten, aktiviert werden kann [46, 47, 48, 49, 50]. TRPM8 kann durch Antagonisten wie z. B. La^{3+} (unspezifisch), BCTC (spezifisch für TRPM8/TRPV1) und AMTB (spezifisch für TRPM8) geblockt werden [51]. Ähnliche Ergebnisse wurden mit HCKs gezeigt [13, 52]. Es gibt Hinweise darauf, dass die TRPM8-Aktivierung TRPV1-induzierte Entzündungsreaktionen abschwächen kann [53, 54]. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass eine TRPV1-Stimulation die proinflammatorische Zytokinfreisetzung in humanen Hornhautepithelzellen und die Apoptose von kortikalen Neuronen der Ratte auslöst, beide in calcium-abhängiger Weise [55, 56, 57]. Die TRPM8-Aktivierung unterdrückte die zuvor genannten Reaktionen erfolgreich. Es wurde auch gezeigt, dass die hochsensitive Kühlverbindung Icilin (ICI) die

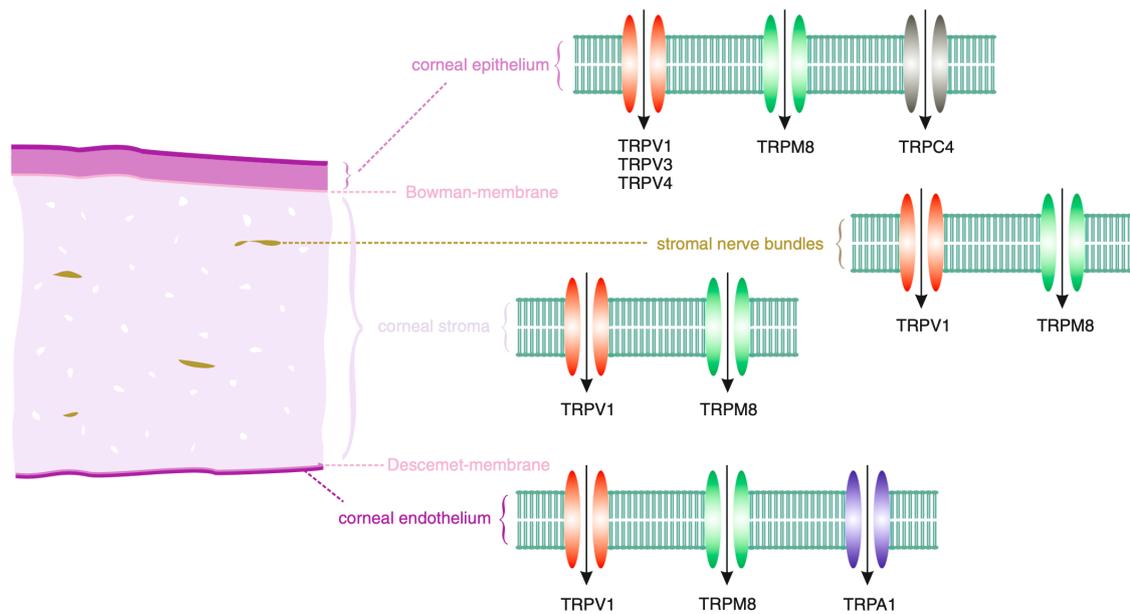


Abb. 1.6 TRP-Kanäle in humanen Hornhautzellen (Abbildung modifiziert nach Reinach et al., 2015 [41]).

Spiegel entzündlicher Zytokine reduziert und die durch Capsaicin ausgelöste Aktivierung von TRPV1 blockiert [58, 59]. Andere TRPM8-Agonisten wie Borneol wurden als therapeutische Behandlungen für Augenkrankheiten wie Keratoconjunctivitis sicca (KCS) untersucht und klinisch angewendet. Der TRPM8-Antagonismus der TRPV1-vermittelten Entzündung erhöht die Feuchtigkeit der Augenoberfläche in menschlichen Hornhautepithelzellen und vermeidet demzufolge deren Schädigung durch Schrumpfung nach hyperosmolarer TRPV1-Aktivierung [60]. TRPV1 hat darüber hinaus eine zusätzliche Aktivität im Stroma, was impliziert, dass die TRPM8-Blockade von TRPV1-Calciumtransienten das Potenzial hat, die proinflammatorische Aktivität und die Heilung von Hornhautwunden bei HCKs zu modulieren [61]. Es kann allerdings zusätzliche entzündungsfördernde Auslöser geben, die der Aktivität von TRPV1 vorausgehen.

1.6 Das Komplementsystem und TRPs

Das Komplementsystem ist an der Pathogenese vieler Krankheiten wie zum Beispiel altersbedingte Makuladegeneration (AMD) beteiligt. Komplementproteine wurden in histologischen Proben von Augen mit AMD gefunden [62, 63, 64, 65, 66]. Die Studien haben den Effekt der Komplementaktivierung in der Retinal-Pigment-Epithel (RPE)-Zellmembran durch Analyse der Änderungen der Membranleitfähigkeit mithilfe von Patch-Clamp-Techniken und Ca^{2+} -Imaging gezeigt [67]. Die Komplement-System-Komponente C5a erzeugt thermische Schmerzüberempfindlichkeit über Makrophagen-zu-Nozizeptor-Signalisierung, die Nervenwachstumsfaktor (NGF)- und TRPV1- Aktivierung erfordert [15, 68]. Bisher sind hauptsächlich C5a und C3a aus dem Komplementsystem dafür bekannt, $[Ca^{2+}]_i$ in verschiedenen Zelltypen zu erhöhen, beispielsweise in Leukozyten, Fibroblasten, Erythrozyten und RPE-Zellen [69, 70, 67, 71].

1.7 Genexpression von TRPs in HCK-Zellen

Die Genexpression von TRPs ist Voraussetzung für die Proteinbiosynthese von TRP-Proteinen, womit eine Expression auf funktioneller Ebene untersucht werden kann. Real-Time-Polymerasekettenreaktionen (RT-PCR) mit reverser Transkriptase wurden durchgeführt, welche die mRNA-Signale sowohl von TRPV1 als auch von TRPM8 in HCK-Zellen zeigten (Abb. 1.7) [13, 52].

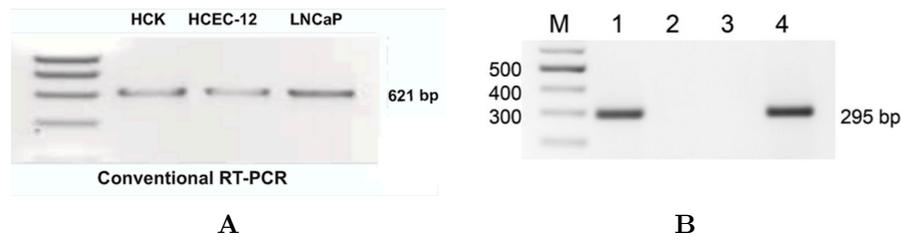


Abb. 1.7 TRPV1- und TRPM8-Genexpression in HCK-Zellen.

(A) Eine konventionelle RT-PCR zeigt das mRNA-Signal des TRPM8-Amplikons (621 bp) in humanen Hornhautkeratozyten (HCK), humanen Hornhautendothelzellen (HCEC-12) und humanen Prostatakrebszellen (LNCaP) als positive Kontrolle an [13].

(B) Eine RT-PCR-Analyse der TRPV1-Expression unter Verwendung von genspezifischen Primern ergab TRPV1 in HCK (Spur 1) und HCEC-12 (Positivkontrolle, Spur 4). Vorlagefreie Negativkontrollen (Spur 2: Matrize durch H_2O ersetzt, Spur 3: ohne reverse Transkriptase in der reversen Transkriptionsreaktion) ergaben keine Banden. $M = 100$ bp plus DNA-Leiter [52].

1.8 Fragestellung und Zielsetzung

In HCK konnten Mergler et al. erstmals die funktionelle Expression von TRPV1 in HCK-Zellen nachweisen [13]. Neuere (unpublizierte) in vitro elektrophysiologische Studien (Ca^{2+} -Imaging, Patch-Clamp) zeigten eine Wirkung von C5a auf die Calciumregulation in einer humanen kornealen Endothelzelllinie (HCEC-12) sowie in HCK-Zellen, die eine Involvierung des Vanilloidrezeptors 1 (TRPV1) andeuten. Es werden daher folgende Hypothesen vorgeschlagen:

1. Es findet ein Effekt von C5a auf die Ca^{2+} -Regulation in HCK statt, der über C5a-Rezeptoren, TRP-Kanäle aktiviert und zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration führt.
2. Da C5a auch an andere in der Kaskade-Relevanten C5a-Rezeptoren binden kann und somit möglicherweise der C5a-induzierte Calciumeffekt trotz Einsatz der spez.C5aR1-Blocker PMX35 sichtbar bliebe, wurde der Multitargetligand C5L2 verwendet [21]. Es wird daher postuliert, dass die Anwendung von C5L2 den C5a-induzierten Calciumeinstrom unterdrückt.

Zur Bestätigung der Hypothesen wurden zwei Methoden angewendet:

- a) Fluorescence Calcium Imaging (Fura-2/AM)
- b) Planar-Patch-Clamp-Technik

Mit Hilfe diesen Methoden können kleinste Änderungen in der zytosolischen Calciumkonzentration detektiert werden sowie Calciumströme durch die Zellmembran.

Material und Methoden

2.1 Lösungen und Chemikalien

- **Medium zur Kultivierung der untersuchten Zellen:**

500 ml DMEM/HAM Kulturmedium mit L-glutamine (Life Technologies Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland und Biochrom AG, Berlin, Deutschland), 2 ml Penicillin/Streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Gibco Invitrogen, Darmstadt, Deutschland), 50 ml fetales Kalbserum (10% Zielkonzentration) (PAA GmbH, Pasching, Österreich) und PBS zum Waschen der Zellkultur: 137 mM NaCl , 2,7 mM KCl , 12 mM PO_4^{3-} .

- **Accutase-Lösung:**

500 μl Accutase (PAA GmbH, Pasching, Österreich) wurden in einer 25-ml-Kulturflasche verwendet, um Zellen zur Verdünnung (Zellpassage) oder zur Herstellung von Zellsuspensionen (Patch-Clamp) weiterverwendet.

- **Zusammensetzung der Lösung (mM) für Fluorescence Calcium Imaging**

Ringer-ähnliche Lösung: 150 mM NaCl , 6 mM CsCl , 1 mM MgCl_2 , 1,5 mM CaCl_2 , 10 mM Glukose, und 10 mM HEPES (pH auf 7,4 eingestellt). K^+ wurde durch Cs^+ ersetzt, um die mutmaßliche Kaliumleitfähigkeiten zu blockieren.

- **Zusammensetzung der intrazellulären Lösung (mM) für die Patch-Clamp-Messungen**

50 mM *CsCl*, 10 mM *NaCl*, 2 mM *MgCl₂*, 60 mM *CsF*, 20 mM EGTA und 10 mM HEPES, pH wurde mit *KOH* auf 7,2 eingestellt (Osmolarität: 288 mOsMol). *Cs⁺* blockiert nach außen gerichtete Ströme von *K⁺* und die Hydrathülle von Fluorid blockiert mögliche Anionen-Chlorid-Kanäle. Diese Lösung wurde verwendet, um nicht-selektive Kationenkanalströme speziell mit der planaren Patch-Clamp-Methode zu messen. Zur Verbesserung der Abdichtwiderstände (Seal) wurde eine sogenannte Seal-Enhancing-Lösung verwendet (80 mM *NaCl*, 3 mM *KCl*, 10 mM *MgCl₂*, 35 mM *CaCl₂* und 10 mM HEPES ((*Na⁺*-Salt)/*HCL*, pH eingestellt auf 7,4) (Osmolarität: 298 mOsMol)). Die Lösungen wurden von der Firma Nanion zur Verfügung gestellt (Nanion Technologies, München, Deutschland).

- **Zusammensetzung der extrazellulären Lösung (mM) für die Patch-Clamp-Messungen**

140 mM *NaCl*, 4 mM *KCl*, 1 mM *MgCl₂*, 2 mM *CaCl₂*, 5 mM D-Glukose Monohydrat und 10 mM HEPES. Der pH-Wert wurde mit *NaOH* auf 7,4 eingestellt (Osmolarität: 298 mOsMol) (Nanion Technologies, München, Deutschland).

- **Chemikalien:**

C5a und C5L2 wurden von Hycult Biotech (Uden, Niederlande) bestellt. Fura-2AM (Fura-2/acetoxymethylester) und BCTC wurden von TOCRIS Bioscience (Bristol, Großbritannien) bezogen. Lanthanum III-Chlorid (*La³⁺*) wurde von Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland) bezogen. Alle anderen Reagenzien wurden auch von Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland) bezogen. Die Reagenzien in den neuen Experimenten (2021-2022) wurden in PBS gelöst. Bis auf

La^{3+} wurden die Reagenzien in der Experimenten vor 2021 in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. DMSO-Effekte auf die Calciumregulation wurden nicht festgestellt und die DMSO-Konzentration überschritt 0,1% nicht.

2.2 Zellkultur von humanen Hornhautkeratozyten (HCK)

Die primären humanen Hornhautkeratozyten wurden ursprünglich aus Augenbankspendermaterial (Augenklinik der Universität, Hamburg, Deutschland) isoliert und die SV40-immortalisierte HCK-Zelllinie wurde von Michaela Zorn-Kruppa vom Universitätsklinikum Eppendorf in Hamburg zur Verfügung gestellt [72, 73]. Die HCK-Zellen wurde als permanente Zelllinie verwendet, um die Fibroblastenaktivität im Hornhautstroma zu untersuchen [74].

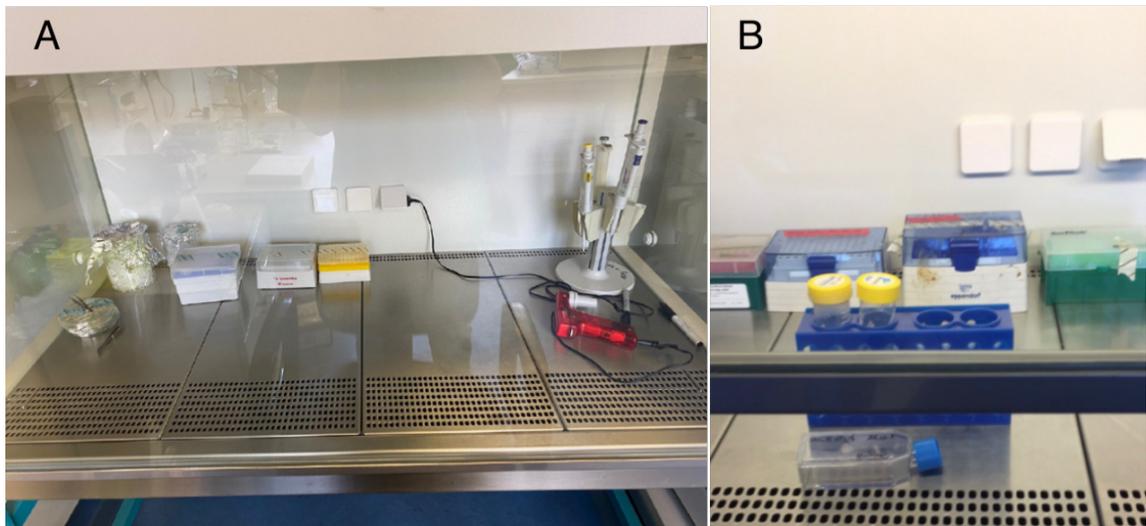


Abb. 2.1 Zellkulturlabor. (A) Laminar-Flowbox (B) Zellkultivierung in 25-ml-Zellkulturflaschen (Fotos Z. Jami).

Die Zellen wurden mindestens 12 Stunden lang auf kreisförmigen Glasdeckgläsern in Zellkulturplatten mit 6 bis 12 Vertiefungen in einem Inkubator mit 37°C und einer angefeuchteten Atmosphäre (95%) in 5% CO_2 kultiviert. Ein Wachstumsmedium bestehend aus 5 ml DMEM wurde in Zellkulturflaschen verwendet, ergänzt mit 10%

fötalem Kälberserum (FCS) und 100 IE/ml Antibiotika wie Penicillin und Streptomycin. Für die Zellpassage wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen bevor sie mit Accutase vom Boden abgelöst wurden. Die enzymatische Reaktion wurde durch Spülen mit Serumhaltigem Medium gestoppt. Dann wurden die Zellen 5 Minuten bei ca. 100 g zentrifugiert und anschließend mit einem Aufteilungsverhältnis von 1:5 auf T25-Zellkulturflaschen ausgesät. Das Medium wurde zwei- bis dreimal pro Woche gewechselt. Die Versuche wurden frühestens 24 Stunden nach der Aussaat begonnen [75, 76].

2.3 Fluorescence Calcium Imaging

Fluorescence Calcium Imaging ist ein fluoreszenzoptisches Verfahren zur Messung von sehr kleinen Änderungen der intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) in Echtzeit. Damit kann die Regulation von Calcium-Signalkaskaden untersucht werden. Um Calcium Imaging durchzuführen, wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2/AM beladen. Nach der Diffusion über die Zellmembran bildet der Farbstoff zusammen mit Ionen Chelatkomplexe. Dies bewirkt eine Konformationsänderung im Farbstoffmolekül, die zu einer Änderung seiner spektralen Eigenschaften führt [77, 78, 79].

In dieser Studie wurden HCK-Zellen auf Glasplättchen mit 15 mm Durchmesser kultiviert, die in eine Kulturplatte mit Vertiefungen gegeben wurden, bis sie eine semi-konfluente Zelldichte erreichten ($\sim 60\text{--}80\%$). Die Zellen wurden dann 20–40 Minuten bei 37°C mit Fura-2/AM ($1\ \mu\text{M}$) beladen. Dann wurden die Zellen mit der ringerähnlichen (Kontroll-) Lösung gespült (Zusammensetzung siehe Abschnitt 2.1). Diese unterbrach den Färbeprozess und entfernte gleichzeitig lose Zellen und Zellbestandteile.

