

Die porcine organotypische Netzhautkultur: Optimierung der Kulturdauer und Anwendung in der gentherapeutischen Forschung

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanbiologie
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Weller, Maria
aus Berlin

Gießen, 2022

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde

AG Experimentelle Ophthalmologie

Gutachter: Prof. Dr. Dr. K. Stieger

Gutachterin: Dr. P. Mahavadi

Tag der Disputation: 05.07.2023

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Allgemeiner Aufbau des Wirbeltierauges	1
1.2 Aufbau der Retina.....	2
1.2.1 Photorezeptorzellen.....	3
1.2.2 Horizontalzellen	4
1.2.3 Bipolarzellen	4
1.2.4 Gliazellen	4
1.2.5 Ganglienzellen.....	5
1.3 Vergleich zwischen humanem und porcinem Auge	5
1.4 Retinale Degeneration und Therapieansätze	6
1.4.1 Degenerative Vorgänge.....	6
1.4.2 Erkrankungen	7
1.4.3 Therapiemöglichkeiten.....	8
1.5 Modellsysteme.....	12
1.5.1 Zellkultur	12
1.5.2 Organoide	13
1.5.3 Tiermodelle	13
1.5.4 Organotypische Kultur	14
1.6 Ziele der Arbeit.....	16
1.6.1 Etablierung der organotypischen Langzeit-Retinakultur	16
1.6.2 Behandlung mit AAVs	16
2. Material und Methoden	17
2.1. Material.....	17
2.1.1 Chemikalien und Verbrauchslösungen.....	17
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	18
2.1.3 Geräte	19

2.1.4 Kulturmedien.....	19
2.1.5 Puffer.....	20
2.1.6 Adeno-assoziierte Viren.....	21
2.1.7 Primärantikörper.....	22
2.1.8 Sekundärantikörper.....	22
2.1.9 Software.....	22
2.2 Methoden.....	24
2.2.1 Organotypische Retinakultur.....	24
2.2.2 Behandlung mit AAVs.....	26
2.2.3 Aufarbeitung von Gewebe.....	26
2.2.4 Anfertigung von Gefrierschnitten.....	27
2.2.5 Einbetten des gesamten Präparats als <i>Wholemout</i>	27
2.2.6 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	28
2.2.7 Immunfluoreszenzfärbungen.....	28
2.2.8 Antigendemaskierung.....	30
2.2.9 Mikroskopie.....	30
2.2.10 Beurteilung der Gewebeerhaltung.....	31
2.2.11 Statistische Auswertung.....	32
2.2.12 Bildbearbeitung.....	32
3. Ergebnisse.....	33
3.1 Gewebequalitätspunktzahl.....	33
3.2 Unterschiede bei Vorbereitungen und Präparation.....	34
3.3 Verschiedene Mediumzusammensetzungen.....	34
3.3.1 Beurteilung der Gewebeerhaltung.....	36
3.3.2 Messungen von Gesamt- und ONL-Dicke.....	45
3.3.3 Rangfolge der Kulturmedien.....	46
3.4 Kulturdauer.....	47

3.4.1 Beurteilung der Gewebeerhaltung.....	47
3.4.2 Messungen von Gesamt- und ONL-Dicke	57
3.5 Behandlung mit AAVs	58
4. Diskussion	63
4.1 Die porcine organotypische Retinakultur	63
4.1.1 Präparation	63
4.1.2 Kulturmedium	64
4.1.3 Kulturdauer.....	66
4.1.4 Einführung der Gewebequalitätspunktzahl	67
4.2 Transduktion der Retina Explantate	67
4.3 Ausblick.....	71
5. Zusammenfassung	72
6. Summary	74
I. Abkürzungsverzeichnis.....	75
II. Abbildungsverzeichnis	77
III. Tabellenverzeichnis.....	80
Literaturverzeichnis.....	81
Publikationsverzeichnis.....	93
Ehrenwörtliche Erklärung	94
Danksagung	95

1. Einleitung

Der Sehsinn ist beim Menschen der dominante der fünf Sinne. Ein Verlust dieses Sinnes bedeutet für die Betroffenen zumeist einen großen Verlust von Lebensqualität. Neben Verletzungen am Auge sind vor allem genetisch bedingte Erkrankungen wie degenerative Netzhauterkrankungen die Ursache für einen solchen Visusverlust. Die Forschung an der Heilung oder zumindest am Aufhalten solcher Degenerationen ist in den letzten Jahren immer weiter vorangeschritten und wurde vor allem durch die Entwicklung neuer Gentherapien vorangetrieben. Um solche neuartigen Therapien zu testen, werden in der Regel zunächst *in vitro* Modelle zurate gezogen, bevor *in vivo* Tierversuche und schließlich klinische Studien durchgeführt werden. In dieser Arbeit sollen porcine organotypische Langzeit-Retinakulturen als Intermediärmodell zwischen *in vitro* und *in vivo* Versuchen entwickelt werden, welche zum einen die Bedingungen im menschlichen Auge gut abbilden und zum anderen einfach, kostengünstig und ohne zu großen Zeitaufwand angewendet werden können. Das Schweineauge ist für Studien zum menschlichen Auge ein sehr gutes Modell, da es unter anderem ebenfalls eine zapfenreiche Region enthält, was bei anderen Spezies nicht der Fall ist. Aus diesem Grund können auch Therapieansätze gegen degenerative Netzhauterkrankungen besonders gut am Schwein erforscht werden. Ein positiver Nebeneffekt ist die Konformität der Retinakultur mit Russell und Burchs 3R-Prinzip von 1959, nach dem Tierversuche reduziert, verbessert oder komplett ersetzt werden sollen (Russell und Burch 1959).

1.1 Allgemeiner Aufbau des Wirbeltierauges

Das Auge ist bei allen Wirbeltieren ähnlich aufgebaut, sie alle besitzen Linsenaugen. Diese werden in den vorderen physikalisch-optischen Teil und den hinteren rezeptiven Teil analog zu ihrer Funktion aufgeteilt. Zudem unterscheidet man zwischen innerer, mittlerer und äußerer Augenhaut, deren Klassifizierung sich durch die Embryonalentwicklung ergibt. Strukturen der inneren Augenhaut entspringen dem Neuroektoderm, die der mittleren und äußeren Augenhaut dem Kopfmesenchym (Lüllmann-Rauch und Asan 2019). Das menschliche Auge besitzt mit der *Fovea centralis* eine Besonderheit, die so sonst nur noch bei anderen Primaten zu finden ist. Die *Fovea centralis* des menschlichen Auges enthält nur Zapfen-Photorezeptoren, die jeweils 1:1 mit Ganglienzellen verschaltet sind und ist damit der Punkt des schärfsten Sehens (Lüllmann-Rauch und Asan 2019).

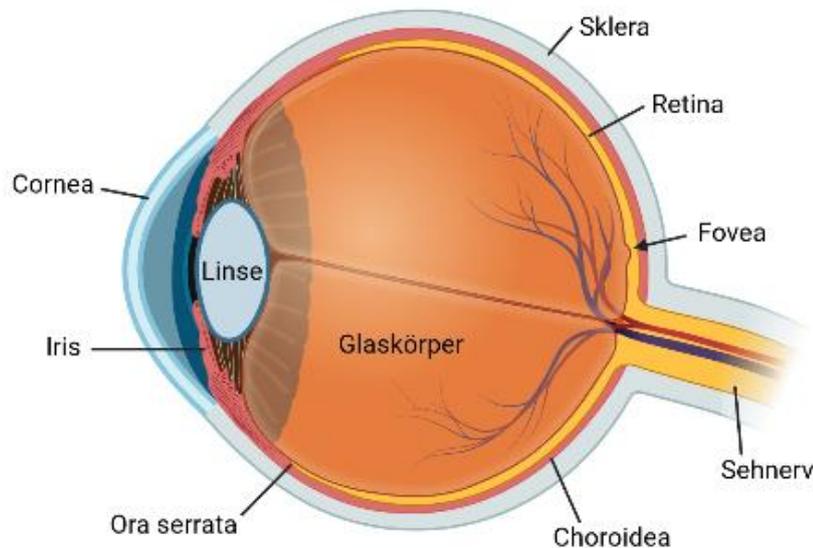


Abbildung 1: Schema eines Sagittalschnittes durch den humanen Bulbus.
Erstellt mit biorender.com.

1.2 Aufbau der Retina

Unter Retina versteht sich in dieser Arbeit das *Stratum nervosum* der Netzhaut (*Pars optica retinae*), also der lichtempfindliche Teil ohne Pigmentepithel (*Stratum pigmentosum*).

Die Retina ist der Teil des Auges, welcher einfallendes Licht in Nervenimpulse umwandelt und die ersten drei Neurone der Sehbahn enthält. Sie kann in sieben Schichten eingeteilt werden, wobei diese Schichtung dadurch zustande kommt, dass gleiche Bestandteile der Neuronen auf ähnlicher Höhe liegen und dadurch sichtbare Schichten ergeben (Lüllmann-Rauch und Asan 2019; Veleri et al. 2015). Die Schicht der Photorezeptoren wird gebildet aus den Innen- und Außensegmenten (*inner segments*, IS und *outer segments*, OS), während die Perikaryen der Zapfen und Stäbchen in der äußeren Körnerschicht (*outer nuclear layer*, ONL) lokalisiert sind. Die darauf folgende äußere plexiforme Schicht (*outer plexiform layer*, OPL) enthält die synaptischen Verschaltungen zwischen Photorezeptoren und Bipolarzellen sowie Horizontalzellen. In der inneren Körnerschicht (*inner nuclear layer*, INL) finden sich die Perikaryen von Bipolar-, Horizontal-, Amakrin- sowie Müllerzellen wieder. Wie auch in der OPL besteht die innere plexiforme Schicht (*inner plexiform layer*, IPL) aus synaptischen Verschaltungen, in dem Fall zwischen Bipolar- und Ganglienzellen, sowie Amakrinzellen. In der Ganglienzellschicht (*ganglion cell layer*, GCL) befinden sich die Perikaryen der

Ganglienzellen und der verlagerten Amakrinzellen (Dyer und Cepko 2001; Lüllmann-Rauch und Asan 2019).

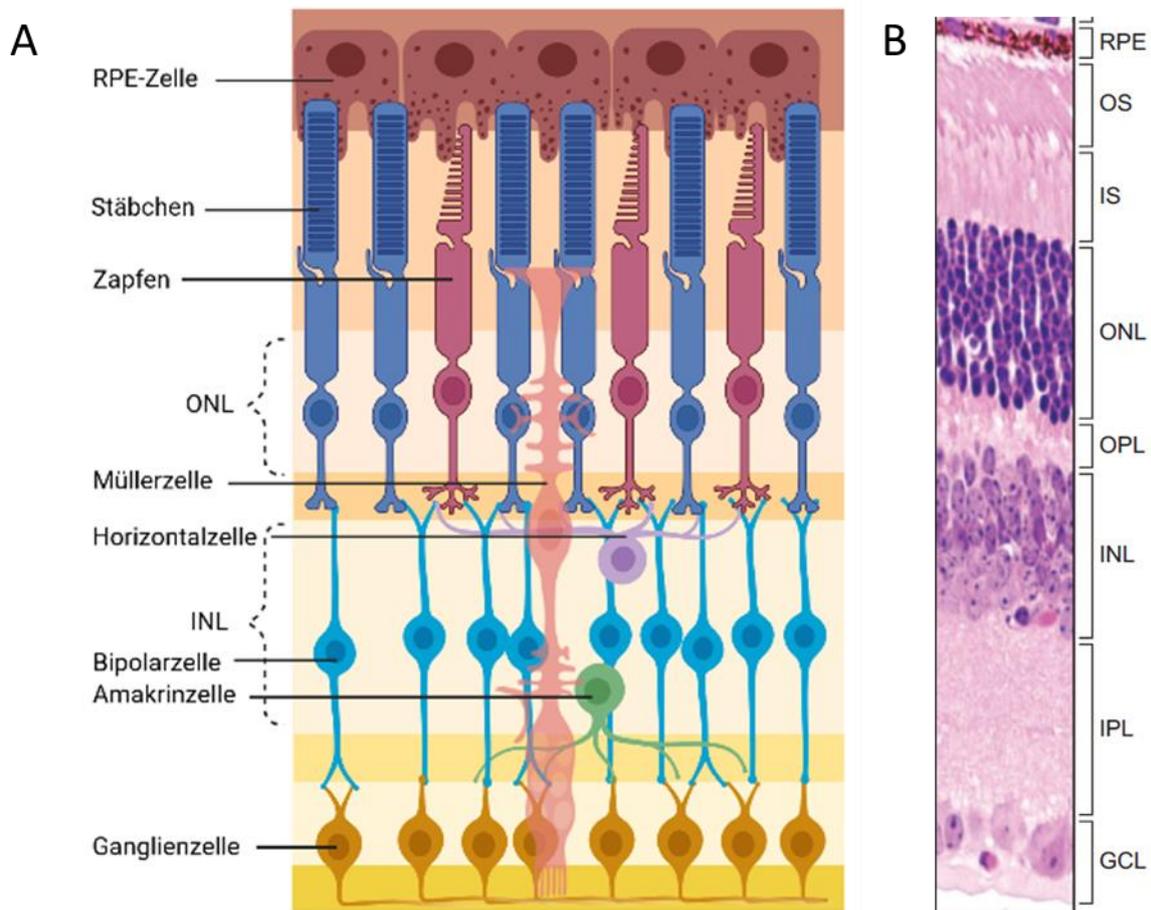


Abbildung 2: Aufbau der Retina.

A: Schematische Darstellung der Hauptzelltypen der Wirbeltierretina. Erstellt mit biorender.com **B:** Hämatoxylin-Eosin-Färbung eines Mause retina-Schnitts. RPE = Retinales Pigmentepithel, OS = Außensegmente der Photorezeptoren, IS = Innensegmente der Photorezeptoren, ONL = äußere Körnerschicht, OPL = äußere plexiforme Schicht, INL = innere Körnerschicht, IPL = innere plexiforme Schicht, GCL = Ganglienzellschicht. (Veleri et al. 2015 © 2015. Published by The Company of Biologists Ltd)

1.2.1 Photorezeptorzellen

Die Photorezeptoren der Retina wandeln das einfallende Licht durch eine Konformationsänderung von 11-cis-Retinal in Rezeptorpotentiale um. Diese werden dann durch das retinale Netzwerk und schließlich über den Sehnerv zum Gehirn weitergeleitet. Es gibt zwei verschiedene Typen Photorezeptoren - Stäbchen und Zapfen. Stäbchen sind für das Hell-Dunkel-Sehen verantwortlich. Zapfen werden aufgrund der enthaltenen Opsin-Moleküle und deren Absorptionsmaxima in verschiedene Typen aufgeteilt und sind für das Tages- und Farbsehen verantwortlich. Der Mensch besitzt drei

unterschiedlich Zapfentypen, das Schwein zwei. Photorezeptoren bestehen aus Innen- und Außensegmenten, die über das *Connecting Cilium* miteinander verbunden sind. Das Außensegment enthält sogenannte Disks, die wiederum Rhodopsin enthalten. Bis zu zehn Prozent dieser werden pro Tag abgestoßen und phagozytiert, weshalb das gesamte Außensegment in etwa zehn bis 15 Tagen komplett erneuert wird (Veleri et al. 2015).

1.2.2 Horizontalzellen

Horizontalzellen sind in der OPL lokalisiert und sorgen als inhibitorische Interneurone für eine laterale Inhibition der Signale zwischen Photorezeptoren und Bipolarzellen (Demb und Singer 2015). Bei fast allen tagaktiven Spezies gibt es mindestens zwei verschiedene Subtypen von Horizontalzellen, ein Subtyp besitzt Axone und einer nicht (Boije et al. 2016). Horizontalzellen sind zudem eventuell einer der initialen Zelltypen, aus denen ein Retinoblastom entstehen kann, da sie trotz bereits abgeschlossener Differenzierung wieder in den Zellzyklus eintreten und unkontrolliert entarten können, während sie ihre differenzierte Form beibehalten (Ajioka et al. 2007; Boije et al. 2016).

1.2.3 Bipolarzellen

Retinale Bipolarzellen sind Interneurone und können in Stäbchen- und Zapfen-Bipolarzellen unterteilt werden, wobei es nur einen Typ Stäbchen-Bipolarzellen und mehrere Typen Zapfen-Bipolarzellen gibt (Grünert und Martin 2020). Die Bipolarzellen sind die Interneurone zwischen Photorezeptoren und Ganglienzellen und werden lateral sowohl durch Horizontal- als auch durch Amakrinzellen verschaltet. Die hier wichtigen Stäbchen-Bipolarzellen sind ON-Bipolarzellen, depolarisieren also bei Lichteinfall und aktivieren die nachfolgenden Ganglienzellen (Grünert und Martin 2020). Stäbchen-Bipolarzellen fassen die Signale von bis zu vierzig Stäbchen-Photorezeptoren zusammen und leiten diese weiter (Lüllmann-Rauch und Asan 2019).

1.2.4 Gliazellen

In der Säugetierretina gibt es drei verschiedene Typen Gliazellen. Den überwiegenden Anteil machen Müllerzellen aus, gefolgt von Astrozyten und Mikroglia (Vecino et al. 2016).

Müllerzellen gehören zu den Makroglia und ihr Zellkörper befinden sich in der INL. Ihre Fortsätze spannen radial fast über die gesamte Retina von der äußeren bis hin zur inneren limitierenden Membran (Lüllmann-Rauch und Asan 2019). Unter anderem sind sie an der Organisation der Blut-Retina-Schranke beteiligt (Reichenbach und Robinson 1995).

Astrozyten gehören auch zu den Makroglia und sind unter anderem für Vaskularisation und das Aufrechterhalten der Blut-Retina-Schranke verantwortlich. Ihre Fortsätze reichen sowohl zu den Axonen der Ganglienzellen als auch zu den retinalen Gefäßen (Vecino et al. 2016).

Mikroglia sind sehr langlebig und helfen bei der generellen Aufrechterhaltung der Retina. Sie sind an Immunantworten beteiligt und spielen zum Beispiel eine Rolle bei der Phagozytose (Thanos et al. 1994; Vecino et al. 2016).

1.2.5 Ganglienzellen

Die retinalen Ganglienzellen sind schließlich für die Signalweiterleitung zum Zwischenhirn über den optischen Nerv zuständig. Ihre Perikaryen sind in der Ganglienzellschicht zu finden und es gibt ON- und OFF-Ganglienzellen sowie verschiedene Subtypen (Lüllmann-Rauch und Asan 2019; Corral-Domenge et al. 2022). Klinisch relevant sind retinale Ganglienzellen, weil ihr Degeneration eine Rolle bei der Entwicklung eines Glaukoms und der Leberschen hereditären optischen Neuropathie (LHON) spielt (Casson et al. 2012; Spiegel und Sadun 2022).

1.3 Vergleich zwischen humanem und porcinem Auge

Vergleicht man die für diese Arbeit relevanten Augen von Mensch und Schwein, fällt zunächst auf, dass beide mit einem anterioposterioren Durchmesser von etwa 24 mm die gleiche Größe besitzen (Sanchez et al. 2011). Auch die grobe Morphologie gleicht sich stark, weshalb Abbildung 1 lediglich das menschliche Auge zeigt. Der wohl größte Unterschied besteht darin, dass das porcine Auge anders als das humane keine *Fovea centralis* besitzt, sondern einen horizontalen Streifen in der Netzhaut (*Area centralis*), in dem das Zapfen-Stäbchen-Verhältnis bei etwa 1:3 bis 1:5 liegt (Mussolino et al. 2011; Slijkerman et al. 2015). Da das Schweineauge die Besonderheit der *Fovea centralis* dadurch gut abbilden kann, ist es ein besonders geeignetes Modell im Gegensatz zu anderen Spezies, wie zum Beispiel Mäusen, die zu den nachtaktiven Spezies gehören und daher eine anders aufgebaute Retina besitzen.

Alles zusammen genommen ist das Schweineauge also ein sehr gutes Modell für die Forschung zu humanen Augenerkrankungen, da es neben der anatomischen Eignung auch vergleichsweise einfach erhältlich ist und die bürokratischen Hürden nicht so hoch sind, wie beispielsweise bei nicht humanen Primaten.

1.4 Retinale Degeneration und Therapieansätze

1.4.1 Degenerative Vorgänge

Die retinale Degeneration kann grundsätzlich in vier Phasen eingeteilt werden, in denen jeweils unterschiedliche Umbauvorgänge vonstattengehen. In der ersten Phase sieht die Retina strukturell noch intakt aus, die Photorezeptoren zeigen jedoch schon frühe Anzeichen von Stress (Cuenca et al. 2014; Jones et al. 2016). Die zweite Phase ist von Photorezeptor-Verlust geprägt und zudem zeigt sich hier ein Umbau von Gliazellen (Gliose) und der neuronalen Verschaltung. In den Zellkernen zeigt sich eine Verdichtung des Chromatins und sie verlieren ihre runde Form nach und nach und werden pyknotisch (Charteris et al. 2007). In der dritten Phase kommt es dann zum Zelltod weiterer Zelltypen wie der Zapfen, fortgeschrittener Gliose und der Migration von Zellen in andere Schichten. Die Dicke der Retina verringert sich deutlich. Charakteristisch für die vierte Phase ist der Verlust sämtlicher Photorezeptoren, was klinisch auch mit dem kompletten Verlust der Sehkraft einhergeht. Zudem verfällt die Blut-Retina-Schranke, da das RPE sowie choroidale Gefäße in die anderen Schichten der Retina migrieren (Marc und Jones 2003; Jones und Marc 2005).

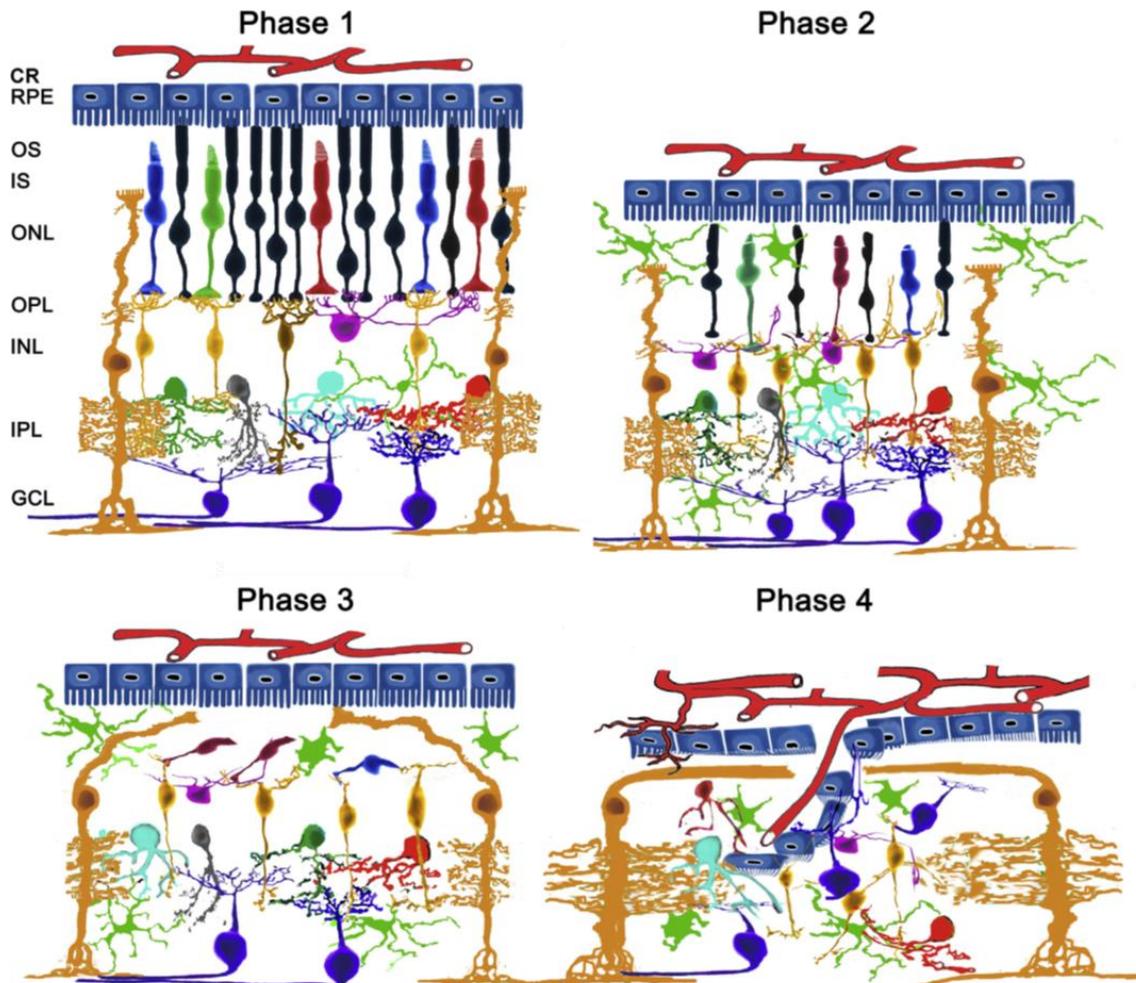


Abbildung 3: Die vier Phasen der neurodegenerativen Vorgänge in der Netzhaut.

In Phase eins zeigen sich keine signifikanten Veränderungen in Morphologie und Funktion. Die zweite Phase beinhaltet den Verlust von Stäbchen sowie die Aktivierung von Gliazellen und den Verlust von Zell-Zell-Interaktionen. Phase drei wird charakterisiert durch den Zelltod von Zapfen, fortgeschrittene Gliose und Abnahme der Retinadicke. In Phase vier kommt es zum Verlust aller Photorezeptoren, der Translokation von Amakrin- und Bipolarzellen und einer Remodellierung der retinalen Schichten. RPE = Retinales Pigmentepithel, OS = Außensegmente der Photorezeptoren, IS = Innensegmente der Photorezeptoren, ONL = äußere Körnerschicht, OPL = äußere plexiforme Schicht, INL = innere Körnerschicht, IPL = innere plexiforme Schicht, GCL = Ganglienzellschicht (Cuenca et al. 2014 © 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved, Lizenznummer 5440111065638).

1.4.2 Erkrankungen

Erbliche Netzhautdystrophien sind einzeln betrachtet selten auftretende Erkrankungen, die in ihrer Gesamtheit aber etwa zwei Millionen Menschen betreffen. Die Schwierigkeit bei der Entwicklung einer Behandlung ist, dass die Gruppe der Netzhautdystrophien nicht nur in ihren Symptomen sondern auch mit fast 300 betroffenen Genen sehr heterogen ist. Zudem gibt es pro Gen noch mehrere krankheitsauslösende Mutationen, derzeit sind etwa 10.000 davon bekannt (Pulman et al. 2022). Retinadystrophien sind dadurch klassifiziert, dass die graduelle Degeneration von Photorezeptoren bei Betroffenen zu einer

Verschlechterung der Sehkraft und schlussendlich zu Blindheit führt. Je nachdem, ob Zapfen oder Stäbchen zuerst degenerieren, spricht man von Zapfen-Stäbchen- oder Stäbchen-Zapfen-Dystrophien. Degenerieren nur die Zapfen-Photorezeptoren, liegt hingegen eine reine Zapfen-Dystrophie vor (Cheng und Punzo 2022).

Als Beispiele für vererbte retinale Erkrankungen sind unter anderem altersbedingte Makuladegeneration (AMD), Lebersche kongenitale Amaurose (LCA), Retinitis Pigmentosa (RP) oder Morbus Stargardt zu nennen. Die meisten erblichen Retinadystrophien manifestieren sich bereits im Jugendalter, manche, wie AMD, sind aber auch mit höherem Alter assoziiert.

1.4.3 Therapiemöglichkeiten

Betroffene von erblichen Retinadystrophien werden meist nur wegen ihrer Symptome behandelt, eine Heilungschance besteht zur Zeit noch nicht. Da das Auge aber einen hervorragenden Angriffspunkt für gentherapeutische Ansätze bietet, wurde und wird immer weiter in diese Richtung geforscht. Das Auge eignet sich deshalb so gut, weil es leicht zugänglich und durch die Blut-Retina-Schranke immunprivilegiert ist. Die meisten Eingriffe sind non- oder minimal-invasiv durchführbar und klinische Parameter können einfach gemessen werden (Veleri et al. 2015; Martinez-Fernandez de la Camara et al. 2018). Während mehrere Gentherapien derzeit in klinischen Studien am Menschen getestet werden, gibt es bisher nur eine zugelassene Therapie (Pulman et al. 2022). Für LCA-Betroffene, deren Erkrankung auf einer Mutation im *RPE65* Gen beruht, wurde 2008 eine Gentherapie entwickelt (Bainbridge et al. 2008; Maguire et al. 2008; Stieger und Lorenz 2010). Diese ist unter dem Namen Luxturna (Voretigen-Neparvovec, Novartis) seit 2017 in den USA und seit 2018 in Europa zugelassen.

1.4.3.1 Gentherapie

Bei der Gentherapie unterscheidet man zwischen Gen-Addition (*gene addition*), Gen-Stillegung (*gene silencing*) und Genom-Editierung (*genome editing*). Alle diese haben dabei verschiedene Anwendungsgebiete, je nachdem auf welcher genetischen Veränderung eine Erkrankung beruht.

Die Gen-Additionstherapie wird angewendet, wenn das Genprodukt entweder gar nicht vorkommt oder nicht schädlich für die Zelle ist. Hier wird ein komplettes Gen in die Zelle eingebracht, wodurch das fehlende Protein fehlerfrei produziert werden kann. Bei dominanten Erbgängen kommt die Gen-Stillegung zur Anwendung, da hierbei die

Herstellung des fehlerhaften Proteins unterdrückt werden kann. Dadurch kann es auch möglich werden, dass das nicht betroffene rezessive Allel die Funktion übernimmt und das Protein wieder korrekt gebildet werden kann.