Unterschiedliche Konzentrationen von C5a wurden nach vier Minuten hinzugefügt, um deren Wirkung zu detektieren. In manchen Experimenten wurden die HCK-Zellen zuvor für 30 – 60 Minuten mit

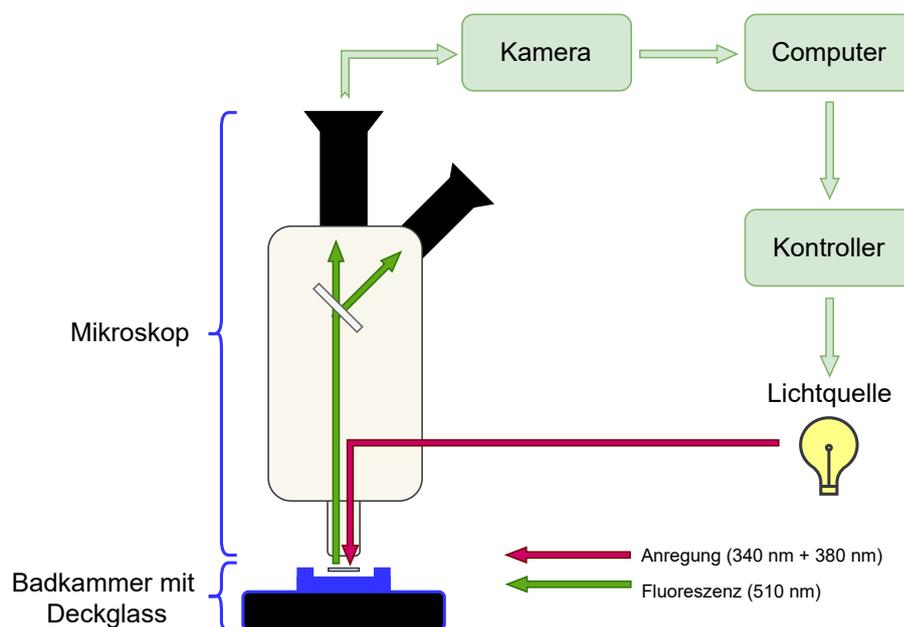
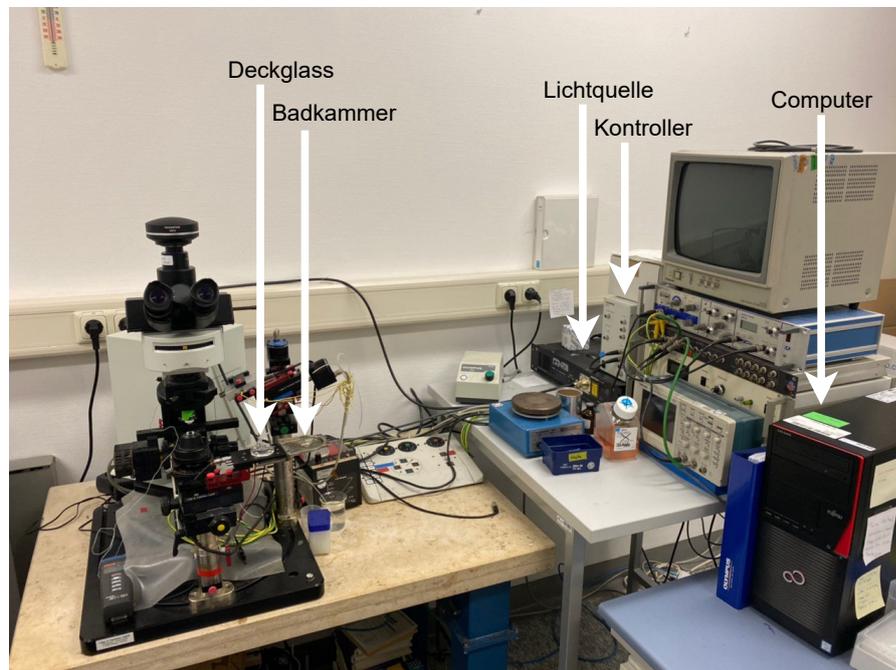


Abb. 2.2 Fluorescence Calcium Imaging Setup. (A) Fluorescence Calcium Imaging Setup der AG Mergler in der Forschungsabteilung der Klinik für Augenheilkunde an der Charité Universität – Campus Virchow Klinikum. (B) Einfache Darstellung vom Setup (Fotos Z. Jami).

dem C5L2 inkubiert. C5L2 ist ein Komplementfragment-bindendes Protein, welches C5a mit hoher Affinität bindet [21, 80]. In diesen Experimenten wurde die Wirkung vom C5L2 als Blocker untersucht. Für diesen Zweck wurde dieser Antagonist dem Zellkulturmedium vor der Fura-2/AM-Gabe hinzugefügt [13, 81]. Das Glasplättchen mit den angefärbten Zellen wurde in eine Badkammer gegeben, die ebenfalls die Ringer-ähnliche Lösung enthielt. Diese Kammer ist Teil eines inversen Mikroskops (Olympus BW50WI, Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg, Deutschland). Dann wurden die mit Fura-2 beladenen Zellen abwechselnd mit UV-Licht der Wellenlängen 340 nm und 380 nm unter Verwendung spezifischer Filter und einer LED-Lichtquelle (LED-Hub von Omikron, Rodgau-Dudenhoven, Deutschland) angeregt. Das digitale Photometrie-Bildgebungssystem (T.I.L.L. Photonics, München, Deutschland) wurde verwendet, um die Fura-2/AM-spezifische Fluoreszenz bei diesen Anregungswellenlängen aufzuzeichnen. In manchen Experimenten wurden die Zellen zuvor für 30 – 60 Minuten mit nicht selektivem Calciumkanalantagonis La^{3+} inkubiert, um dessen Auswirkung auf TRP-Kanäle darzustellen.

Zusätzlich wurden ein Photomultiplier und ein Kameraverstärker verwendet (beide Hamamatsu, Japan) in Verbindung mit der Software TIDA (HEKA, Lamprecht, Deutschland), um die Messungen durchzuführen. Die Emission wurde nach Anregung mit 340 und 380 nm alle 5 s bei jeweils 380 nm mit der Life-Science-Fluoreszenzzelle n-Bildgebungssoftware „cellSens“ (Olympus, Hamburg, Deutschland) in Verbindung mit einer Digitalkamera (Olympus XM-10) gemessen. Jedes Experiment dauerte insgesamt zehn Minuten. Zunächst wurde für vier Minuten eine Kontrollmessung der Basislinie durchgeführt, um die Calciumhomöostase der Zellen zu untersuchen.

Abb. 2.3 zeigt die HCK-Zellen beladen mit $1 \mu\text{M}$ Fura-2/AM bei mittlerer Zelldichte. Mit $1 \mu\text{M}$ Fura-2/AM wurden die HCK-Zellen beladen. Die Zellen wurden mit 380 nm UV-Licht stimuliert und die Fluoreszenzantwort durch ein invertiertes Fluoreszenzmikroskop gemessen. Die Olympus cellSENS-Software ermöglicht die digitale

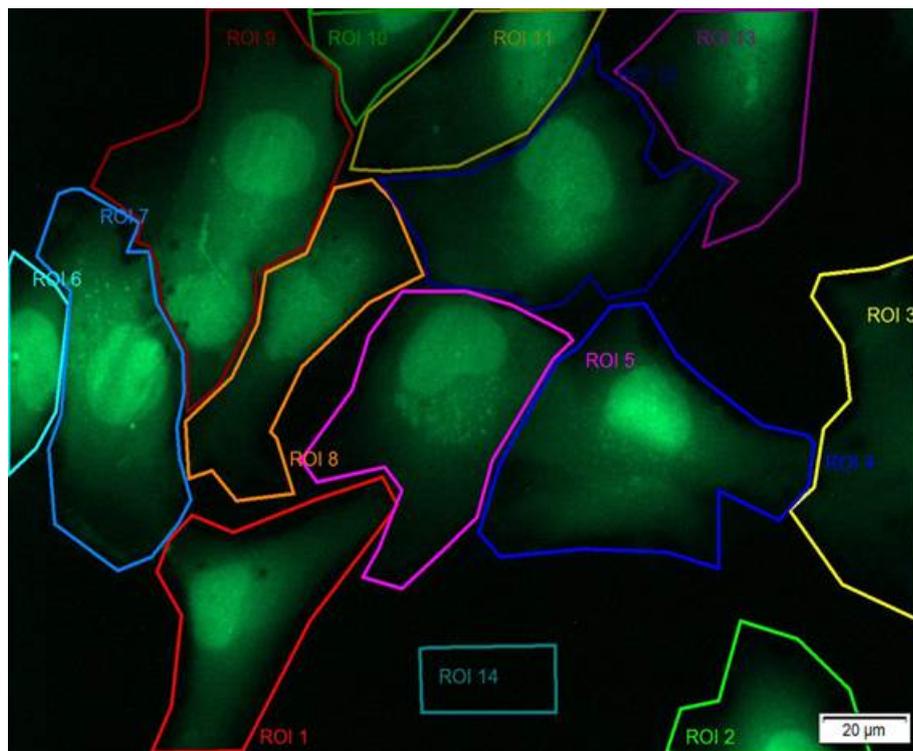


Abb. 2.3 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von kultivierten HCK-Zellen beladen mit $1 \mu\text{M}$ Fura-2/AM. Die Zellen wurden mit 340 nm angeregt. Entsprechende Fluoreszenzeigenschaft imitierenden die Zellen bei 510 nm (grünes Fluoreszenzlicht) (Foto AG Mergler).

Färbung der Zellen, sodass die beiden Fluoreszanzantworten bei den unterschiedlichen Stimulationswellenlängen unterschieden werden können (340 nm grün und 380 nm rot). Die Zellen wurden mithilfe der Software von als ROIs markiert („Regions of Interest“). Die ROIs wurden manuell um den Umfang einzelner Zellen herum gezeichnet. Während der Aufzeichnung wurden die Fluoreszenzwerte nur innerhalb vordefinierter ROIs aufgezeichnet [77].

2.4 Die planare Patch-Clamp-Technik

In dieser Studie wurde die planare Patch-Clamp-Technik angewandt. Das Setup (Port-a-Patch) (Nanion, München, Deutschland) hat einen hohen Durchsatz gegenüber der konventionellen Patch-Clamp-Technik. Es wurden ausschließlich Ganzzellenströme gemessen. Nach Einbruch in die Ganzzellkonfiguration konnte die Membranleitfähigkeit der gesamten Zellmembran erfasst werden [82, 83]. Zu den Hauptvorteilen der planaren Patch-Clamp-Technik gehört die interne Dialyse der intrazellulären Seite der Membran während dieser Messkonfiguration. Grundsätzlich kann die innere Umgebung perfundiert werden, was den Wechsel der intrazellulären Lösung ermöglicht. Ein Zugang in die extrazelluläre Seite der Zellmembran ist auch für Arzneimittelanwendungen verfügbar, während gleichzeitig das Experiment durchgeführt wird [84, 85, 86] (Abb. 2.5).

Zunächst wurden $5\ \mu\text{l}$ Nanion-Standardlösung [interne Lösung] (Abschnitt 2.1) mit einer Osmolarität von 288 mOsMol auf die Innenseite des Mikrochips pipettiert. Der Mikrochip wurde dann fest auf die Oberseite des Chipalters geschraubt, sodass die interne Elektrode mit der internen Lösung verbunden wurde (Abb. 2.6-A). Eine Metallbox diente als Faradayscher Käfig. Danach wurden $5\ \mu\text{l}$ extrazelluläre Puffer zugegeben (Abb. 2.6-B und Abb. 2.6-C). Es ist die Standardlösung (externe Lösung) mit einer Osmolarität von 298 mOsMol. Zu diesem Zeitpunkt war der Stromkreis geschlossen

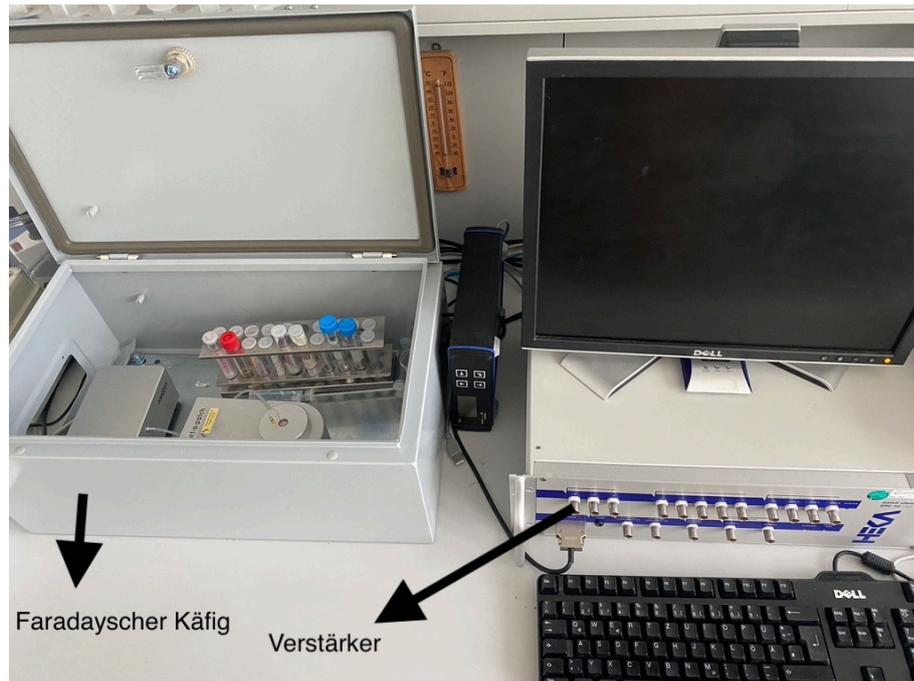


Abb. 2.4 Das Planar-Patch-Clamp-System. Die Forschungsabteilung der Klinik für Augenheilkunde an der Charité Universität – Campus Virchow Klinikum (Foto Z. Jami).

und der Chipwiderstand konnte mithilfe des Patch-Clamp-Verstärkers überprüft werden (Abb. 2.6). Das Cs^+ in der internen Lösung hat den Zweck, auswärtsfließende Kaliumströme zu blockieren. Vor der eigentlichen Messung wurden $5\mu l$ der zuvor hergestellten Zellsuspension zugegeben.

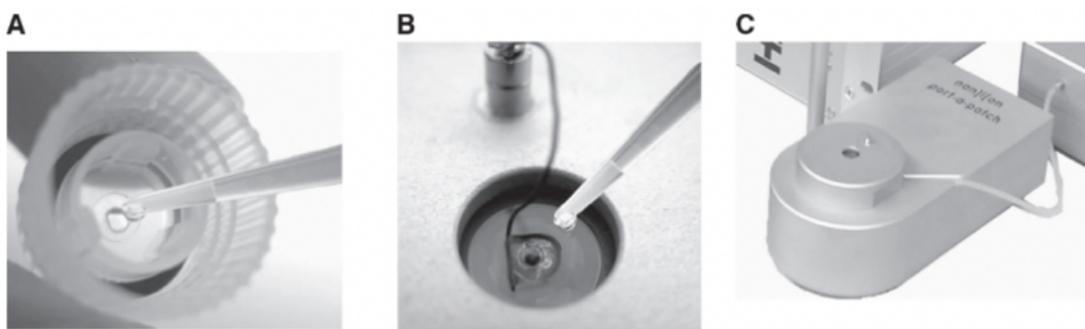


Abb. 2.6 Die Vorbereitung des Port-a-Patch: (A) Füllen der Unterseite des planaren Glaschips mit der intrazellulären Lösung unter Verwendung einer Pipette. (B) Auf dem oberen Teil des Chips befindet sich der extrazelluläre Puffer in Kontakt mit der Badelektrode. (C) Die Port-a-Patch-Einstellung (Abbildung modifiziert nach Brüggemann et al., 2008 [84]).

Infolge des von einer softwaregesteuerten Pumpe angelegten Unterdrucks konnte das Ansaugen der Zelle an die Öffnung des

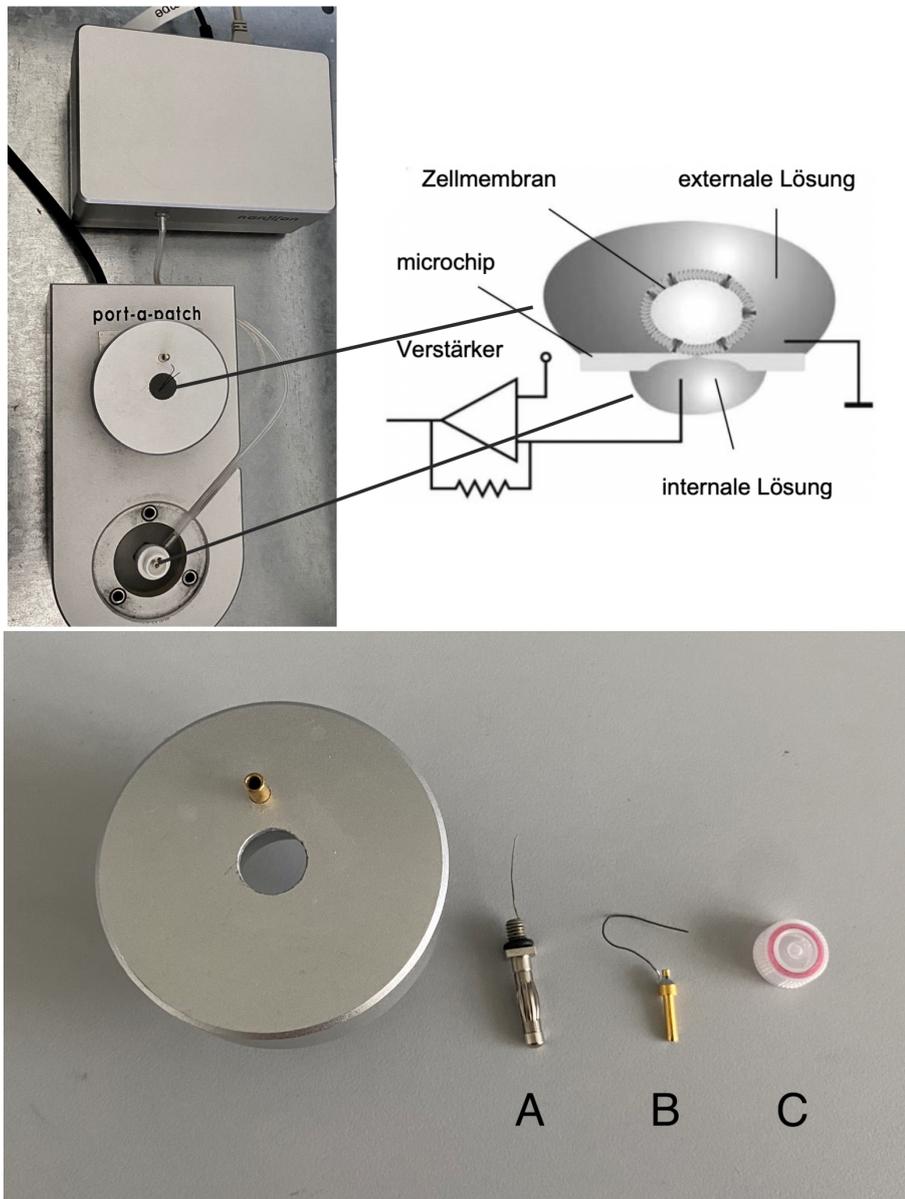


Abb. 2.5 Planar-Patch-Clamp-Setup. Das System (Port-a-Patch, Nanion, München, Deutschland) besteht aus einem Mikrochiphalter, zwei Elektroden, einer Pumpe, einem Verstärker und einem Computer. (A) Intrazelluläre Elektrode (B) Extrazelluläre Elektrode (C) Mikrochip (Fotos Z. Jami).

Chips gewährleistet werden (Öffnungsdurchmesser ca. 1-3 μm). Durch weiteren Unterdruck konnte eine „Cell-attached“-Konfiguration erreicht werden, bei der Abdichtwiderstand erhöht wurde („sealing“). Folglich wurden die Messungen der Gesamtmembranleitfähigkeit mit dem Patch-ClampVerstärker in Verbindung mit der Patchmaster-Software Version 2.5 für Windows (HEKA, Lambrecht, Deutschland) durchgeführt.

Zur weiteren Verbesserung des Abdichtwiderstands wurde manuell ein negatives Haltepotential (HP) von -30 mV eingestellt. Um toxische Effekte der hoch Ca^{2+} -haltigen Seal-Enhancing-Lösung zu vermeiden, wurde diese Lösung nach Verbesserung des Sealwiderstands schnell wieder ausgewaschen. Nach weiterer Unterdruckerhöhung und damit verbundener Erhöhung des Abdichtwiderstandes (Seal) konnte die Ganzzellkonfiguration erreicht werden. In vielen Fällen brach diese Konfiguration schon vor Erreichen des optimalen Abdichtwiderstands ein, wobei sich der Seal trotzdem weiter erhöhte. Mithilfe der Patch-Clamp-Software wurden vor jedem Experiment die kapazitiven Ströme sowie etwaige Leakströme kompensiert. Zur Spannungsstimulation wurde eine Spannungsrampe gewählt (-60 mV bis $+130\text{ mV}$; 500 ms). Die Spannungsrampen wurden alle 5 Sekunden aufgezeichnet. Softwarebedingt kam es oft zur Überkompensation der Leckströme, die dann manuell korrigiert wurden (nS). Bei Leakströmen deutlich über 100 pA wurden die gemessenen Aufzeichnungen verworfen. Die Stromdichte ($[\text{pA}/\text{pF}]$) wurde berechnet, um den aufgezeichneten Strom wie folgt zu normalisieren [84, 87, 88]:

$$\text{Stromdichte}(\text{pA}/\text{pF}) = \frac{\text{Stromamplitude}(\text{pA})}{\text{Membrankapazität}(\text{pF})}$$

2.5 Datenanalyse und Statistik

Eine Diagrammerstellung wurde unter Verwendung der SigmaPlot-Softwareversion 12,5 (CA, USA) durchgeführt, während die

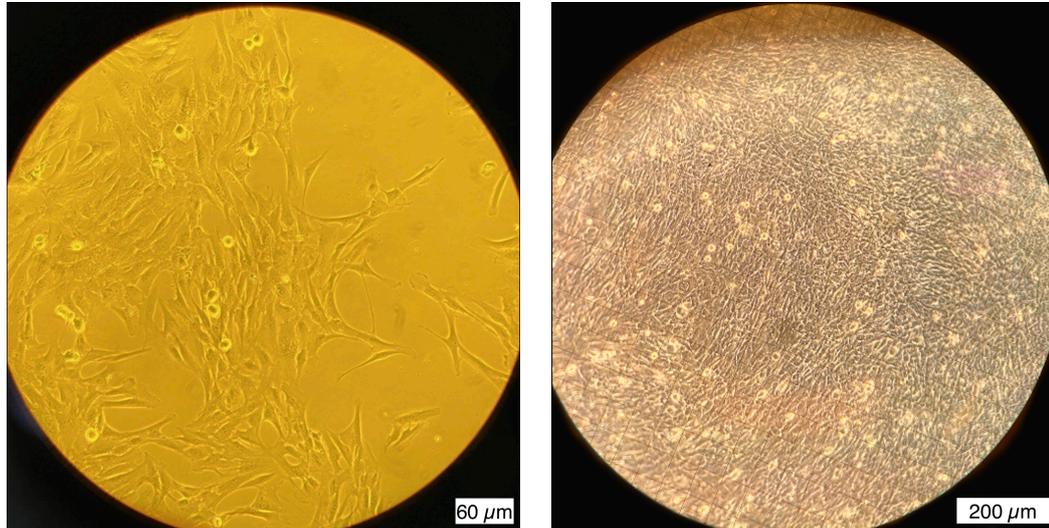
GraphPad-Prism-Softwareversion 7 (La Jolla, CA, USA) zur statistischen Analyse verwendet wurde. Die erfassten Patch-Clamp-Aufzeichnungen wurden mit der PatchMaster-Software (HEKA, Lamprecht, Deutschland) ausgewertet. In jedem Experiment wurde die Anzahl der Experimente in Klammern über den Säulen in den Diagrammen angegeben. Alle Werte sind als Mittelwerte mit Standardfehlern angegeben (\pm SEM). Die zeitabhängigen Einzelmessungen (Calciumantworten und Stromantworten) wurden in Diagrammen dargestellt. Davon wurden die Mittelwerte berechnet und in einem weiteren Diagramm dargestellt. Unter Verwendung des Normalitätstests von Kolmogorov-Smirnov wurden die Daten auf die Gaußsche Normalverteilung getestet. Wenn die ungepaarten Daten der Gaußschen Normalverteilung entsprachen, wurde zur Bestimmung der statistischen Relevanz der parametrische Student-t-Test verwendet [89]. Wenn die ungepaarten Daten nicht normal verteilt waren, wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-Test verwendet. Der ungepaarte t-Test wurde in allen Grafiken mit einem Hashtag „#“ markiert. Der gepaarte t-Test wurde benutzt, um die Effekte vor und nach der Zugabe von Substanzen zu analysieren (z. B. die Messung des $[Ca^{2+}]_i$ vor und nach Zugabe des C5a).

Bei Normalverteilung wurde der gepaarte Student-t-Test eingesetzt, ansonsten der nicht parametrische Wilcoxon-Test. Der gepaarte t-Test wurde in allen Grafiken mit einem Sternchen „*“ markiert. p-Werte $< 0,05$ wurden als signifikant angesehen. */# korreliert mit einem p-Wert $< 0,05$; **/## korreliert mit $< 0,01$ und ***/### mit $< 0,005$.

Ergebnisse

3.1 Die Morphologie von HCK-Zellen

Bei geringer Zelldichte zeigten die Zellen ein lang gestrecktes Zellwachstum. Mit zunehmender Zelldichte veränderte sich das Wachstum in eher kompakterer Morphologie. Die HCK-Zellen hatten eine fibroblastische Form und wuchsen als einzelne anhaftende Zellen auf der Zellkulturplatte. Je nach Räumlichkeit verteilten sich die Zellen in kleinen Clustern oder parallel angeordnet.



A: HCK-Zellen in geringer Zelldichte

B: HCK-Zellen in hoher Zelldichte

Abb. 3.1 HCK-Zellen unter dem Lichtmikroskop. Lichtmikroskopische Aufnahmen von HCK-Zellen mit unterschiedlicher Zelldichte (Fotos Z. Jami).

Die Zellen in geringer Zelldichte waren semi-konfluent und die Zellen in hoher Zelldichte waren konfluent (Abb. 3.1). Die Zellen teilten sich besonders stark in der exponentiellen Phase. Abbildung 3.1B zeigt die HCK-Zellen mit hoher Zelldichte. In diesem

Stadium teilten sich die Zellen nicht mehr und starben ab.

3.2 Fluoreszenzoptische Messungen

In den folgenden Experimenten wurde das Fluorescence Calcium Imaging (Fura-2/AM) für die Messung von sehr kleinen Calciumänderungen in HCK-Zellen verwendet, und zwar nach Zugabe vom menschlichen C5a mit und ohne C5L2.

3.2.1 Funktionelle Calciumregulation in HCK-Zellen

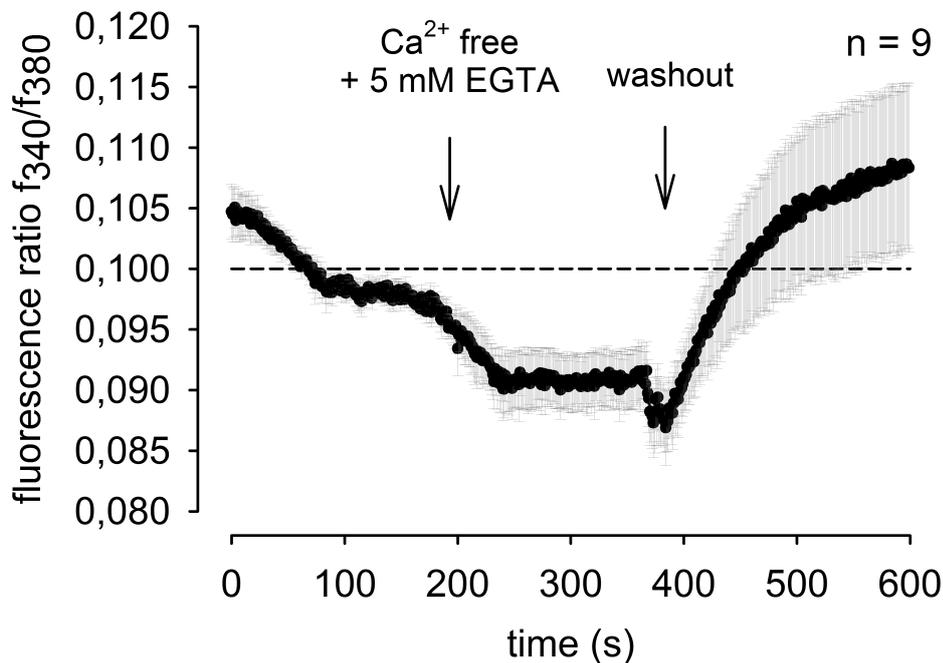


Abb. 3.2 Effekt von Ca^{2+} freier Lösung auf die $[Ca^{2+}]_i$ in HCK. Die $[Ca^{2+}]_i$ wurde nach extrazellulärer Zugabe von Ca^{2+} -freier Lösung (ringerähnliche Lösung) und beim Auswaschen gemessen. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM aus 9 Experimenten.

Es wurde zuerst der Effekt der Zugabe von calciumfreier ringerähnlicher Lösung auf die $[Ca^{2+}]_i$ untersucht, damit eine funktionelle Calciumregulation in HCK-Zellen bestätigt wird.

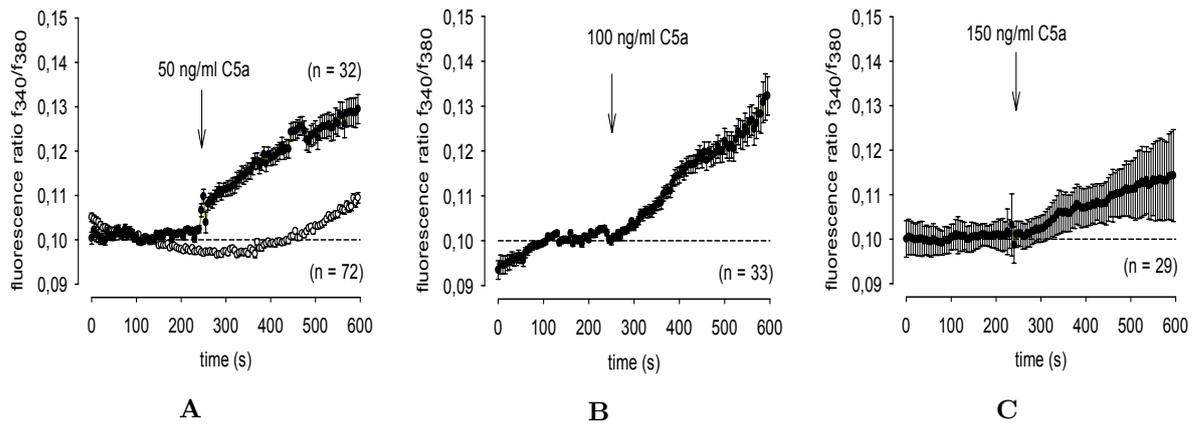


Abb. 3.3 Effekt von verschiedenen Konzentrationen von C5a auf die $[Ca^{2+}]_i$ in HCK-Zellen: Die Abbildung zeigt eine Zunahme des f_{340}/f_{380} -Verhältnisses nach Zugabe von verschiedenen C5a-Konzentrationen. Abbildung 3.3A: Zunahme des f_{340}/f_{380} -Verhältnisses zwischen Kontrollbedingungen und 50 ng/ml C5a. Abbildung 3.3B : Nach Zugabe von 100 ng/ml C5a und Abbildung 3.3C: Nach Zugabe von 150 ng/ml C5a

Abbildung 3.2 zeigt einen Abfall des Fluoreszenzratios f_{340} / f_{380} von $0,099 \pm 0,000756$ auf $0,0908 \pm 0,00204$ bei 300 s ($p < 0,005$; $n = 9$, gepaarter Student-t-Test) und dann ein Anstieg auf $0,1083 \pm 0,00698$ bei 600 s nach Auswaschen ($p < 0,05$; $n = 9$, gepaarter Student-t-Test). Das bestätigt, dass Ca^{2+} -Kanäle in HCK-Zellen existieren und in der Abwesenheit von extrazellulärem Calcium kein Ca^{2+} -Einfluss passiert.

3.2.2 C5a erhöht die intrazelluläre Calciumkonzentration

Nach extrazellulärer Zugabe von der verschiedenen Konzentrationen von C5a, erhöhte sich das Fluoreszenzverhältnis f_{340} / f_{380} , was einem erhöhten $[Ca^{2+}]_i$ entspricht. Das Fluoreszenzratio stieg bei 50 ng/ml C5a von $0,1015 \pm 0,0006$ bei 200 s auf $0,1295 \pm 0,003$ bei 600 s ($p < 0,0001$; $n = 32$, gepaarter Student-t-Test), bei 100 ng/ml C5a von $0,1002 \pm 0,0004$ bei 200 s auf $0,1323 \pm 0,004$ ($p < 0,0001$; $n = 33$, gepaarter Student-t-Test) und bei 150 ng/ml C5a von $0,1009 \pm 0,0005$ bei 200 s auf $0,1158 \pm 0,0017$ ($p < 0,0001$; $n = 29$, gepaarter Student-t-Test). Abbildung 3.3A zeigt sehr gut

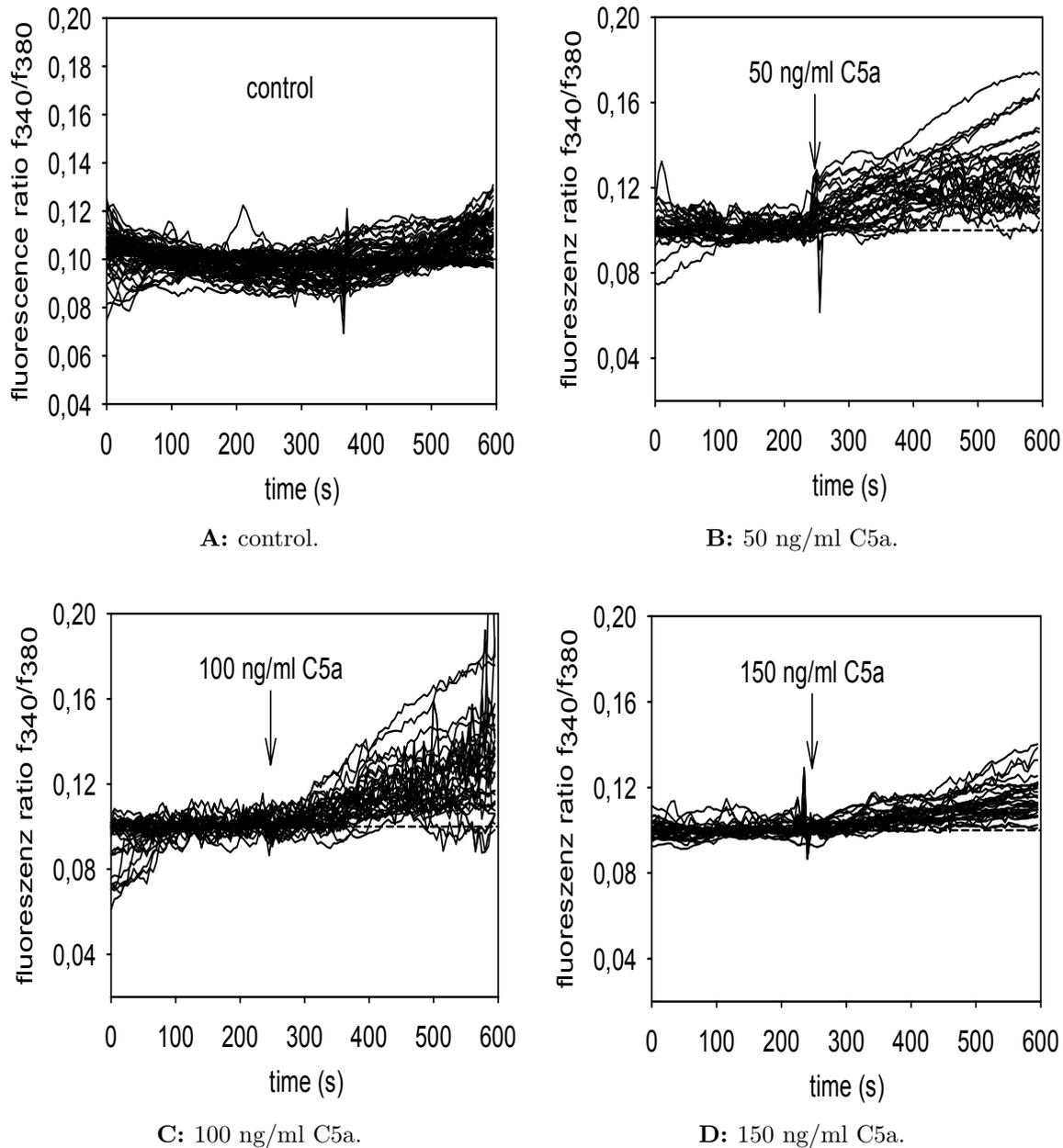


Abb. 3.4 Darstellung einzelner Messungen mit dem Fluorescence Calcium Imaging. Abbildung 3.4A: Ca^{2+} -Basislinien wurden als Kontrollen aufgezeichnet (n=72). Abbildung 3.4B: Die Anwendung von 50 ng/ml C5a verursachte einen Ca^{2+} -Einstrom (n=32). Abbildung 3.4C: Die Anwendung von 100 ng/ml C5a verursachte einen Ca^{2+} -Einstrom (n=33). Abbildung 3.4D: Die Anwendung von 150 ng/ml C5a verursachte einen Ca^{2+} -Einstrom (n=29).