Die Genom Editierung zielt hingegen darauf ab, dass das Genom der Zelle durch eine einmalige Therapie repariert werden kann. Bei monogenetischen Erkrankungen ist dies die mittlerweile am häufigsten verwendete Methode von Forschenden. Im Wesentlichen werden sich zelleigene DNA-Reparaturmechanismen zur Nutze gemacht, nachdem mittels programmierbarer Nukleasen ein DNA-Doppel- oder Einzelstrangbruch eingefügt wurde. Stellvertretend für verschiedene Nukleasen sei hier CRISPR/Cas zu nennen, welches derzeit die am meisten eingesetzte Methode ist (Anzalone et al. 2020). Die Endonukleasen sowie eventuell benötigte weitere Gensequenzen werden mithilfe von verschiedensten Vektoren in die Zelle eingebracht. Am geläufigsten ist die Verwendung von Adeno-assoziierten Viren (AAV), aber auch Nanopartikel, Liposomen oder Lentiviren finden Verwendung (Allocca et al. 2008). So kann eine Mutation im Genom von Betroffenen zielgenau anvisiert und repariert werden. Die unterschiedlichen Vektoren haben jeweils verschiedene Vor- und Nachteile.

1.4.3.2 Applikationswege

Für eine Gentherapie am Auge stellt sich zusätzlich noch die Frage, auf welchem Weg das Therapeutikum verabreicht werden soll. Hier kommen invasive Methoden wie subretinale oder intravitreale Injektionen (vgl. Abb. 4) wie auch non-invasive wie die Anwendung als Augentropfen in Frage. Diese Entscheidung muss schon bei der Entwicklung einer Therapie mit einbezogen werden, da sie Einfluss auf die Zusammensetzung nimmt. Auch die Frage, welche Zelltypen erreicht werden sollen, spielt eine Rolle bei der Auswahl (Ochakovski et al. 2017).

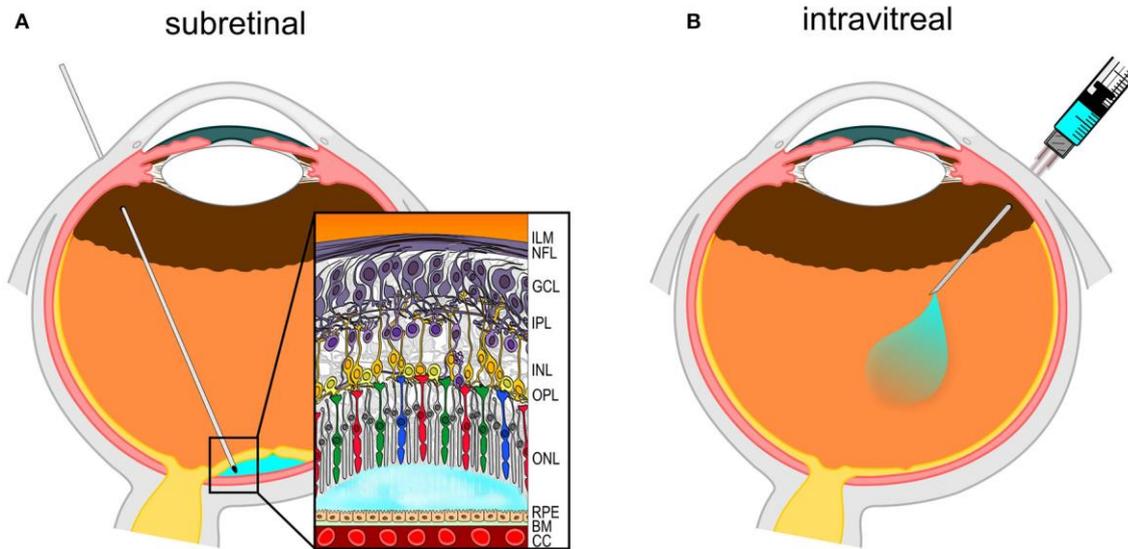


Abbildung 4: Schematische Darstellung von subretinaler und intravitrealer Injektion.

A: Bei der subretinalen Injektion wird das Therapeutikum zwischen ONL und RPE injiziert, wodurch die Retina sich an dieser Stelle ablöst und ein sogenannter *bleb* entsteht. **B:** Bei der intravitrealen Injektion wird das Therapeutikum in den vitrealen Raum injiziert. ILM = Innere limitierende Membran, NFL = Nervenfaserschicht, GCL = Ganglienzellschicht, IPL = Innere plexiforme Schicht, INL = Innere Körnerschicht, OPL = Äußere plexiforme Schicht, ONL = Äußere Körnerschicht, RPE = Retinales Pigmentepithel, BM = Bruchs Membran, CC = Aderhaut (Ochakovski et al. 2017 © 2017 Ochakovski, Bartz-Schmidt and Fischer).

1.4.3.3 Adeno-assoziierte Viren

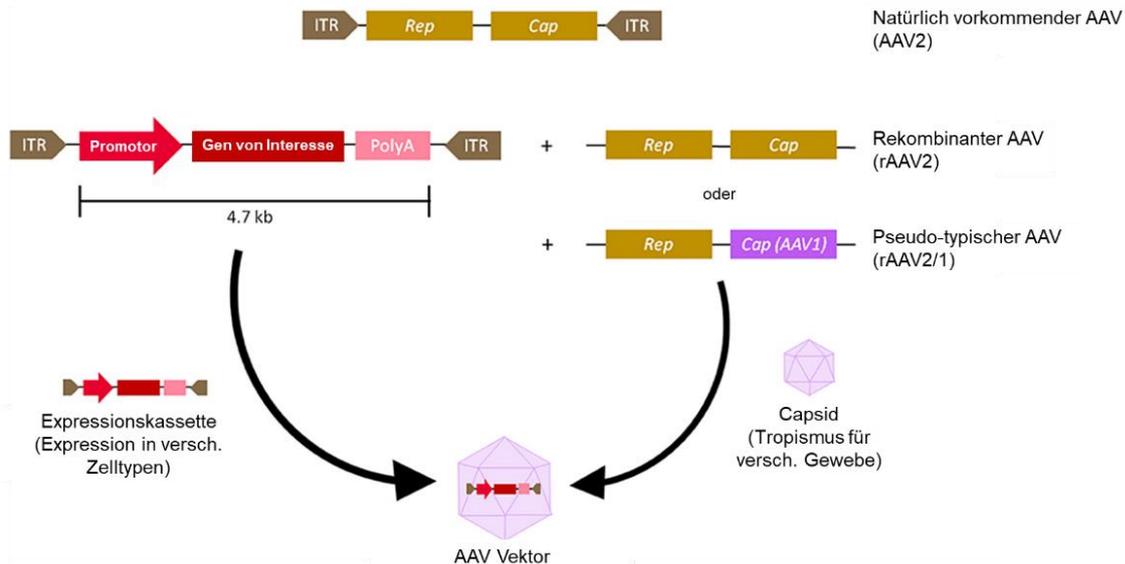


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Herstellung von rekombinanten AAVs (rAAV).

Gezeigt wird beispielhaft die Herstellung eines rekombinanten AAV-Vektors (rAAV2 oder pseudo-typischer rAAV2/1) basierend auf einem wildtypischen AAV2. Die Kombination einer Expressionskassette zwischen des ITRs und plasmidischen *Rep*- und *Cap*-Sequenzen ergibt einen rAAV (Au et al. 2021 © 2022 Au, Isalan and Mielcarek).

Adeno-assoziierte Viren (AAVs) sind Dependoparvoviren und enthalten in ihrem Genom einzelsträngige DNA mit drei Genen, zwei davon sind *Rep* für die Replikation und *Cap* für die Capsidinformationen. Flankiert sind diese von *inverted terminal repeats* (ITR). Durch den Austausch von *Rep* und *Cap* mit einer Expressionskassette können AAVs als rekombinante AAVs (rAAV) für die Gentherapie genutzt werden. Wird ein spezieller Promotor in der Expressionskassette verwendet, kann die Expression auf einen oder mehrere Zelltypen beschränkt werden (McClements und MacLaren 2013). Für die Herstellung von rAAVs werden *Rep*- und *Cap*-Sequenzen als Plasmide *in trans* dazugegeben. Hierbei kann dann zum Beispiel auch eine andere *Cap*-Sequenz als die des Ursprungsvektors hinzugegeben werden, um pseudo-typische rAAVs herzustellen (vgl. Abb. 5). Das Capsid eines AAVs ist für den Tropismus des Vektors verantwortlich (Au et al. 2021). Für die Transduktion der Retina werden für gewöhnlich rAAVs basierend auf AAV2 verwendet. Die pseudo-typischen AAVs rAAV2/1, rAAV2/4 und rAAV2/6 (Yang et al. 2002; Weber et al. 2003) können RPE-Zellen in Mäusen transduzieren, während rAAV2/2, rAAV2/5, rAAV2/7, rAAV2/8 und rAAV2/9 RPE-Zellen und Photorezeptoren erreichen (Allocca et al. 2007; McClements und MacLaren 2013). Speziell für die Anwendung als intravitreale Injektion ist es wichtig, dass die AAVs trotz limitierender Strukturen wie der inneren limitierenden Membran die gewünschten Zellen wie Photorezeptoren erreichen können. Hierfür werden immer wieder neue Capside durch gerichtete Evolution hergestellt (Pavlou et al. 2021; Palfi et al. 2022; Pupo et al. 2022). Als Promotoren können beispielsweise der ubiquitäre CMV-Promotor verwendet werden, aber auch zellspezifische Promotoren können eingesetzt werden, um eine gerichtete Expression zu fördern (Allocca et al. 2007; McClements und MacLaren 2013).

Als eine der größten Schwierigkeiten von AAVs wird deren Kapazitätsgrenze von etwa 4,7 Kilobasen gesehen (Colella und Auricchio 2012). Da einige Gene, die bei retinalen Erkrankungen eine Rolle spielen, sehr groß sind und diese Kapazitätsgrenze alleine schon weit überschreiten würden, wird hier unter anderem über *dual-AAV* Systeme nachgedacht, bei denen sich die einzelnen Teile später in der Zielzelle wieder zusammensetzen können (Auricchio et al. 2015; McClements et al. 2020). Zudem dauert das Umschreiben der einzelsträngigen Virus-DNA in doppelsträngige DNA vergleichsweise lange, weshalb derzeit häufig *self-complementary* AAVs (scAAVs) verwendet werden, bei denen beide Einzelstränge bereits vorliegen und sich somit in der

Zielzelle nur noch aneinanderlagern müssen, um exprimiert werden zu können (McCarty 2008; Colella und Auricchio 2012).

1.5 Modellsysteme

Um die beschriebenen Degenerationsvorgänge der Retina zu modellieren, nachzuvollziehen und gegebenenfalls neue Therapien entwickeln zu können, werden verschiedene Typen an Modellen verwendet, an denen jeweils unterschiedliche Aspekte besser erforscht werden können. Es ist sehr wichtig, ein Modell zu finden, welches genau auf die Fragestellung zugeschnitten ist, möglichst wenige Ressourcen verbraucht und zudem noch ethisch vertretbar ist. Im Folgenden werden verschiedene Modellsysteme erläutert, welche für die Forschung an erblichen Retinadystrophien geeignet sind.

1.5.1 Zellkultur

In der Zellkultur können sehr viele verschiedene Zelltypen einfach und relativ kostengünstig gehalten und parallel mit hohem Durchsatz erforscht werden. Zellkulturexperimente können mit den vielen existierenden Protokollen ohne große Vorlaufzeit begonnen werden und die Zellen können oft bis zu dreißig Passagen in Kultur gehalten werden. Neben Primärzellen finden auch stabile Zelllinien Verwendung, vor allem da diese länger in Kultur gehalten werden können. Als primäre retinale Zelltypen können zum Beispiel Mikroglia oder RPE-Zellen in Kultur genommen werden (Klettner et al. 2014), stabile Zelllinien existieren unter anderem für RPE-Zellen (ARPE-19), Photorezeptoren (WERI-RB1 und 661W) und Ganglienzellen (RGC-5) (Schnichels et al. 2020). Seit einiger Zeit werden vermehrt verschiedene Typen von Stammzellen, darunter vor allem induzierte pluripotente Stammzellen (iPSC), für die Forschung eingesetzt (Gonzalez-Cordero et al. 2018; Schnichels et al. 2020). Da vielen Zelltypen für die normale Funktion, die sie im Körper ausüben würden, angrenzende andere Zelltypen und deren ausgeschütteten Faktoren fehlen, sind Co-Kulturen verschiedener Zelltypen eine weitere Möglichkeit, um physiologische Verhältnisse zu modellieren (Singh et al. 2020; Touhami et al. 2022). Es ist leicht möglich, Zelllinien zu manipulieren und beispielsweise einzelne Gene oder Genabschnitte zu verändern oder auszuknocken. Neuronale Zellkulturen sind jedoch problematischer als andere, in der Hinsicht, dass adulte neuronale Zellen postmitotisch sind und sich nicht mehr teilen. Eine DNA-Reparatur ist daher nur noch eingeschränkt möglich.

1.5.2 Organoide

Neben Zellkulturmodellen werden in den letzten Jahren auch zunehmend zwei- oder dreidimensionale Organoide in der *in vitro* Forschung verwendet. Auch für neuronale Modelle wie Gehirn oder Netzhaut existieren bereits etablierte Organoid-Systeme. Aus humanen embryonalen Stammzellen (hESC) konnten die ersten ganzen Augenbecher differenziert werden (Eiraku et al. 2011; Nakano et al. 2012). Mittlerweile können Organoide erstellt werden, die die retinale Architektur korrekt abbilden und alle Zelltypen enthalten und es werden hauptsächlich humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSC) für die Generierung verwendet. Schwierigkeiten entstehen jedoch dadurch, dass die entstandenen Photorezeptoren nicht vollständig ausdifferenziert sind und deshalb nicht alle Funktionen ausüben können (Bellapianta et al. 2022). Auch die Blutzufuhr, wie sie physiologisch existiert, kann bisher noch nicht modelliert werden, wobei aktuelle Studien schon in naher Zukunft die Möglichkeiten für vaskularisierte neuronale Organoide sehen (Li et al. 2022).

Degenerative Erkrankungen können abgebildet werden, indem zum Beispiel hiPSC von Betroffenen mit den entsprechenden Mutationen für die Differenzierung verwendet werden. Dennoch ist es zur Zeit noch nicht vollständig möglich, progressive Degenerationsvorgänge und ein repräsentatives Altern der Organoide zu modellieren, was vor allem für die Forschung an Erkrankungen, die erst später im Leben auftreten, wichtig wäre (Artero Castro et al. 2019). Ein weiterer Nachteil gegenüber anderer Modellsysteme ist es, dass alleine für die Generierung der Organoide je nach Protokoll dreißig bis zweihundert Tage veranschlagt werden muss (Bellapianta et al. 2022). Für kleinere Labore ist die Arbeit mit Organoiden also kaum möglich, denn um für zweihundert Tage das kleinste Risiko einer Kontamination der Kulturen vermeiden zu können, müssen diese konsequent von anderen Kulturen getrennt werden. Dazu braucht es im Grunde einen separaten Raum und strikte Maßnahmen zur Kontaminationsvermeidung, was neben dem finanziellen Aspekt eine weitere große Hürde darstellt.

1.5.3 Tiermodelle

Bei tierischen Modellorganismen lässt sich unterscheiden zwischen Tiermodellen, die natürlich und spontan die gleiche Erkrankung wie der Mensch entwickeln können und transgenen Tiermodellen, bei denen durch *Knock-Ins* oder *Knock-Outs* von bestimmten Genen solche Erkrankungen hervorgerufen werden. In die erste Kategorie fallen zum

Beispiel Hunde und Katzen, die ebenfalls retinale Degenerationserkrankungen entwickeln können (Stieger und Lorenz 2010). Als transgene Modelltiere werden häufig Mäuse eingesetzt, da diese klein und leicht zu halten sind und schnell viele Nachkommen produzieren können. Ideal sind Mausmodelle vor allem für die Forschung zu Makuladegenerationen jedoch nicht, da sie zu den nachtaktiven Tieren gehören und demnach nicht den gleichen Anteil Zapfen in der Retina besitzen wie tagaktive Spezies (Slijkerman et al. 2015). Einzelne Aspekte zum Beispiel von AMD können gut modelliert werden, die Gesamtheit einer solchen komplexen Erkrankung kann jedoch nicht in einem Mausmodell abgebildet werden (Schnichels et al. 2020). Betrachtet man rein den Nutzen, den ein Modellorganismus für die Forschung hätte, dann wären nicht-humane Primaten sicherlich die beste Wahl, um erbliche Retinaerkrankungen zu betrachten. Das Immunsystem dieser Tiere ist zudem dem des Menschen sehr ähnlich, was zum Beispiel für die Forschung an viralen Vektoren für die Gentherapie sinnvoll wäre, um Immunreaktionen untersuchen zu können (Slijkerman et al. 2015). Aus ethischer Sicht, ist eine Forschung an Primaten jedoch bedenklich. Zusätzlich erkranken Primaten wie beispielsweise Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*) wohl nicht an altersbedingten retinalen Erkrankungen, obwohl sie in anderen Forschungsgebieten gute Modelle für altersbedingte Veränderungen sind (Haverkamp et al. 2022). Weitere geeignete Modellorganismen sind andere große Säugetiere wie Schwein, Schaf oder Rind (Bellapianta et al. 2022). Wie bereits in Abschnitt 1.3 beschrieben, eignet sich das Schwein in diesem Fall gut als Tiermodell, da sich die Anatomie des Auges mit dem menschlichen nahezu gleicht. Für verschiedene Studien zum Thema retinaler Forschung wurden porcine Modelle schon erfolgreich genutzt (Tornabene et al. 2022; Lytvynchuk et al. 2022).

1.5.4 Organotypische Kultur

Die organotypische Retinakultur gilt als Intermediärmodell zwischen Zellkultur *in vitro* und den Tiermodellen *in vivo*. Im Gegensatz zu *in vivo* Modellen sind *in vitro* organotypische Kulturen unabhängig von der Möglichkeit zur Nutzung einer Tierhaltungs-Einrichtung und den damit einhergehenden Kosten für die Versorgung der Tiere und einer speziellen Schulung des Personals.

Physiologisch sind die Retina-Explantate nah an der Situation *in vivo* und dennoch ist der Arbeitsaufwand eher mit Zellkulturen zu vergleichen. Ein besonderer Vorteil der organotypischen Kultur sind die bis ins kleinste Detail kontrollierbaren Bedingungen,

unter denen die Retinae kultiviert werden. Retinakulturen sind mittlerweile ein relativ gut etabliertes System und können aus Augen mehrerer unterschiedlicher Spezies wie Maus, Rind oder Schwein hergestellt werden (Müller et al. 2017; Peynshaert et al. 2017; Schnichels et al. 2019). Auch aus gespendetem humanem Material können organotypische Kulturen hergestellt werden und für verschiedene Versuche verwendet werden, die ohne entsprechende klinische Studie an lebenden Menschen nicht durchgeführt werden könnten (Pavlou et al. 2021). Während organotypische Retinakulturen aus der Maus bisher häufig verwendet wurden, weil Mäuse bisher das Standard-Tiermodell darstellen und sehr viele etablierte Biomarker bekannt sind, sind porcine Retinakulturen immer mehr auf dem Vormarsch (Schnichels et al. 2019; Schnichels et al. 2020). Wie bereits beschrieben, sind Schweine ein besonders gutes Modellsystem für humane Retinadystrophien und auch hier wurden bereits viele Besonderheiten charakterisiert. Besonders hervorzuheben ist auch, dass für solche porcinen organotypischen Retinakulturen keine Tiere extra gehalten und getötet werden müssen, da Schweineaugen als Abfall aus der Lebensmittelproduktion sehr einfach erhältlich sind (Schnichels et al. 2020).

Derzeit werden porcine Retina-Explantate häufig für die Forschung zur grundlegenden molekularbiologischen Fragestellungen wie Apoptose-Studien oder das Screening von potentiellen neuroprotektiven Agenzien verwendet (Bell et al. 2016; Maliha et al. 2019; Schnichels et al. 2021). Auch adeno-assoziierte Viren (AAV), die als Shuttle für Gentherapien dienen sollen, werden in porcinen organotypischen Kulturen getestet (Wiley et al. 2018). Explantate können mit den existierenden Protokollen etwa sieben bis 14 Tage in Kultur gehalten werden (Rettinger und Wang 2018). Auch hier sind Co-Kulturen möglich, wobei die Retina-Explantate zum Beispiel mit RPE-Zellen oder humanen neuronalen Vorläuferzellen (hNPC) gemeinsam kultiviert werden (Di Lauro et al. 2016; Mollick et al. 2016).

1.6 Ziele der Arbeit

In dieser Arbeit soll ein organotypisches Modell etabliert werden, welches der menschlichen Retina möglichst nahekommt und welches verwendet werden kann, um potentielle gentherapeutische Strategien vorab testen zu können.

1.6.1 Etablierung der organotypischen Langzeit-Retinakultur

Die porcine organotypische Retinakultur in dieser Arbeit soll stabil für längere Zeit (mindestens drei Wochen) in Kultur gehalten werden können, einfach durchführbar sein und dadurch ein passendes Modell für die Testung gentherapeutischer Ansätze bieten. Durch die längere Kulturdauer im Gegensatz zu den bisher üblichen Protokollen soll sichergestellt werden, dass zu exprimierende Konstrukte der Therapien vollständig transkribiert werden und Erfolge sichtbar gemacht werden können. Zudem soll ein Vergleich zwischen unterschiedlichen Experimenten durch ein neu etabliertes System zur Klassifizierung von retinaler Degeneration in Explantaten einfach und schnell durchzuführen sein.

1.6.2 Behandlung mit AAVs

Zusätzlich zur Etablierung des organotypischen Systems soll getestet werden, auf welche Weise und mit welchen AAV porcine Explantate transduziert werden können, um verschiedene Zelltypen in der Retina zu erreichen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchslösungen

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und Verbrauchslösungen in alphabetischer Reihenfolge unter Nennung des Herstellers.

Chemikalie	Hersteller
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	<i>Life Technologies</i> , Carlsbad, California, USA
Antibiotic-antimycotic (Anti-anti)	<i>Thermo Fisher Scientific</i> , Waltham, Massachusetts, USA
B-27 mit Insulin	<i>Thermo Fisher Scientific</i> , Waltham, Massachusetts, USA
B-27 ohne Insulin	<i>Thermo Fisher Scientific</i> , Waltham, Massachusetts, USA
Bovines Serum Albumin (BSA)	<i>Serva</i> , Heidelberg
Di-Natriumhydrogenphosphat Heptahydrat (Na ₂ HPO ₄)	<i>Carl Roth</i> , Karlsruhe
DMEM	<i>Anprotec</i> , Bruckberg
Eosin G-Lösung 0,5 % wässrig	<i>Carl Roth</i> , Karlsruhe
Essigsäure (C ₂ H ₄ O ₂)	<i>Merck</i> , Darmstadt
Ethanol absolut	<i>Carl Roth</i> , Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	<i>Sigma Aldrich</i> , Steinheim
Fluorescence Mounting Medium	<i>Agilent Dako</i> , Santa Clara, California, USA
Fötale Kälberserum (FKS)	<i>Anprotec</i> , Bruckberg
Hämatoxylin nach Gill II	<i>Carl Roth</i> , Karlsruhe
HEPES	<i>Carl Roth</i> , Karlsruhe
Immersionsöl IMMOIL-F30CC	<i>Olympus</i> , Hamburg
Kaliumchlorid (KCl)	<i>Carl Roth</i> , Karlsruhe
L-Glutamin	<i>Anprotec</i> , Bruckberg
N-2	<i>Thermo Fisher Scientific</i> , Waltham, Massachusetts, USA
Natriumchlorid (NaCl)	<i>Carl Roth</i> , Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	<i>Carl Roth</i> , Karlsruhe
Normal Donkey Serum (NDS)	<i>Sigma Aldrich</i> , Steinheim
Paraformaldehyd (PFA)	<i>Merck</i> , Darmstadt
Roti Histokitt II	<i>Carl Roth</i> , Karlsruhe
RPMI 1640	<i>Anprotec</i> , Bruckberg

Salzsäure (HCl)	<i>Merck, Darmstadt</i>
Sucrose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	<i>Serva, Heidelberg</i>
Tissue Tek	<i>Leica Biosystems, Nussloch</i>
Tri-Natriumcitrat Dihydrat (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇)	<i>Merck, Darmstadt</i>
Tris	<i>Carl Roth, Karlsruhe</i>
Triton X-100	<i>Carl Roth, Karlsruhe</i>
Tween 20	<i>Carl Roth, Karlsruhe</i>

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien in alphabetischer Reihenfolge unter Nennung der Hersteller.

Material	Hersteller
Alufolie	<i>VWR, Radnor, Pennsylvania, USA</i>
Cryomold	<i>Sakura Finetik, Alphen aan den Rijn, Niederlande</i>
Deckgläser 24x50 mm	<i>Carl Roth, Karlsruhe</i>
Objektträger	<i>Langenbrinck, Emmendingen</i>
Objektträger SuperFrost Plus	<i>Langenbrinck, Emmendingen</i>
Parafilm M	<i>Bemis, Neenah, Wisconsin, USA</i>
Petrischalen	<i>Sarstedt, Nürnbergrecht</i>
Pipettenspitzen in verschiedenen Größen	<i>Biozym, Hess. Oldendorf; Eppendorf, Hamburg; Brand, Wertheim</i>
Pipettenspitzen mit Filter in verschiedenen Größen	<i>Biozym, Hess. Oldendorf; nerbe plus, Winsen (Luhe)</i>
Präparierbesteck	<i>Bausch and Lomb, Laval, Kanada; Fine Science Tools, Heidelberg</i>
Reaktionsgefäße in verschiedenen Größen	<i>Eppendorf, Hamburg; Sarstedt, Nürnbergrecht; Biozym, Hess. Oldendorf; Simport, Bernard-Pilon Beloeil, Kanada</i>
Skalpellgriffe	<i>Feather, Osaka, Japan</i>
Skalpellklingen Größen 11 & 21	<i>Feather, Osaka, Japan</i>
Wattestäbchen	<i>dm Drogeriemarkt, Karlsruhe</i>
Zellkultureinsätze mit Polycarbonatmembran, Porengröße 0,4 µm	<i>SPL Life Sciences, Pocheon-si, Gyeonggi-do, Südkorea</i>
Zellkulturschalen 6-Well	<i>Sarstedt, Nürnbergrecht</i>

2.1.3 Geräte

Tabelle 3: Verwendete Geräte und deren Hersteller in alphabetischer Reihenfolge.

Gerät	Hersteller
Analysewaage	<i>Sartorius, Göttingen</i>
Autoklav	<i>Systec, Wettenberg; Tuttnauer Europe, Breda, Niederlande</i>
CO ₂ -Inkubator	<i>Binder, Tuttlingen</i>
Flockeneismaschine	<i>Wessamat, Kaiserslautern</i>
Fluoreszenzmikroskop Biozero	<i>Keyence, Neu-Isenburg</i>
Konfokales Laser Scanning Mikroskop Fluoview FV10i	<i>Olympus, Hamburg</i>
Kryostat MEV	<i>SLEE medical, Mainz</i>
Lichtmikroskop	<i>KERN Optics, Balingen</i>
Magnetrührer	<i>IKA, Staufen; NEUATION Technology, Gujarat, Indien</i>
Mikrowelle	<i>Siemens, München</i>
Orbitalschüttler	<i>Analytik Jena, Jena; Heidolph, Schwabach</i>
pH Messgerät	<i>Mettler Toledo, Gießen</i>
Sterilbank Laminar Flow	<i>Thermo Scientific, Schwerte</i>
Vortex Mischer	<i>VWR International, Darmstadt</i>
Waage	<i>Ohaus, Zürich, Schweiz</i>
Zentrifuge Mikro 200 R	<i>Hettich, Tuttlingen</i>
Zoom-Stereomikroskop binokular	<i>MoticEurope, Barcelona, Spanien</i>

2.1.4 Kulturmedien

Für die Kultivierung der organotypischen Explantate wurden verschiedene Kulturmedien getestet, um eine optimale Gewebeerhaltung auch bei langer Kulturdauer zu erreichen. Alle verwendeten Medien basieren auf Neurobasal-A Medium (*Thermo Fisher Scientific*, Dreieich) und wurden mit verschiedenen Supplementen sowie Antibiotika und einem Antimykotikum versetzt.

Die Nomenklatur der Kulturmedien wurde wie folgt durchgeführt: Der Name eines Mediums bestand aus zwei Zeichen sowie einer dreistelligen Zahl, wobei diese der Glucosekonzentration in mg/dl entsprach. Das erste Zeichen (- oder +) besagte, ob im Medium FKS enthalten war, das zweite, ob B-27 mit (+) oder ohne Insulin (-) verwendet wurde. Wurde N-2 zugesetzt, wurde dies dem Namen hinten angehängt.

Um ein Glucoselevel von 100 mg/dl im Kulturmedium einzustellen, wurden Neurobasal-A Medium mit 450 mg/dl (Art. Nr.: 10888022) und Neurobasal-A Medium ohne Glucose (Art. Nr.: A2477501) im Verhältnis 1:3,5 miteinander gemischt. Die verschiedenen Supplemente wurden je nach Zusammensetzung in den in Tabelle 4 beschriebenen Mengen zugesetzt. Die getesteten Zusammensetzungen sind unter Abschnitt 3.3 zusammengetragen.

Tabelle 4: Anteile der Supplemente an Neurobasal-A Medium für die organotypische Retinakultur.

Supplement	Menge in Prozent
Anti-anti	5 (in der ersten Woche der Kultur) 1 (Rest der Kulturdauer)
B-27 mit Insulin	2
B-27 ohne Insulin	2
FKS	10
L-Glutamin	1
N-2	1

Als Beispiel ergibt sich daraus die folgende Zusammensetzung für 100 ml Neurobasal-A --+100 N-2 für die erste Woche der Kultur:

Neurobasal-A 450 mg/dl Glucose	20,2 ml
Neurobasal-A ohne Glucose	70,8 ml
B-27 mit Insulin	2 ml
L-Glutamin	1 ml
Anti-anti	5 ml
N-2	1 ml

Das Kulturmedium wurde entsprechend der Datenblätter für maximal sieben Tage im Kühlschrank aufbewahrt und danach nicht mehr verwendet.