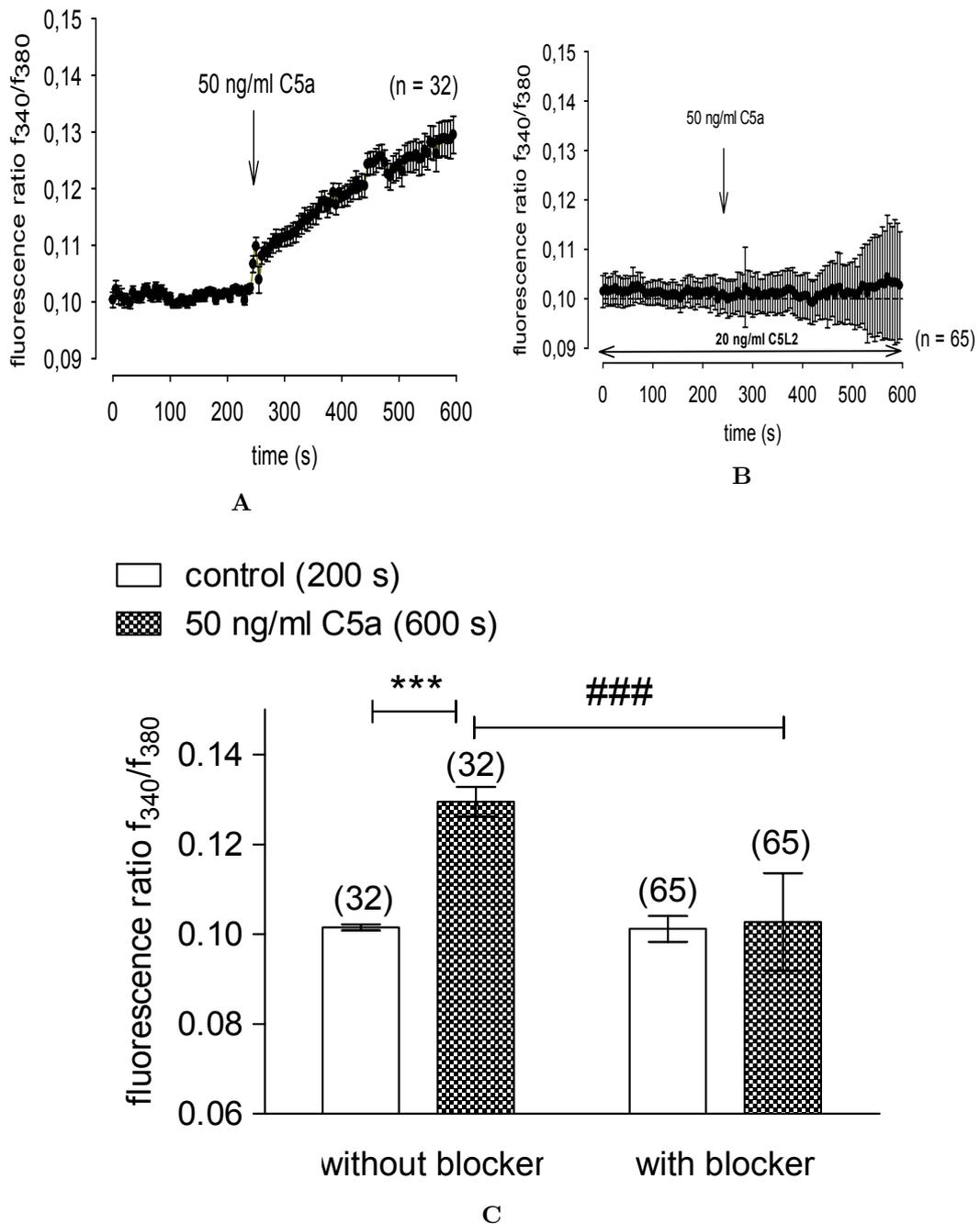


Abb. 3.5 Effekt von C5a und C5L2 auf die $[Ca^{2+}]_i$ in HCK-Zellen: Die Abbildung zeigt die Zunahme des f_{340} / f_{380} -Verhältnisse zwischen Kontrollbedingungen und 50 ng/ml C5a (Abbildung 3.5A) und die Unterdrückung des Calciumeinstroms durch C5L2 (Abbildung 3.5B). Die Fehlerbalken repräsentieren Mittelwerte \pm SEM für Fluoreszenzverhältnisse. Sternchen (*) werden verwendet, um die Signifikanz zwischen gepaarten Gruppen anzuzeigen, z. B. Kontrollbedingungen und nach C5a-Zugabe ($p < 0,0001$; gepaarter Student-t-Test). Ein Kreuz (#) wird verwendet, um die Signifikanz zwischen ungepaarten Gruppen anzuzeigen ($p < 0,0001$; ungepaarter Student-t-Test) in diesem Fall die beobachtete Wirkung von C5a mit und ohne Blocker.

den signifikanten Effekt auf den Calciumeinstrom in HCK-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe ($n = 72$).

3.2.3 C5L2 unterdrückt den C5a-induzierten Calciumeinstrom in HCK

Der C5a-induzierte Ca^{2+} -Einstrom wurde durch das Bindungsprotein C5L2 blockiert. Während 50 ng/ml C5a das Fluoreszenzratio $f340 / f380$ erhöhten, führte die Anwesenheit von 20 ng/ml C5L2 zu einer Unterdrückung des Ca^{2+} -Einstroms auf $0,1027 \pm 0,0013$ ($p < 0,0001$; $n = 65$, Mann-Whithney-Test) (Abbildung 3.5).

3.3 Elektrophysiologische Untersuchungen der HCK-Zellen

Um die Wechselwirkung von humanem C5a und La^{3+} in HCK-Zellen weiter zu untersuchen, wurden Ganzzellströme mithilfe der planaren Patch-Clamp-Technik gemessen. In dieser Reihe von in vitro elektrophysiologischen Experimenten wurden etwaige Leckströme subtrahiert, um die Ionenkanalströme besser zu identifizieren.

3.3.1 Effekt von humanem C5a mit und ohne La^{3+} auf die Ganzzellströme in HCK

In der Ganzzellkonfiguration wurden positive (nach außen) und negative (nach innen) gerichtete Ströme unter Kontrollbedingungen gemessen.

Abbildung 3.6 zeigt erhöhte Einwärtsströme von Ca^{2+} -Ionen, die durch humanes C5a aktiviert wurden. C5a ($140 \mu\text{g/ml}$) erhöhte die Einwärtsströme (-60 mV) von $-12,58 \pm 3,399$ auf $-18,94 \pm 4,256 \text{ pA/pF}$ ($p < 0,05$; $n = 12$, gepaarter Student-t-Test) in HCK.

Das La^{3+} ($500 \mu\text{M}$) unterdrückte den durch humanen C5a induzierten Anstieg auf $-10,80 \pm 2,457 \text{ pA/pF}$ ($p < 0,05$; $n =$

12, gepaarter Student-t-Test) (Abb. 3.6C). Ähnliche Ergebnisse wurden für die Auswärtsströme erhalten. Entsprechend stiegen die Auswärtsströme (+130 mV) nach Anwendung von C5a von $+86,45 \pm 15,05$ auf $+118,0 \pm 19,21$ pA/pF ($p < 0,005$; $n = 12$, gepaarter Student-t-Test) und fielen nach Zugabe von La^{3+} auf $+92,93 \pm 19,98$ pA/pF ($p < 0,05$; $n = 12$, gepaarter Student-t-Test).

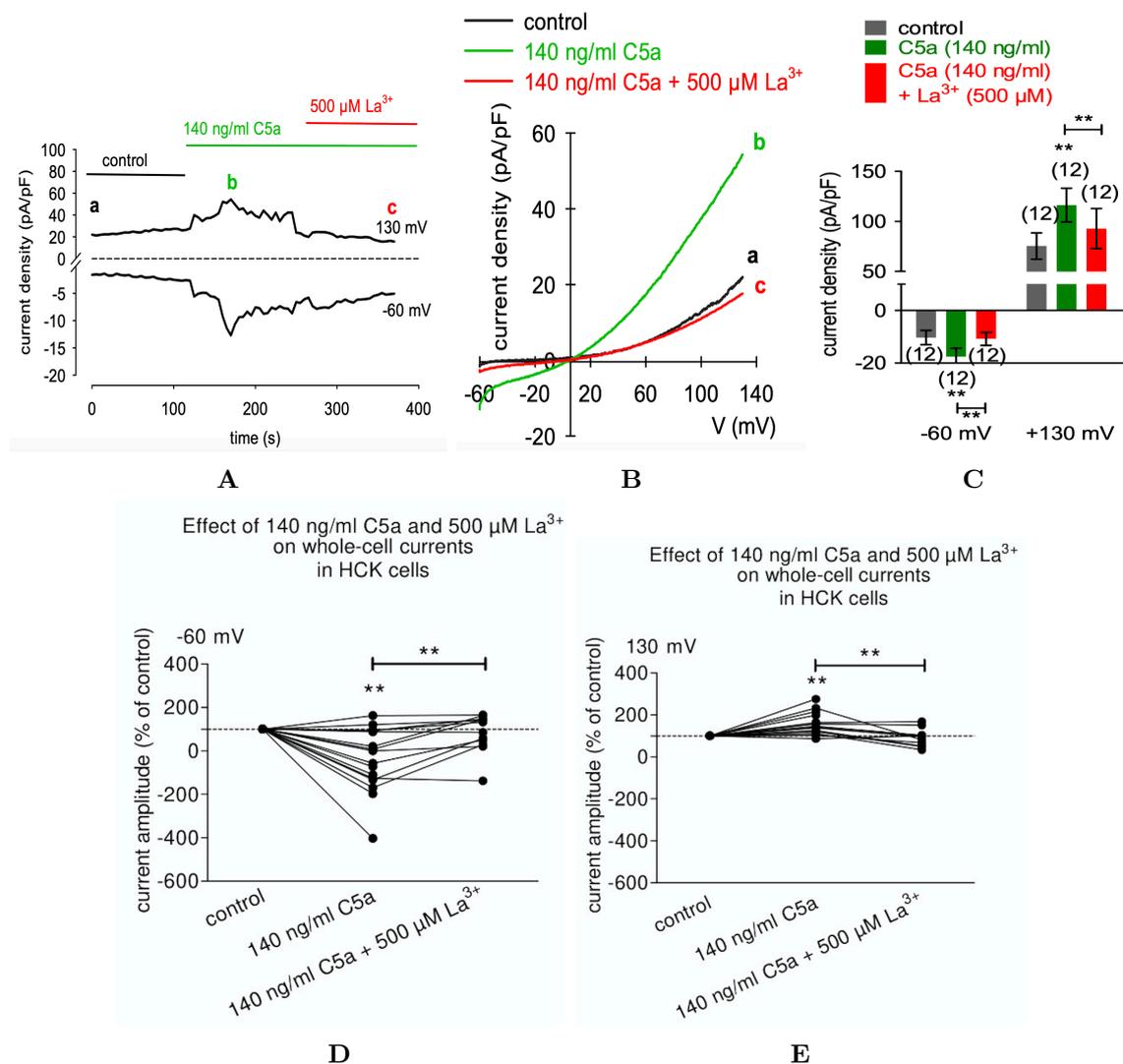


Abb. 3.6 Ganzzellströme gemessen in HCK (Messungen mit humanem C5a). Abbildung 3.6A: Der zeitliche Verlauf einer einzelnen Messung bei Anwendung von 140 ng/ml humanem C5a und 500 μ M La^{3+} auf Ganzzellströme. Abbildung 3.6B: Kontrollströme ohne Stimulation (A) Einwärts- und Auswärtsströme nach extrazellulärer Zugabe von 140 ng/ml humanem C5a (B) und 140 ng/ml humanem C5a + 500 μ M La^{3+} (C). Abb. 3.6C: Die statistische Analyse aller Messungen Abb. 3.6D: Zusammenfassung der Einwärtsströme von Ca^{2+} -Ionen durch humanes C5a und C5a + La^{3+} Abb. 3.6E: Zusammenfassung der Auswärtsströme von Ca^{2+} -Ionen durch humanes C5a und C5a + La^{3+} .

Abbildung 3.6A zeigt den zeitlichen Verlauf einer einzelnen Messung bei Anwendung von $140 \mu\text{g/ml}$ C5a und $500 \mu\text{M}$ La^{3+} auf Ganzzellströme. Die Absolutströme nach innen (-60 mV) und nach außen ($+130 \text{ mV}$) wurden über die Zellmembrankapazität auf die Stromdichte (pA/pF) normiert. Abb. 3.6A-a zeigt den Kontrollstrom für die gesamte Zelle. Abb. 3.6A-b zeigt die Auswirkungen von C5a über die Zeit nach Zugabe von C5a. Es ist deutlich zu sehen, dass die nach außen und nach innen gerichteten Ströme entsprechend zunehmen. Abb. 3.6A-c zeigt die Messung des Ioneneinstroms, wenn das La^{3+} der extrazellulären Lösung zugefügt wird.

Abbildung 3.6C zeigt eine kollektive statistische Analyse aller Messungen: eine Zusammenfassung der mittleren Stromdichten unter Kontrollbedingungen (grau), der Anwendung von C5a (grün) und der Anwendung von C5a + La^{3+} (rot).

Abbildung 3.6B zeigt die typischen Ganzzellströme nach stufenloser Spannungsstimulation (-60 bis $+130 \text{ mV}$ für 500 ms) (Abb. 3.6B-a, schwarze Linie). Nach Zugabe von C5a erhöhten sich die Ströme (Abb. 3.6B-b, grüne Linie). Diese rote Linie repräsentiert die Stromdichte nach Auswaschen der extrazellulären Lösung (Recovery) (Abb. 3.6B-c).

3.4 Messungen mit Maus-C5a

Da Maus-C5a möglicherweise nicht an humanen C5aR1 bindet, wurde dennoch geprüft ob Maus-Ca einen Calcium-Effekt in HCK auslöst. Das Interesse besteht an Tiermodelle in Forschung zu verwenden, um zu sehen ob im Maus diese Effekte zu sehen sind.

3.4.1 Maus-C5a erhöhte die intrazelluläre Calciumkonzentration

Nach extrazellulärer Zugabe von 100 ng/ml Maus-C5a, erhöhte sich das Fluoreszenzverhältnis f_{340} / f_{380} , was einem erhöhten $[\text{Ca}^{2+}]_i$

entspricht. Das Fluoreszenzratio stieg von $0,0998 \pm 0,0002$ bei 80 s auf $0,1085 \pm 0,0011$ bei 300 s an ($p < 0,0001$; $n = 64$, Wilcoxon-Test). Abbildung 3.7A zeigt sehr gut den signifikanten Effekt auf den Calciumeinstrom in HCK-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe ($n = 6$).

3.4.2 La^{3+} unterdrückt den C5a-induzierten Calciumeinstrom in HCK

Der C5a-induzierte Ca^{2+} -Einstrom wurde durch den allgemeinen TRP-Kanalblocker La^{3+} blockiert. Während 100 ng/ml C5a das Fluoreszenzratio f_{340} / f_{380} erhöhten, führte die Vorbehandlung und Anwesenheit von $500 \mu M La^{3+}$ zu einer Unterdrückung des Ca^{2+} -Einstroms auf $0,1014 \pm 0,0005$ bei 300 s (\pm SEM; $n = 28$; $p < 0,0001$, Mann-Whitney-Test). Abbildung 3.7B zeigt, dass der von C5a-induzierte Calciumeinstieg durch La^{3+} deutlich unterdrückt wird.

3.4.3 Effekt von Maus-C5a auf die Ganzzellströme

In der Ganzzellkonfiguration wurden positive (nach außen) und negative (nach innen) gerichtete Ströme unter Kontrollbedingungen gemessen. Nach Zugabe von Maus-C5a erhöhten sich die Einwärtsströme (bei -60 mV) von -5.075 ± 2.192 auf -14.70 ± 2.511 pA/pF (\pm SEM $p < 0,0005$; $n = 12$, gepaarter Student-t-Test) in HCK. Entsprechend stiegen auch die Auswärtsströme (bei $+130$ mV) nach Anwendung von C5a von $+47.88 \pm 10.44$ auf $+76.61 \pm 14.88$ pA/pF ($p < 0,01$; $n = 12$, gepaarter Student-t-Test).

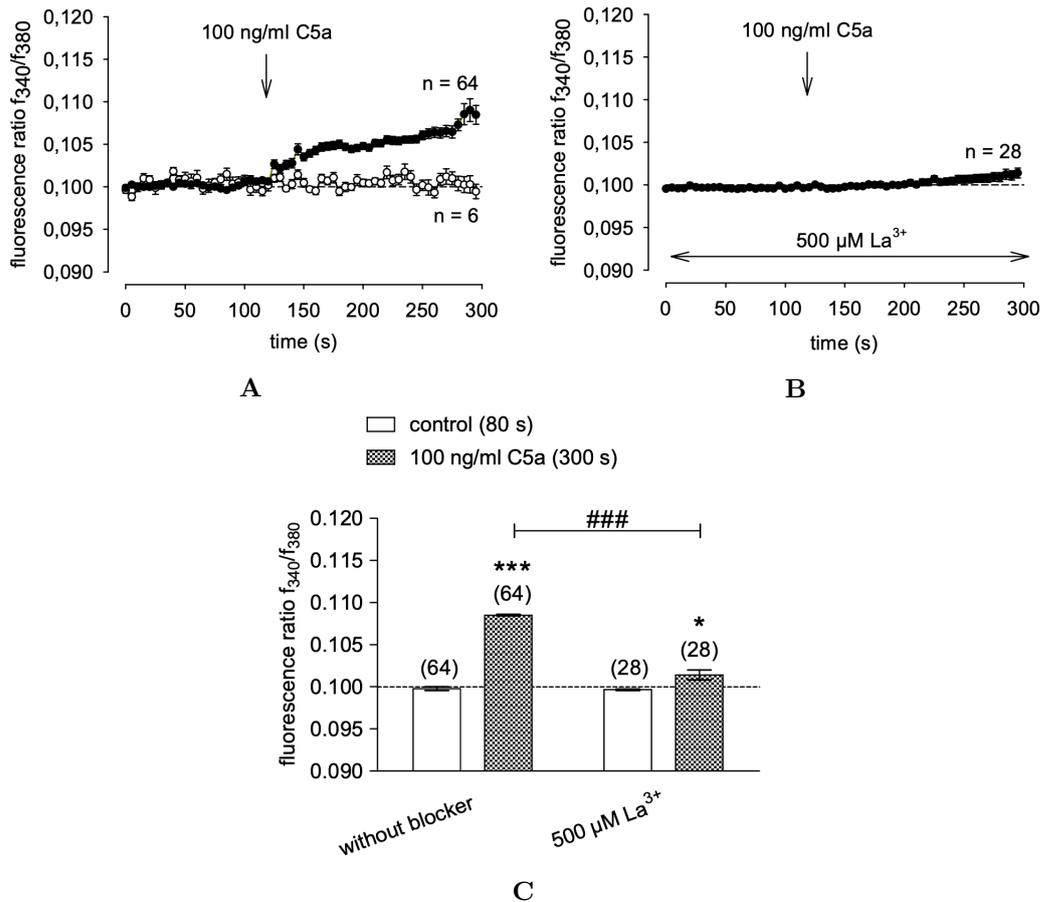
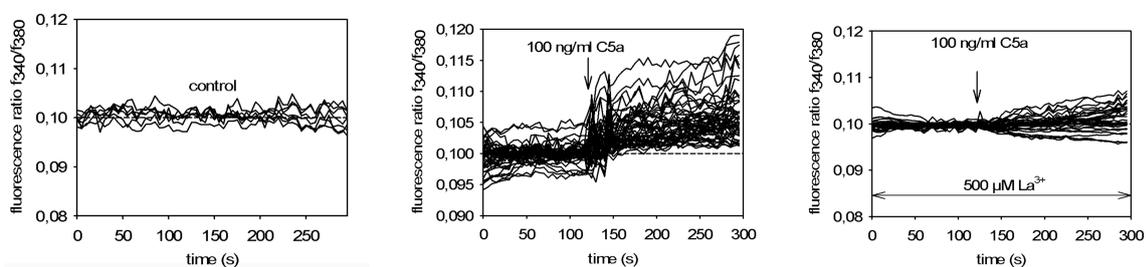


Abb. 3.7 Effekt von C5a und La^{3+} auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in HCK-Zellen: Die Abbildung zeigt eine Zunahme des f_{340}/f_{380} -Verhältnisses zwischen Kontrollbedingungen und 100 ng/ml C5a. Zusammenfassung der Messungen mit 100 ng/ml C5a und 500 μM La^{3+} . Die Fehlerbalken repräsentieren Mittelwerte \pm SEM für Fluoreszenzverhältnisse. Sternchen (*) werden verwendet, um die Signifikanz zwischen gepaarten Gruppen anzuzeigen, z. B. Kontrollbedingungen und nach C5a-Zugabe ($p < 0,0001$, $p < 0,05$; gepaarter Student-t-Test). Ein Kreuz (#) wird verwendet, um die Signifikanz zwischen ungepaarten Gruppen anzuzeigen ($p < 0,0001$; ungepaarter Student-t-Test) in diesem Fall die beobachtete Wirkung von C5a mit und ohne Blocker.



A: Ca^{2+} -Basislinien wurden als Kontrollen aufgezeichnet (n=6).

B: Die Anwendung von 100 ng/ml C5a verursachte einen Ca^{2+} -Einstrom (n=64).

C: Durch Zugabe von 500 μM La^{3+} wurde der C5a-induzierte Ca^{2+} -Anstieg deutlich unterdrückt (n=28).

Abb. 3.8 Darstellung einzelner Messungen mit dem Fluorescence Calcium Imaging (Fura-2/AM).

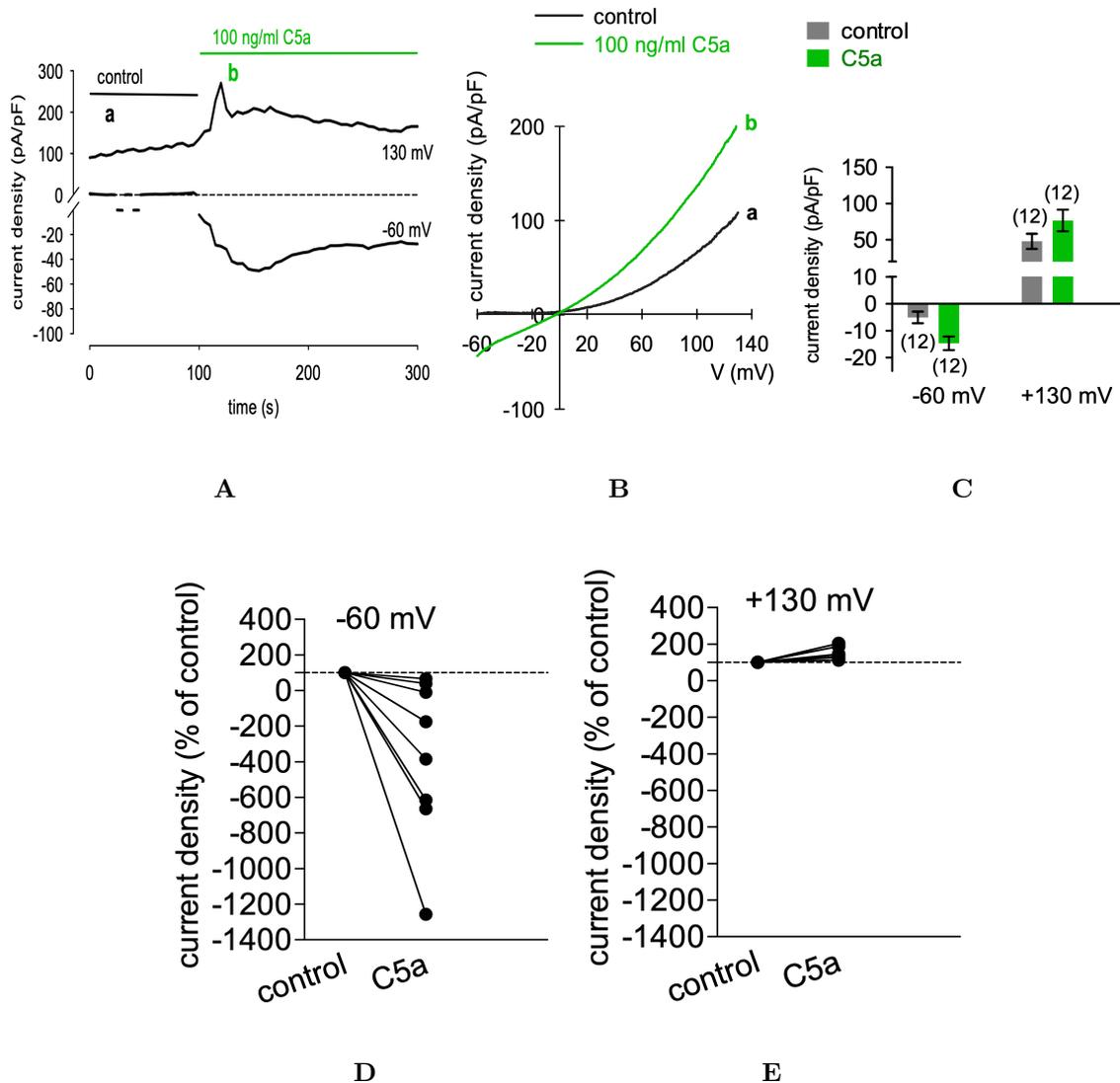


Abb. 3.9 Ganzzellströme von HCK und Wirkungen von 100ng/ml Maus-C5a. Abb. 3.9A: Der zeitliche Verlauf einer einzelnen Messung bei Anwendung von 100 ng/ml Maus C5a. Abb. 3.9B: Eine einzige Messung: Gesamtströme von HCK und Wirkungen von 100 ng/ml Maus-C5a. Abb. 3.9C: Eine Zusammenfassung der mittleren Stromdichten unter Kontrollbedingungen und Anwendung von Maus-C5a. Abb. 3.9D: Zusammenfassung der Einwärtsströme von Ca^{2+} -Ionen durch Maus-C5a. Abb. 3.9E: Zusammenfassung der Auswärtsströme von Ca^{2+} -Ionen durch Maus-C5a.

Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern deutliche Hinweise auf die Wirkung von C5a auf die Ca^{2+} -Regulation im HCK und dass diese über C5a-Rezeptoren eine TRP-Kanalaktivierung ausgelöst wird. Diese Beobachtung wird durch experimentelle Daten gestützt, die mit verschiedenen hochempfindlichen Methoden wie das Fluorescence Calcium Imaging und der Patch-Clamp-Technik und der Anwendung eines Bindungsproteins C5L2 gewonnen wurden.

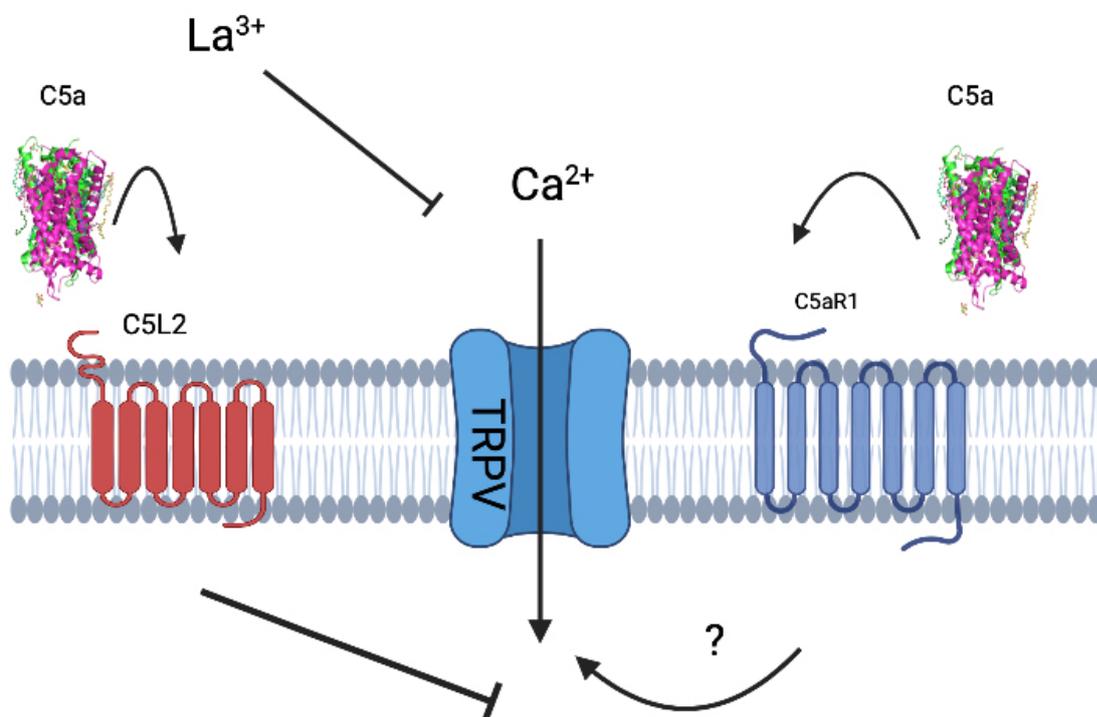


Abb. 4.1 Schematische Darstellung der Ca^{2+} -Regulation in HCK. Extrazelluläre Applikation von C5a führt zu einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ und C5L2 und La^{3+} unterdrücken das (Schema gezeichnet von Z. Jami nach <https://biorender.com>).

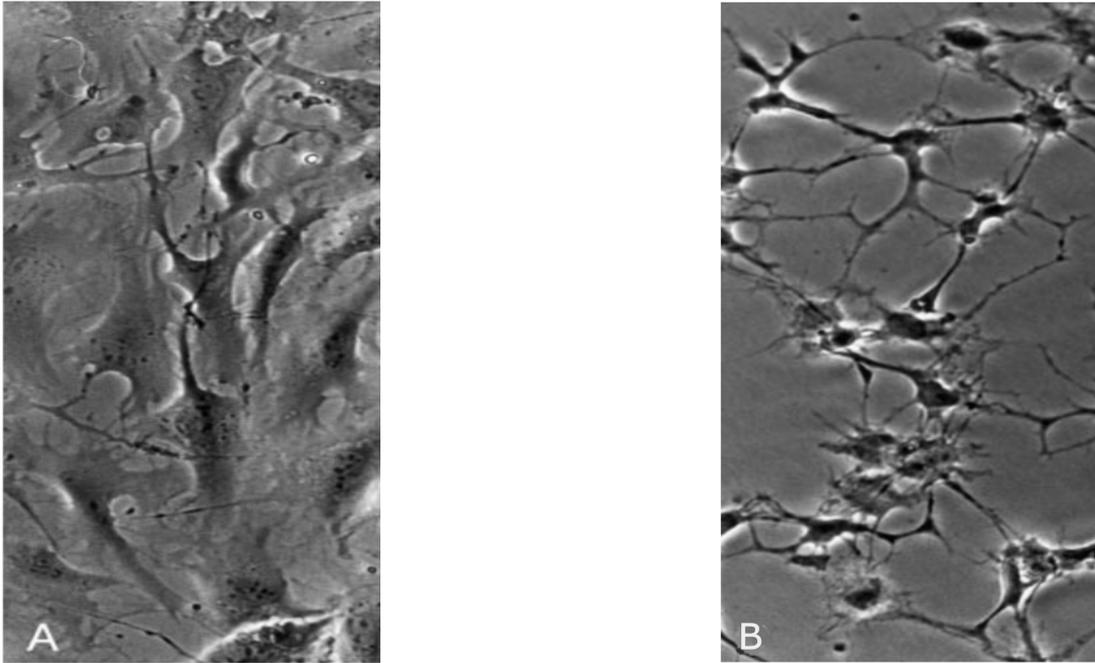


Abb. 4.2 Mikroskopische Aufnahmen von Kollagenase-isolierten Keratozyten, die unter verschiedenen Bedingungen kultiviert wurden, (A) kultiviert in DMEM, enthaltend 10 % FBS (B) nur in DMEM transformierte Keratozyten (Abbildung modifiziert nach Beales et al., 1999 [91]).

4.1 Evaluation der Zellmorphologie der HCK

Die immortalisierte HCK-Zelllinie ist weit verbreitet und wurde in mehreren Studien erfolgreich als Modell für Hornhautkeratozyten verwendet [73, 75, 72, 90]. Die Keratozyten beinhalten einen nativeren biosynthetischen Phänotyp und Erscheinungsbild, wenn sie in serumfreien Medien kultiviert werden. Die Studie von Beales et al zeigte, dass in 0% FBS-kultivierte Keratozyten fibroblastisch erscheinen, während die Zellen in serumfreien Medien eher dendritisch gesehen wurden [91].

Für die Stabilität der HCK-Zelllinie wurden aus dem Hornhautbank-Spendermaterial primäre Keratozyten isoliert und mit einem Säugetier-Expressionsvektor transformiert. Dieser enthielt Gene, die für die frühe SV40-Region kodieren [72] (Abb. 4.3).

Für die Validierung der HCK-Identität sind Biomarker wie

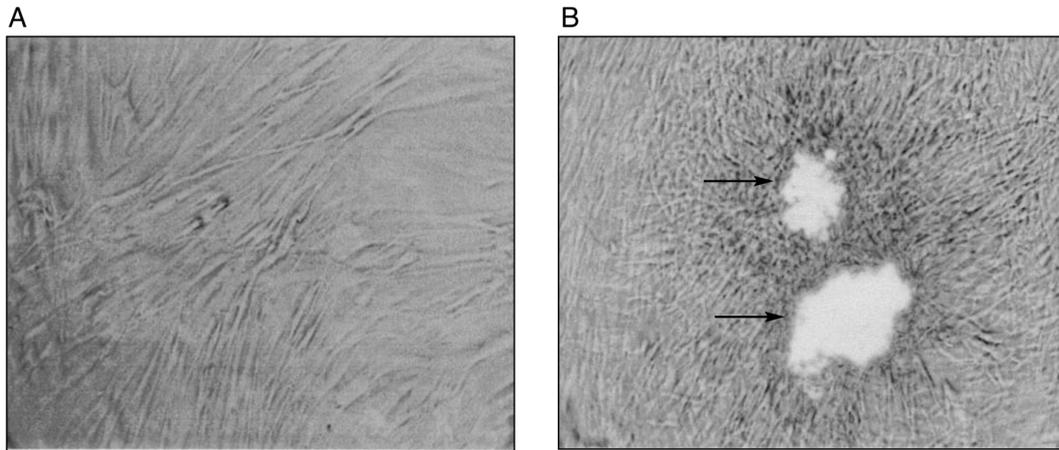


Abb. 4.3 Morphologie von nicht transformierten HCK-Zellen und mit SV40 transformierten HCK-Zellen. (A) Nicht transformierte Keratozyten (B) transformierte Keratozyten (Abbildung modifiziert nach Zorn-Kruppa et al., 2005 [72]).