2.1.5 Puffer

Tabelle 5: Verwendete Puffer und deren Zusammensetzung.

Puffer	Zusammensetzung
Antikörpermedium	3 % Normal Donkey Serum 1 % BSA 0,5 % Triton X-100 In 0,1 M PBS
Natriumcitrat-Puffer pH 6,0	1,47 g Tri-Natriumcitrat Dihydrat ad 500 ml ddH ₂ O pH-Wert auf 6,0 einstellen 250 µl Tween 20 hinzufügen
Parafomaldehydlösung 4 %	4 % Parafomaldehyd In 0,1 M PBS

Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) 0,1 M, pH 7,4	50 % PBS 0,2 M 50 % ddH ₂ O pH-Wert auf 7,4 einstellen
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) 0,2 M	8,28 g KH ₂ PO ₄ 23,36 g NaCl 91,14 g Na ₂ HPO ₄ ad 2 l ddH ₂ O
Präinkubationslösung	10 % Normal Donkey Serum 1 % BSA 0,5 % Triton X-100 In 0,1 M PBS
Transportpuffer für Schweineaugen	40 % DMEM 40 % RPMI 1640 10 % HEPES (250 mM) 10 % Anti-anti
Tris-EDTA-Puffer pH 9,0	0,605 g Tris 0,185 g EDTA Ad 500 ml ddH ₂ O pH-Wert auf 9,0 einstellen 250 µl Tween 20 hinzufügen

2.1.6 Adeno-assoziierte Viren

Die verwendeten AAVs basieren alle auf einem AAV Serotyp 2 und unterscheiden sich in ihren Capsiden, sowie den verwendeten Promotoren. Alle verwendeten AAVs codieren für das grün fluoreszierende Protein eGFP.

Tabelle 6: Verwendete AAVs in alphabetischer Reihenfolge unter Nennung des Titers und der Herkunft.

AAV	Titer (vg/ml)	Herkunft
AAV 2.1_sc-CMV_eGFP 7m8	$1,12 \times 10^{14}$	Bereitgestellt von Prof. Stylianos Michalakis, AG Genterapie von Augenerkrankungen, LMU München
AAV 2.1_sc-CMV_eGFP GL	$1,21 \times 10^{14}$	
AAV 2.1_sc-CMV_eGFP NN	$3,59 \times 10^{13}$	
AAV 2.1_sc-CMV_eGFP wt	$9,89 \times 10^{12}$	

2.1.7 Primärantikörper

Tabelle 7: Verwendete Primärantikörper in alphabetischer Reihenfolge unter Nennung von Wirtsspezies, Verdünnungsstufe und Hersteller.

Antikörper	Wirt	Verdünnung	Hersteller
Calbindin	Kaninchen	1:1000	<i>Swant</i> , Burgdorf, Schweiz
GFAP	Kaninchen	1:1000	<i>Merck</i> , Darmstadt
GFP	Kaninchen	1:500	<i>Molecular Probes</i> , Eugene, Oregon, USA
Glutamin Synthetase	Maus	1:2500	<i>BD Transduction</i> , Franklin Lakes, New Jersey, USA
Lectin PNA Conjugate Alexa Fluor 488	-	1:300	<i>Molecular Probes</i> , Eugene, Oregon, USA
PKC α	Maus	1:300	<i>Sigma Aldrich</i> , Saint Louis, Missouri, USA
Rhodopsin	Maus	1:500	<i>Millipore</i> , Temecula, California, USA
S-Opsin	Ziege	1:600	<i>Santa Cruz Biotechnology</i> , Dallas, Texas, USA

2.1.8 Sekundärantikörper

Tabelle 8: Verwendete Sekundärantikörper in alphabetischer Reihenfolge unter Nennung von Wirtsspezies, Reaktivität, Verdünnungsstufe und Hersteller.

Antikörper	Wirt	Reaktivität	Verdünnung	Hersteller
Alexa Fluor 488	Esel	Kaninchen	1:500	<i>Thermo Fisher GmbH</i> , Dreieich
Alexa Fluor 594	Esel	Maus	1:500	<i>Thermo Fisher GmbH</i> , Dreieich
Alexa Fluor 594	Esel	Kaninchen	1:500	<i>Thermo Fisher GmbH</i> , Dreieich
Alexa Fluor 647	Esel	Maus	1:500	<i>Thermo Fisher GmbH</i> , Dreieich
Cy3	Esel	Ziege	1:500	<i>Thermo Fisher GmbH</i> , Dreieich

2.1.9 Software

Tabelle 9: Verwendete Software in alphabetischer Reihenfolge unter Nennung des Herstellers.

Software	Hersteller
Adobe Photoshop CS 3 Extended	<i>Adobe Inc.</i> , San José, California, USA
Affinity Designer Version 1.10.5.1342	<i>Serif</i> , Nottingham, UK
Affinity Photo Version 1.10.5.1342	<i>Serif</i> , Nottingham, UK

2. Material und Methoden

Affinity Publisher Version 1.10.5.1342	<i>Serif, Nottingham, UK</i>
Citavi Version 6.14	<i>Swiss Academic Software, Wädenswil, Schweiz</i>
Fluoview FV10-ASW Version 4.1	<i>Olympus, Hamburg</i>
ImageJ Fiji Version 2.9.0	Open Source unter GNU General Public Licence (<i>Schindelin et al. 2012</i>)
Microsoft Excel	<i>Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA</i>
Microsoft PowerPoint	<i>Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA</i>
Microsoft Word	<i>Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA</i>
SigmaPlot Version 12	<i>Systat, Erkrath</i>

2.2 Methoden

2.2.1 Organotypische Retinakultur

Die Herstellung von murinen organotypischen Retinakulturen stellt eine etablierte Methode im Labor für Experimentelle Ophthalmologie in Gießen dar (Müller et al. 2017; Müller 2019). In Anlehnung an dieses Protokoll wurde die porcine Retinakultur etabliert.

Für die porcine organotypische Retinakultur wurden Augen von adulten Schweinen von einem lokalen Metzger direkt nach der Schlachtung bezogen. Die noch warmen, also ganz frisch entnommenen, Augen wurden umgehend in eine Flasche mit Transportpuffer auf Eis gegeben und so zum Labor transportiert. Die Flasche mit den gerade nicht verwendeten Augen wurde auch während der gesamten Präparationszeit auf Eis belassen, um sicherzustellen, dass sich der Glaskörper gut von der Retina löst. Nach der Schlachtung der Tiere sollte die Präparation der Augen möglichst schnell abgeschlossen werden, um einen guten Gewebeerhalt gewährleisten zu können.

Die Präparation der organotypischen Kulturen wurde an der Sterilbank in Petrischalen durchgeführt. Zunächst wurde das Auge so gut wie möglich von umliegendem Gewebe befreit und wenige Sekunden in ein Becherglas mit siebzigprozentigem Ethanol getaucht. Danach folgte ein Abspülen mit ddH₂O. Das Auge wurde hinter der *Ora serrata* mit einem spitzen Skalpell (Nr. 11) eröffnet und entlang dieser gedachten Linie rundherum mit einer Schere aufgeschnitten, so dass der komplette vordere Augenteil inklusive Glaskörper entfernt werden konnte. Sollte sich der Glaskörper nicht ohne weiteres von der Retina gelöst haben, dann wurde mit rollenden Bewegungen mit einem Wattestäbchen nachgeholfen. Der Augenbecher wurde anschließend in steriles 0,1 M PBS getaucht. Um eine vergleichbare Qualität der Kulturen sicherzustellen, wurden pro Auge drei bis vier Stücke der Retina entnommen, die der zentralen Region, also des *Visual Streaks*, entsprangen. Dazu wurde zuerst die Peripherie dorsal und ventral des *Visual Streaks* mit einem großen Skalpell (Nr. 21) entfernt, bevor die nasale und laterale Peripherie ebenfalls abgetrennt wurden. Aus diesem etwa fünf Millimeter hohen Streifen wurden schließlich drei bis vier Stücke ausgeschnitten, die in etwa eine Kantenlänge von drei bis vier Millimetern hatten.

Um die Retina auf die Membran des Zellkultureinsatzes zu positionieren, wurde ein Tropfen supplementiertes Neurobasal-A Medium (Raumtemperatur) in die Petrischale gegeben, das Gewebestück dort platziert und die Retina mithilfe eines Raspatoriums

vorsichtig von den darunterliegenden Schichten abgehoben. So konnte die Retina mit der Photorezeptor-Schicht auf einen Tropfen Kulturmedium überführt werden, der zuvor auf der Membran des Zellkulturinserts platziert wurde. Überschüssiges Medium wurde dann, ohne das Gewebe zu berühren, vorsichtig wieder abgesaugt, damit die Retina flach auf der Membran auflag. Der Zwischenraum unter dem Membraneinsatz wurde zuletzt mit Kulturmedium befüllt (1200 μ l), so dass der Flüssigkeitsspiegel die Unterseite der Membran berührte, und die Kultivierung erfolgte für unterschiedlich lange Zeit bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator. Das Kulturmedium wurde alle zwei Tage durch frisches ersetzt, welches zuvor auf Raumtemperatur gebracht wurde.

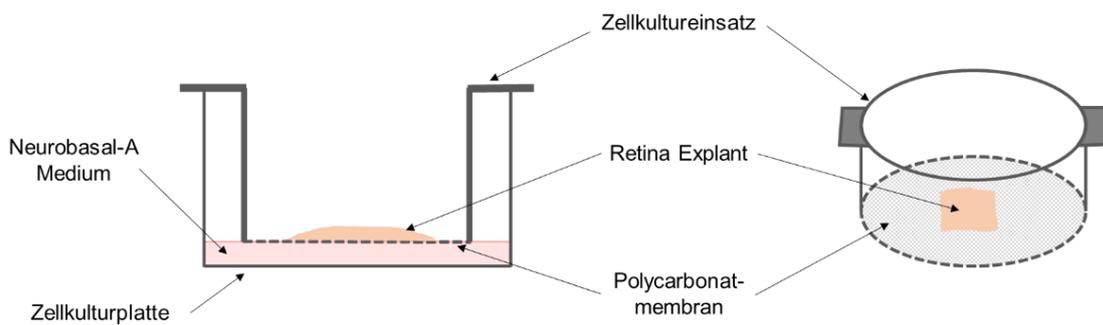


Abbildung 6: Schematische Darstellung der organotypischen Retinakultur.

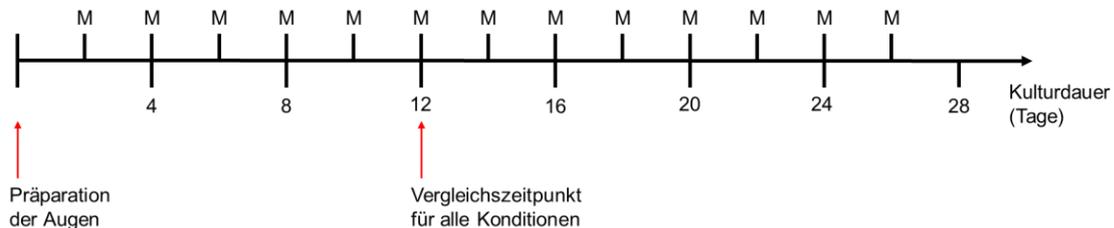


Abbildung 7: Zeitlicher Ablauf der Retinakultur.

Um die optimalen Kulturbedingungen herauszufinden, wurden verschiedene Kulturmedien (siehe Abschnitt 2.1.4) auf ihren Einfluss auf die Gewebeerhaltung getestet. Die Gewebeerhaltung wurde zunächst für alle Medien nach zwölf Tagen Kulturdauer beurteilt, die besten Bedingungen wurden später auch bei längerer Kulturdauer untersucht. Des Weiteren wurde getestet, ob es einen Einfluss hat, wenn die Retina mit der Ganglienzell-Schicht nach unten auf der Membran kultiviert wird. Dafür wurde die *Tweezers*-Methode verwendet, die von Schnichels *et al.* beschrieben wurde (Schnichels *et al.* 2019).

2.2.2 Behandlung mit AAVs

Um einen Ausblick darauf zu erhalten, ob zukünftig ein Test von möglichen gentherapeutischen Ansätzen in organotypischen Retinakulturen durchgeführt werden kann, wurden in dieser Arbeit verschiedene adeno-assoziierte Viren (AAV) hinsichtlich ihrer Transduktionsfähigkeit getestet. Die verwendeten AAV codieren alle für das grün fluoreszierende Protein eGFP und daher konnte bei erfolgreicher Transduktion ein grünes Fluoreszenzsignal detektiert werden (Pavlou et al. 2021).

Für die Vergleichbarkeit der Ansätze wurden jeweils 5×10^{10} vg pro Explantat appliziert. Da die verwendeten AAVs für intravitreale Injektion vorgesehen sind, wurden sie mit Hilfe einer Mikropipette auf die Ganglienzellseite der Explantate gegeben (supraretinal). Durch die Oberflächenspannung verblieb der Tropfen auf der Oberfläche der Retina.

2.2.3 Aufarbeitung von Gewebe

Nach Ende der gewünschten Kulturdauer erfolgte eine Fixierung des Gewebes und die Vorbereitungen für das Anfertigen von Gefrierschnitten. Um die Fixierung mit Paraformaldehydlösung (vier Prozent in 0,1 M PBS) vornehmen zu können, wurden die Zellkultureinsätze mit den Retinapräparaten unter der Sterilbank aus der Kulturplatte gehoben und in eine Petrischale überführt. Hier wurde die Membran des Zellkultureinsatzes um die Retina herum mittels eines Skalpells ausgeschnitten und Membran und Retina gemeinsam mit einer Pinzette in eine *6-Well*-Platte überführt, in die zuvor pro Vertiefung jeweils zwei Milliliter Paraformaldehydlösung pipettiert wurde. Dabei war besonders darauf zu achten, dass die Retina selber nicht mit der Pinzette berührt wurde. Um eine ausreichende Fixierung zu erhalten, wurden die Präparate auch von oben mit Paraformaldehydlösung beträufelt und anschließend 45 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Orbitalschüttler inkubiert.

Zum Auswaschen des Fixativs wurde ebendieses aus der Kulturplatte entfernt und durch 0,1 M PBS ersetzt und für zwanzig Minuten auf dem Orbitalschüttler inkubiert. Dieser Waschschrift wurde insgesamt drei Mal durchgeführt. Anschließend erfolgte das Durchlaufen der aufsteigenden Sucrose-Reihe, um die Präparate vor Gefrierbrand zu schützen. Dazu wurden diese zuerst jeweils zwei Stunden in zehn- und zwanzigprozentiger Sucroselösung inkubiert und dann über Nacht bei vier Grad im Kühlschrank in dreißigprozentiger Sucroselösung belassen. Am nächsten Tag wurde die Hälfte der Sucroselösung durch Einfriermedium ersetzt und die Präparate wiederum für

zwei Stunden auf dem Orbitalschüttler inkubiert. Um die Retinapräparate abschließend für Gefrierschnitte vorzubereiten, wurden diese in mit Einfriermedium gefüllte Cryomolds überführt, mittig in diesen ausgerichtet und schließlich auf einem Metallblöckchen umgeben von flüssigem Stickstoff eingefroren. Eingepackt in Parafilm und anschließend Alufolie konnten die Blöckchen so bei -20 °C aufbewahrt werden.

Im Falle, dass sich die Retina während eines Schrittes von der Membran gelöst hat, wurde diese ab diesem Zeitpunkt nicht mehr weiter mit der Pinzette sondern vorsichtig mit einem Raspatorium bewegt.

2.2.4 Anfertigung von Gefrierschnitten

Zur Anfertigung von Gefrierschnitten wurde das jeweilige Blöckchen auf einen Objektträger aufgeblickt. Die Schnittdicke wurde auf 14 µm eingestellt und die Kammertemperatur des Gefriermikrotoms betrug zwischen -16 und -18 °C. Bei schwierigen Präparaten wurde zusätzlich die Objektkühlung verwendet. Die Schnitte wurden zuerst auf einfache Glas-Objektträger aufgezogen bis durch Sichtkontrollen unter dem Mikroskop sichergestellt werden konnte, dass die Retina ausreichend angeschnitten wurde. Anschließend wurden SuperFrost Plus Objektträger verwendet und jeweils fünf Schnitte aufgezogen. Zur Aufbewahrung wurden die Objektträger bei -20 °C in Objektträgerkästen gelagert.

2.2.5 Einbetten des gesamten Präparats als *Wholemout*

Um die Explantate zu analysieren, die mit AAVs behandelt wurden, wurden diese nicht für Gefrierschnitte aufgearbeitet, sondern als Ganzes auf einem Objektträger platziert und eingedeckt. Falls die Behandlung erfolgreich war, kann auch so eine Fluoreszenz beobachtet werden und die Präparate bei Bedarf anschließend trotzdem noch am Kryostaten geschnitten werden.

Hierfür wurde das entsprechende Explantat wie gewohnt möglichst auf der Membran belassen und in 4 % Paraformaldehyd fixiert. Anschließend wurde das Präparat inklusive Membran auf einen SuperFrost Plus Objektträger überführt, auf dem sich ein Tropfen *Fluorescence Mounting Medium* befand. Das Präparat wurde nochmal mit Eindeckmedium bedeckt und mit einem Deckglas eingedeckt. Nach einer Trocknungszeit von mindestens 18 Stunden konnte das Präparat mikroskopiert werden.

Um das Eindeckmedium wieder zu lösen, wenn im Anschluss Gefrierschnitte angefertigt wurden, wurde der gesamte Objektträger mit Deckglas in eine mit 1x PBS gefüllte

Petrischale gelegt und so lange auf dem Orbitalschüttler inkubiert, bis sich das Deckglas wieder löste. Im Anschluss wurde das Präparat wie gewohnt für Gefrierschnitte aufbereitet.

2.2.6 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Als Übersichtsfärbung für die Beurteilung der Gewebeerhaltung wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung an Gefrierschnitten durchgeführt. Eine Färbung durch Hämatoxylin zeigt sich dunkelblau-lila und lagert sich an negativ geladene Nukleinsäuren (DNA) an und ist deshalb eine spezifische Kernfärbung. Eosin in leicht saurer Lösung eignet sich für die Cytoplasmafärbung und färbt positiv geladene Proteine sowie Kollagen (Mulisch und Welsch 2015).

Ausgesuchte Objektträger mit Gefrierschnitten guter Qualität wurden zuerst etwa eine Stunde bei Raumtemperatur zum Antrocknen liegen gelassen. Danach wurden sie in eine entsprechende Glasküvette überführt und zwei Mal für fünf Minuten in 0,1 M PBS gewaschen. Anschließend folgten zwei ebenfalls fünfminütige Waschschrte mit ddH₂O. Die Färbung mit Hämatoxylinlösung nach Gill II erfolgte in einer Färbeküvette für 25-30 Sekunden. Zum Bläuen wurden die Schnitte unter fließendem, handwarmen Leitungswasser für zehn Minuten gespült. Nach einem kurzen Spülen mit ddH₂O folgte die Färbung in leicht saurer, wässriger Eosin-G Lösung (0,5 %) in einer Färbeküvette für 10-15 Sekunden. Einem erneuten Spülen in ddH₂O folgte eine aufsteigende Alkoholreihe, um die Schnitte zu entwässern. Für jeweils zwei bis drei Minuten wurden die Objektträger zweimal in siebzigprozentigem, einmal in achtzigprozentigem, einmal in neunzigprozentigem, einmal in sechsundneunzigprozentigem und zweimal in absolutem Ethanol gespült. Zum Klären wurden die Schnitte dann zweimal fünf Minuten mit Xylol gespült. Abschließend erfolgte das Eindecken mit Roti-Histokitt II. Nach dem Aushärten für wenige Tage konnten die Schnitte schließlich unter einem Mikroskop beurteilt werden.

2.2.7 Immunfluoreszenzfärbungen

Für die Markierung unterschiedlicher Proteine, die ausschlaggebend für den Gewebeerhalt der Retina sind, wurde hauptsächlich die Methode der indirekten Immunfluoreszenz angewendet. Zusätzlich wurde immer eine Kernfärbung mit DAPI durchgeführt, um die Zellkerne zu markieren.

Bei der indirekten Immunfluoreszenzfärbung werden zunächst Primärantikörper verwendet, die spezifisch an das Zielantigen binden. Diese Primärantikörper werden dann wiederum mikroskopisch sichtbar gemacht, indem ein mit einem Fluorochrom gekoppelter Sekundärantikörper eingesetzt wird, der an den Primärantikörper bindet. Durch die indirekte Immunfluoreszenz kommt es außerdem zu einer Signalverstärkung gegenüber der direkten Methode, bei der direkt ein markierter Primärantikörper zum Einsatz kommt.

Zur Vorbereitung auf die Immunfluoreszenzfärbung wurden die entsprechenden Objektträger mit Schnitten mindestens dreißig Minuten liegend bei Raumtemperatur angetrocknet, um einen besseren Halt sicherzustellen. Anschließend wurden die Objektträger in eine Glasküvette überführt und dreimal 15 Minuten in 0,1 M PBS auf dem Orbitalschüttler gewaschen. Anschließend wurden die Objektträger in eine feuchte Kammer gelegt und mit je 150 µl Präinkubationslösung beträufelt, um unspezifische Bindungen zu minimieren. Die Präinkubationslösung wurde für 45-60 Minuten auf den Schnitten belassen. Danach wurde die Präinkubationslösung durch Schräghalten ablaufen lassen und die Objektträger nochmals kurz in PBS gewaschen, anschließend durch ein Abtupfen mit Papiertüchern um die Schnitte herum leicht getrocknet und wieder in die feuchte Kammer gelegt. Die zu verwendenden Primärantikörper wurden entsprechend Tabelle 7 in Antikörpermedium verdünnt und 110 µl dieser Lösung wird auf die Objektträger gegeben. Um ein Verdunsten der Antikörperlösung zu vermeiden, wurden Parafilmstreifen auf die Schnitte mit der Lösung gegeben. Die Primärantikörperinkubation erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Am folgenden Tag wurden die Parafilmstreifen mit etwas PBS freigeschwemmt und mithilfe einer Pinzette nach oben abgehoben. Es folgte erneut ein dreimaliges Waschen in PBS auf dem Schüttler. Währenddessen wurden die Sekundärantikörper und DAPI in Antikörpermedium verdünnt und für fünf Minuten bei 13.000 x g abzentrifugiert. Bei der Herstellung der Sekundärantikörperlösung sowie allen folgenden Schritten wurde darauf geachtet, möglichst unter Ausschluss von Licht zu arbeiten, um ein Verbleichen der Fluorochrome zu vermeiden. Die Objektträger wurden wieder wie zuvor beschrieben trockengetupft und in die feuchte Kammer gelegt, wo sie mit 110 µl Sekundärantikörperlösung beträufelt wurden. Hierbei war darauf zu achten, nur den Überstand der zuvor zentrifugierten Lösung zu verwenden, um fluoreszierende Präzipitate auf den Objektträgern zu vermeiden. Mit Parafilm abgedeckt wurden die

Schnitte etwa zwei Stunden mit der Sekundärantikörperlösung inkubiert. Nach weiteren drei Waschschrritten in PBS konnten die Objektträger mit Deckgläsern und Fluorescence Mounting Medium eingedeckt werden. Ausgehärtet und gelagert wurden die Objektträger in Mappen im Kühlschrank.

Als Negativkontrollen wurde jeweils ein Objektträger des selben Präparats nur mit dem jeweiligen Sekundärantikörper und DAPI gefärbt. Als Referenz wurde frische Schweineretina gefärbt, die direkt nach der Präparation der Augen fixiert und eingefroren wurde.

2.2.8 Antigendemaskierung

Eine Antigendemaskierung wurde durchgeführt, wenn eine bisher nicht an Schweineretina etablierte Immunfluoreszenzfärbung nicht die erwarteten Ergebnisse zeigte. Durch Einbettung und Fixierung können manche Antigene so in ihrer Konformation verändert worden sein, dass sie nicht mehr von den entsprechenden Antikörpern erkannt werden können. Durch hitzeinduzierte Antigendemaskierung kann die Affinität der Antikörper zu diesen Antigenen wieder hergestellt werden. Für jedes Antigen ist ein unterschiedlicher pH-Wert des eingesetzten Puffers besser oder schlechter geeignet, daher sollten immer mehrere Puffer getestet werden.

Um eine Antigendemaskierung durchzuführen, wurden die Schnitte wie gewohnt dreißig Minuten antrocknen gelassen und dann einmal für zehn Minuten in 0,1 M PBS in einer Hellendahl Küvette gewaschen. Anschließend folgten zwei Waschschrritte im jeweiligen Antigendemaskierungspuffer (Natriumcitrat-Puffer mit pH 6 oder Tris-EDTA-Puffer mit pH 9) für fünf Minuten. Die Waschschrritte erfolgten wie üblich auf dem Orbitalschüttler. Für die Hitzebehandlung wurden die mit Puffer gefüllten Küvetten inklusive der Objektträger so lange in der Mikrowelle erhitzt, bis der Puffer eine Temperatur von 80 °C aufwies. Dabei wurde immer ein Hitzepuls von 15 Sekunden verwendet, auf den eine Pause von 45 Sekunden folgte. Nach dem Abkühlen auf etwa 40 °C wurden die Schnitte nochmals zehn Minuten in 0,1 M PBS gewaschen, bevor mit dem Immunfluoreszenz-Protokoll fortgefahren wurde.

2.2.9 Mikroskopie

2.2.9.1 Mikroskopie von Hämatoxylin-Eosin-Färbungen

Die mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitte wurden am Mikroskop Biozero des Herstellers Keyence durch Hellfeldmikroskopie betrachtet. Es wurden das 4x sowie das

20x Objektiv verwendet und Stapelaufnahmen bestehend aus jeweils acht bis zwölf Bildern angefertigt.

2.2.9.2 *Mikroskopie von Immunfluoreszenzfärbungen*

Die mit Immunfluoreszenz gefärbten Schnitte wurden am Konfokalen Laser Scanning Mikroskop Olympus Fluoview FV10i betrachtet. Hier wurden das 10x für Übersichtsaufnahmen sowie das 60x Objektiv für Detailaufnahmen verwendet. Für die Detailaufnahmen wurde der Abstand zwischen den einzelnen Z-Ebenen auf 0,7 μm eingestellt und jeweils Stapelaufnahmen mit 15-25 Ebenen aufgenommen. Die Laser wurden jeweils so eingestellt, dass eine Überbelichtung vermieden wurde. Für die korrespondierenden Negativkontrollen wurden die Lasereinstellungen entsprechend übernommen.

2.2.10 **Beurteilung der Gewebeerhaltung**

Um die Gewebeerhaltung nach den unterschiedlichen Kulturzeiträumen beurteilen und vergleichen zu können, wurde eine Gewebequalitätspunktzahl eingesetzt, die sich aus der Analyse verschiedener Zelltypen sowie der Zellkerne zusammensetzt, für die es robuste Ergebnisse bei immunhistochemischen Färbungen gab. Diese Gewebequalitätspunktzahl wurde eigens für diese Arbeit entwickelt und an die Beurteilung von porcinen Retina-Explantaten angepasst. Die Kriterien zur Einordnung sind im Ergebnisteil in Tabelle 9 dargestellt, wobei die höchste Punktzahl zwei beträgt und an frischer Retina festgemacht wurde. Die Betrachtung und Analyse erfolgte an Einzelbildern der jeweiligen Immunfluoreszenzfärbungen. Pro Zeitpunkt bzw. Mediumzusammensetzung wurden für die Vergleiche jeweils mindestens drei Explantate angefertigt. Von jedem dieser Explantate wurden zwei Aufnahmen unterschiedlicher Schnitte angefertigt, die nach den Färbungen dann angeschaut und kategorisiert wurden.

Die Messung von Gesamt- und ONL-Dicke wurde an den selben Aufnahmen durchgeführt, wie die oben genannten Analyse. Hierfür wurden die Aufnahmen gedanklich gedrittelt und in diesen Abschnitten jeweils eine Messung der gesamten Retina sowie der ONL mit Fiji vorgenommen. Falls die gesamte Retina nicht auf ein Bild gepasst hat, wurde zuvor ein Zusammenschluss von zwei separat aufgenommenen, überlappend liegenden Abschnitten hergestellt. Für ein solches *photomerge* wurde das Plugin „Stitching“ in Fiji verwendet (Preibisch et al. 2009).

2.2.11 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit SigmaPlot durchgeführt. Die Gewebequalitätspunktzahlen der jeweiligen Kategorien wurden mithilfe eines One Way ANOVA (Student-Newman-Keuls oder Holm-Sidak Methode) auf ihre Signifikanz getestet. Die dazugehörigen Diagramme wurden ebenfalls mit SigmaPlot erstellt.

2.2.12 Bildbearbeitung

Nach der Analyse an unbearbeiteten Aufnahmen, erfolgte eine Bildbearbeitung einzelner Bilder, um die Ergebnisse besser veranschaulichen zu können. Hierfür wurde zunächst im Mikroskop eigenen Programm FV10-ASW 4.2 Viewer die Anzahl der Z-Ebenen auf so wenige wie nötig verringert und Projektionen hergestellt. Anschließend wurden sowohl Adobe Photoshop als auch Affinity Photo verwendet, die über in etwa den gleichen Funktionsumfang verfügen. Alle Aufnahmen wurden nach dem gleichen Schema bearbeitet. Es wurde eine Tonwertkorrektur durchgeführt. Zur besseren Sichtbarkeit wurde meistens nur eine Immunfluoreszenzfärbung zusammen mit DAPI dargestellt und der andere Kanal bei Doppelfärbungen ausgeblendet.

3. Ergebnisse

Zu Beginn der Arbeit wurden Erfahrungen und Literaturbeispiele zusammengetragen und die Versuche zur Retinakultur danach ausgerichtet. Die Kulturbedingungen wurden danach immer wieder optimiert. Für die Charakterisierung der verschiedenen Zelltypen ergab sich die Notwendigkeit einer Quantifizierungsmöglichkeit, welche mit der Gewebequalitätspunktzahl geschaffen wurde. Nachdem die idealen Bedingungen festgelegt werden konnten, wurden Versuche zur Langzeitkultur und möglicher AAV-Transduktion der Explantate gemacht.