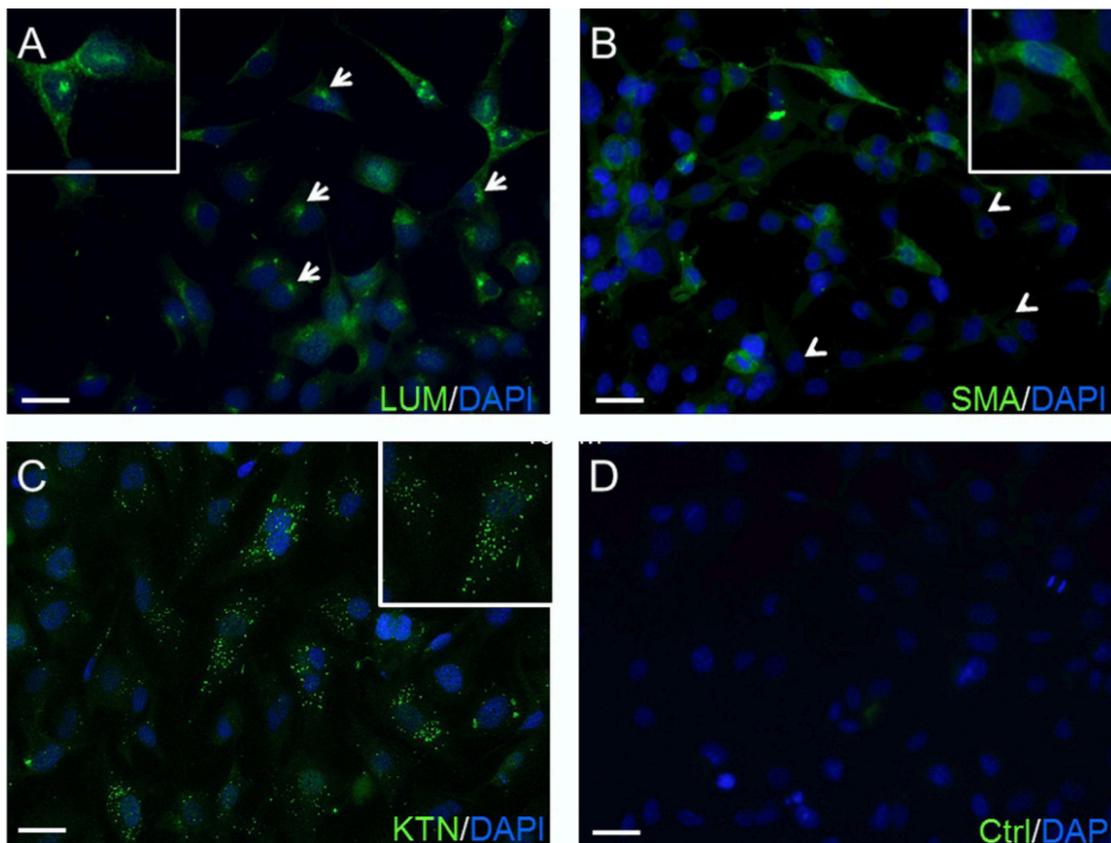


Abb. 4.4 HCK-Identifizierung mit Immunfluoreszenz(IF)-Färbung. (A) Die grüne Anti-LUM-Antikörper-IF-Färbung ist im endoplasmatischen Retikulum begrenzt (Pfeile). (B) IF-Färbungsmuster des Anti- α -SMA-Antikörpers (C) IF-Grünfärbung mit Anti-KTN-Antikörper (D) Eine Negativkontrolle (Ctrl). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt (Abbildung modifiziert nach Türker et al., 2018 [13]).

Lumican (LUM), Anti-Keratocan (KTN) und Alpha-Smooth-Muscle-Actin (α -SMA) verwendet und damit die Identifikation der HCK bestätigt [13]. Die Expressionsmuster mit LUM und KTN sind ähnlich und die Expressionsmuster von α -SMA unterscheiden sich von den Mustern mit dem LUM- und KTN-Biomarker. Die α -SMA-Expressionsmuster weisen außerdem auf eine Koexpression von Myofibroblasten hin (Abb. 4.4) [13].

4.2 Rolle von C5a in der Calciumregulation in HCK-Zellen

In dieser Studie wurde die Wirkung der Komplementsystemkomponente C5a auf die Calciumregulation in HCK-Zellen in dieser Studie näher untersucht. Zunächst wurde die Wirkung vom C5a mittels Calcium Imaging untersucht, um festzustellen, ob der C5a-induzierte $[Ca^{2+}]_i$ Einstrom entweder direkt über TRP-Kanäle oder indirekt über C5a-Rezeptoren reguliert wird. Der C5a-induzierte $[Ca^{2+}]_i$ Einstrom und $[Ca^{2+}]_i$ konnte mit Patch-Clamp-Messungen bestätigt werden. Das Ergebnis hat gezeigt, dass C5a zu einem Anstieg von der Ganzzellströme des HCKs führt (Abschnitt 3.3). Die extrazelluläre Applikation von C5a führt wahrscheinlich indirekt zur Aktivierung der Calciumkanäle und somit zu einem Anstieg des Fluoreszenzratios und der Ganzzellströme des HCK (Abb. 4.1).

Es gibt wenige weitere Studien, die die Calciumregulation in Verbindung mit C5a brachten [63, 92, 93]. Der C5a-induzierte Ca^{2+} -Einstrom entspricht der Ca^{2+} -Antwort, die bereits von Mergler et al. mit HCEC-12-Zellen erzielt wurden (nicht-publizierte Beobachtung) (Abb. 4.5).

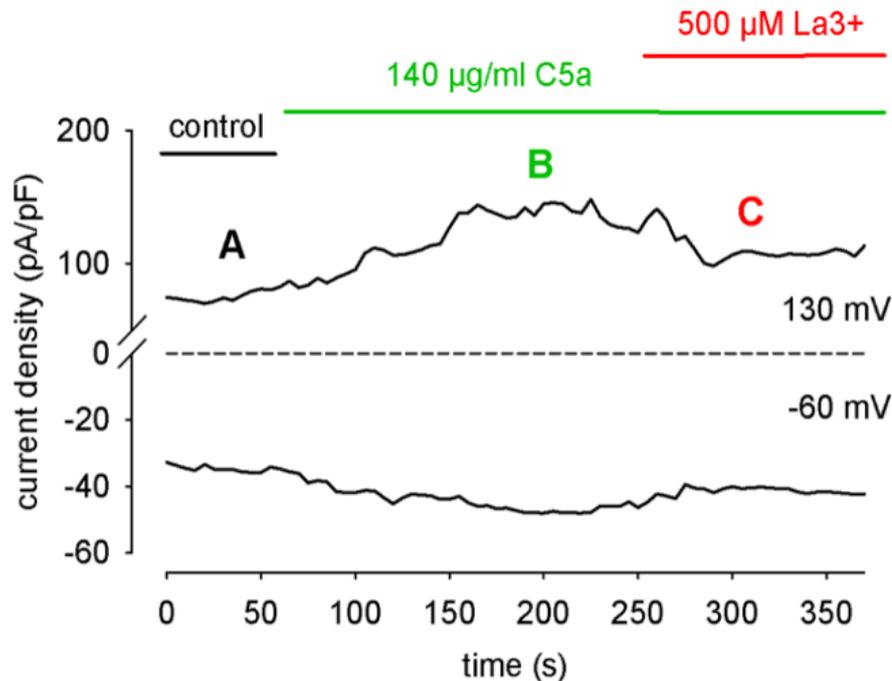


Abb. 4.5 Der zeitliche Verlauf bei Anwendung von von 140 ng/ml humanem C5a und 500 μM La^{3+} auf Ganzzellströme in HCEC-12. (nicht-publizierte Beobachtung von Mergler et al. 2017)

4.3 Rolle von C5L2 in der Calciumregulation in HCK-Zellen

Verschiedenen Studien haben dazu beigetragen, dass C5L2 ein nicht signalisierender Köderrezeptor (decoy receptor) ist. Diese Experimente legen nahe, dass C5L2 funktioniert, indem es aktive Komplementfragmente aus der extrazellulären Umgebung entfernt und so die C5aR-Aktivierung verhindert [94, 95, 96] (Abb. 4.6). Daher haben wir in unserer Arbeit C5L2 als C5aR-Blocker verwendet und haben auch ähnliche Ergebnisse gesehen. In der Arbeit von Scola et al., 2009 [22] wurde intrazellulären $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in RBL-Zellen mit und ohne C5L2 gemessen. Abb. 4.7 zeigt, dass C5a stimuliert keinen Anstieg des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in mit C5L2 transfizierten RBL-Zellen stimuliert. Abschnitt 3.2.3 in unserer Arbeit bestätigt diese Experimente.

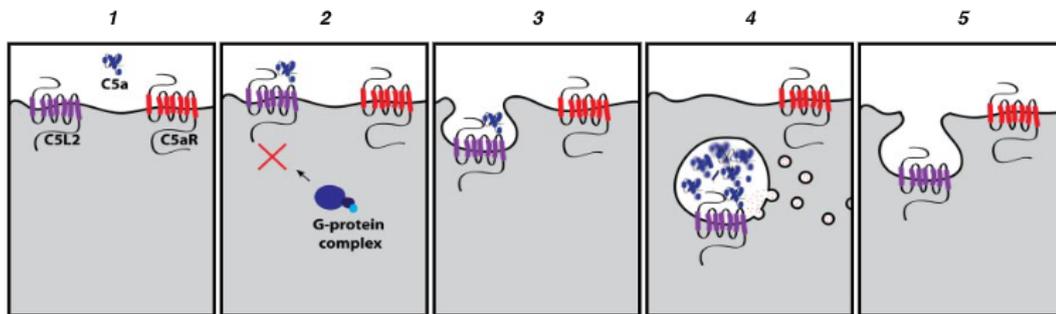


Abb. 4.6 Decoy-Rezeptormodell von C5L2. 1: C5L2 auf der Zelloberfläche bindet C5a und verhindert die C5a-C5aR-Interaktion. 2: C5L2 kann G-Protein nicht koppeln; es erfolgte keine Second-Messenger-Signalisierung. 3: C5L2 internalisiert beim Binden von C5a. 4: C5 wird in intrazellulären Vesikeln abgebaut. 5: C5L2 kehrt zur Zelloberfläche zurück. (Abbildung modifiziert nach Li et al., 2013 [94])

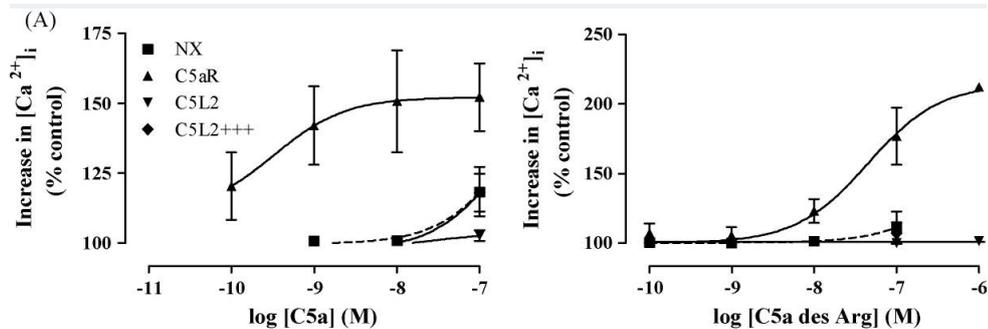


Abb. 4.7 C5a stimuliert keinen Anstieg des $[Ca^{2+}]_i$ oder die Translokation von β -Arrestin in mit C5L2 transfizierten RBL-Zellen. Fluo4-AM-beladene RBL-Zellen, die mit C5aR, Wildtyp-C5L2, C5L2 mit C5aR-ähnlichen Sequenzen an drei Schlüsselsignalmotiven (C5L2+++), oder untransfizierten Kontrollen (NX) transfiziert waren, wurden mit C5a (linkes Feld) oder C5a des Arg stimuliert (rechtes Feld). (Abbildung modifiziert nach Scola et al., 2009 [22])

4.4 Rolle von TRP-Kanälen in der C5a-regulierten Calciumhämostasie

Die Ergebnisse der hier gezeigten Untersuchungen haben das Wissen um die Rolle und Funktion von TRP-Kanälen in der Ca^{2+} -Regulation in HCK-Zellen erweitert. In dieser Studie konnte eine funktionale Aktivität von TRPs in HCK-Zellen in Verbindung mit C5a nachgewiesen werden. Dies wurde durch die deutliche Ca^{2+} -Antwort auf das C5a, gezeigt.

Der nicht selektive TRP-Kanalblocker La^{3+} , der fast alle TRPs blockiert [97], hat den C5a-induzierten Ca^{2+} -Einstrom und Ganzzellstrom blockiert (Abb. 3.7 und Abschnitt 3.3). Das bestätigt, dass die Applikation von C5a zur Aktivierung der TRPs führt. Der nicht selektive TRP-Kanalblocker La^{3+} blockiert generell TRPs [97] und hat auch die C5a-induzierte Erhöhung des Ca^{2+} -Einstroms und der Ganzzellströme unterdrückt (Abb. 3.7 und Abschnitt 3.3). Das bestätigt, dass die Applikation von C5a zur Aktivierung der TRPs führte.

Die Antwortmuster der Ganzzellströme entsprechen TRP-ähnlichen Strömen mit auswärts-retifizierenden Strömen und Einwärtsströmen nach C5a-Zugabe, wobei das Umkehrpotential um 0 mV lag, was typisch für TRP-Kanalströme ist [42] und wie sie bereits in HCK gemessen wurden [13]. Das Interessante dabei ist, dass die Einwärtsströme gespiegelt gesehen genau den Ca^{2+} -Imaging-Messungen entsprechen. Die Erklärung hierfür ist, dass in diesen Experimenten eine Ca^{2+} -freie interne Lösung verwendet wurde und eine Ca^{2+} -haltige externe Messlösung (Nanion; siehe Abschnitt 2.1), was einem hohen elektrochemischen Gradienten für Ca^{2+} -Ionen von außen nach innen entspricht.

Eine weitere interessante Beobachtung ist, dass unter Kontrollbedingungen deutliche Auswärtsströme zu sehen sind. Dafür gibt es zwei Erklärungsmöglichkeiten. Einmal könnten unter

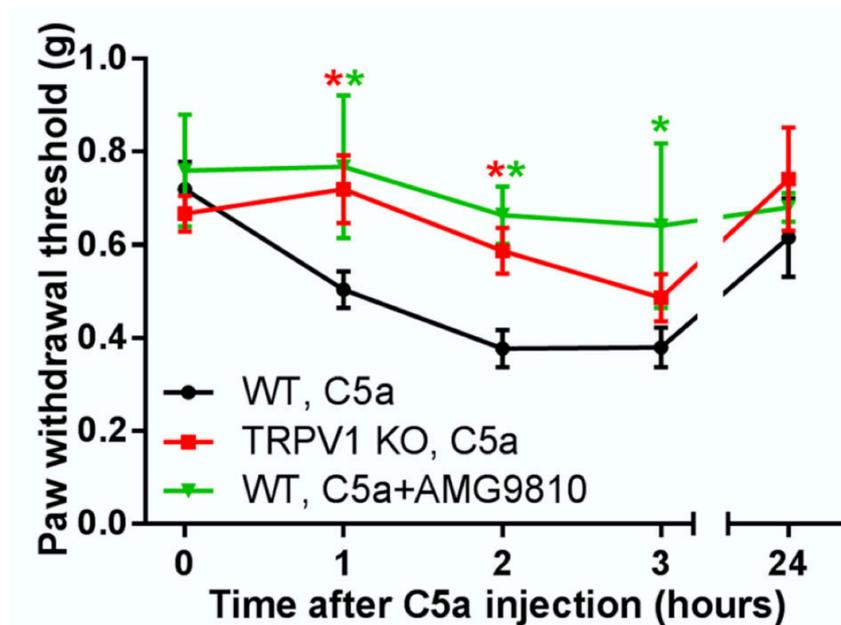


Abb. 4.8 C5a-induzierte mechanische Sensibilisierung bei TRPV1. Die C5a-induzierte mechanische Sensibilisierung erfordert TRPV1. Die mechanische Sensibilisierung gegen 500 ng C5a wurde für 3 Behandlungsgruppen bestimmt: (1) Wildtyp(WT)-Mäuse, denen nur C5a injiziert wurde (schwarze Kreise; $n = 10$), (2) WT-Mäuse, denen C5a und 67 ng des TRPV1-Antagonisten AMG9810 (67 ng) gemeinsam injiziert wurde (grüne Dreiecke; $n = 6$) und (3) TRPV1- Knockout(KO)-Mäuse, denen C5a injiziert wurde (rote Quadrate; $n = 9$) (Abbildung modifiziert nach Warwick et al., 2019 [68]).

Raumtemperatur und unter mechano-sensitiven Reizen beim Pipettieren TRP-Kanalströme ausgelöst werden. Andererseits könnten dies auch Anionströme sein (Chloridströme). In humanen Epithelzellen konnte durch Ersatz von Chlorid durch Gluconat gezeigt werden, dass sich die Auswärtsströme nicht signifikant veränderten, und somit gezeigt werden, dass etwaige Chloridströme eher eine vernachlässigbare Rolle spielen [44]. Ungeachtet dessen, konnte trotz leicht erhöhter Kontrollströme ein deutliche erhöhter Strom in Gegenwart von Maus- und humanem C5a gesehen werden.

Dies wurde auch in der in der Arbeit von Warwick et al., 2019 [68] beobachtet. Es wurde gezeigt, dass TRPV1 eine Rolle bei der C5a-vermittelten mechanischen Sensibilisierung hat. Es wurde auch festgestellt, dass die Wirkung von C5a bei TRPV1-Knockout-Mäusen signifikant verringert war. In Übereinstimmung mit diesem genetischen Ansatz verringerte die Vorbehandlung mit den TRPV1-Antagonisten AMG9810 die C5a-induzierte mechanische Überempfindlichkeit signifikant (Abb. 4.8).