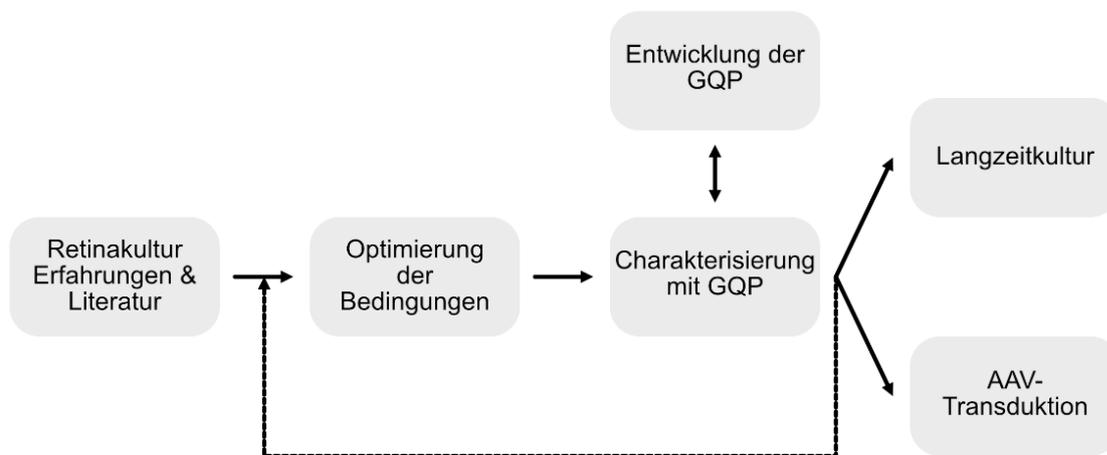


Abbildung 8: Übersicht über den Arbeitsablauf.
GQP = Gewebequalitätspunktzahl.

3.1 Gewebequalitätspunktzahl

Bei der Betrachtung der Immunfluoreszenzfärbungen stellte sich die Frage nach einer sinnvollen Quantifizierung der Ergebnisse, um eine bessere Vergleichbarkeit zu schaffen. Hierfür wurde die Gewebequalitätspunktzahl entwickelt, mit der die erstellten Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbungen an porcinen Retina-Explantaten hinsichtlich ihrer Gewebeerhaltung charakterisiert werden können.

Als besonders robuste Marker für die porcine Netzhautkultur wurden PKC α für die Stäbchenbipolarzellen, DAPI für die Zellkerne und deren normale Verteilung in der Retina, sowie PNA und S-Opsin für die Zapfen-Photorezeptoren identifiziert. Anhand der sich während der Degeneration verändernden Merkmale wurde schließlich die untenstehende Tabelle ausgearbeitet, mithilfe welcher allen Explantaten eine Gewebequalitätspunktzahl zugeordnet werden kann.

Tabelle 10: Kriterien zur Ermittlung der Gewebequalitätspunktzahl.
Skala von 0 (am schlechtesten) bis 2 (am besten).

	0	1	2
Stäbchen-bipolarzellen	Keine oder kaum vorhanden	Axon liegt nur in Fragmenten vor	Axon ist lang und durchgehend
Zellkerne	Keine oder stark pyknotisch	Nicht vollständig rund, > 20 % sind pyknotisch	Keine Pyknose, runde Form
Photorezeptor-Innensegmente	Keine	In > 50 % des Bildes zu sehen	Dicht gepackt
Photorezeptor-Außensegmente	Keine	An > 50 % des Innensegmente	An (fast) jedem Innensegment

3.2 Unterschiede bei Vorbereitungen und Präparation

Die Augen von adulten Schweinen wurden direkt nach der Schlachtung vom lokalen Metzger bezogen. Im Normalfall werden die Schweine dort vor der Verarbeitung durch unterschiedliche Methoden dekontaminiert. Dabei kommt das Abflämmen der gesamten Oberfläche oder eine Dampfkammer zum Einsatz. In beiden Fällen waren negative Auswirkungen auf die Augen unmittelbar bei der Präparation sichtbar. Es fiel auf, dass die allgemeine Erhaltung der Augen nicht ausreichend für eine weitere Verarbeitung für Retinakulturen war. Die Augen waren zum Teil nicht mehr prall und fest, die Cornea trüb und der Glaskörper ließ sich nur sehr schwer von der Retina lösen, ohne diese zu beschädigen. Als Lösung wurden die Schweine ab der Feststellung dieses Problems zuerst dekapitiert, bevor der Rest des Körpers dekontaminiert und weiter verarbeitet wird. Die E nukleation der Augen erfolgte möglichst schnell nach Tötung durch den Metzger selber und anschließend wurden die Augen von umliegendem Gewebe befreit und in eiskalten Transportpuffer gelegt. Dass die Augen umgehend und dauerhaft eisgekühlt aufbewahrt wurden, war ebenfalls ausschlaggebend dafür, den Glaskörper problemlos von der Retina lösen zu können. Zudem war es wichtig für die Gewebeerhaltung, alle Schritte bis zur fertigen Retinakultur so schnell wie möglich durchzuführen. Für diese Arbeit lagen Schlachtung und fertige Kultur zumeist weniger als drei Stunden auseinander.

3.3 Verschiedene Mediumzusammensetzungen

Für die Kultivierung der Retina Explantate wurde zu Beginn ein Medium verwendet, das zuvor in der AG für Experimentelle Ophthalmologie gute Ergebnisse gezeigt hat (Christin Loyal, unveröffentlichte Daten). Nach einigen Vorversuchen zeigte sich, dass mit diesem

Medium jedoch keine ausreichende Gewebeerhaltung sichergestellt werden konnte. Für die Suche nach einer geeigneten Zusammensetzung wurden verschiedene Supplemente zu Neurobasal-A Medium hinzugegeben und deren Einfluss analysiert. Zudem wurden zwei Glucose-Konzentrationen getestet. Die Zusammensetzung der verschiedenen Kulturmedien wird in Tabelle 9 gezeigt. Als Vergleichszeitpunkt wurden zwölf Tage betrachtet.

Tabelle 9: Übersicht über die sich unterscheidenden Bestandteile der verschiedenen Medien für die organotypische Retinakultur. Jedes Medium enthielt zusätzlich L-Glutamin sowie Anti-anti.

Name des Mediums	Glucose (mg/dl)	FKS	B-27 mit Insulin	B-27 ohne Insulin	N-2
+ - 100	100	x		x	
++ 100	100	x	x		
+ - 450	450	x		x	
++ 450	450	x	x		
-- 100	100			x	
-+ 100	100		x		
-- 450	450			x	
-+ 450	450		x		
-+ 100 N-2	100		x		x

Für die Beurteilung der Gewebeerhaltung wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit Antikörpern gegen Proteinkinase C alpha (PKC α), saures Gliafaserprotein (GFAP), Rhodopsin, *short-wave sensitive Opsin* (S-Opisin) sowie dem Marker Erdnuss Agglutinin (PNA) verwendet. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt.

3.3.1 Beurteilung der Gewebeerhaltung

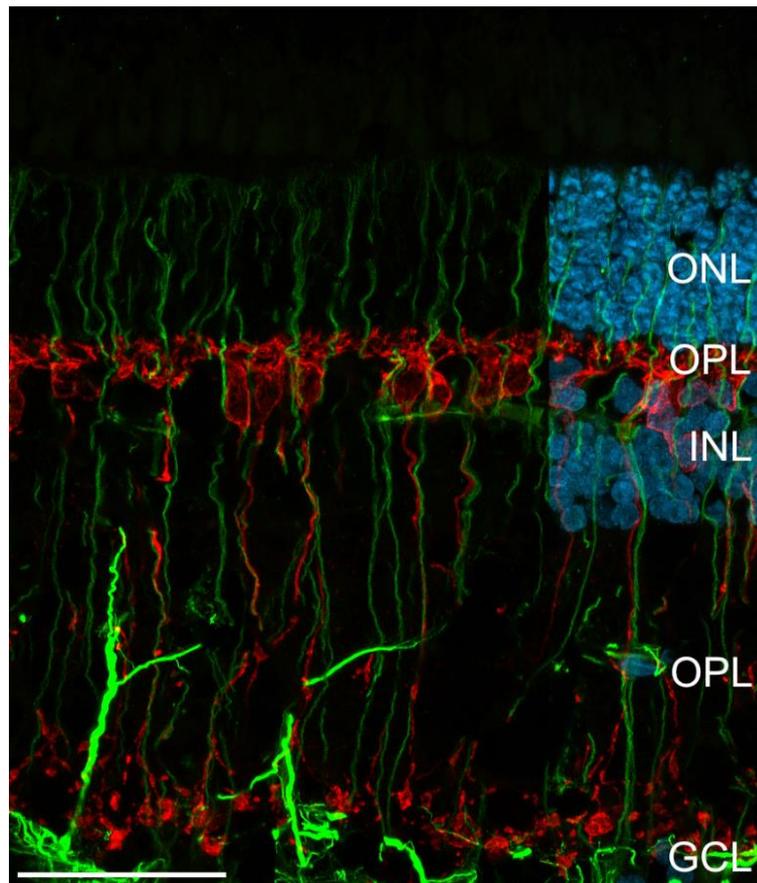


Abbildung 9: Expression des Stäbchen-Bipolarzellen-Markers Proteinkinase C alpha (PKC α) und des Gliafaser-Markers saures Gliafaserprotein (GFAP) in frisch fixierter porciner Retina.

Die PKC α -Färbung wird in Rot dargestellt, die GFAP-Färbung in Grün und die DAPI-Kernfärbung in Blau (anteilig gezeigt). Der Maßstab entspricht 50 μ m. ONL = äußere Körnerschicht, OPL = äußere plexiforme Schicht, INL = innere Körnerschicht, IPL = innere plexiforme Schicht, GCL = Ganglienzellschicht.

In Abbildung 9 wird ein Gefrierschnitt der frisch entnommenen Schweineretina gezeigt, an dem eine immunhistochemische Färbung mit den etablierten Markern PKC α und GFAP sowie ein DAPI-Kernfärbung durchgeführt wurde. Die physiologische Morphologie der Stäbchen-Bipolarzellen zeigt lange, durchgehende Axone, die von der INL bis Richtung GCL ziehen und dort endständige Verzweigungen aufweisen. Die Perikaryen der Stäbchen-Bipolarzellen sind im äußeren Teil der INL zu finden. GFAP wird hauptsächlich in Astrozyten exprimiert, deren Zellkörper in der Ganglienzellschicht liegen. Auch eine Expression in Müllerzellen ist zu sehen. Die Zellkerne liegen dicht gepackt in ONL und INL vor und zeigen keine Anzeichen von Pyknose.

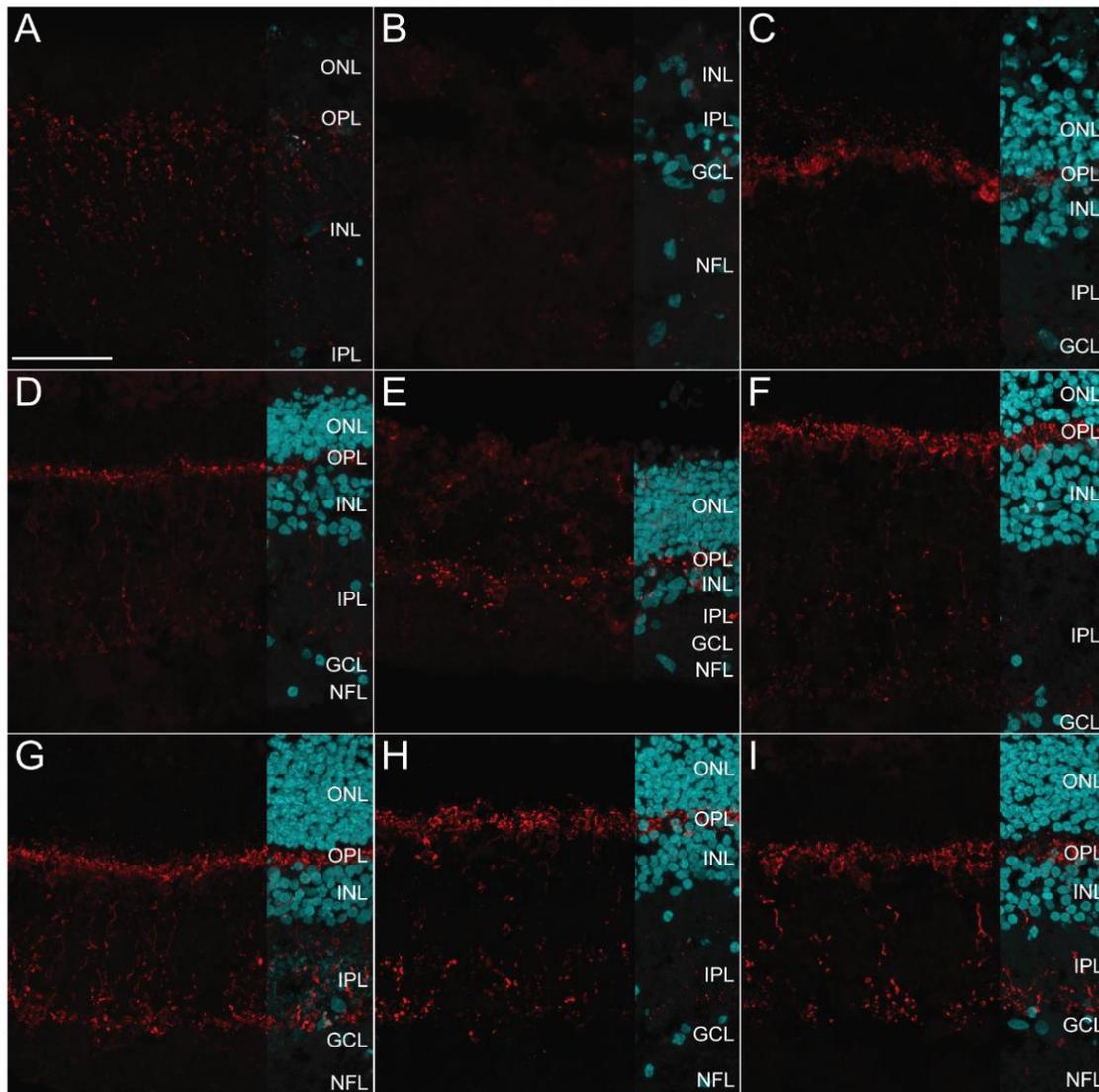


Abbildung 10: Expression des Stäbchen-Bipolarzellen-Markers Proteinkinase C alpha (PKC α) in Retina Explantaten nach zwölf Tagen Kultur mit unterschiedlichen Medien.

Die PKC α -Färbung wird in Rot dargestellt, die DAPI-Kernfärbung in Türkis (anteilig gezeigt). Der Maßstab in A entspricht 50 μ m und gilt für A-I. A: Medium +-100, B: Medium ++450, C: Medium +-450, D: Medium ++100, E: Medium --450, F: Medium --+450, G: Medium --100, H: Medium --+100, I: Medium --+100 N-2. ONL = äußere Körnerschicht, OPL = äußere plexiforme Schicht, INL = innere Körnerschicht, IPL = innere plexiforme Schicht, GCL = Ganglienzellschicht, NFL = Nervenfaserschicht.

PKC α als immunhistochemischer Marker zeigt die Stäbchen-Bipolarzellen der Wirbeltierretina. In Abbildung 10 wird die Immunfärbung mit PKC α mit der DAPI-Kernfärbung kombiniert und zum Vergleich der verschiedenen Kulturmedien Retina Explantate nach zwölf Tagen Kulturdauer gezeigt. In D sowie F-I sind klar auszumachende PKC α -markierte Stäbchen-Bipolarzellen zu sehen. Durchgehende Axone sieht man hierbei jedoch nur in D, F und I. Die Perikaryen der Zellen können nur in I nach Kultur mit dem Medium --+100 N-2 deutlich ausgemacht werden. A-C sowie E

zeigen keine klar auszumachenden Stäbchen-Bipolarzellen, sondern lediglich Fragmente solcher. In A und B ist zudem keine Schichtung der Retina mehr sichtbar.

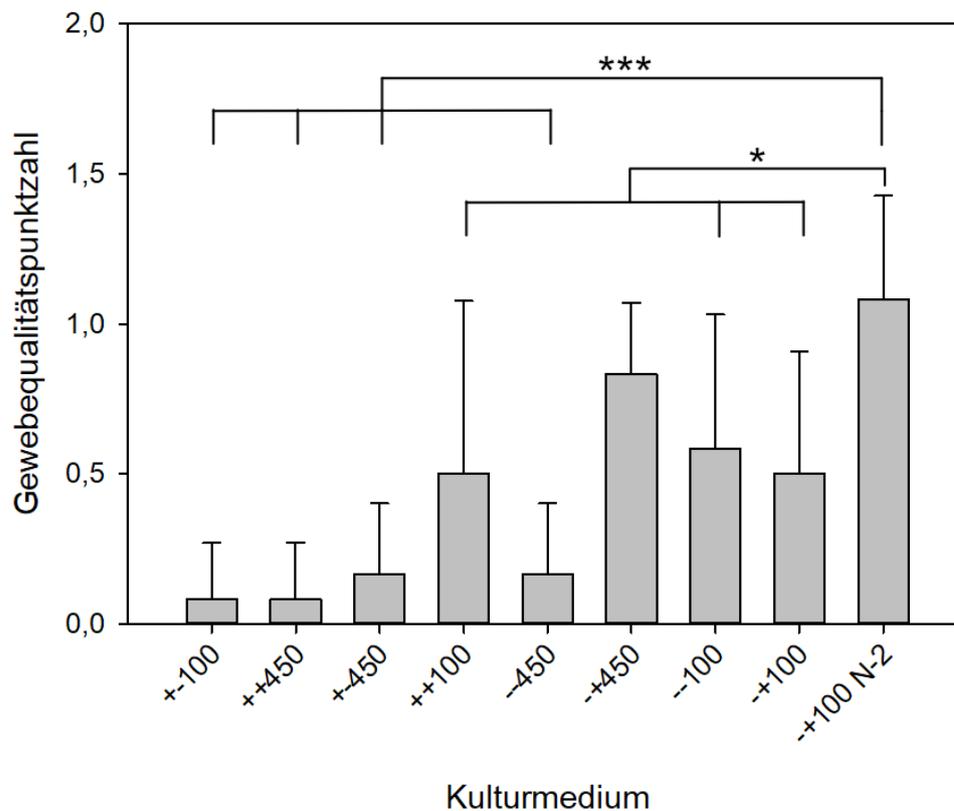


Abbildung 11: Vergleich der verschiedenen Kulturmedien in Bezug auf die Erhaltung der Stäbchenbipolarzellen nach zwölf Tagen Kultur.

Darstellung der Mittelwerte der ermittelten Gewebequalitätspunktzahlen (n=6) und dazugehöriger Standardabweichungen. *** P < 0,001 bzw. * P < 0,05.

Vergleicht man die unterschiedlichen Kulturmedien dahingehend, welchen Einfluss sie auf die Erhaltung der Stäbchen-Bipolarzellen nach zwölf Tagen in Kultur haben, kann man erschließen, dass das Medium --+100 N-2 die Erhaltung der physiologischen Strukturen hier am besten unterstützt (vgl. Abb. 11). Während die Gewebequalitätspunktzahl bei frischer Retina mit einem Wert von 2 festgesetzt wird, ist bei Kultur mit dem Medium --+100 N-2 nach zwölf Tagen ein Wert von 1,08 ermittelt worden. Die Werte bei Kultur mit anderen Medien liegen zwischen 0,08 (+-100 sowie ++450) und 0,83 (--+100). Eine erste Tendenz lässt erkennen, dass Medien, die kein fötales Kälberserum enthalten im Schnitt eine höhere Gewebequalitätspunktzahl bei Betrachtung der Stäbchen-Bipolarzellen erreichen. Ebenso führt ein Glucosegehalt von 100 mg/dl zu einer besseren Erhaltung der Zellen. Der Zusatz von N-2 Supplement hebt

den Wert letztlich über 1. Das Medium $++100$ N-2 zeigt bezogen auf die Stäbchenbipolarzellen eine (sehr) signifikant ($P < 0,001$ bzw. $P < 0,05$) bessere Gewebeerhaltung als alle anderen Medien außer $++450$.

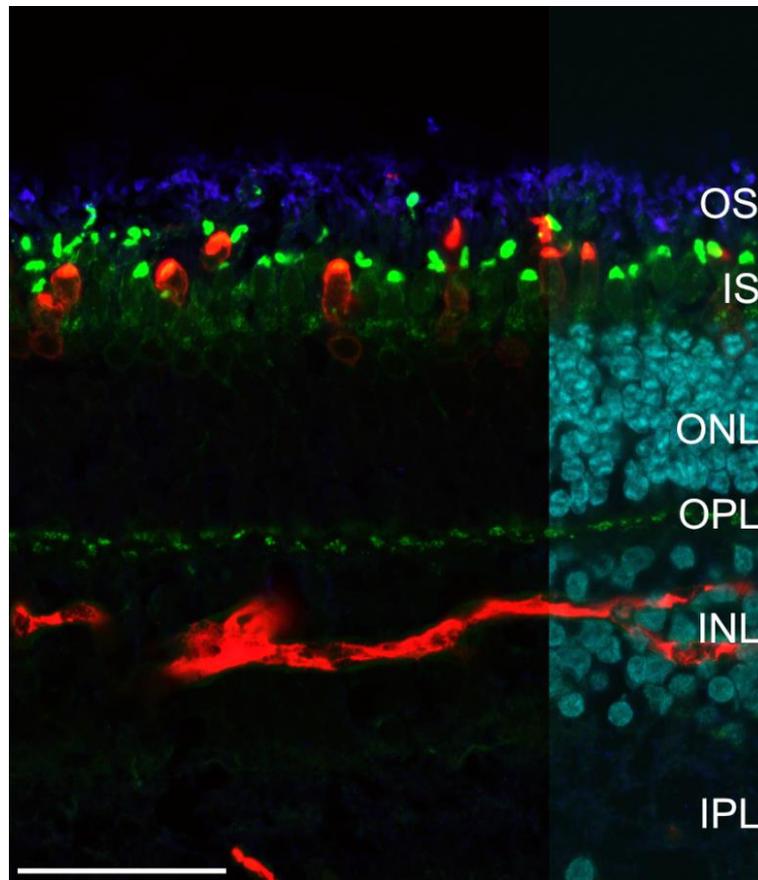


Abbildung 12: Expression des Zapfen-Photorezeptor-Markers Erdnuss Agglutinin (PNA), von S-Opsin für Zapfen-Photorezeptoren, die Reize im kurzwelligen Sehbereich verarbeiten und dem Stäbchen-Photorezeptor-Marker Rhodopsin in frisch fixierter porciner Retina.

Die S-Opsin-Färbung wird in Rot dargestellt, die PNA-Färbung in Grün, die Rhodopsin-Färbung in Dunkelblau und die DAPI-Kernfärbung in Türkis (anteilig gezeigt). Der Maßstab entspricht $50 \mu\text{m}$. OS = Außensegmente der Photorezeptoren, IS = Innensegmente der Photorezeptoren, ONL = äußere Körnerschicht, OPL = äußere plexiforme Schicht, INL = innere Körnerschicht, IPL = innere plexiforme Schicht.

Um die Photorezeptoren der Retina, die für die meisten Augenerkrankungen relevant sind, zu markieren, wurde hier eine Immunfärbung mit Antikörpern gegen S-Opsin und Rhodopsin verwendet, sowie der Marker PNA und DAPI eingesetzt. Eine Expression von PNA ist in allen Zapfen-Photorezeptoren sowohl in Innen- und Außensegmenten, als auch in den synaptischen Endfüßchen zu sehen. Die Außensegmente sitzen dabei zipfelförmig oben an den Innensegmenten in der Photorezeptorschicht und die synaptischen Endfüßchen in der OPL. Mit S-Opsin werden die ‚blauen‘ Zapfen markiert, also jene, die Reize im kurzwelligen Lichtbereich verarbeiten. Hierbei sieht man eine Expression in

Innen- und Außensegmenten dieser. Rhodopsin wird in den Stäbchen-Photorezeptoren exprimiert und wird hier in dunkelblau gezeigt. Die DAPI-Kernfärbung dient dazu, die Schichten der Retina klar definieren zu können.

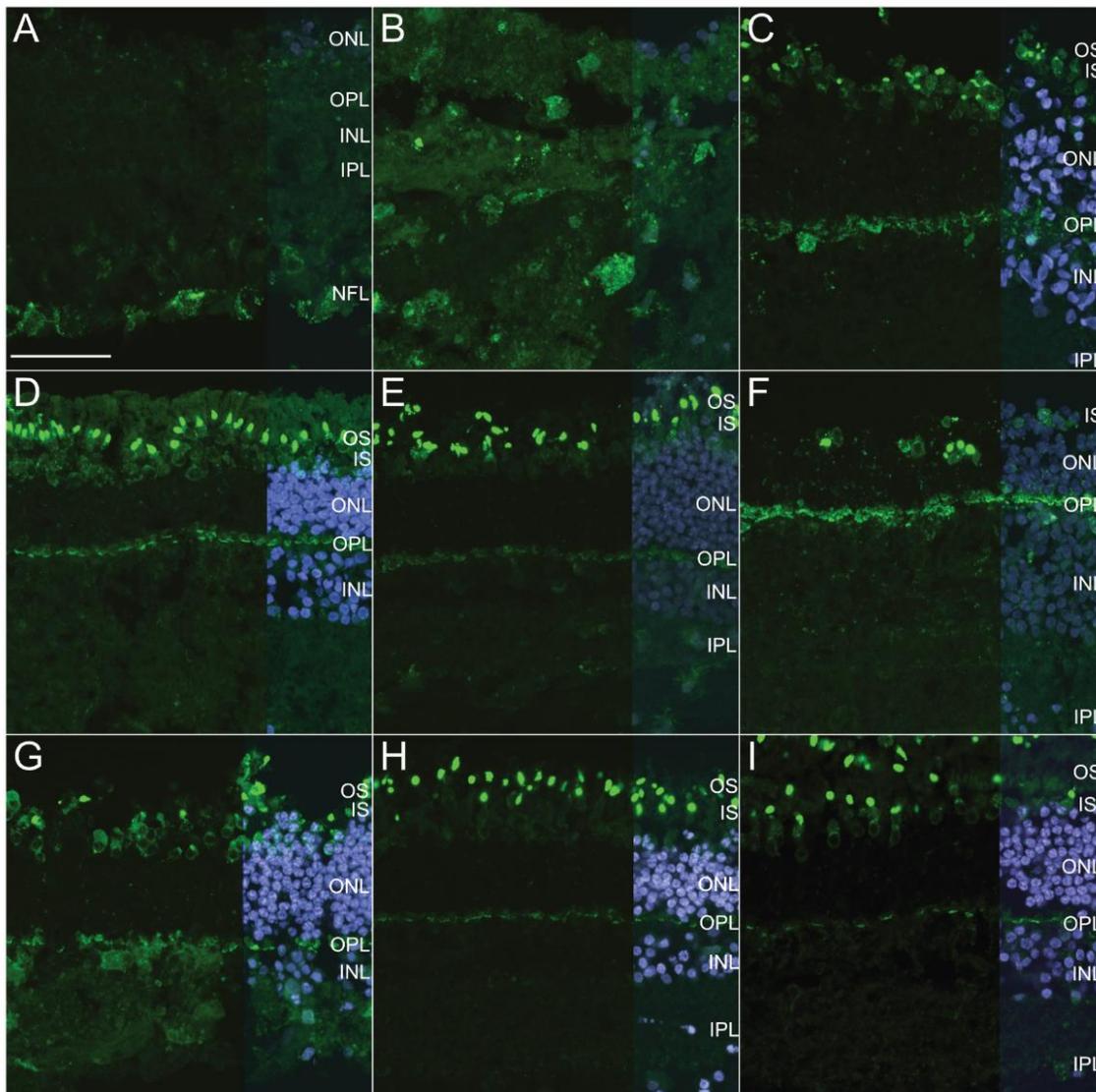


Abbildung 13: Expression des Zapfen-Photorezeptor-Markers Erdnuss Agglutinin (PNA) in Retina Explantaten nach zwölf Tagen Kultur mit unterschiedlichen Medien.

Die PNA-Färbung wird in Grün dargestellt, die DAPI-Kernfärbung in Lila (anteilig gezeigt). Der Maßstab in A entspricht 50 µm und gilt für A-I. A: Medium +-100, B: Medium ++450, C: Medium +-450, D: Medium ++100, E: Medium --450, F: Medium ++450, G: Medium --100, H: Medium +-100, I: Medium -+100 N-2. OS = Außensegmente der Photorezeptoren, IS = Innensegmente der Photorezeptoren, ONL = äußere Körnerschicht, OPL = äußere plexiforme Schicht, INL = innere Körnerschicht, IPL = innere plexiforme Schicht, GCL = Ganglienzellschicht, NFL = Nervenfaserschicht.

Für die Beurteilung der Erhaltung von Zapfen-Photorezeptoren wird in Abbildung 13 die Immunfärbung mit PNA nach jeweils zwölf Tagen Kultur mit den verschiedenen Medien gezeigt. In A und B mit den Medien +-100 bzw. ++450 sind keine Zapfen-

Photorezeptoren zu sehen und die Schichtung der Retina ist ebenfalls nicht erkennbar. In den restlichen Bildern sind mindestens die synaptischen Endfüßchen der Zapfen in der ONL auszumachen. Auch die Außensegmente der Zapfen sind in C-I jeweils zu finden, wobei sie in D, E, H und I gut erhalten sind und an (fast) jedem Innensegment vorhanden sind. Die Innensegmente der Zapfen sind lediglich in D und I ganz klar umrissen, während sie mit den anderen Medien in C-I ebenfalls spezifisch angefärbt werden konnten. Die allgemeine Morphologie der Retina Explantate ist in D-I jeweils mindestens als gut zu beurteilen.