In einer weiteren Arbeit von Genewsky et al., 2015 [67] wurden Untersuchungen mit sarkoplasmatischem Ca^{2+} -ATPase-Inhibitor, L-Typ-Kanalblockern, TRPV-Kanalblockern und RYR(Ryanodin-Rezeptor)-Blockern durchgeführt. Zusammenfassend wurde gesehen, dass der komplementinduzierte Ca^{2+} -Einstrom in das Pigmentepithel der Netzhaut durch Ryanodin-Rezeptor-abhängige Aktivierung von Kanälen des L-Typs und zusätzlich durch Kaliumkanäle (Maxi-K-Kanäle) sowie TRPVs realisiert wurde.

4.5 Medizinische Relevanz

Das genaue Verständnis der Physiologie der HCK-Zellen in der Hornhaut kann wichtige neue Erkenntnisse liefern, die helfen können, therapeutisch effektiver gegen Hornhautschädigung vorzugehen. Ionenkanäle sind Membranproteine, die den Ionenfluss durch die Zellmembran steuern. Sie sind essentiell in der Zellphysiologie und

Pathophysiologie. Hornhautkeratozyten kontrollieren die Reparatur der Hornhautstromamatrix nach einer Verletzung oder Infektion. Die Stimulierung der TRP-Kanalaktivität in HCK ist an Prozessen beteiligt, in denen sowohl die Keratozyten-Transdifferenzierung in Myofibroblasten als auch die Remodellierung der extrazellulären Matrix gefördert wird. Die Untersuchung des Einflusses aktiver Komplementverbindungen auf die Calciumhomöostase und ihre Verbindung mit Calciumkanälen, hauptsächlich TRPs, könnte neue Ziele bieten, z. B. für entzündungshemmende und antinozizeptive Medikamente, nicht nur für Hornhauterkrankungen, sondern auch allgemein [41, 98].

4.6 Schlussfolgerung

Diese Studie hat die Hypothese bestätigt, dass es eine Interaktion zwischen C5a und TRPs in HCK gibt. C5a aktiviert TRPs und ist in die intrazellulären Ca^{2+} -Regulation involviert. Weitere Untersuchungen in dieser Richtung könnten dazu beitragen, das Wissen der Physiologie der menschlichen Hornhaut zu verbessern.

4.7 Limitationen der Studie

4.7.1 Zellkultur

Eine Einschränkung ist das Zellkulturmodell. Es kann nicht sicher bestätigt werden, dass die in dieser Studie gezeigten Wirkungen dieselben sind wie in vivo. Es wurde jedoch in verschiedenen Studien gezeigt, dass SV40-transformiertes HCK, das unter serumfreien Bedingungen kultiviert wurde, eine ähnliche Morphologie und funktionelle Eigenschaften wie primäres HCK aufweist [72, 13]. Man kann aber nicht einfach die In-vitro-Daten auf einen lebenden Organismus übertragen; dies ist nur eingeschränkt möglich. Die Physiologie und die Umgebungsverhältnisse in vivo können anhand

von Zellmodellen unzureichend simuliert werden. In dieser Arbeit wurden die Messungen auf zellbiologischer Ebene durchgeführt, was nur ein erster Schritt zur Erweiterung der Physiologie der Hornhaut ist.

4.7.2 Komplementkomponente C5a

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, zu untersuchen, ob andere aktive Komplementverbindungen einen Einfluss auf die Calciumhomöostase haben (z. B. C3a). Brockmann et al., 2015 [99] haben bereits die Wirkung der C5a-Hemmung mit Argon-Laser, C5a-Inhibitor (NOX-D20) auf die choroidale Neovaskularisation (CNV) untersucht. Darüber hinaus wird empfohlen zu untersuchen, ob ein Block von C5a oder C3a einen Einfluss auf die Ca^{2+} -Regulierung hat.

4.7.3 TRPs und La^{3+}

Da das La^{3+} ein nicht-spezifischer Calciumkanalblocker insbesondere der TRP-Kanäle ist, kann keine Aussage getroffen werden, welcher spezielle TRP-Kanalsubtyp an dem C5a-induzierten Calciumeinstrom beteiligt ist. Zur Erweiterung des Wissens über den Einfluss von C5a auf TRP-Kanäle in zukünftigen Untersuchungen kann eine Kaskade diverser spezifische Kanalblocker getestet werden, was in zukünftigen Studien durchgeführt werden kann.

4.7.4 Technische Limitationen

Die hochsensitiven Untersuchungen mit dem Calcium-Imaging und der planaren Patch-Clamp-Technik hatten auch eine relativ hohe Datenstreuung aufgrund des geringen Signal-Rausch-Verhältnisses. Fura-2 hat eine eigene Pufferkapazität für Calcium und kann daher in hohen Konzentrationen den Zellstoffwechsel beeinflussen [100]. Eine zu lange Exposition von Licht und Metaboliten, beispielsweise freien Radikalen, kann zu einem irreversiblen Ausbleichen der

Zellen durch Fura-2 führen (Bleicheffekt) [101]. Deshalb fanden alle Versuche in einem dunklen Raum statt und die Exposition gegenüber Anregungslicht wurde so kurz wie möglich gehalten. Zusätzlich kann es zu einem Umwelteffekt kommen, wenn Fura-2 durch Exozytose oder beschädigte Zellen in den extrazellulären Raum gelangt. Darüber hinaus kann sich der fluoreszierende Farbstoff im intrazellulären Raum inkonstant verteilen [101]. Schon vor der Zugabe von C5a gab es Fluoreszenzspikes, die rhythmisch oder repetitiv zu erfolgen schienen (Auto-Store-Depletions). Diese Beobachtungen könnten eine hypersekretorische Aktivität der Zellen aufgrund von Stressbedingungen oder anderen Gründen darstellen. Die Varianz der Zellkonfluenz kann sich auf die Ergebnisse auswirken, aber eine Konfluenz zwischen 60 und 80% führt normalerweise nicht zu einer Varianz der elektrophysiologischen Eigenschaften von HCK [13].

Hinzu kommt die Leckage, die beim Patch-Clamping auftreten kann und in der Praxis nur schwer vollständig zu erkennen ist. Spezifische Parameter wie der Dichtungswiderstand können während des Experimentierens aus verschiedenen Gründen (hoher Saugdruck oder kontaminierte Zellmembran usw.) schwanken, was zu entsprechenden Änderungen des Leckagegrades führt. Der Dichtungswiderstand (R_s) ist eine wichtige Größe, um eine elektrische Isolierung der aufgezeichneten Ströme über die Zellmembran von Rauschsignalen einzuschätzen. In dieser Hinsicht sind bestimmte Fehlerkorrekturverfahren bemerkenswert, wie sie bei der Computermodellierung von Neuronen verwendet werden, um Fehler in Leckströmen oder andere relevante Probleme zu korrigieren. Darüber hinaus könnte bei einigen Messungen auch der intrazelluläre Durchgang oder sogar die Öffnung des Mikrochips verstopft sein, was zu hohen Werten des Serienwiderstands führt, der einen Qualitätsparameter für Patch-Clamp-basierte Aufzeichnungen darstellt. Außerdem gibt es in der verwendeten Software integrierte Probleme für das Patch-Clamping, z. B. die Kompensation langsamer und schneller Kapazitäten oder die Korrektur von Versatz, die

alle eine spezielle Fehlerbehebung bei der Neuprogrammierung erfordern [102]. Es können aber durch neue Protokolle und Verbesserungen der Messtechnik bessere Verhältnisse geschaffen werden, die zu zuverlässigeren Daten führen. Deshalb war die Entwicklung der planaren Patch-Clamp-Technik im Gegensatz zur klassischen Methode, die u. a. einen großen Zeitaufwand und hohes Geschick des Experimentators erfordert, ein großer Erfolg in der Entwicklung [103].

Literaturverzeichnis

- [1] Stephen F Wilson and Allen R Last. Management of corneal abrasions. *American family physician*, 70(1):123–128, 2004.
- [2] J. L. Wipperman and J. N. Dorsch. Evaluation and management of corneal abrasions. *Am Fam Physician*, 87(2):114–120, Jan 2013.
- [3] Shumoos Al-Fahdawi, Rami Qahwaji, Alaa Al-Waisy, and Stan Ipsopn. An automatic corneal subbasal nerve registration system using fft and phase correlation techniques for an accurate dpn diagnosis. 10 2015. doi: 10.1109/CIT/IUCC/DASC/PICOM.2015.157.
- [4] S. P. Srinivas. Cell signaling in regulation of the barrier integrity of the corneal endothelium. *Exp. Eye Res.*, 95(1):8–15, Feb 2012.
- [5] David M Maurice. The structure and transparency of the cornea. *The Journal of physiology*, 136(2):263–286, 1957.
- [6] Y. M. Michelacci. Collagens and proteoglycans of the corneal extracellular matrix. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 36(8):1037–1046, Aug 2003.
- [7] J. J. Tomasek, G. Gabbiani, B. Hinz, C. Chaponnier, and R. A. Brown. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 3(5):349–363, May 2002.
- [8] Luo Lu, Peter S Reinach, and Winston W-Y Kao. Corneal

- epithelial wound healing. *Experimental biology and medicine*, 226(7):653–664, 2001.
- [9] Koichi Nishida, Koji Sugioka, Junko Murakami, Aya Kodama-Takahashi, Isamu Nanri, Hiroshi Mishima, Teruo Nishida, and Shunji Kusaka. Requirement for the collagen receptor endo180 in collagen gel contraction mediated by corneal fibroblasts. *Experimental Eye Research*, page 107933, 2020.
- [10] Christelle Gross, Corinne Belville, Marilyne Lavergne, H el ena Choltus, Matthieu Jabaudon, Raiko Blondonnet, Jean-Michel Constantin, Fr ed eric Chiambaretta, Loic Blanchon, and Vincent Sapin. Advanced glycation end products and receptor (rage) promote wound healing of human corneal epithelial cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 61(3):14–14, 2020.
- [11] Whitney L Stuard, Rossella Titone, and Danielle M Robertson. The igf/insulin-igfbp axis in corneal development, wound healing, and disease. *Frontiers in Endocrinology*, 11, 2020.
- [12] Laura E Sidney and Andrew Hopkinson. Corneal keratocyte transition to mesenchymal stem cell phenotype and reversal using serum-free medium supplemented with fibroblast growth factor-2, transforming growth factor- β 3 and retinoic acid. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 12(1): e203–e215, 2018.
- [13] Ersal T urker, Fabian Garreis, Noushafarin Khajavi, Peter S. Reinach, Pooja Joshi, Tobias Brockmann, Alexander Lucius, Nina Ljubojevic, Elizabeth Turan, Drew Cooper, Felix Schick, Rob Reinholz, Uwe Pleyer, Josef K ohrle, and Stefan Mergler. Vascular endothelial growth factor (vegf) induced downstream responses to transient receptor potential vanilloid 1 (trpv1) and 3-iodothyronamine (3-t1am) in human corneal keratocytes. *Frontiers in endocrinology*, 9:670, 2018.

- [14] S Dikstein and DM Maurice. The metabolic basis to the fluid pump in the cornea. *The Journal of physiology*, 221(1):29–41, 1972.
- [15] Leonid P Shutov, Charles A Warwick, Xiaoyu Shi, Aswini Gnanasekaran, Andrew J Shepherd, Durga P Mohapatra, Trent M Woodruff, J David Clark, and Yuriy M Usachev. The complement system component c5a produces thermal hyperalgesia via macrophage-to-nociceptor signaling that requires ngf and trpv1. *Journal of Neuroscience*, 36(18):5055–5070, 2016.
- [16] Peter N Monk, A-M Scola, Praveen Madala, and David P Fairlie. Function, structure and therapeutic potential of complement c5a receptors. *British journal of pharmacology*, 152(4):429–448, 2007.
- [17] Faith H Brennan, Aileen J Anderson, Stephen M Taylor, Trent M Woodruff, and Marc J Ruitenberg. Complement activation in the injured central nervous system: another dual-edged sword? *Journal of neuroinflammation*, 9(1):1–13, 2012.
- [18] E Ting, ATG Guerrero, TM Cunha, WA Verri Jr, SM Taylor, TM Woodruff, Fernando de Queiroz Cunha, and Sérgio Henrique Ferreira. Role of complement c5a in mechanical inflammatory hypernociception: potential use of c5a receptor antagonists to control inflammatory pain. *British journal of pharmacology*, 153(5):1043–1053, 2008.
- [19] Ágnes Füst, Dorottya Csuka, László Imre, Mária Bausz, Attila Nagymihály, György Füst, Ágnes Csorvási, János Németh, and Lilian Varga. The role of complement activation in the pathogenesis of fuchs’ dystrophy. *Molecular immunology*, 58(2):177–181, 2014.
- [20] Francois Boulay, Laurence Mery, Marianne Tardif, Laurence

- Brouchon, and Pierre Vignais. Expression cloning of a receptor for c5a anaphylatoxin on differentiated hl-60 cells. *Biochemistry*, 30(12):2993–2999, 1991.
- [21] Markus Huber-Lang, J. Vidya Sarma, Daniel Rittirsch, Heike Schreiber, Manfred Weiss, Michael Flierl, Ellen Younkin, Marion Schneider, Heidemarie Suger-Wiedeck, Florian Gebhard, Shannon D. McClintock, Thomas Neff, Firas Zetoune, Uwe Bruckner, Ren-Feng Guo, Peter N. Monk, and Peter A. Ward. Changes in the novel orphan, c5a receptor (c5l2), during experimental sepsis and sepsis in humans. *The Journal of Immunology*, 174(2):1104–1110, 2005. ISSN 0022-1767. doi: 10.4049/jimmunol.174.2.1104. URL <https://www.jimmunol.org/content/174/2/1104>.
- [22] Anne-Marie Scola, Kay-Ole Johswich, B Paul Morgan, Andreas Klos, and Peter N Monk. The human complement fragment receptor, c5l2, is a recycling decoy receptor. *Molecular immunology*, 46(6):1149–1162, 2009.
- [23] Trent M Woodruff, Kutty S Nandakumar, and Francesco Tedesco. Inhibiting the c5–c5a receptor axis. *Molecular immunology*, 48(14):1631–1642, 2011.
- [24] Ernesto Carafoli. The unusual history and unique properties of the calcium signal. *New comprehensive biochemistry*, 41:3–22, 2007.
- [25] Sten Orrenius, Boris Zhivotovsky, and Pierluigi Nicotera. Regulation of cell death: the calcium–apoptosis link. *Nature reviews Molecular cell biology*, 4(7):552–565, 2003.
- [26] R Maynard Case, David Eisner, Alison Gurney, Owen Jones, Shmuel Muallem, and Alexei Verkhratsky. Evolution of calcium homeostasis: from birth of the first cell to an omnipresent signalling system. *Cell calcium*, 42(4-5):345–350, 2007.

- [27] Ole H Petersen, Marek Michalak, and Alexei Verkhratsky. Calcium signalling: past, present and future. *Cell calcium*, 38 (3-4):161–169, 2005.
- [28] DJ Cosens and Aubrey Manning. Abnormal electroretinogram from a drosophila mutant. *Nature*, 224(5216):285–287, 1969.
- [29] PK Lepage and G Boulay. Molecular determinants of trp channel assembly. *Biochemical Society Transactions*, 35(1):81–83, 2007.
- [30] Craig Montell and Gerald M Rubin. Molecular characterization of the drosophila trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron*, 2(4):1313–1323, 1989.
- [31] Baruch Minke. Drosophila mutant with a transducer defect. *Biophysics of structure and mechanism*, 3(1):59–64, 1977.
- [32] Marek Skrzypski, Maria Billert, Stefan Mergler, Noushafarin Khajavi, Krzysztof W Nowak, and Mathias Z Strowski. Role of trpv channels in regulating various pancreatic β -cell functions: Lessons from in vitro studies. *Bioscience trends*, 11(1):9–15, 2017.
- [33] V Flockerzi. An introduction on trp channels in transient receptor potential (trp) channels 179, 2007.
- [34] Bernd Nilius, Grzegorz Owsianik, Thomas Voets, and John A Peters. Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiological reviews*, 87(1):165–217, 2007.
- [35] David E Clapham, Loren W Runnels, and Carsten Strübing. The trp ion channel family. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(6): 387–396, 2001.
- [36] David E Clapham. Trp channels as cellular sensors. *Nature*, 426 (6966):517–524, 2003.