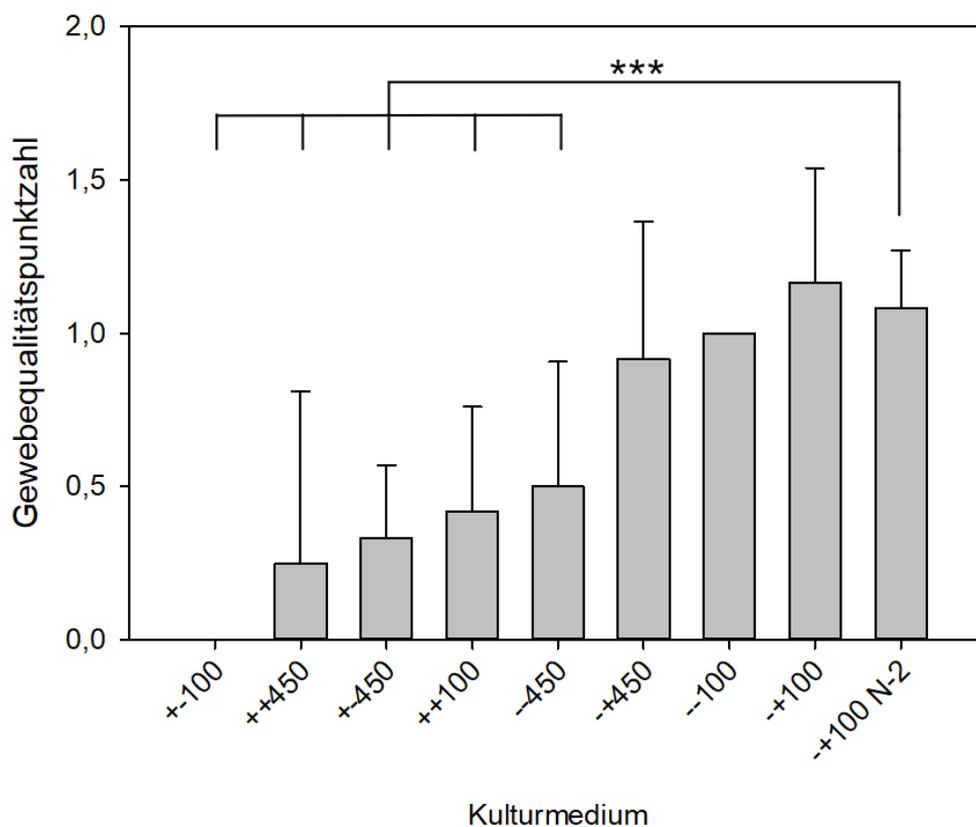


Abbildung 14: Vergleich der verschiedenen Kulturmedien in Bezug auf die Erhaltung der Photorezeptor-Innensegmente nach zwölf Tagen Kultur.

Darstellung der Mittelwerte der ermittelten Gewebequalitätspunktzahlen (n=6) und dazugehöriger Standardabweichungen. *** P < 0,001.

Die Gewebequalitätspunktzahl der Photorezeptor-Innensegmente nach zwölf Tagen Kultur mit unterschiedlichen Medien wird in Abbildung 14 dargestellt. Die Werte differieren sehr stark zwischen 0 (+-100) und 1,16 (-+100). Auch hier ist klar erkennbar, dass die Medien ohne fötales Kälberserum mit 100 mg/dl Glucose für den besten Erhalt der Innensegmente sorgen. Der beste Wert wird mit dem Medium -+100 erreicht (1,16),

die Standardabweichung ist hier jedoch mit 0,37 relativ hoch. Betrachtet man die Explantate, die mit +-100 N-2 kultiviert wurden, liegt der Wert bei 1,08 und hat eine Standardabweichung von nur 0,19. Das Medium +-100 N-2 zeigt eine sehr signifikant ($P < 0,001$) bessere Erhaltung von Photorezeptor-Innensegmenten als die Medien +-100, ++450, +-450, ++100 und --450.

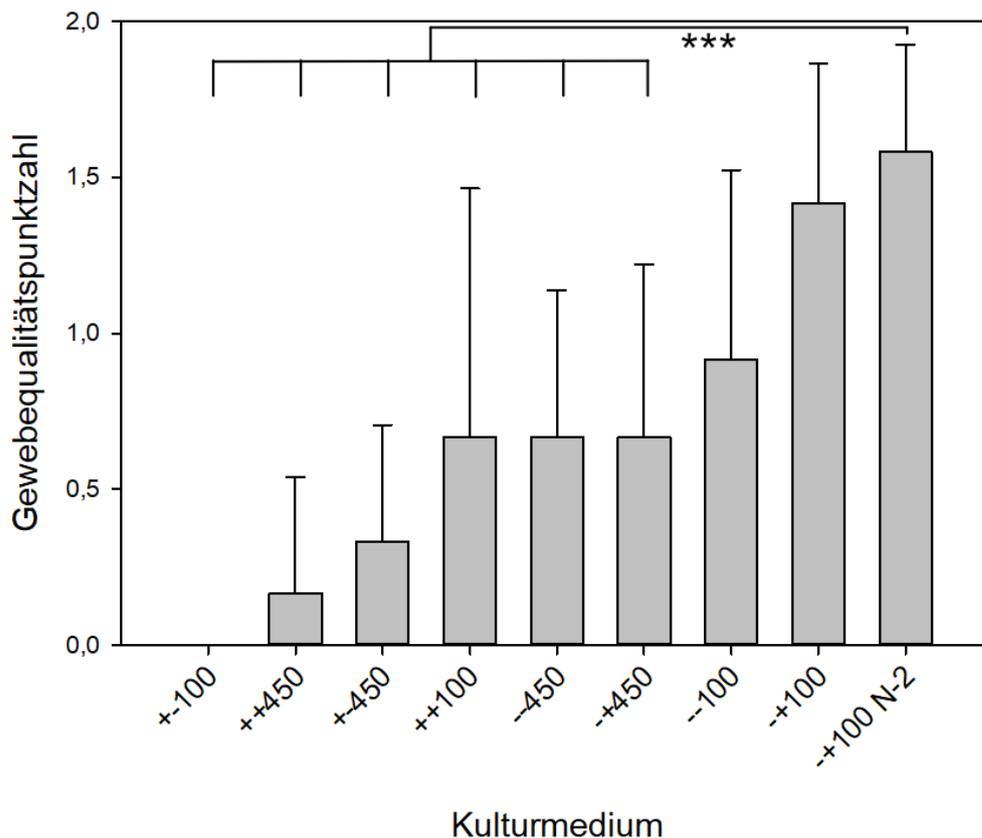


Abbildung 15: Vergleich der verschiedenen Kulturmedien in Bezug auf die Erhaltung der Photorezeptor-Außensegmente nach zwölf Tagen Kultur.

Darstellung der Mittelwerte der ermittelten Gewebequalitätspunktzahlen ($n=6$) und dazugehöriger Standardabweichungen. *** $P < 0,001$.

Die Auswertung der Gewebequalitätspunktzahl bei Photorezeptor-Außensegmenten in Abbildung 15 zeigt genau wie bei den Innensegmenten, dass Medien mit 100 mg/dl Glucose sowie ohne fötales Kälberserum für den besten Erhalt der Strukturen sorgen. Die Medien +-100 und +-100 N-2 zeigen die klar besten Werte mit 1,42 bzw. 1,58. Mit dem Medium +-100 sind hier wie auch bei den Innensegmenten zuvor keine Strukturen mehr auszumachen, was zu einer Gewebequalitätspunktzahl von 0 führte. Generell sind die Standardabweichungen aller Werte hier aber als eher hoch anzusehen. Das Medium +-100 N-2 zeigt eine sehr signifikant ($P < 0,001$) bessere Erhaltung der Photorezeptor-

verteilt vor. Mit dem Medium +-450 in C sind nach zwölf Tagen Kultur ansatzweise ONL und INL zu erkennen, die Zellkerne sind jedoch ebenfalls pyknotisch. Die anderen Medien in D-I zeigen eine gute bis sehr gute Erhaltung der Schichten mit dicht gepackten Zellkernen. Vereinzelt liegen pyknotische Kerne vor, die gesunden Kerne sind jedoch klar in der Überzahl. Die Schichtdicken sind ebenfalls relativ konstant, wobei das Explantat aus F mit dem Medium -+450 etwas herausfällt, da die ONL dort im Vergleich zur INL dünner erscheint.

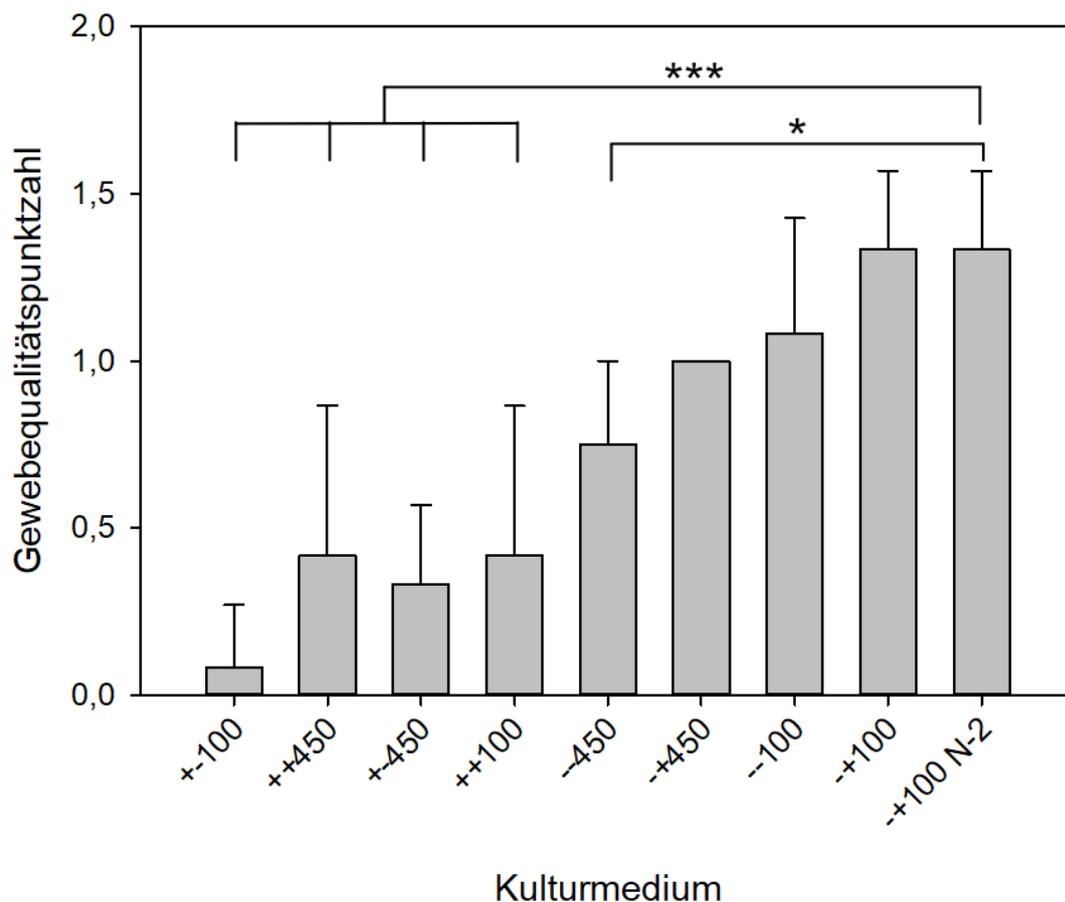


Abbildung 17: Vergleich der verschiedenen Kulturmedien in Bezug auf die Erhaltung der Zellkerne nach zwölf Tagen Kultur.

Darstellung der Mittelwerte der ermittelten Gewebequalitätspunktzahlen ($n=6$) und dazugehöriger Standardabweichungen. *** $P < 0,001$ bzw. * $P < 0,05$.

Die Auswertung der Zellkerne mithilfe der Gewebequalitätspunktzahl ist in Abbildung 17 zu sehen. Die Werte liegen zwischen 0,08 (+-100) und 1,33 (-+100 sowie -+100 N-2). Auch hier ist zu sehen, dass die Medien ohne fötales Kälberserum und mit einem Glucosegehalt von 100 mg/dl am besten zur Erhaltung der Zellkerne beitragen. Bei Kultur mit einem der drei Medien, auf die das zutrifft, sinkt die Gewebequalitätspunktzahl nicht

unter einen Wert von 1,08. Die Erhaltung der Zellkerne ist nach Kultur mit dem Medium +-100 N-2 (sehr) signifikant ($P < 0,001$ bzw. $P < 0,05$) besser als mit den Medien +-100, ++450, +-450, ++100 und --450.

3.3.2 Messungen von Gesamt- und ONL-Dicke

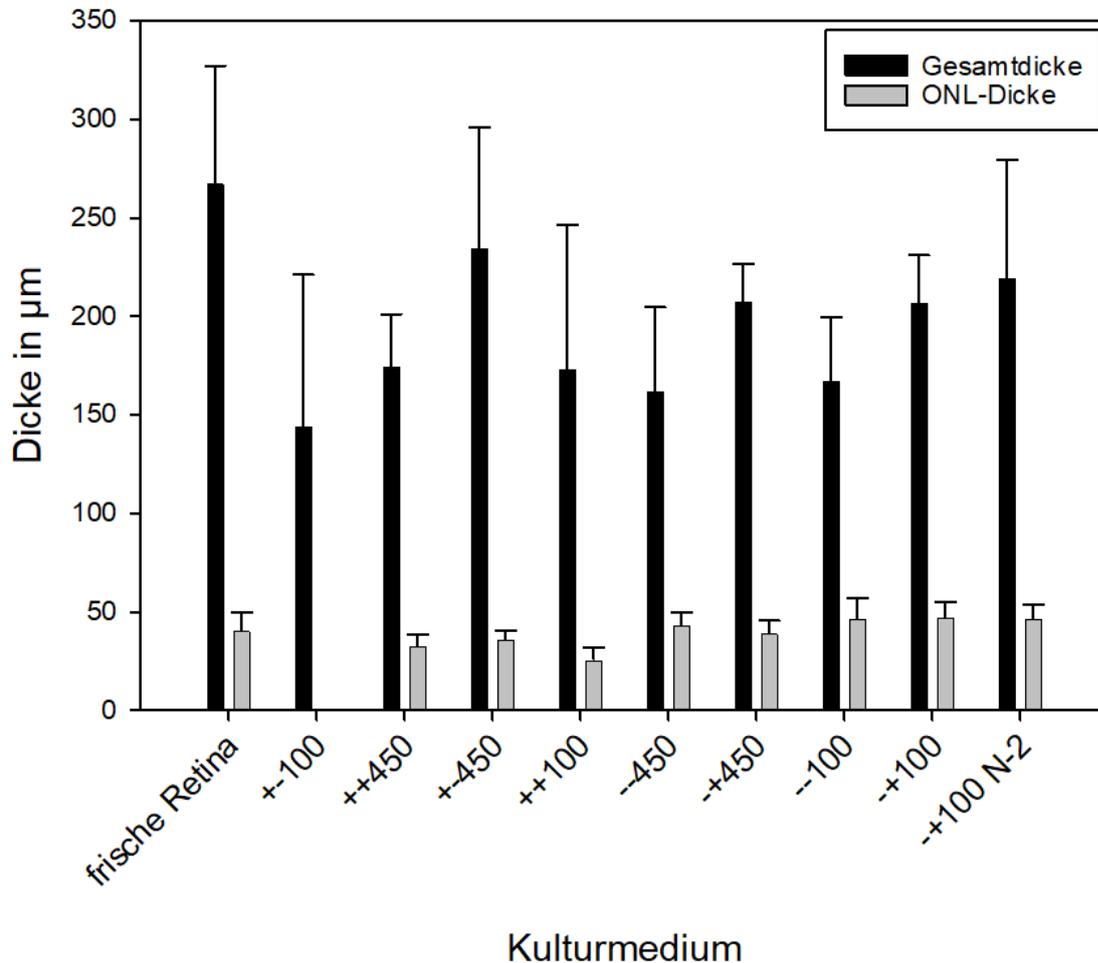


Abbildung 18: Messungen der Gesamt- und ONL-Dicke bei Retina-Explantaten nach zwölf Tagen Kultur. Vergleich zwischen verschiedenen Kulturmedien.

Darstellung der Mittelwerte der gemessenen Werte in μm ($n=18$ bzw. $n=21$ für frische Retina) und dazugehöriger Standardabweichungen. Schwarze Balken = Gesamtdicke, graue Balken = ONL-Dicke.

Bei der Messung der Gesamt- und ONL-Dicke nach Kultur mit unterschiedlichen Medien ist kein ganz so klares Bild zu sehen. Die Werte für die Gesamtdicke der Explantate liegen zwischen $144 \mu\text{m}$ (+-100) und $234 \mu\text{m}$ (+-450). Die ONL ist zwischen $26 \mu\text{m}$ (++) und $47 \mu\text{m}$ (--) dick. Nach Kultur mit dem Medium +-100 ist in keinem der betrachteten Schnitte eine klare Schichtung zu erkennen und somit konnte auch keine ONL-Dicke gemessen werden. Im Gegensatz zu frischer Retina ist die Gesamtdicke bei allen Medien außer +-450 und +-100 N-2 (sehr) signifikant ($P < 0,001$ bzw. $P < 0,05$)

geringer. Nach der Kultur mit dem Medium $-+100$ N-2 ist die Gesamtdicke der Retina signifikant ($P < 0,001$ bzw. $P < 0,05$) größer als mit den Medien $+100$ und $--450$. Zu den anderen Medien sind keine signifikanten Unterschiede zu erkennen. Bei der ONL-Dicke sind signifikante ($P < 0,001$ bzw. $P < 0,05$) Unterschiede zwischen $-+100$ N-2 und den Medien $+100$, $+100$, $++450$, $+-450$ und $--450$ zu sehen.

3.3.3 Rangfolge der Kulturmedien

Die oben gezeigten Ergebnisse wurden je Kategorie in eine Rangfolge gebracht (siehe Tabellen 11 und 12) und anschließend wurden diese Ränge dann wiederum zusammengezählt, um herauszufinden, welches Medium insgesamt am besten abgeschnitten hat. Alle Ergebnisse zusammengenommen, sorgt das Medium $-+100$ N-2 für die beste Gewebeerhaltung bei der porcinen organotypischen Retinakultur (Tabelle 13).

Tabelle 11: Gewebequalitätspunktzahl (GQP) der Retinakulturen mit verschiedenen Medien nach zwölf Tagen. Gezeigt werden die Mittelwerte der GQP pro Kategorie und der Rang, der sich daraus ergibt.

Medium	Stäbchen-Bipolarzellen		Zellkerne		Innen-segmente		Außen-segmente	
	GQP	Rang	GQP	Rang	GQP	Rang	GQP	Rang
$-+100$ N-2	1,08	1	1,33	1	1,08	2	1,58	1
$-+100$	0,5	4	1,33	1	1,17	1	1,42	2
$--100$	0,58	3	1,08	3	1	3	0,92	3
$-+450$	0,83	2	1	4	0,92	4	0,67	4
$--450$	0,17	7	0,75	5	0,5	5	0,67	4
$++100$	0,5	4	0,42	6	0,42	6	0,67	4
$+450$	0,17	7	0,33	8	0,33	7	0,33	7
$++450$	0,08	9	0,42	6	0,25	8	0,17	8
$+100$	0,08	9	0,08	9	0	9	0	9

Tabelle 12: Gesamtdicke und ONL-Dicke der Retinakulturen mit verschiedenen Medien nach zwölf Tagen. Gezeigt werden die Mittelwerte der Messungen pro Kategorie und der Rang, der sich daraus ergibt.

Medium	Gesamtdicke		ONL-Dicke	
	Dicke (μm)	Rang	Dicke (μm)	Rang
--100 N-2	219,73	2	46,54	3
--100	206,82	4	47,21	1
--100	167,27	7	46,78	2
--450	207,54	3	39,27	5
--450	162,09	8	43,51	4
++100	173,74	6	25,89	8
+450	234,63	1	36,23	6
++450	175,03	5	33,07	7
+100	144,51	9	Nicht messbar	9

Tabelle 13: Rangfolge der Kulturmedien basierend auf der Gewebequalitätspunktzahl sowie Schichtdickenmessungen.

Rang	Medium
1	--100 N-2
2	--100
3	--100
4	--450
5	--450
6	++100
7	+450
8	++450
9	+100

3.4 Kulturdauer

Nach der Festlegung auf ein Kulturmedium wurde getestet, wie lange die Explantate in Kultur gehalten werden können, ohne dass die Gewebeerhaltung zu stark beeinträchtigt wird. Dafür wurden alle vier Tage Präparate aus der Kultur genommen und analysiert, wobei die längste Kulturdauer 28 Tage betrug. Hier wurde ebenfalls die Gewebequalitätspunktzahl ermittelt und Schichtdicken gemessen.

3.4.1 Beurteilung der Gewebeerhaltung

Zunächst wurde die Gewebeerhaltung zu den verschiedenen Zeitpunkten mit Hilfe der Immunfärbung mit dem Primärantikörper gegen PKC α analysiert.

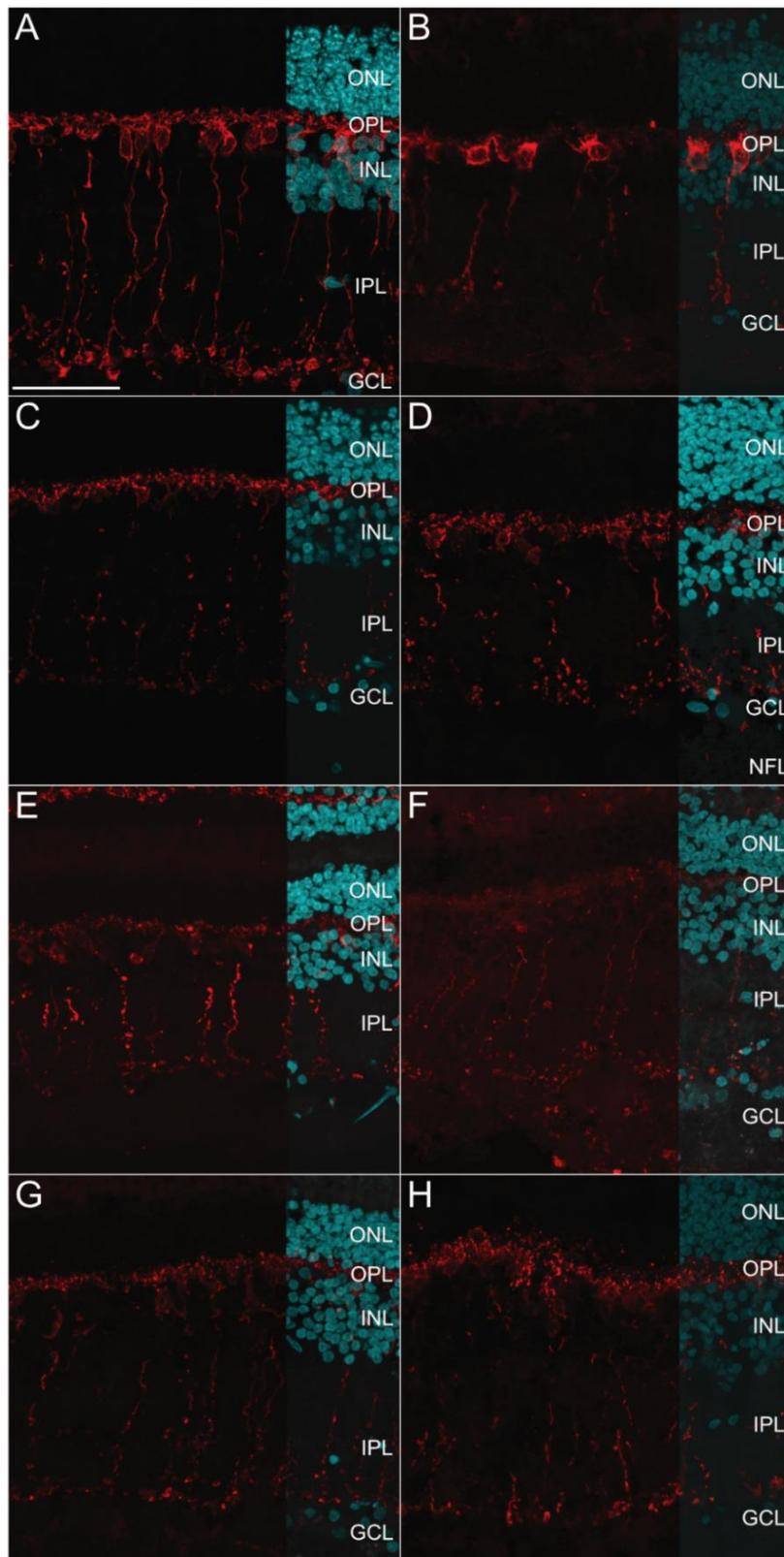


Abbildung 19: Expression des Stäbchen-Bipolarzellen-Markers Proteinkinase C alpha (PKC α) in Retina Explantaten im Zeitverlauf von null bis 28 Tagen Kulturdauer mit dem Medium +100 N-2. Die PKC α -Färbung wird in Rot dargestellt, die DAPI-Kernfärbung in Türkis (anteilig gezeigt). Der Maßstab in A entspricht 50 μ m und gilt für A-H. A: 0 Tage (frische Retina), B: 4 Tage Kultur, C: 8 Tage Kultur, D: 12 Tage Kultur, E: 16 Tage Kultur, F: 20 Tage Kultur, G: 24 Tage Kultur, H: 28 Tage Kultur. ONL = äußere Körnerschicht, OPL = äußere plexiforme Schicht, INL = innere Körnerschicht, IPL = innere plexiforme Schicht, GCL = Ganglienzellschicht, NFL = Nervenfaserschicht.

In Abbildung 19 wird die Immunfärbung mit PKC α im Zeitverlauf der Kultur bis 28 Tage Dauer mit dem Medium +-100 N-2 dargestellt. An allen Zeitpunkten ist eine spezifische Färbung auszumachen und Stäbchen-Bipolarzellen zu sehen. Die Axone der Stäbchen-Bipolarzellen sind in den meisten Fällen lang und durchgängig von der INL bis zur GCL auszumachen. Lediglich in C nach acht Tagen Kultur sind nur noch stark durchbrochene Axone zu finden. Die Perikaryen der Zellen sind bis zwölf Tage Kulturdauer in der äußeren INL klar sichtbar, an späteren Zeitpunkten ist die Expression von PKC α nur noch undeutlich. Die Dichte der Stäbchen-Bipolarzellen bleibt im Verlauf der Zeit weitgehend gleich.

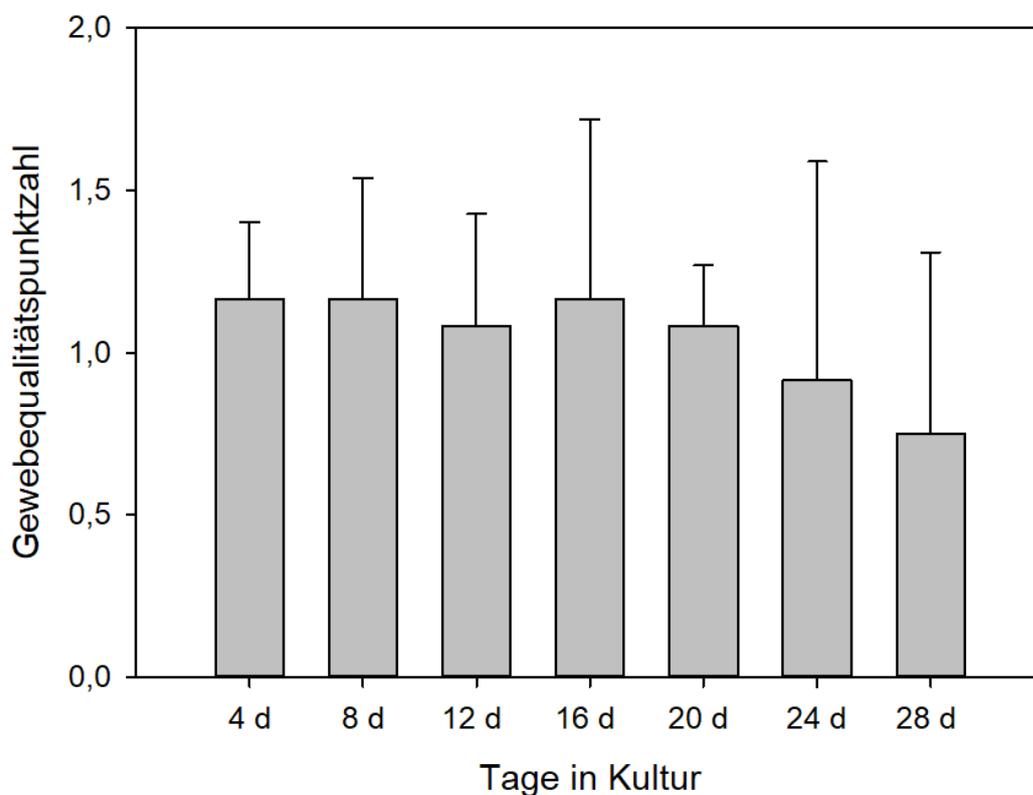


Abbildung 20: Auswertung der Erhaltung von Stäbchenbipolarzellen in Retina Explantaten im Zeitverlauf von vier bis 28 Tagen Kulturdauer mit dem Medium +-100 N-2 mithilfe der Gewebequalitätspunktzahl.

Darstellung der Mittelwerte der ermittelten Gewebequalitätspunktzahlen (n=6) und dazugehöriger Standardabweichungen.

Aus den Auswertungen aller Schnitte für die Beurteilung der Stäbchen-Bipolarzellen durch Ermittlung der Gewebequalitätspunktzahl, ergab sich das Diagramm in Abbildung 20. Wird das Gesamtbild betrachtet, fällt auf, dass die Gewebequalitätspunktzahl bis einschließlich zwanzig Tage Kulturdauer mit dem Medium +-100 N-2 ziemlich stabil bei

Werten zwischen 1,08 und 1,17 liegt, wobei die Standardabweichung nach 16 Tagen höher ist, als an den anderen Zeitpunkten. Nach 24 bzw. 28 Tagen in Kultur nimmt die Qualität der Stäbchen-Bipolarzellen etwas ab und die Gewebequalitätspunktzahl sinkt bis auf 0,75 nach 28 Tagen Kulturdauer, was jedoch immer noch für ein Vorhandensein zumindest partiell intakter Strukturen spricht. Die Standardabweichung steigt jedoch, je länger die Explantate in Kultur sind auf 0,67 nach 24 Tagen bzw. 0,56 nach 28 Tagen in Kultur. Im Vergleich mit frischer Retina ist die Gewebeerhaltung der Retina nach Kultur mit dem Medium +100 N-2 nach allen Tagen signifikant verringert ($P < 0,001$ bzw. $P < 0,05$). Unter den verschiedenen Zeitpunkten gibt es keine signifikanten Unterschiede.

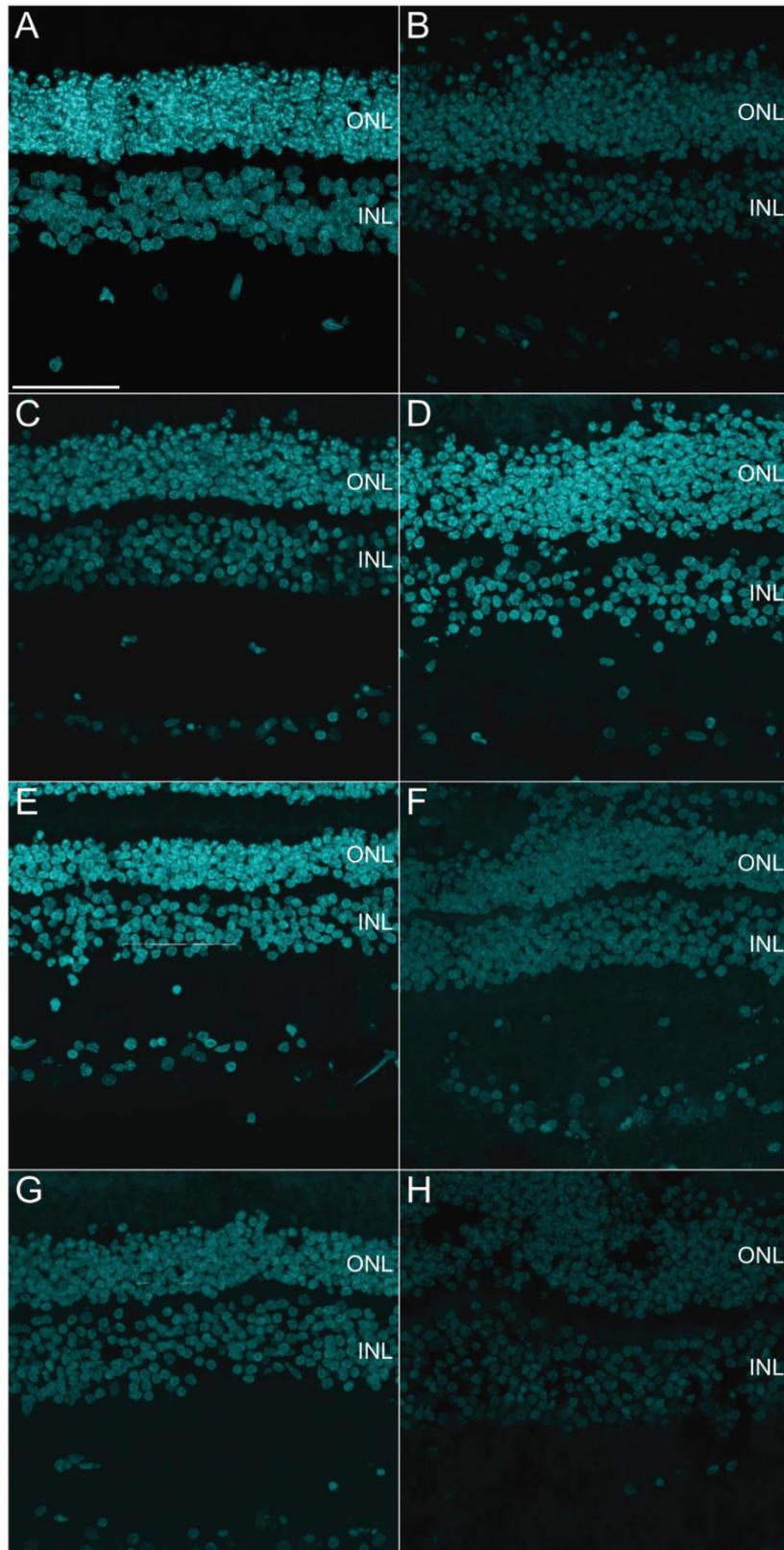


Abbildung 21: DAPI-Kernfärbung in Retina Explantaten im Zeitverlauf von null bis 28 Tagen Kulturdauer mit dem Medium +100 N-2.

Die DAPI-Kernfärbung wird in Türkis gezeigt. Der Maßstab in A entspricht 50 µm und gilt für A-H. A: 0 Tage (frische Retina), B: 4 Tage Kultur, C: 8 Tage Kultur, D: 12 Tage Kultur, E: 16 Tage Kultur, F: 20 Tage Kultur, G: 24 Tage Kultur, H: 28 Tage Kultur. ONL = äußere Körnerschicht, INL = innere Körnerschicht.

In Abbildung 21 ist die DAPI-Kernfärbung der Explantate nach unterschiedlich langer Kulturdauer mit dem Medium $-+100$ N-2 gezeigt. Die einzelnen Kerne sind an allen Zeitpunkten fast ausschließlich prall und nicht pyknotisch. Sowohl in der ONL als auch in der INL liegen die Kerne dicht gepackt vor und die Schichten sind klar voneinander abgrenzbar. Nach zwölf (D), 16 (E) und 28 Tagen (H) Kulturdauer sind die Kerne in der INL etwas aufgelockert.

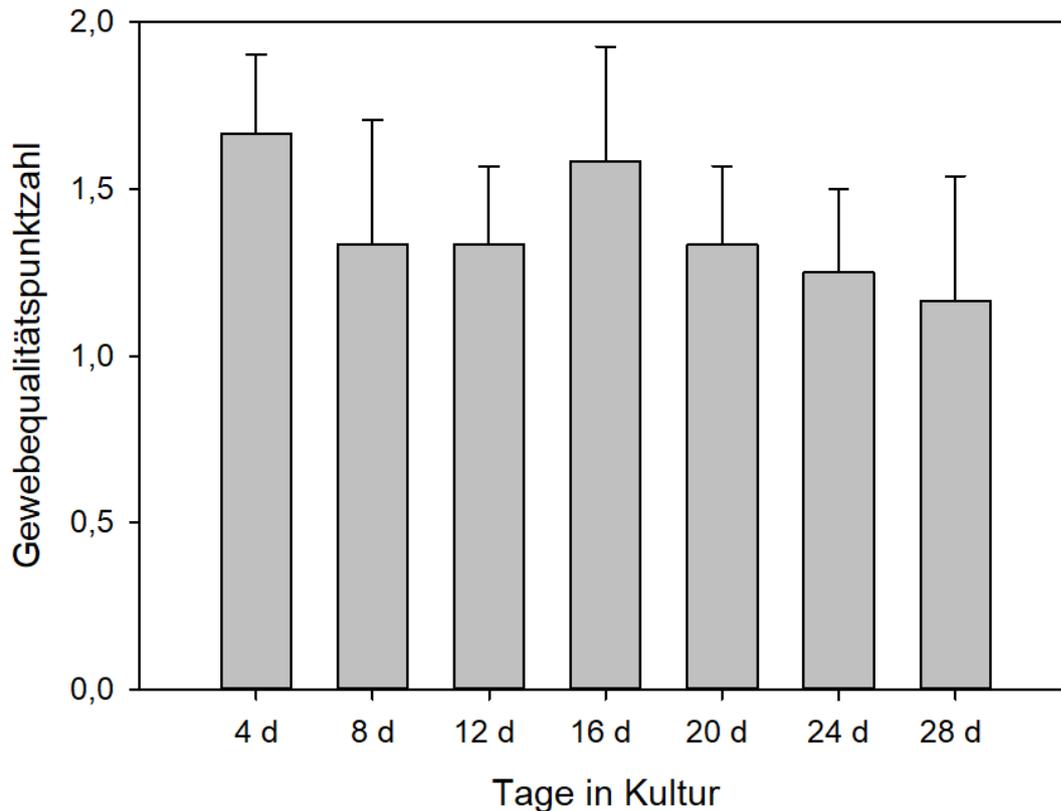


Abbildung 22: Auswertung der Erhaltung der Zellkerne in Retina Explantaten im Zeitverlauf von vier bis 28 Tagen Kulturdauer mit dem Medium $-+100$ N-2 mithilfe der Gewebequalitätspunktzahl. Darstellung der Mittelwerte der ermittelten Gewebequalitätspunktzahlen ($n=6$) und dazugehöriger Standardabweichungen.

Die Beurteilung der Zellkerne mithilfe der Gewebequalitätspunktzahl ist in Abbildung 22 aufgetragen. Im Allgemeinen kann gesagt werden, dass die Qualität der Zellkerne auch nach längerer Kulturdauer mit dem Medium $-+100$ N-2 noch gewährleistet werden kann, an keinem der Zeitpunkte sinkt der Wert unter 1, alle liegen zwischen 1,17 und 1,67. Dennoch ist im Zeitverlauf eine leichte Tendenz zur Abnahme der Zellkernqualität zu sehen. Die niedrigste Gewebequalitätspunktzahl ist auch hier nach 28 Tagen Kulturdauer erreicht und beträgt 1,17 mit einer Standardabweichung von 0,37. Insgesamt sind die Standardabweichungen hier nicht so hoch, wie es bei der Beurteilung der Stäbchen-

Bipolarzellen zu sehen war. Die Erhaltung der Zellkerne ist nach vier bzw. 16 Tagen Kultur nicht signifikant schlechter als bei Zellkernen in frischer Retina, an den anderen Zeitpunkten ist eine signifikante ($P < 0,001$ bzw. $P < 0,05$) Abnahme der Qualität zu beobachten. Untereinander gibt es bei den verschiedenen Zeitpunkten keine signifikanten Unterschiede bei Betrachtung der Zellkerne.

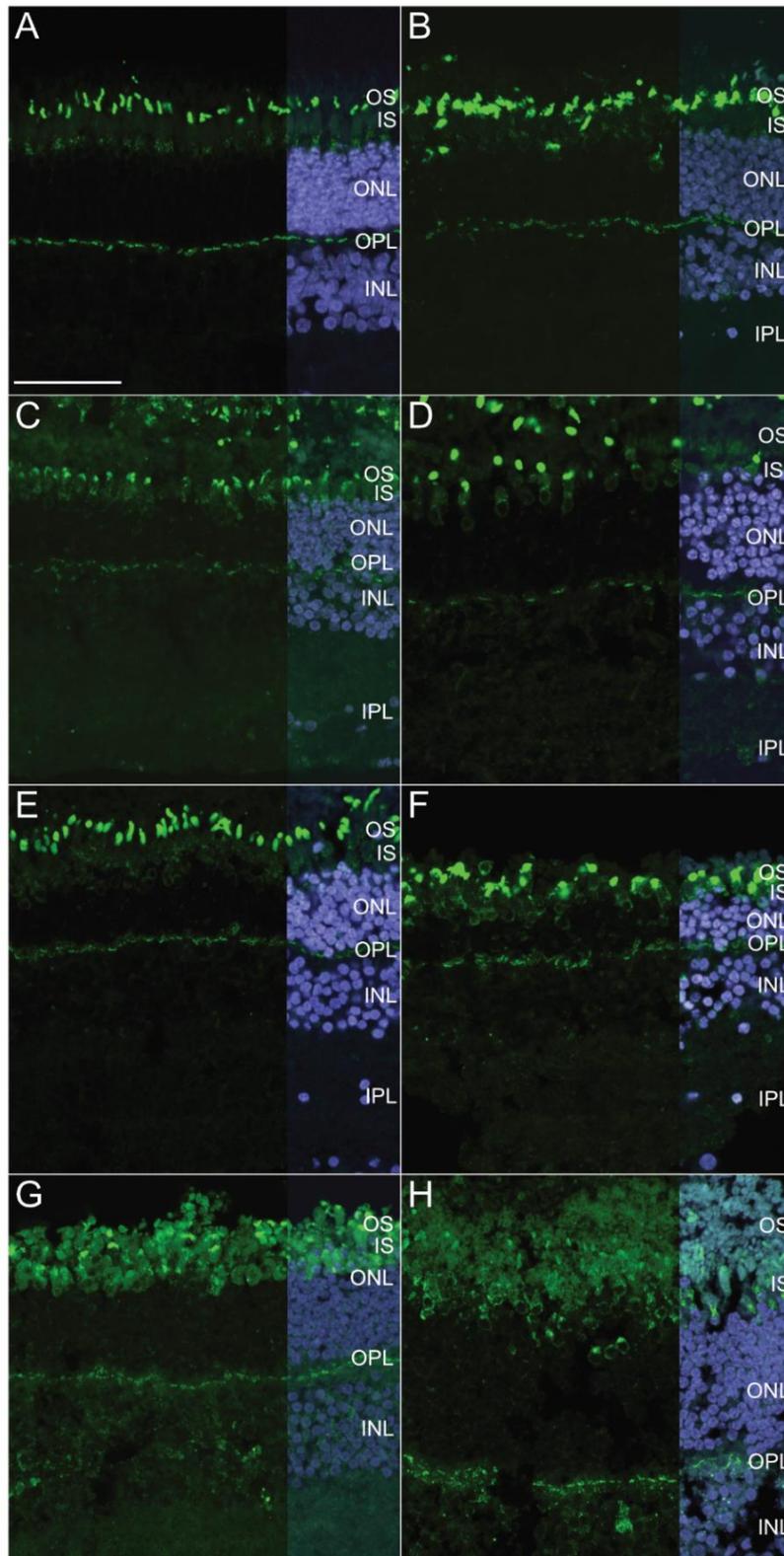


Abbildung 23: Expression des Zapfen-Photorezeptor-Markers Erdnuss Agglutinin (PNA) in Retina Explantaten im Zeitverlauf von null bis 28 Tagen Kulturdauer mit dem Medium ++100 N-2.

Die PNA-Färbung wird in Grün dargestellt, die DAPI-Kernfärbung in Lila (anteilig gezeigt). Der Maßstab in A entspricht 50 μm und gilt für A-H. A: 0 Tage (frische Retina), B: 4 Tage Kultur, C: 8 Tage Kultur, D: 12 Tage Kultur, E: 16 Tage Kultur, F: 20 Tage Kultur, G: 24 Tage Kultur, H: 28 Tage Kultur. ONL = äußere Körnerschicht, OPL = äußere plexiforme Schicht, INL = innere Körnerschicht, IPL = innere plexiforme Schicht, GCL = Ganglienzellschicht, NFL = Nervenfaserschicht.

Bis zu einer Kulturdauer von 16 Tagen mit dem Medium $+100$ N-2 sind die Zapfen-Photorezeptoren durchweg sehr gut erhalten (Abb. 23 A-E). In F-H sind die Zapfen-Photorezeptoren nicht mehr ganz so ordentlich nebeneinander aufgereiht wie zu früheren Zeitpunkten während der Kultur, aber dennoch deutlich als solche zu erkennen. Sowohl Innen- als auch Außensegmente sind klar auszumachen. Die synaptischen Endfüßchen sind an allen Zeitpunkten gut zu erkennen.

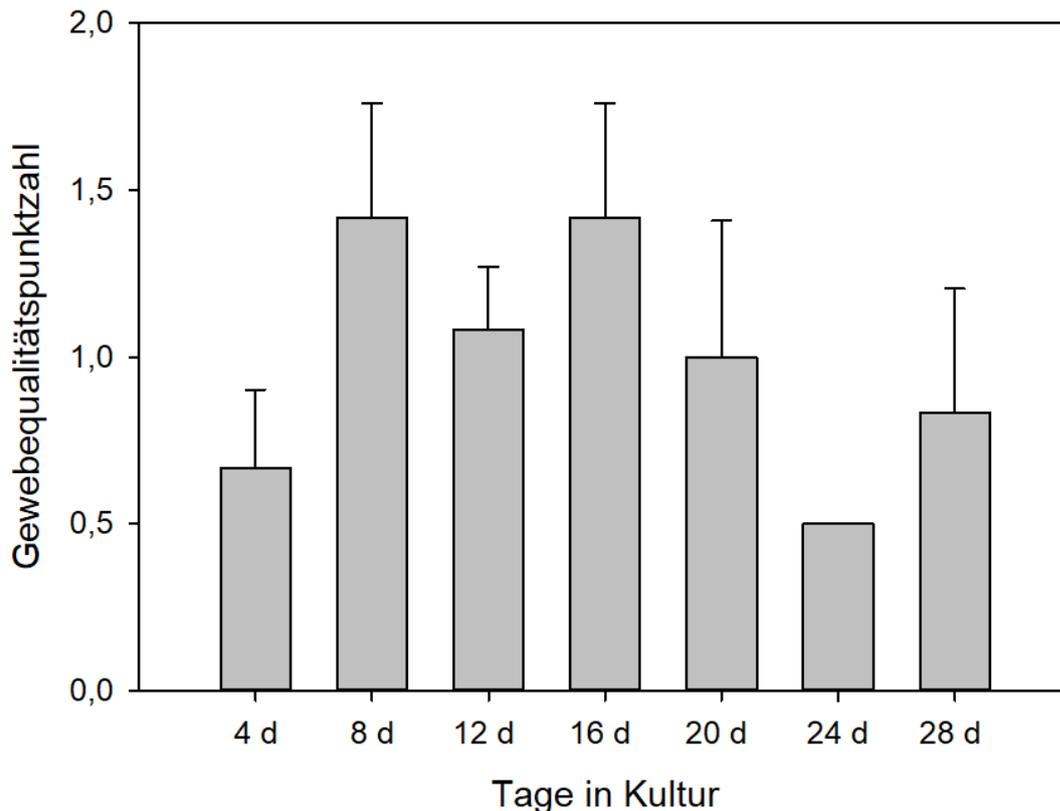


Abbildung 24: Auswertung der Erhaltung von Photorezeptor-Innensegmenten in Retina Explantaten im Zeitverlauf von vier bis 28 Tagen Kulturdauer mit dem Medium $+100$ N-2 mithilfe der Gewebequalitätspunktzahl.

Darstellung der Mittelwerte der ermittelten Gewebequalitätspunktzahlen ($n=6$) und dazugehöriger Standardabweichungen.

Die Beurteilung der Photorezeptor-Innensegmente wird in Abbildung 24 dargestellt. Hier ist nicht zu beobachten, dass die Gewebequalitätspunktzahl mit längerer Zeit in Kultur abnimmt, vielmehr sind interindividuelle Unterschiede zu erkennen. Die erreichten Punktzahlen liegen zwischen 0,5 (Tag 24) und 1,42 (Tag 8 und 16). An über der Hälfte der Zeitpunkte liegt die Gewebequalitätspunktzahl bei 1 oder niedriger. Die Photorezeptor-Innensegmente sind an allen Zeitpunkten nach Kultur signifikant ($P < 0,001$ bzw. $P < 0,05$) schlechter erhalten als in frischer Retina. Untereinander weicht die

Gewebequalitätspunktzahl zwischen einigen Zeitpunkten signifikant voneinander ab, jedoch ist keine Tendenz korrelierend zur steigenden Dauer zu erkennen.

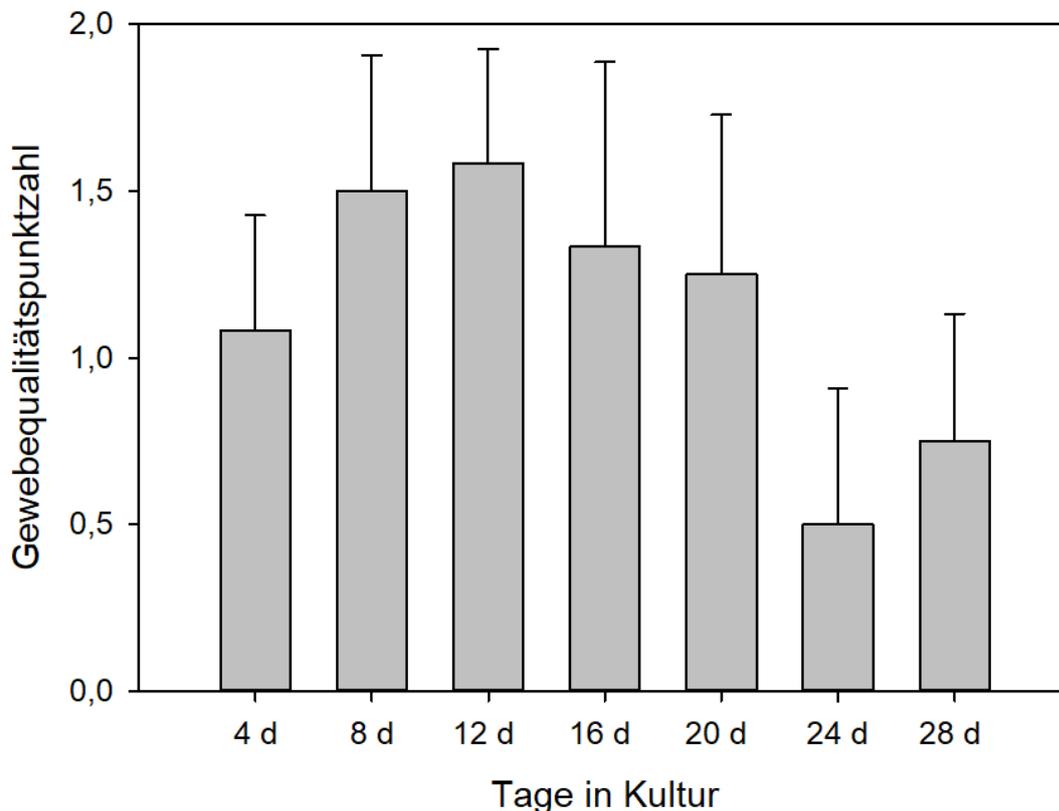


Abbildung 25: Auswertung der Erhaltung von Photorezeptor-Außensegmenten in Retina Explantaten im Zeitverlauf von vier bis 28 Tagen Kulturdauer mit dem Medium ++100 N-2 mithilfe der Gewebequalitätspunktzahl.

Darstellung der Mittelwerte der ermittelten Gewebequalitätspunktzahlen (n=6) und dazugehöriger Standardabweichungen.

Bei den Photorezeptor-Außensegmenten in Abbildung 25 hingegen ist wieder eine leichte Tendenz zur Abnahme der Gewebequalitätspunktzahl mit längerer Kulturdauer zu beobachten, lediglich die Explantate, die nach vier Tagen Kultur mit dem Medium ++100 N-2 geerntet wurden, fallen mit einer Punktzahl von 1,08 etwas heraus. Nach einer Kulturdauer von acht bis zwanzig Tagen liegt die Gewebequalitätspunktzahl bei 1,25 bis 1,58. Danach sinkt sie auf 0,5 (Tag 24) bzw. 0,75 (Tag 28). Insgesamt betrachtet liegen die Standardabweichungen hier mit Werten zwischen 0,34 bis 0,55 relativ hoch. Gegenüber der frischen Retina sind die Photorezeptor-Außensegmente der Explantate nach vier, zwanzig, 24 und 28 Tagen Kultur signifikant ($P < 0,001$ bzw. $P < 0,05$) schlechter erhalten. Hier lässt sich erkennen, dass die Außensegmente nach einer Kulturdauer länger als zwanzig Tage nicht mehr gut erhalten sind.

3.4.2 Messungen von Gesamt- und ONL-Dicke

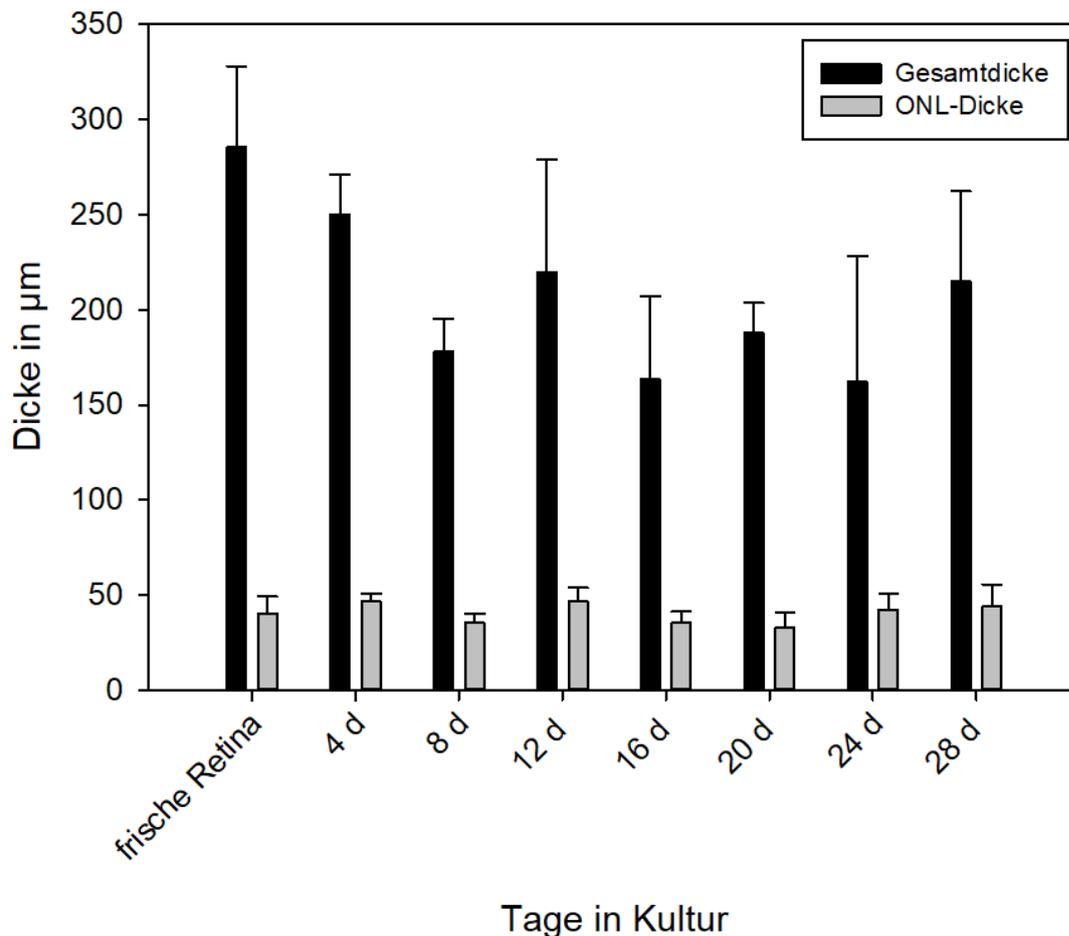


Abbildung 26: Messungen der Gesamt- und ONL-Dicke von Retina-Explantaten im Zeitverlauf zwischen null und 28 Tagen Kulturdauer mit dem Medium +100 N-2.

Darstellung der Mittelwerte der gemessenen Werte in μm ($n=18$ bzw. $n=21$ für frische Retina) und dazugehöriger Standardabweichungen. Schwarze Balken = Gesamtdicke, graue Balken = ONL-Dicke.

Die Ergebnisse der Messungen der Retina-Gesamtdicke sowie der ONL-Dicke sind in Abbildung 26 aufgetragen. Die Gesamtdicke der frischen Retina, die als Referenz gilt, beträgt im Schnitt $285 \mu\text{m}$, während die ONL hier eine Dicke von $41 \mu\text{m}$ vorweist. Durch die Kultur der Explantate nimmt die Gesamtdicke der Retina im Allgemeinen ab, wobei keine klare Abnahme im Verlauf der Zeit ausgemacht werden kann. Die Dicke der kultivierten Retinae liegt im Schnitt zwischen 163 und $250 \mu\text{m}$, nach der längsten Kulturdauer mit 28 Tagen, sind die Explantate im Schnitt noch $215 \mu\text{m}$ dick. Betrachtet man die ONL-Dicke, fällt auf, dass diese in den kultivierten Retinae auch größer ausfallen kann, als es in frischer Retina im Schnitt der Fall ist. Bei den kultivierten Explantaten liegt die ONL-Dicke zwischen 33 und $47 \mu\text{m}$. Die Standardabweichungen aller Messungen und vor allem der Gesamtdicke-Messungen ist als relativ hoch anzusehen. An

allen Tagen ab Tag 8 ist die Gesamtdicke der Explantate signifikant ($P < 0,001$ bzw. $P < 0,05$) geringer als die von frischer Retina. Die ONL-Dicke hingegen ist an keinem der Zeitpunkte signifikant abweichend von der ONL-Dicke in frischer Retina.

3.5 Behandlung mit AAVs

Die mit AAVs behandelten Explantate wurden zunächst als *Wholemout* eingedeckt und analysiert, um feststellen zu können, ob eine Transduktion überhaupt erfolgreich war, bevor weitergehende Analysen durchgeführt wurden. Verwendete AAVs codieren für eGFP, um mittels Fluoreszenzmikroskopie sehen zu können, ob sie ihr designiertes Ziel in der Retina erreicht haben und das Protein korrekt exprimiert wurde.