- [37] Bernd Nilius and Grzegorz Owsianik. The transient receptor potential family of ion channels. *Genome biology*, 12(3):218, 2011.
- [38] Kartik Venkatachalam and Craig Montell. Trp channels. *Annu. Rev. Biochem.*, 76:387–417, 2007.
- [39] Makoto Tominaga and Michael J Caterina. Thermosensation and pain. *Journal of neurobiology*, 61(1):3–12, 2004.
- [40] Rachele Gaudet. 25 structural insights into the function of trp channels. *TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades*, page 349, 2006.
- [41] Peter S Reinach, Stefan Mergler, Yuka Okada, and Shizuya Saika. Ocular transient receptor potential channel function in health and disease. In *BMC ophthalmology*, volume 15, page 153. Springer, 2015.
- [42] Thomas Voets, Guy Droogmans, Ulrich Wissenbach, Annelies Janssens, Veit Flockerzi, and Bernd Nilius. The principle of temperature-dependent gating in cold-and heat-sensitive trp channels. *Nature*, 430(7001):748–754, 2004.
- [43] Yuanquan Yang, Hua Yang, Zheng Wang, Stefan Mergler, J Mario Wolosin, and Peter S Reinach. Functional trpv1 expression in human corneal fibroblasts. *Experimental eye research*, 107:121–129, 2013.
- [44] Stefan Mergler, Fabian Garreis, Monika Sahlmüller, Peter S Reinach, Friedrich Paulsen, and Uwe Pleyer. Thermosensitive transient receptor potential channels in human corneal epithelial cells. *Journal of cellular physiology*, 226(7):1828–1842, 2011.
- [45] Stefan Mergler, Monika Valtink, Vivien Jane Coulson-Thomas, Dirk Lindemann, Peter S Reinach, Katrin Engelmann, and Uwe Pleyer. Trpv channels mediate temperature-sensing in human

- corneal endothelial cells. *Experimental eye research*, 90(6):758–770, 2010.
- [46] Diana M Bautista, Jan Siemens, Joshua M Glazer, Pamela R Tsuruda, Allan I Basbaum, Cheryl L Stucky, Sven-Eric Jordt, and David Julius. The menthol receptor trpm8 is the principal detector of environmental cold. *Nature*, 448(7150):204–208, 2007.
- [47] Huai-hu Chuang, Werner M Neuhausser, and David Julius. The super-cooling agent icilin reveals a mechanism of coincidence detection by a temperature-sensitive trp channel. *Neuron*, 43(6):859–869, 2004.
- [48] Alison J Reeve Samer R Eid Johannes Mosbacher Todd R Hricik Taryn J Earley-Anne C Hergarden David A Andersson Sun Wook Hwang Peter McIntyre Tim Jegla Stuart Bevan Ardem Patapoutian Gina M Story, Andrea M Peier. Anktm1, a trp-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell*, 112(6):819–829, 2003.
- [49] Annette Weil, Stephen E Moore, Nicola J Waite, Andrew Randall, and Martin J Gunthorpe. Conservation of functional and pharmacological properties in the distantly related temperature sensors trpv1 and trpm8. *Molecular pharmacology*, 68(2):518–527, 2005.
- [50] H-J Behrendt, T Germann, C Gillen, H Hatt, and R Jostock. Characterization of the mouse cold-menthol receptor trpm8 and vanilloid receptor type-1 vr1 using a fluorometric imaging plate reader (flipr) assay. *British journal of pharmacology*, 141(4):737–745, 2004.
- [51] Stefan Mergler, Charlotte Mertens, Monika Valtink, Peter S. Reinach, Violeta Castelo Székely, Nefeli Slavi, Fabian Garreis, Suzette Abdelmessih, Ersal Türker, Gabriele Fels, and Uwe

- Pleyer. Functional significance of thermosensitive transient receptor potential melastatin channel 8 (trpm8) expression in immortalized human corneal endothelial cells. *Experimental eye research*, 116:337–349, 2013.
- [52] Elizabeth Turan, Monika Valtink, Peter S Reinach, Annett Skupin, Huan Luo, Tobias Brockmann, Marah Hussain Omar Ba Salem, Uwe Pleyer, and Stefan Mergler. L-carnitine suppresses transient receptor potential vanilloid type 1 activity and myofibroblast transdifferentiation in human corneal keratocytes. *Laboratory Investigation*, pages 1–10, 2021.
- [53] Noushafarin Khajavi, Peter S Reinach, Nefeli Slavi, Marek Skrzypski, Alexander Lucius, Olaf Strauß, Josef Köhrle, and Stefan Mergler. Thyronamine induces trpm8 channel activation in human conjunctival epithelial cells. *Cellular signalling*, 27(2): 315–325, 2015.
- [54] Scott M Rawls, Teresa Gomez, Zhe Ding, and Robert B Raffa. Differential behavioral effect of the trpm8/trpa1 channel agonist icilin (ag-3-5). *European journal of pharmacology*, 575(1-3):103–104, 2007.
- [55] Zan Pan, Zheng Wang, Hua Yang, Fan Zhang, and Peter S Reinach. Trpv1 activation is required for hypertonicity-stimulated inflammatory cytokine release in human corneal epithelial cells. *Investigative ophthalmology & visual science*, 52(1):485–493, 2011.
- [56] Hisashi Shirakawa, Tomoko Yamaoka, Kazuaki Sanpei, Hirotohi Sasaoka, Takayuki Nakagawa, and Shuji Kaneko. Trpv1 stimulation triggers apoptotic cell death of rat cortical neurons. *Biochemical and biophysical research communications*, 377(4):1211–1215, 2008.
- [57] Fan Zhang, Hua Yang, Zheng Wang, Stefan Mergler, Hongshan

- Liu, Tetsuya Kawakita, Souvenir D. Tachado, Zan Pan, José E. Capó-Aponte, Uwe Pleyer, Henry Koziel, Winston W.Y. Kao, and Peter S. Reinach. Transient receptor potential vanilloid 1 activation induces inflammatory cytokine release in corneal epithelium through mapk signaling. *Journal of Cellular Physiology*, 213(3):730–739, 2007. doi: <https://doi.org/10.1002/jcp.21141>. URL <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jcp.21141>.
- [58] Rithwik Ramachandran, Eric Hyun, Liena Zhao, Tamia K. Lapointe, Kevin Chapman, Christina L. Hirota, Subrata Ghosh, David D. McKemy, Nathalie Vergnolle, Paul L. Beck, Christophe Altier, and Morley D. Hollenberg. Trpm8 activation attenuates inflammatory responses in mouse models of colitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(18):7476–7481, 2013.
- [59] Fabian Garreis, Antje Schröder, Peter S Reinach, Stefanie Zoll, Noushafarin Khajavi, Priyavathi Dhandapani, Alexander Lucius, Uwe Pleyer, Friedrich Paulsen, and Stefan Mergler. Upregulation of transient receptor potential vanilloid type-1 channel activity and ca²⁺ influx dysfunction in human pterygial cells. *Investigative ophthalmology & visual science*, 57(6):2564–2577, 2016.
- [60] Gui-Lan Chen, Ming Lei, Lu-Ping Zhou, Bo Zeng, and Fangdong Zou. Borneol is a trpm8 agonist that increases ocular surface wetness. *PloS one*, 11(7), 2016.
- [61] Yuka Okada, Peter S Reinach, Kumi Shirai, Ai Kitano-Izutani, Masayasu Miyajima, Osamu Yamanaka, Takayoshi Sumioka, and Shizuya Saika. Transient receptor potential channels and corneal stromal inflammation. *Cornea*, 34:S136–S141, 2015.
- [62] S Khandhadia, V Cipriani, JRW Yates, and Andrew J Lotery.

- Age-related macular degeneration and the complement system. *Immunobiology*, 217(2):127–146, 2012.
- [63] Robyn Reynolds, M Elizabeth Hartnett, John P Atkinson, Patricia C Giclas, Bernard Rosner, and Johanna M Seddon. Plasma complement components and activation fragments: associations with age-related macular degeneration genotypes and phenotypes. *Investigative ophthalmology & visual science*, 50(12):5818–5827, 2009.
- [64] Sakurai E Sarma JV Barnum SR Lambris JD Chen Y Zhang K Ambati BK Baffi JZ-Ambati J. Drusen Nozaki M, Raisler BJ. Drusen complement components c3a and c5a promote choroidal neovascularization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(7):2328–2333, 2006.
- [65] Minzhong Yu, Weilin Zou, Neal S Peachey, Thomas M McIntyre, and Jinbo Liu. A novel role of complement in retinal degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science*, 53(12):7684–7692, 2012.
- [66] Don H. Anderson, Monte J. Radeke, Natasha B. Gallo, Ethan A. Chapin, Patrick T. Johnson, Christy R. Curletti, Lisa S. Hancox, Jane Hu, Jessica N. Ebright, Goldis Malek, Michael A. Hauser, Catherine Bowes Rickman, Dean Bok, Gregory S. Hageman, and Lincoln V. Johnson. The pivotal role of the complement system in aging and age-related macular degeneration: Hypothesis revisited. *Progress in Retinal and Eye Research*, 29(2):95–112, 2010. ISSN 1350-9462. doi: <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2009.11.003>. URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S135094620900072X>.
- [67] Andreas Genewsky, Ingmar Jost, Catharina Busch, Christian Huber, Julia Stindl, Christine Skerka, Peter F Zipfel, Bärbel Rohrer, and Olaf Strauß. Activation of endogenously expressed

- ion channels by active complement in the retinal pigment epithelium. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 467(10):2179–2191, 2015.
- [68] Charles A Warwick, Leonid P Shutov, Andrew J Shepherd, Durga P Mohapatra, and Yuriy M Usachev. Mechanisms underlying mechanical sensitization induced by complement c5a: the roles of macrophages, trpv1 and cgrp receptors. *Pain*, 160(3):702, 2019.
- [69] Jun Ho Jang, J David Clark, Xiangqi Li, Matthew S Yorek, Yuriy M Usachev, and Timothy J Brennan. Nociceptive sensitization by complement c5a and c3a in mouse. *Pain*, 148(2):343–352, 2010.
- [70] Philip Newsholme, Azubueze A Adogu, MA Soos, and C Nicholas Hales. Complement-induced ca^{2+} influx in cultured fibroblasts is decreased by the calcium-channel antagonist nifedipine or by some bivalent inorganic cations. *Biochemical Journal*, 295(3):773–779, 1993.
- [71] B Paul Morgan and Anthony K Campbell. The recovery of human polymorphonuclear leucocytes from sublytic complement attack is mediated by changes in intracellular free calcium. *Biochemical Journal*, 231(1):205–208, 1985.
- [72] Michaela Zorn-Kruppa, Svitlana Tykhonova, Gazanfer Belge, Jürgen Bednarz, Horst A Diehl, and Maria Engelke. A human corneal equivalent constructed from sv40-immortalised corneal cell lines. *Alternatives to Laboratory Animals*, 33(1):37–45, 2005.
- [73] Michaela Zorn-Kruppa, Svitlana Tykhonova, Gazanfer Belge, Horst A Diehl, and Maria Engelke. Comparison of human corneal cell cultures in cytotoxicity testing. *ALTEX-Alternatives to animal experimentation*, 21(3):129–134, 2004.

- [74] Simona Dropcova, StevenP Denyer, AndrewW Lloyd, PaulR Gard, GeoffW Hanlon, SergeiV Mikhailovsky, Susan Sandeman, Cedric J Olliff, and RichardG A Faragher. A standard strain of human ocular keratocytes. *Ophthalmic research*, 31(1):33–41, 1999.
- [75] M Engelke, M Zorn-Kruppa, D Gabel, K Reisinger, B Rusche, and KR Mewes. A human hemi-cornea model for eye irritation testing: quality control of production, reliability and predictive capacity. *Toxicology in Vitro*, 27(1):458–468, 2013.
- [76] Shukti Chakravarti, W Matthew Petroll, John R Hassell, James V Jester, Jonathan H Lass, Jennifer Paul, and David E Birk. Corneal opacity in lumican-null mice: defects in collagen fibril structure and packing in the posterior stroma. *Investigative ophthalmology & visual science*, 41(11):3365–3373, 2000.
- [77] Odmara L Barreto-Chang and Ricardo E Dolmetsch. Calcium imaging of cortical neurons using fura-2 am. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (23):e1067, 2009.
- [78] Roger B Moreton. Optical methods for imaging ionic activities. *SCANNING MICROSCOPY-SUPPLEMENT-*, pages 371–390, 1994.
- [79] A Trautmann and YP Tan. Calcium imaging. *Blood cells*, 19(1):133–7, 1993.
- [80] Stuart A Cain and Peter N Monk. The orphan receptor c5l2 has high affinity binding sites for complement fragments c5a and c5a des-arg74. *Journal of Biological Chemistry*, 277(9):7165–7169, 2002.
- [81] Grzegorz Grynkiewicz, Martin Poenie, and Roger Y Tsien. A new generation of ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of biological chemistry*, 260(6):3440–3450, 1985.

- [82] Erwin Neher and Bert Sakmann. The patch clamp technique. *Scientific American*, 266(3):44–51, 1992.
- [83] Bruce G Kornreich. The patch clamp technique: principles and technical considerations. *Journal of Veterinary Cardiology*, 9(1): 25–37, 2007.
- [84] Andrea Brüggemann, Cecilia Farre, Claudia Haarmann, Ali Haythornthwaite, Mohamed Kreir, Sonja Stoelzle, Michael George, and Niels Fertig. Planar patch clamp: advances in electrophysiology. In *Potassium Channels*, pages 165–176. Springer, 2008.
- [85] Peter H Barry. Jpcalc, a software package for calculating liquid junction potential corrections in patch-clamp, intracellular, epithelial and bilayer measurements and for correcting junction potential measurements. *Journal of neuroscience methods*, 51 (1):107–116, 1994.
- [86] Owen P Hamill, A Marty, Erwin Neher, Bert Sakmann, and FJ Sigworth. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv*, 391(2):85–100, 1981.
- [87] Michael Pusch and Erwin Neher. Rates of diffusional exchange between small cells and a measuring patch pipette. *Pflügers Archiv*, 411(2):204–211, 1988.
- [88] Andrea Brüggemann, Sonja Stoelzle, Michael George, Jan C Behrends, and Niels Fertig. Microchip technology for automated and parallel patch-clamp recording. *small*, 2(7):840–846, 2006.
- [89] Tonse NK Raju. William sealy gosset and william a. silverman: two “students” of science. *Pediatrics*, 116(3):732–735, 2005.
- [90] Anna Katharina Manzer, Simone Lombardi-Borgia, Monika Schäfer-Korting, Judith Seeber, Michaela Zorn-Kruppa, and

- Maria Engelke. Sv40-transformed human corneal keratocytes: optimisation of serum-free culture conditions. *ALTEX-Alternatives to animal experimentation*, 26(1):33–39, 2009.
- [91] Marianne P Beales, James L Funderburgh, James V Jester, and John R Hassell. Proteoglycan synthesis by bovine keratocytes and corneal fibroblasts: maintenance of the keratocyte phenotype in culture. *Investigative ophthalmology & visual science*, 40(8):1658–1663, 1999.
- [92] Georgios Sogkas, Timo Vögtle, Eduard Rau, Britta Gewecke, David Stegner, Reinhold E Schmidt, Bernhard Nieswandt, and J Engelbert Gessner. Orai1 controls c5a-induced neutrophil recruitment in inflammation. *European journal of immunology*, 45(7):2143–2153, 2015.
- [93] Imre Farkas, Patricia Varju, Emese Szabo, Erik Hrabovszky, Noriko , Hidechika Okada, and Zsolt Liposits. Estrogen enhances expression of the complement c5a receptor and the c5a-agonist evoked calcium influx in hormone secreting neurons of the hypothalamus. *Neurochemistry international*, 52(4-5):846–856, 2008.
- [94] Rui Li, Liam G Coulthard, MCL Wu, Stephen M Taylor, and Trent M Woodruff. C5l2: a controversial receptor of complement anaphylatoxin, c5a. *The FASEB Journal*, 27(3):855–864, 2013.
- [95] Mitsuharu Ohno, Tomohisa Hirata, Makoto Enomoto, Takeyoshi Araki, Hiroshi Ishimaru, and Tsuneo A Takahashi. A putative chemoattractant receptor, c5l2, is expressed in granulocyte and immature dendritic cells, but not in mature dendritic cells. *Molecular immunology*, 37(8):407–412, 2000.
- [96] Alison Humbles Zsusanna Zsengeller Olivier Morteau Michele Bennett Kinrade Robbin M. Brodbeck James E. Krause Hye-Ryun Choe Norma P. Gerard Shoji Okinaga, Dubhfeasa Slattery

- and Craig Gerard. C5l2, a nonsignaling c5a binding protein. *Biochemistry*, 42(31):9406–9415, 2003.
- [97] Alexandre Bouron, Kirill Kiselyov, and Johannes Oberwinkler. Permeation, regulation and control of expression of trp channels by trace metal ions. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 467(6):1143–1164, 2015.
- [98] Bernd Nilius and Arpad Szallasi. Transient receptor potential channels as drug targets: from the science of basic research to the art of medicine. *Pharmacological reviews*, 66(3):676–814, 2014.
- [99] Claudia Brockmann, Tobias Brockmann, Sabrina Dege, Catharina Busch, Norbert Kociok, Axel Vater, Sven Klussmann, Olaf Strauß, and Antonia M Jousen. Intravitreal inhibition of complement c5a reduces choroidal neovascularization in mice. *Graefe’s Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 253(10):1695–1704, 2015.
- [100] Denis Noble and Thomas Philip Stroud Powell. The slowing of ca^{2+} signals by ca^{2+} indicators in cardiac muscle. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 246(1316):167–172, 1991.
- [101] Wolfhard Almers and E Neher. The ca signal from fura-2 loaded mast cells depends strongly on the method of dye-loading. *FEBS letters*, 192(1):13–18, 1985.
- [102] Stephen R Williams and Christian Wozny. Errors in the measurement of voltage-activated ion channels in cell-attached patch-clamp recordings. *Nature communications*, 2(1):1–9, 2011.
- [103] Sukumar P Majeed Y Dallas ML English A Emery P Porter KE Smith AM McFadzean I-Beccano-Kelly D Bahnasi Y Cheong A Naylor J Zeng F Liu X Gamper N Jiang LH Pearson HA Peers C Robertson B Beech DJ Milligan CJ, Li J. Robotic multiwell

planar patch-clamp for native and primary mammalian cells.
Nature protocols, 4(2):244, 2009.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Zohreh Jami, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: “Der Einfluss der Komplementkomponente C5a auf die Calciumhämostase in humanen Hornhautkeratozyten“; “The influence of the complement component C5a on calcium homeostasis in human corneal keratocytes” selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal

Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

Zuerst möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater PD Dr. Stefan Mergler bedanken. Er hat mich mit sehr viel Zeit und Geduld in die aufwändigen Methoden des Calcium Imaging und der Patch-Clamp-Technik eingearbeitet. Ich hatte einen Ansprechpartner, der mir sehr geholfen hat. Ohne seine ständige Unterstützung hätte ich diese Arbeit Parallel zum Studium und der Arbeit nie fertigstellen können. Ich hatte das große Glück, ihn als meinen Doktorvater zu haben. Danke!

Ein besonderer Dank geht an meinem Betreuer, Prof. Dr. Uwe Pleyer. Ich bin sehr dankbar für seine Unterstützung und dass er mir die Gelegenheit gegeben hat, meine Doktorarbeit an der Augenklinik der Charité zu schreiben.

Des Weiteren danke ich dem Team rund um Mergler et. al., welches mich freundlicherweise im Labor unterstützt haben. Besonderen Dank gilt PD Dr. Tobias Brockmann für die Bereitstellung der Komplementkomponente C5a und C5L2 und seine Unterstützung.

Zuletzt möchte ich meiner Familie, meine lieben Eltern, meinem Bruder Kamran und meiner Schwester Maryam und meinen Freunden Dr. Mahsa Zamani; Sohrab Elahwiesy und Johanna Kretzschmar für ihre Unterstützung danken.

Masoud, meine Liebe, du bist der beste Partner, den ich mir vorstellen kann. Danke, dass du immer für mich da warst.

Mama, danke, dass du mich in allem was ich tue unterstützt.

Ich möchte meine Doktorarbeit meinem Vater, der vor einem Jahr verstorben ist, widmen. Ich wünschte du wärst noch bei uns. Danke für alles.