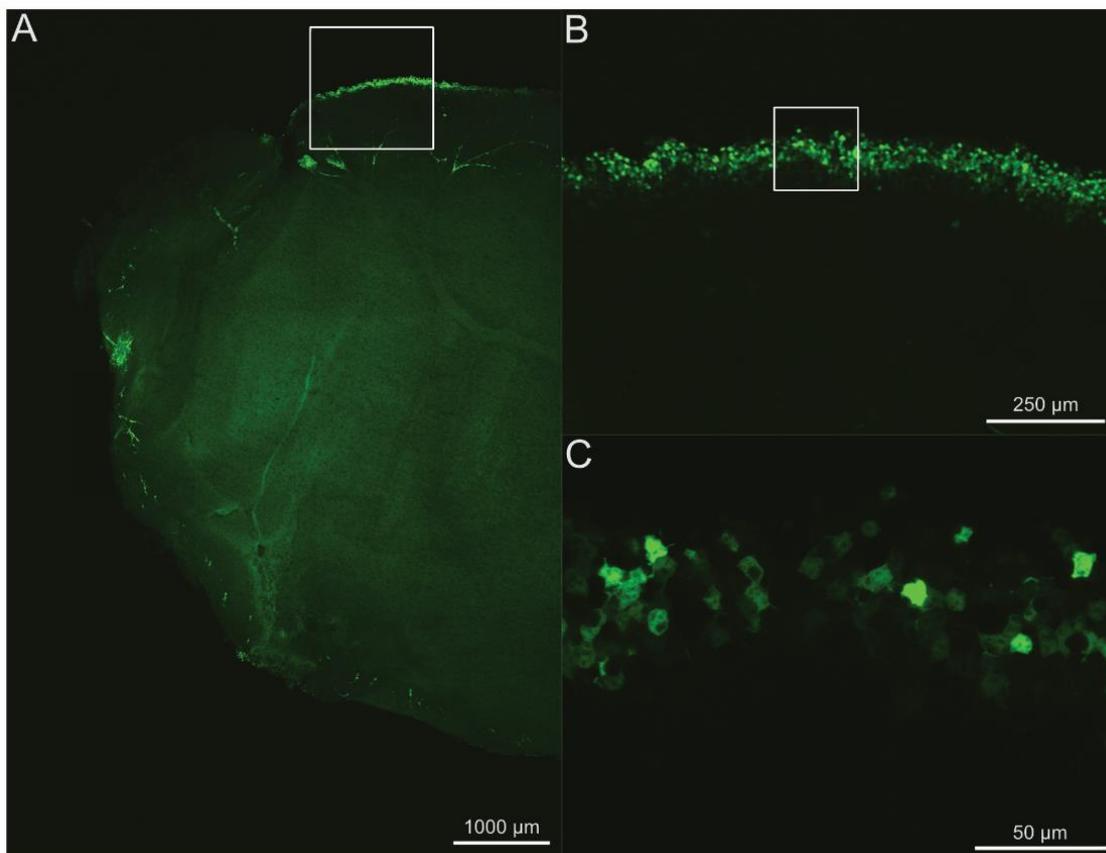


Abbildung 27: Wholemout eines mit AAV 2.1_sc-CMV_eGFP NN transduzierten porcinen Retina Explantats nach sieben Tagen Kultur.

A: Mit AAV behandeltes Retina Explantat im Ganzen, die grüne Fluoreszenz zeigt transduzierte Strukturen. Der Maßstab entspricht 1000 µm. **B:** 10-fache Vergrößerung des weißen Quadrats aus A. Die grüne Fluoreszenz zeigt sich in einem Randstreifen des Explantats. Der Maßstab entspricht 250 µm. **C:** 60-fache Vergrößerung des Quadrats aus B. Die grüne Fluoreszenz zeigt klar definiert transduzierte Strukturen am Rand des Explantats. Der Maßstab entspricht 50 µm.

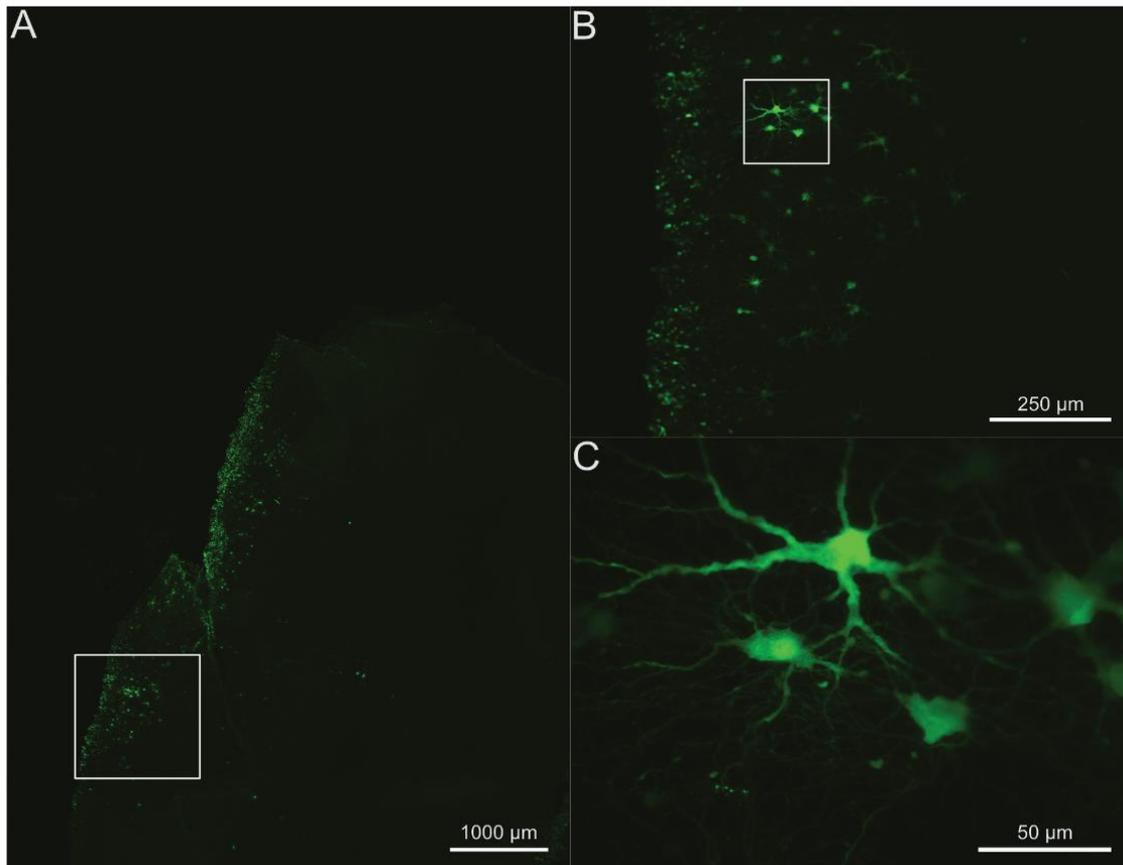


Abbildung 28: Wholemount eines mit AAV 2.1_sc-CMV_eGFP NN transduzierten porcinen Retina Explantats nach sieben Tagen Kultur.

A: Mit AAV behandeltes Retina Explantat im Ganzen, die grüne Fluoreszenz zeigt transduzierte Strukturen. Der Maßstab entspricht 1000 µm. **B:** 10-fache Vergrößerung des weißen Quadrats aus A. Die grüne Fluoreszenz zeigt sich in einem Randstreifen des Explantats sowie etwas weiter Richtung Mitte. Der Maßstab entspricht 250 µm. **C:** 60-fache Vergrößerung des Quadrats aus B. Die grüne Fluoreszenz zeigt klar definierte transduzierte Ganglienzellen. Der Maßstab entspricht 50 µm.

Nach sieben Tagen Kultur konnten im *Wholemount* der mit AAV 2.1_sc-CMV_eGFP NN transduzierten Retinakulturen transduzierte Strukturen ausgemacht werden. Diese befinden sich hauptsächlich am Rand des Explantats. Ohne Vergrößerung wird außerdem sichtbar, dass die Retina eine gewisse Eigenfluoreszenz zeigt, was auch für die Kapillaren gilt. Vergrößert man entsprechend grün fluoreszierende Stellen heraus, kann gesagt werden, dass diese Fluoreszenz spezifisch ist und sich klar vom Hintergrund mit der Eigenfluoreszenz abhebt. Während die meisten fluoreszierenden Strukturen im *Wholemount* nicht klar einem Zelltypen zugeordnet werden können, kann man in Abbildung 28 eindeutig Ganglienzellen identifizieren, da diese aufgrund ihrer Größe und Form einzigartig sind. Um zu klären, um welchen Zelltypen es sich bei den anderen transduzierten Strukturen handelt, wurden die Explantate wieder ausgedeckt und für

Gefrierschnitte aufbereitet, damit Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt werden konnten.

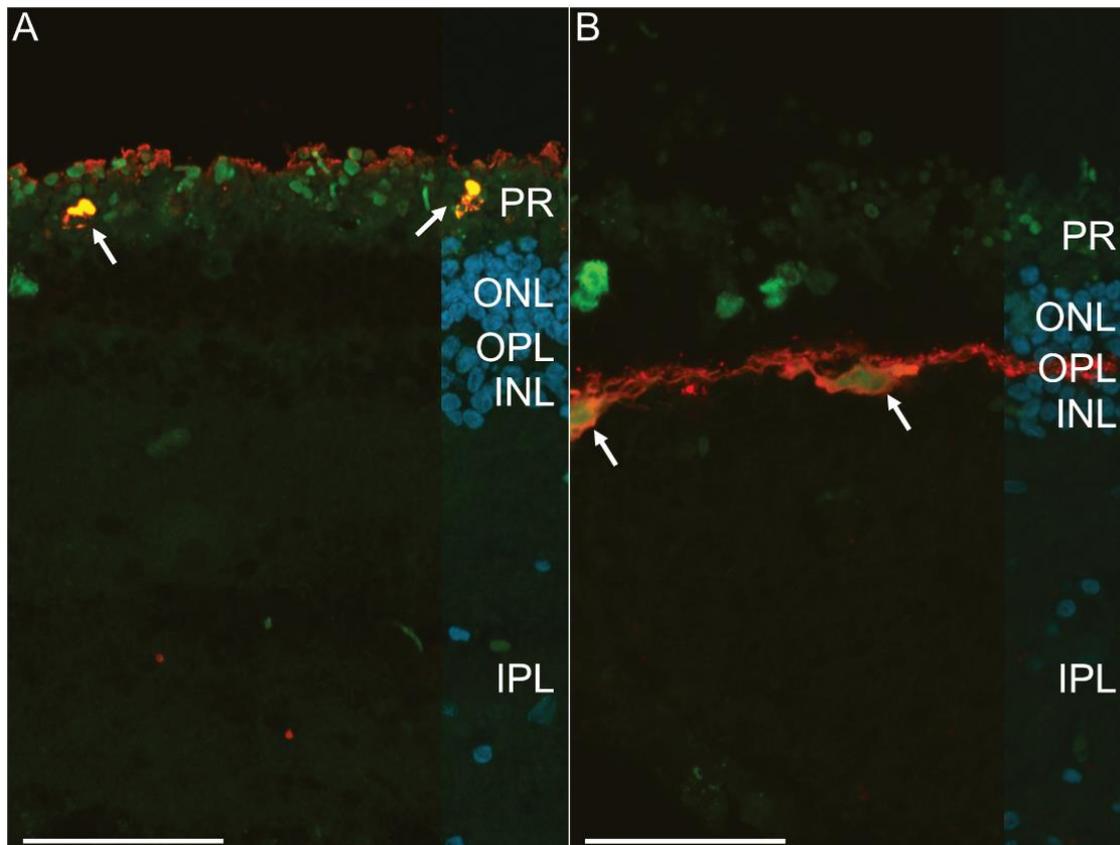


Abbildung 29: Expression von S-Opsin (A) und Calbindin (B) in mit AAV 2.1_sc-CMV_eGFP GL transduzierten Retina-Explantaten nach sieben Tagen Kultur.

A: Die S-Opsin-Färbung markiert Zapfen, die Lichtreize im kurzwelligen Bereich verarbeiten und wird in Rot dargestellt, die DAPI-Kernfärbung in Blau. Transduzierte Strukturen fluoreszieren in Grün. Eine Kolokalisation von roter und grüner Fluoreszenz wird durch die weißen Pfeile markiert. B: Die Calbindin-Färbung markiert Horizontalzellen und wird in Rot dargestellt, die DAPI-Kernfärbung in Blau (anteilig gezeigt). Transduzierte Strukturen fluoreszieren in Grün. Eine Kolokalisation von roter und grüner Fluoreszenz wird durch die weißen Pfeile markiert. PR = Photorezeptorschicht, ONL = äußere Körnerschicht, OPL = äußere plexiforme Schicht, INL = innere Körnerschicht, IPL = innere plexiforme Schicht. Der Maßstab entspricht 50 µm.

Bei den mit AAV 2.1_sc-CMV_eGFP GL transduzierten Explantaten ist nach sieben Tagen Kultur und späterer Immunfluoreszenzfärbung gegen S-Opsin an einigen Stellen eine Kolokalisation mit der Expression des eGFP zu sehen. Daher kann davon ausgegangen werden, dass zumindest einige Zapfen-Photorezeptoren transduziert werden konnten. Auch nach der Immunfluoreszenzfärbung gegen Calbindin, welches die Horizontalzellen in der Retina markiert, ist eine Kolokalisation mit dem exprimierten eGFP zu erkennen, auch dieser Zelltyp konnte also erreicht werden. Wie auch schon im *Wholemout* zu erkennen war, liegen die transduzierten Zellen eher am Rand des Explantates.

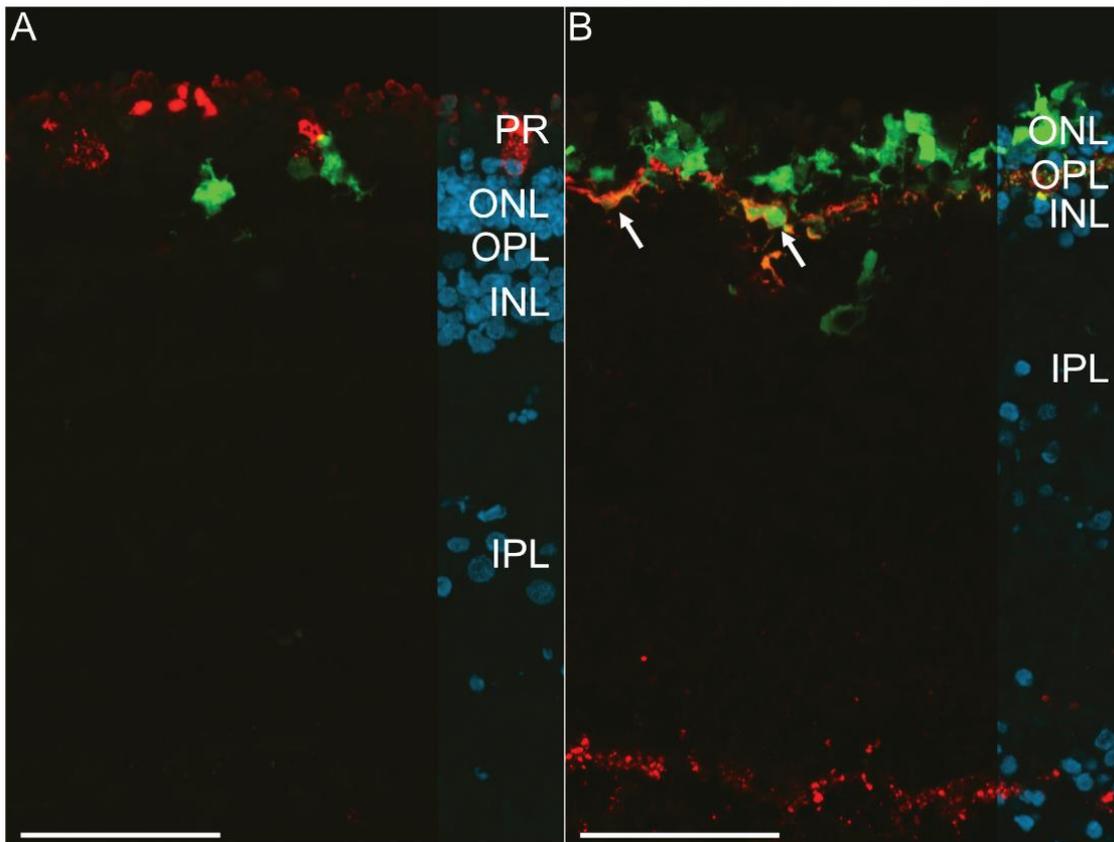


Abbildung 30: Expression von S-Opsin (A) und Calbindin (B) in mit AAV 2.1_sc-CMV_eGFP NN transduzierten Retina-Explantaten nach 14 Tagen Kultur.

A: Die S-Opsin-Färbung markiert Zapfen, die Lichtreize im kurzwelligen Bereich verarbeiten und wird in Rot dargestellt, die DAPI-Kernfärbung in Blau. Transduzierte Strukturen fluoreszieren in Grün. **B:** Die Calbindin-Färbung markiert Horizontalzellen und wird in Rot dargestellt, die DAPI-Kernfärbung in Blau (anteilig gezeigt). Transduzierte Strukturen fluoreszieren in Grün. Eine Kolokalisation von roter und grüner Fluoreszenz wird durch die weißen Pfeile markiert. PR = Photorezeptorschicht, ONL = äußere Körnerschicht, OPL = äußere plexiforme Schicht, INL = innere Körnerschicht, IPL = innere plexiforme Schicht. Der Maßstab entspricht 50 µm.

Bei den mit AAV 2.1_sc-CMV_eGFP NN transduzierten Explantaten sind nach 14 Tagen Kultur einige grün fluoreszierende Strukturen zu sehen. Nach einer Immunfluoreszenzfärbung gegen S-Opsin konnte keine Kolokalisation ausgemacht werden und die Erhaltung der Zapfen-Photorezeptoren war generell eher schlecht. Wie auch zuvor bei AAV 2.1_sc-CMV_eGFP GL konnte hier dennoch eine Kolokalisation mit der Färbung gegen Calbindin festgestellt werden. Die transduzierten Horizontalzellen sind in Abbildung 30 mit weißen Pfeilen markiert.

Generell kann gesagt werden, dass die Erhaltung der transduzierten Präparate nicht so gut ist, wie sie zuvor mit dem Medium +100 N-2 nach bis zu 28 Tagen Kulturdauer erreicht werden konnte. Die Kernschichten sowie die Gesamtdicke der Retina sind im Vergleich eher dünn. Um die Gewebeerhaltung genauer beurteilen zu können, wurde noch eine

Immunfluoreszenzfärbung gegen PKC α durchgeführt, wie sie zuvor für die Beurteilung der Integrität verwendet wurde.

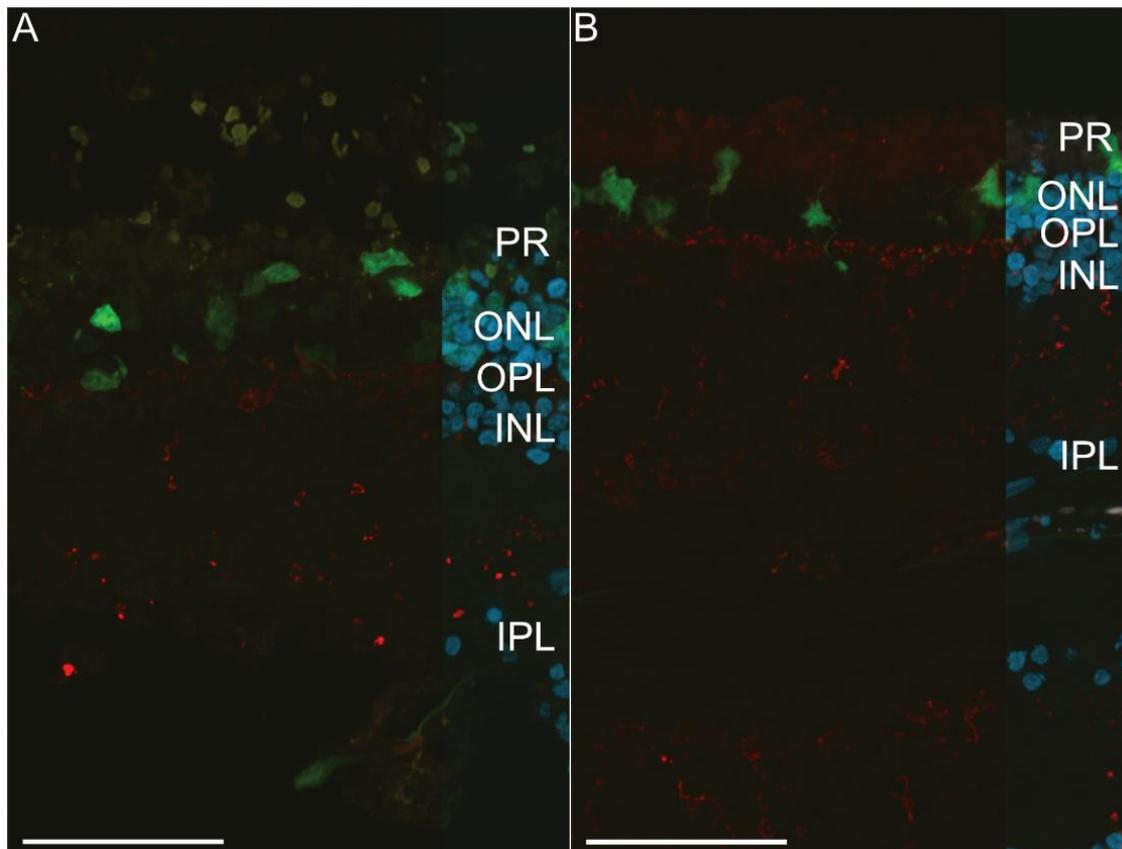


Abbildung 31: Expression des Stäbchenbipolarzellen-Markers Proteinkinase C alpha (PKC α) in mit AAV 2.1_sc-CMV_eGFP GL (A) oder AAV 2.1_sc-CMV_eGFP NN (B) transduzierten Retina-Explantaten nach sieben bzw. 14 Tagen Kultur.

Die PKC α -Färbung zeigt Stäbchenbipolarzellen und wird in Rot dargestellt, die DAPI-Kernfärbung in Blau. Transduzierte Strukturen fluoreszieren in Grün. PR = Photorezeptorschicht, ONL = äußere Körnerschicht, OPL = äußere plexiforme Schicht, INL = innere Körnerschicht, IPL = innere plexiforme Schicht. Der Maßstab entspricht 50 μ m.

Nach der Transduktion der Retinakulturen mit den Vektoren AAV 2.1_sc-CMV_eGFP GL und AAV 2.1_sc-CMV_eGFP NN und anschließender Kultur für sieben bzw. 14 Tage sind die Stäbchenbipolarzellen nicht gut erhalten. Weder Perikaryen noch Axone können mehr richtig ausgemacht werden und auch die Kernschichten, die durch die DAPI-Färbung sichtbar gemacht werden, sind sehr dünn.

Zusätzlich zu den vorher genannten AAVs wurden die Retinakulturen noch mit AAV 2.1_sc-CMV_eGFP 7m8 und AAV 2.1_sc-CMV_eGFP wt behandelt. Retina Explantate nach der Transduktion mit diesen Vektoren zeigten kaum bis keine Fluoreszenz und wurden daher hier nicht dargestellt.

4. Diskussion

4.1 Die porcine organotypische Retinakultur

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Retina-Explantate mindestens drei Wochen in Kultur halten zu können, ohne dass eine signifikante Degeneration im Zeitverlauf stattfinden konnte. Für die Etablierung der porcinen organotypischen Retinakultur wurden mehrere publizierte Protokolle getestet. Dabei sind einige Punkte aufgefallen, die für die Zwecke dieser Arbeit verändert oder ganz neu erdacht werden mussten.

4.1.1 Präparation

Noch vor der Präparation der Schweineaugen müssen diese bei einem lokalen Metzger oder Schlachter bestellt und abgeholt werden. Hier ist es besonders wichtig, dass die Bedingungen zur Dekontamination der Tiere und somit auch der Augen besprochen werden. Oft werden die ganzen Tieren nach der Tötung und vor dem Zerlegen komplett abgeflammt oder in einer Dampfdruckkammer dekontaminiert. Beide Methoden sind für Augen, die für Forschungszwecke genutzt werden sollen, dringend zu vermeiden. Durch die einwirkende Hitze degeneriert die Retina im Anschluss deutlich schneller und auch der Glaskörper lässt sich nur schwer vollständig von der Retina lösen, ohne diese zu beschädigen. Demnach ist es besonders wichtig, dass die Augen bei der Dekontaminationsprozedur des Metzgers ausgespart werden, oder die E nukleation sogar davor stattfindet, soweit das möglich ist. Ein weiterer wichtiger Faktor ist der Transport der Augen zum Labor. Es ist notwendig, dass die Augen so schnell wie möglich in eiskalten Transportpuffer gegeben werden und so auch zum Labor gebracht werden. Auch hier spielt die Zeit eine besondere Rolle. Svare *et al.* fanden heraus, dass Retinae, die neunzig Minuten nach E nukleation in Kultur genommen wurde, deutlich besser erhalten bleiben, als Retinae, die erst nach 240 Minuten in Kultur genommen wurden (Svare et al. 2021). Ähnliche Erfahrungen wurden auch bei dieser Arbeit gemacht und es wird versucht, den kompletten Versuch in unter zwei Stunden nach E nukleation abzuschließen. Dadurch ist es im Schnitt möglich, zwölf bis maximal 18 Explantate pro Versuch in Kultur zu nehmen. Außerdem ist es hilfreich, die Konzentration der Antibiotika und Antimykotika im Transportpuffer mit zehn Prozent vergleichsweise hoch zu halten, damit Mikroorganismen gar nicht erst die Chance haben sich auszubreiten. Zusätzlich ist auch ein Eintauchen in siebzigprozentigen Ethanol vor dem Eröffnen des Auges angebracht und wird auch von anderen Forschungsgruppen so gehandhabt (Kuehn et al. 2016; Wagner et al. 2020).

4.1.2 Kulturmedium

Um eine möglichst gute Gewebeerhaltung zu ermöglichen, ist es außerdem von großer Bedeutung ein Kulturmedium zu finden, welches Inhaltsstoffe enthält, die die Erhaltung unterstützen. Die meisten veröffentlichten Protokolle empfehlen, Neurobasal-A Medium zu verwenden und dieses mit veränderlichen Anteilen von fötalem Kälberserum (FKS), L-Glutamin, verschiedenen Antibiotika und/oder Antimykotika und B-27 zu supplementieren; manche verwenden auch DMEM als Grundbestandteil und setzen N-2 zu (Bell et al. 2016; Wiley et al. 2018; Wagner et al. 2020). Für diese Arbeit wurden verschiedene Zusammensetzungen getestet, da mit den Standard-Medien keine guten Ergebnisse erzielt werden konnten.

Neurobasal-A Medium ist ein spezielles Zellkulturmedium für neuronale Systeme und soll laut Hersteller für optimale Bedingungen mit B-27 supplementiert werden. B-27 ist ein chemisch definiertes Supplement und enthält Vitamine, Proteine, Enzyme und Fettsäuren, deren Anteile spezielle auf Neuronen ausgelegt sind. L-Glutamin als essentielle Aminosäure ist hauptsächlich wichtig als Stickstoffquelle. Antibiotika bzw. Antimykotika werden zugesetzt, um Kontaminationen der Kulturen zu vermeiden, was im Hinblick darauf, dass die Schweineaugen bei Schlachtung nicht dekontaminiert werden können, einen besonderen Stellenwert einnimmt. Für postmitotische Neuronen wird zusätzlich empfohlen, dem Medium N-2 zuzusetzen. Die organotypischen Retinakulturen in dieser Arbeit zeigten die beste Gewebeerhaltung mit Neurobasal-A Medium, B-27, L-Glutamin, N-2 und anti-anti, welches eine kommerziell erhältliche Mischung aus den Antibiotika Penicillin und Streptomycin sowie dem Antimykotikum Amphotericin B ist. Die Glucosekonzentration wurde mit 100 mg/dl als optimal befunden, was dem physiologischen Level entspricht. Eine zu hohe Glucosekonzentration wirkt neurotoxisch und ist daher auch für organotypische Kulturen zu vermeiden (Tomlinson und Gardiner 2008; Bahniwal et al. 2017). Um diese Konzentration zu erhalten, werden hier die beiden kommerziell erhältlichen Neurobasal-A Medien gemischt (vgl. Abschnitt 2.1.4).

Fötales Kälberserum wird schon lange fast standardmäßig als Zusatz in Zellkulturmedien verwendet, da es verschiedene Stoffe wie Wachstumsfaktoren, Proteine, Vitamine, Spurenelemente und Hormone enthält, die essentiell für Wachstum und Erhalt von Zellen und Gewebe sind. Trotz aller Vorteile von FKS und möglicher Vorurteile gegenüber einer Neuetablierung von Protokollen mit Ersatzstoffen, sollte dennoch wenn möglich auf

Serum verzichtet werden. Die Kontroverse gegenüber FKS beruht vor allem auf der Tatsache, dass die *batch-to-batch* Variabilität der Zusammensetzung mitunter relativ groß ausfallen kann und man immer noch nicht genau weiß, welche Bestandteile enthalten sind (van der Valk et al. 2010). Dazu kommt, dass die Gewinnung von FKS aus Kälberföten mit einem Leiden dieser einhergeht und daher ohnehin zu vermeiden ist (van der Valk et al. 2004). Im Sinne der *good cell culture practice* (GCCP) sollte wenn möglich auf chemisch definierte Medien oder andere serumfreie Systeme zurückgegriffen werden (Hartung et al. 2002). Dass für die organotypische Retinakultur in dieser Arbeit generell auf FKS verzichtet wird, weil die Gewebeerhaltung unter Verwendung von Serum schlechter ist, ist also auch im Sinne des 3R-Prinzips und der GCCP sehr sinnvoll.

Betrachtet man die Ergebnisse unter Abschnitt 3.3, dann wird deutlich, dass das Medium +100 N-2 die besten Bedingungen für die Kultur bietet. Die Erhaltung von physiologischer Zellkernmorphologie, Stäbchen-Bipolarzellen, sowie Photorezeptor-Innen- und Außensegmenten ist hier gemessen an der Gewebequalitätspunktzahl am ehesten gegeben. Warum die Retina-Explantate ohne FKS am besten erhalten bleiben, lässt sich nicht abschließend klären, da zu viele Bestandteile des Serums unbekannt bleiben. Möglicherweise kommt es zu einer Unverträglichkeit der Bestandteile aufgrund speziesspezifischer Unterschiede zwischen Schwein und Rind. Dass Medien mit Insulin eine gute Gewebeerhaltung begünstigen, mag daran liegen, dass fehlendes Insulin unter anderem eine Rolle bei der Degeneration von retinalen Ganglienzellen spielt (Al Hussein Al Awamlh et al. 2021). In einer kürzlich veröffentlichten Publikation konnte zudem gezeigt werden, dass neurotrophische Faktoren aus iPSCs wie *Insulin-like growth factor 1* (IGF-1) die Gewebeerhaltung von porcinen Retinakulturen verbessern (Rettinger et al. 2021). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Insulin selber eine anti-apoptische Wirkung in murinen Retina-Explantaten besitzt (Duenker et al. 2005). Die Verwendung von L-Glutamin, B-27 und N-2 deckt sich mit bisherigen Veröffentlichungen.

Falls zukünftig eine weitere Optimierung des Mediums notwendig sein sollte, könnte eine Zugabe von humanem Plättchenlysat eine vielversprechende Möglichkeit darstellen, um Wachstumsfaktoren, Hormone und ähnliches zuzuführen. Humanes Plättchenlysat wird aus menschlichem Blut gewonnen und kann entweder selbst extrahiert oder käuflich erworben werden. In vielen Studien wird es in Kombination mit Heparin als Alternative zu FKS verwendet (Carducci et al. 2016; Mohamed et al. 2020).

Auch eine Co-Kultur mit anderen Zelltypen wie beispielsweise retinalen Pigmentepithelzellen kann zu einer Verbesserung der Gewbeerhaltung führen. Di Lauro *et al.* beschreiben, dass eine solche Co-Kultur zu einer vergleichsweise besseren Erhaltung von Photorezeptoren, weniger Gliose und einer größeren Gesamtdicke führen kann (Di Lauro *et al.* 2016). Ähnliche Ergebnisse werden auch bei einer Co-Kultur mit humanen neuronalen Vorläuferzellen (hNPC) erreicht (Mollick *et al.* 2016). Die Ergebnisse dieser beiden Studien wurden jedoch bereits nach drei bzw. neun Tagen Kultur zusammengetragen und können daher nicht ohne weiteres auf längerfristige Versuche übertragen werden, wie sie in dieser Arbeit gemacht wurden.

4.1.3 Kulturdauer

Schaut man auf verschiedene Publikationen zum Thema retinale Kulturen, ist eine Kulturdauer von etwa sieben bis zehn Tage die Regel (Taylor *et al.* 2014; Schnichels *et al.* 2019; Wagner *et al.* 2020). Um potentielle Therapien testen zu können und auch um altersbedingte neurodegenerative Vorgänge besser modellieren zu können, war es ein Ziel dieser Arbeit, die Retina-Explantate mindestens drei Wochen in Kultur halten zu können.

Betrachtet man die Ergebnisse in Abschnitt 3.4, dann wird sichtbar, dass dieses Ziel erreicht werden konnte. Die Retinakulturen konnten bis zu einer Dauer von 28 Tagen so in Kultur gehalten werden, dass keine zu große Degeneration stattgefunden hat. Dennoch ist eine kürzere Dauer als besser anzusehen und zukünftige Experimente sollten nur so lange wie unbedingt nötig dauern, um die besten Ergebnisse zu erhalten. Alleine das Umschreiben des einzelsträngigen AAV-Genoms in doppelsträngige DNA dauert für gewöhnlich sehr lange, was zu einer starken Expression erst nach etwa 14-28 Tagen führt, was von Serotyp zu Serotyp unterschiedlich ist (McCarty 2008). Vor allem bei neueren rekombinanten AAVs ist die maximale Expression schon früher erreicht. Durch die Verwendung von *self-complementary* AAVs (scAAVs) kann zudem die lange Zeit, die zum Umschreiben in doppelsträngige DNA benötigt wird, umgangen werden, aber dennoch dauert das Erreichen einer stabilen Expression auch hier seine Zeit und erreicht ihren Höhepunkt meist nach etwa zwei Wochen (McCarty 2008; Colella und Auricchio 2012). Bedenkt man außerdem, dass zukünftige Therapien auch mehrfach administriert werden könnten, ist eine längere Kulturdauer auch hier ein großer Fortschritt, um dies zu modellieren. Eine solche wiederholte Dosierung steigert für gewöhnlich die Effektivität zum Beispiel bei Verwendung von Nanopartikeln (Da Sun *et al.* 2022; Xi *et al.* 2022).

Bei wiederholter Dosierung stellt sich aber wiederum die Frage nach der Toxizität oder möglicher Überdosierung.

Ob eine noch längere Kulturdauer möglich wäre, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht getestet. Hier stellt sich jedoch auch die Frage, ob dies sinnvoll wäre oder für noch länger andauernde Studien eher andere Modelle wie Organoide zurate gezogen werden sollten.

4.1.4 Einführung der Gewebequalitätspunktzahl

Die Einführung der Gewebequalitätspunktzahl bietet eine einfache Möglichkeit, die Gewebeerhaltung vieler Präparate zu klassifizieren und zu vergleichen. Angelehnt an den *tissue damage score* von Svare *et al.* wurde ein Schema gesucht, welches einfach und schnell angewendet werden kann und eine Vergleichbarkeit bei der Bewertung schafft (Svare *et al.* 2021). Für die Anwendung in dieser Arbeit wurde die Gewebequalitätspunktzahl so entwickelt, dass die Ergebnisse der hier standardmäßigen Immunfluoreszenzfärbungen für Photorezeptoren und Stäbchen-Bipolarzellen berücksichtigt werden können. Eine zusätzliche Messung der Gesamt- und ONL-Dicke sollte Aufschluss darüber geben, wie integer das Retina-Explantat noch ist.

Eine Erweiterung der Gewebequalitätspunktzahl auf weitere Zelltypen könnte für zukünftige Experimente eine gute Möglichkeit sein, noch präzisere Aussagen über die Gewebeerhaltung treffen zu können. Trotz allem bleibt eine solche Beurteilung immer subjektiv. Neben der rein histologischen Analyse wären also zusätzlich auch transkriptom-basierte Methoden nützlich, um eine objektive Quantifizierung verschiedener Faktoren erreichen zu können (Xi *et al.* 2022). Auch Genexpressionsstudien, wie sie im Labor für experimentelle Ophthalmologie bereits zuvor für murine Retinakulturen durchgeführt wurden, könnten weiter Aufschluss geben, wie die Gewebeerhaltung sich im Laufe der Zeit verhält (Wagner 2019).

4.2 Transduktion der Retina Explantate

Die Transduktion der porcinen Retina-Explantate mit wildtypischen sowie capsid-modifizierten AAVs verlief erfolgreich. In Abschnitt 3.5 sind beispielhaft Bilder gezeigt, auf denen die transduzierten Strukturen der Retina durch grüne Fluoreszenz sichtbar wurden. Die grüne Fluoreszenz war hauptsächlich am Rand der Retina-Explantate zu sehen, was darauf hindeutet, dass die AAVs an den verletzten Stellen des Explantats zuerst angreifen. Ein solches Phänomen ist auch in anderen Publikationen zu finden und kann besonders gut an *Wholemounds* beobachtet werden (Xi *et al.* 2022). Zusätzlich

konnte jedoch beobachtet werden, dass die mit AAV behandelten Retinae nicht so gut erhalten bleiben, wie die Kontroll-Explantate, die nicht oder nur mit PBS behandelt wurden. Möglicherweise waren die AAVs zu hoch dosiert und wirkten daher leicht toxisch auf die Retina. Dass die Integrität der transduzierten Explantate nicht so gut erscheint, kann aber auch daran liegen, dass nur die Randstücke betrachtet wurde, da dort grundsätzlich grüne Fluoreszenz zu sehen war. Da die Explantate jedoch am Rand zuerst dünner werden, könnte dies das Ergebnis leicht verfälscht haben. Bei Betrachtung der anderen, nicht mit AAV behandelten, Präparate wurde der Randbereich außer Acht gelassen und zuerst ein substantielles Stück der Retina zugeschnitten, bevor die Schnitte aufgezoogen wurden, weshalb die Vergleichbarkeit eventuell nicht ausreichend sein könnte.

Vergleicht man die Ergebnisse dieser Arbeit mit Publikationen, für die andere Spezies verwendet wurden, dann kann man zum Beispiel feststellen, dass die auch hier verwendeten AAV 2.1_sc-CMV_eGFP GL und NN in der Maus, im Affen und im Hund *in vivo* sowie in der humanen Retinakultur sehr gut Photorezeptoren transduzieren konnten (Pavlou et al. 2021). AAV9-basierte Vektoren wie AAV-PHP.eB haben in der Maus viele Zelltypen transduzieren können, darunter Photorezeptoren, Ganglienzellen und Horizontalzellen und können subretinal, intravitreal, retroorbital sowie intravenös verabreicht werden (Simpson et al. 2019; Palfi et al. 2022). In Tabelle 14 werden verschiedene AAVs in Hinblick auf ihre Transduktionseffizienz bei unterschiedlichen Spezies verglichen.

Tabelle 14: Beispiele für AAVs, die in anderen Veröffentlichungen verschiedene retinale Zelltypen in unterschiedlichen Spezies transduzieren konnten.

AAV	Zelltyp	Applikation	Spezies	Referenz
AAV 2.1_sc-CMV_eGFP 7m8	Ganglienzellen, Müllerzellen, Amakrinzellen, Bipolarzellen, Photorezeptoren, RPE-Zellen	intravitreal	Maus <i>in vivo</i> , Affe <i>in vivo</i>	(Dalkara et al. 2013)
AAV 2.1_sc-CMV_eGFP GL	Photorezeptoren	intravitreal	Maus <i>in vivo</i> , Hund <i>in vivo</i> , Affe <i>in vivo</i> , Mensch <i>in vitro</i> (Retinakultur)	(Pavlou et al. 2021)
AAV 2.1_sc-CMV_eGFP NN	Photorezeptoren	intravitreal	Maus <i>in vivo</i> , Hund <i>in vivo</i> , Affe <i>in vivo</i> , Mensch <i>in vitro</i> (Retinakultur)	(Pavlou et al. 2021)
AAV 2.1_sc-CMV_eGFP wt	Photorezeptoren (wenige)	intravitreal	Maus <i>in vivo</i> , Hund <i>in vivo</i>	(Pavlou et al. 2021)
AAV-PHP.eB-CMV-EGFP	Horizontalzellen, Ganglienzellen, Amakrinzellen	intravenös	Maus <i>in vivo</i>	(Palfi et al. 2022)
	Horizontalzellen, Ganglienzellen, Amakrinzellen	intravitreal		
	Photorezeptoren, RPE-Zellen	subretinal		
AAV-PHP.eB CAG-tdTomato	Horizontalzellen, Ganglienzellen, Bipolarzellen	retroorbital	Maus <i>in vivo</i>	(Simpson et al. 2019)
	Ganglienzellen	intravitreal		
	Photorezeptoren	subretinal		

Tabelle 15: In dieser Arbeit suprachoroidal verwendete AAVs und Zelltypen, die in porcinen Retina Explantaten transduziert werden konnten.

AAV	Zelltyp
AAV 2.1_sc-CMV_eGFP GL	Zapfen-Photorezeptoren, Horizontalzellen
AAV 2.1_sc-CMV_eGFP NN	Horizontalzellen, Ganglienzellen

Betrachtet man die AAVs, die sowohl für diese Arbeit als auch für andere Publikationen verwendet wurden, dann fällt auf, dass in dieser Arbeit zuerst einmal weniger Photorezeptoren erreicht werden konnten. Zusätzlich zu der Transduktion von Zapfen-Photorezeptoren konnten hier jedoch auch Horizontal- und Ganglienzellen erreicht werden. Die Unterschiede könnten durch die Testung in unterschiedlichen Spezies erklärt werden. Eine Untersuchung weiterer AAVs wie beispielsweise des in Tabelle 14 aufgeführten AAV-PHP.eB und deren Verwendung in Retinakulturen könnte in Zukunft sinnvoll sein, um eventuell einen größeren Anteil an Photorezeptoren transduzieren zu können. Für zukünftige Therapien scheint es jedenfalls enorm wichtig, dass der verwendete Vektor genau auf die gewünschte Spezies angepasst wird, da die Ergebnisse aus vorangegangenen Studien eventuell nur bedingt übertragen werden können.

Da gerade Gentherapien, die auf CRISPR/Cas beruhen, die Kapazität von einem AAV oft überschreiten, werden verschiedene Alternativen gesucht. Sowohl *dual-AAV* als auch lentivirale Strategien sind als virusbasierte Systeme zu nennen und bieten größere Kapazitäten (Trapani 2018; McClements et al. 2020; Cheng und Punzo 2022). Nicht-virale Strategien wie Nanopartikel und lipid-basierte Systeme rücken jedoch immer mehr in den Fokus der Forschung, da sie kaum Kapazitätsbeschränkungen haben und auch weniger Entzündungsreaktion im Organismus hervorrufen (Masri et al. 2019; Salman et al. 2022; Da Sun et al. 2022). Der Applikationsweg spielt zudem auch eine wichtige Rolle, um die möglichen Komplikationen einer Behandlung zu minimieren und die Anwendung auch für das ärztliche Personal so leicht wie möglich zu machen, ohne dass die Qualität der Therapie darunter leidet (Han et al. 2020). Intravenöse Injektionen wie von Palfi *et al.* beschrieben, scheinen auf den ersten Blick auch eine praktikable und einfache Lösung für die Administrierung von AAVs zu sein, hier werden jedoch auch andere Organe wie die Leber erreicht und die Dosis muss in der Regel deutlich höher ausfallen, was wiederum zu Komplikationen führen könnte (Palfi et al. 2022).

Die verschiedenen Applikationswege können an der Retinakultur ein Stück weit nachgestellt werden, indem die AAV-Lösung auf die Photorezeptor- oder die Ganglienzellseite appliziert wird. Intravitreale Injektionen können so aber nicht vollständig nachgebildet werden, weil limitierende Strukturen wie der Glaskörper oder die innere limitierende Membran nicht mehr vorhanden bzw. nicht mehr vollständig intakt sind.

Durch die reine histologische Analyse kann jedoch nicht wirklich quantifiziert werden, wie gut welche Zelltypen transduziert werden. Hier könnten in Zukunft eher transkriptom-basierte Methoden, wie sie von Xi *et al.* beschrieben wurden, eingesetzt werden (Xi et al. 2022). Es verhält sich hier also ähnlich, wie es oben schon bei der Gewebequalitätspunktzahl beschrieben wurde.

Da aber nun gezeigt werden konnte, dass die porcine organotypische Retinakultur ein gut geeignetes Modell für solche Screenings ist, können zukünftig auch andere Therapiestrategien hieran getestet werden.

4.3 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass porcine organotypische Retinakulturen ein gut geeignetes Modell sind, um degenerative Vorgänge der humanen Netzhaut zu modellieren und darüber hinaus geeignet sind, um Therapiestrategien gegen erbliche Netzhautdystrophien zu testen.

Um noch mehr über die porcine Retinakultur zu lernen, könnten in Zukunft Genexpressions- oder Transkriptom-Studien durchgeführt werden. Auch eine funktionelle Analyse mittels *multi-electrode-array* wäre eine gute Möglichkeit, um tiefere Einblicke zu erlangen. Die Testung von verschiedenen Therapiestrategien basierend auf Nanopartikeln, Liposomen oder lentiviralen Systemen an diesem Retina-Kultursystem bietet sich an, da dies einfach und kostengünstig möglich wäre und zudem zur Reduktion von *in vivo* Tierversuchen beiträgt.

5. Zusammenfassung

Erbliche Retinadystrophien sind eine sehr heterogene Gruppe an Erkrankungen mit insgesamt über zwei Millionen Betroffenen und können bisher nicht geheilt werden. Durch die große Heterogenität und die sehr vielen betroffenen Gene, bietet es sich an, zur Therapie dieser Erkrankungen gentherapeutische Strategien zu erforschen. Das Auge ist für solche Methoden hervorragend geeignet, da es ein Immunprivileg besitzt und sehr gut zugänglich ist. Für die Erforschung von Gentherapien werden verschiedene Modellsysteme verwendet, um die Wirkung und eventuelle unerwünschte Reaktionen abschätzen zu können. Neben der Zellkultur und Organoiden werden hierfür *in vitro* organotypische Kulturen eingesetzt. Schweineaugen eignen sich dabei besonders gut, da sie anatomisch sehr nah am menschlichen Auge liegen. Ziel dieser Arbeit war es, ein porcines organotypisches Langzeit-Kulturmodell zu etablieren, an dem zukünftige gentherapeutische Ansätze getestet werden können. Zusätzlich sollten verschiedene AAVs auf ihre Transduktionseffizienz in dieser Kultur getestet werden, um einen Grundstein für den Test von AAV-vermittelten Gentherapien zu legen.

Dazu wurden unterschiedliche Kulturmedien auf der Basis von Neurobasal-A-Medium getestet und die Gewebeerhaltung mit Hilfe einer eigens entwickelten Gewebequalitätspunktzahl kategorisiert. Auch wurde die Gewebeerhaltung über einen Zeitraum von 28 Tagen in regelmäßigen Abständen beurteilt, um feststellen zu können, wie lange die Retina Explantate ohne signifikante Qualitätsverlust in Kultur gehalten werden können.

Die Ergebnisse zeigten, dass das Kulturmedium $-+100$ N-2, welches B-27 mit Insulin, L-Glutamin, Antibiotic-Antimycotic, N-2 und kein FKS bei einer Glucosekonzentration von 100 mg/dl enthielt, am besten geeignet ist, die Integrität der Retinakulturen über einen Zeitraum bis zu zwölf Tagen aufrechtzuerhalten. Sowohl Photorezeptoren als auch Stäbchen-Bipolarzellen und Zellkerne waren nach dieser Zeit gut erhalten und die Dicke von Retina und der ONL im Speziellen blieb stabil. Weitere Versuche konnten zeigen, dass die Retina Explantate mit diesem Medium bis zu zwanzig Tage sehr gut in Kultur gehalten werden konnten, aber auch nach 28 Tagen noch eine gewisse Integrität aufweisen konnten. Die Transduktionsversuche mit verschiedenen AAVs zeigten, dass es grundsätzlich möglich ist, verschiedene Zelltypen in der porcinen Retinakultur zu erreichen. Es gelang sowohl Zapfen-Photorezeptoren als auch Horizontal- und

Ganglienzellen zu transduzieren, was durch grüne Fluoreszenz des exprimierten eGFP nachgewiesen werden konnte.

Grundsätzlich lässt sich also resümieren, dass die porcine Retinakultur gut für die Testung von gentherapeutischen Strategien geeignet ist. Dies kann zusätzlich auch zu einer Verringerung der Versuchstierzahlen für *in vivo* Versuche beitragen.

6. Summary

Inherited retinal dystrophies are a very heterogeneous group of diseases with a total of more than two million people affected and cannot yet be cured. Due to the great heterogeneity and the large number of genes affected, gene therapy strategies are being explored to treat these diseases. The eye is very suitable for such methods because of its immune privilege and accessibility. For researching gene therapies, model systems are used in order to be able to assess the desired effect and possible side effects. In addition to cell culture and organoids, *in vitro* organotypic cultures are used for this purpose. Pig eyes are particularly suitable for this purpose, as they are anatomically very close to the human eye. The aim of this work was to establish a porcine organotypic long-term culture model in which future gene therapy approaches can be tested. In addition, different AAVs were tested for their transduction efficiency in this culture in order to lay a foundation for testing AAV-mediated gene therapies.

For this purpose, different culture media based on Neurobasal-A medium were tested and tissue preservation was categorised using a specially developed tissue quality score. Tissue preservation was also assessed at regular intervals over a 28-day period to determine how long retinal explants could be maintained in culture without significant loss of quality.

The results showed that the culture medium --+100 N-2 containing B-27 with insulin, L-glutamine, antibiotic-antimycotic, N-2 and no FCS at a glucose concentration of 100 mg/dl was the best at maintaining the integrity of the retinal cultures for a period up to 12 days. Photoreceptors as well as rod bipolar cells and nuclei were well preserved at this timepoint and the thickness of the retina and the ONL in particular remained stable. Further experiments showed that retinal explants could be kept in culture for up to twenty days with little to no degradation with this medium, but still were somewhat integer after 28 days. The transduction experiments with different AAVs showed that it is basically possible to target different cell types in a porcine retinal culture. It was possible to transduce cone photoreceptors as well as horizontal and ganglion cells, as seen by the green fluorescence of the expressed eGFP from the vectors.

Basically, it can be concluded that porcine retinal culture is well suited for testing gene therapy strategies. This can also contribute to a reduction in the number of animals needed for *in vivo* experiments.

I. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
(h)iPSCs	<i>(Human) induced pluripotent stem cells</i> / (humane) induzierte pluripotente Stammzellen
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
AAV	Adeno-assoziiertes Virus
AMD	Altersbedingte Makuladegeneration
CMV-Promotor	Cytomegalovirus-Promotor
CRISPR	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	Doppelt-destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
eGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i> / verbessertes grün fluoreszierendes Protein
FCS / FKS	<i>Fetal calf serum</i> / Fötales Kälberserum
GCL	<i>Ganglion cell layer</i> / Ganglienzellschicht
GQP	Gewebequalitätspunktzahl
hESC	<i>Human embryonic stem cells</i> / Humane embryonale Stammzellen
hNPC	<i>Human neural progenitor cells</i> / Humane neurale Vorläuferzellen
ILM	Innere limitierende Membran
INL	<i>Inner nuclear layer</i> / Innere Körnerschicht
IPL	<i>Inner plexiform layer</i> / Innere plexiforme Schicht
IS	<i>Inner segments</i> / Innensegmente der Photorezeptoren
kB	Kilobasen

I. Abkürzungsverzeichnis

LCA	Lebersche kongenitale Amaurose
M	Molar
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
NFL	<i>Nerve fiber layer</i> / Nervenfaserschicht
ONL	<i>Outer nuclear layer</i> / Äußere Körnerschicht
OPL	<i>Outer plexiform layer</i> / Äußere plexiforme Schicht
OS	<i>Outer segments</i> / Außensegmente der Photorezeptoren
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> / phosphatgepufferte Salzlösung
PKC α	Protein Kinase C alpha
PNA	<i>Peanut agglutinin</i> / Erdnuss Agglutinin
PR	Photorezeptoren
rAAV	Rekombinantes adeno-assoziiertes Virus
RP	Retinitis Pigmentosa
RPE	Retinales Pigmentepithel
scAAV	<i>Self complementary</i> Adeno-assoziiertes Virus
vg	Vektorgenome
wt	Wildtyp

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema eines Sagittalschnittes durch den humanen Bulbus.....	2
Abbildung 2: Aufbau der Retina.	3
Abbildung 3: Die vier Phasen der neurodegenerativen Vorgänge in der Netzhaut.	7
Abbildung 4: Schematische Darstellung von subretinaler und intravitrealer Injektion. .	10
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Herstellung von rekombinanten AAVs (rAAV).	10
Abbildung 6: Schematische Darstellung der organotypischen Retinakultur.	25
Abbildung 7: Zeitlicher Ablauf der Retinakultur.	25
Abbildung 8: Übersicht über den Arbeitsablauf.	33
Abbildung 9: Expression des Stäbchen-Bipolarzellen-Markers Proteinkinase C alpha (PKC α) und des Gliafaser-Markers saures Gliafaserprotein (GFAP) in frisch fixierter porciner Retina.	36
Abbildung 10: Expression des Stäbchen-Bipolarzellen-Markers Proteinkinase C alpha (PKC α) in Retina Explantaten nach zwölf Tagen Kultur mit unterschiedlichen Medien.	37
Abbildung 11: Vergleich der verschiedenen Kulturmedien in Bezug auf die Erhaltung der Stäbchenbipolarzellen nach zwölf Tagen Kultur.	38
Abbildung 12: Expression des Zapfen-Photorezeptor-Markers Erdnuss Agglutinin (PNA), von S-Opsin für Zapfen-Photorezeptoren, die Reize im kurzwelligen Sehbereich verarbeiten und dem Stäbchen-Photorezeptor-Marker Rhodopsin in frisch fixierter porciner Retina.	39
Abbildung 13: Expression des Zapfen-Photorezeptor-Markers Erdnuss Agglutinin (PNA) in Retina Explantaten nach zwölf Tagen Kultur mit unterschiedlichen Medien.	40
Abbildung 14: Vergleich der verschiedenen Kulturmedien in Bezug auf die Erhaltung der Photorezeptor-Innensegmente nach zwölf Tagen Kultur.	41
Abbildung 15: Vergleich der verschiedenen Kulturmedien in Bezug auf die Erhaltung der Photorezeptor-Außensegmente nach zwölf Tagen Kultur.	42
Abbildung 16: Kernfärbung mit DAPI in Retina Explantaten nach zwölf Tagen Kultur mit unterschiedlichen Medien.	43
Abbildung 17: Vergleich der verschiedenen Kulturmedien in Bezug auf die Erhaltung der Zellkerne nach zwölf Tagen Kultur.	44

Abbildung 18: Messungen der Gesamt- und ONL-Dicke bei Retina-Explantaten nach zwölf Tagen Kultur. Vergleich zwischen verschiedenen Kulturmedien.....	45
Abbildung 19: Expression des Stäbchen-Bipolarzellen-Markers Proteinkinase C alpha (PKC α) in Retina Explantaten im Zeitverlauf von null bis 28 Tagen Kulturdauer mit dem Medium +100 N-2.....	48
Abbildung 20: Auswertung der Erhaltung von Stäbchenbipolarzellen in Retina Explantaten im Zeitverlauf von vier bis 28 Tagen Kulturdauer mit dem Medium +100 N-2 mithilfe der Gewebequalitätspunktzahl.	49
Abbildung 21: DAPI-Kernfärbung in Retina Explantaten im Zeitverlauf von null bis 28 Tagen Kulturdauer mit dem Medium +100 N-2.	51
Abbildung 22: Auswertung der Erhaltung der Zellkerne in Retina Explantaten im Zeitverlauf von vier bis 28 Tagen Kulturdauer mit dem Medium +100 N-2 mithilfe der Gewebequalitätspunktzahl.	52
Abbildung 23: Expression des Zapfen-Photorezeptor-Markers Erdnuss Agglutinin (PNA) in Retina Explantaten im Zeitverlauf von null bis 28 Tagen Kulturdauer mit dem Medium +100 N-2.	54
Abbildung 24: Auswertung der Erhaltung von Photorezeptor-Innensegmenten in Retina Explantaten im Zeitverlauf von vier bis 28 Tagen Kulturdauer mit dem Medium +100 N-2 mithilfe der Gewebequalitätspunktzahl.	55
Abbildung 25: Auswertung der Erhaltung von Photorezeptor-Außensegmenten in Retina Explantaten im Zeitverlauf von vier bis 28 Tagen Kulturdauer mit dem Medium +100 N-2 mithilfe der Gewebequalitätspunktzahl.	56
Abbildung 26: Messungen der Gesamt- und ONL-Dicke von Retina-Explantaten im Zeitverlauf zwischen null und 28 Tagen Kulturdauer mit dem Medium +100 N-2.	57
Abbildung 27: <i>Wholemout</i> eines mit AAV 2.1_sc-CMV_eGFP NN transduzierten porcinen Retina Explantats nach sieben Tagen Kultur.	58
Abbildung 28: <i>Wholemout</i> eines mit AAV 2.1_sc-CMV_eGFP NN transduzierten porcinen Retina Explantats nach sieben Tagen Kultur.	59
Abbildung 29: Expression von S-Opisin (A) und Calbindin (B) in mit AAV 2.1_sc-CMV_eGFP GL transduzierten Retina-Explantaten nach sieben Tagen Kultur.....	60
Abbildung 30: Expression von S-Opisin (A) und Calbindin (B) in mit AAV 2.1_sc-CMV_eGFP NN transduzierten Retina-Explantaten nach 14 Tagen Kultur.	61

Abbildung 31: Expression des Stäbchenbipolarzellen-Markers Proteinkinase C alpha (PKC α) in mit AAV 2.1_sc-CMV_eGFP GL (A) oder AAV 2.1_sc-CMV_eGFP NN (B) transduzierten Retina-Explantaten nach sieben bzw. 14 Tagen Kultur.62

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und Verbrauchslösungen in alphabetischer Reihenfolge unter Nennung des Herstellers.....	17
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien in alphabetischer Reihenfolge unter Nennung der Hersteller.....	18
Tabelle 3: Verwendete Geräte und deren Hersteller in alphabetischer Reihenfolge.	19
Tabelle 4: Anteile der Supplemente an Neurobasal-A Medium für die organotypische Retinakultur.....	20
Tabelle 5: Verwendete Puffer und deren Zusammensetzung.....	20
Tabelle 6: Verwendete AAVs in alphabetischer Reihenfolge unter Nennung des Titters und der Herkunft.	21
Tabelle 7: Verwendete Primärantikörper in alphabetischer Reihenfolge unter Nennung von Wirtsspezies, Verdünnungsstufe und Herstellers.....	22
Tabelle 8: Verwendete Sekundärantikörper in alphabetischer Reihenfolge unter Nennung von Wirtsspezies, Reaktivität, Verdünnungsstufe und Hersteller.....	22
Tabelle 9: Verwendete Software in alphabetischer Reihenfolge unter Nennung des Herstellers.....	22
Tabelle 10: Kriterien zur Ermittlung der Gewebequalitätspunktzahl.	34
Tabelle 11: Gewebequalitätspunktzahl (GQP) der Retinakulturen mit verschiedenen Medien nach zwölf Tagen. Gezeigt werden die Mittelwerte der GQP pro Kategorie und der Rang, der sich daraus ergibt.	46
Tabelle 12: Gesamtdicke und ONL-Dicke der Retinakulturen mit verschiedenen Medien nach zwölf Tagen. Gezeigt werden die Mittelwerte der Messungen pro Kategorie und der Rang, der sich daraus ergibt.	47
Tabelle 13: Rangfolge der Kulturmedien basierend auf der Gewebequalitätspunktzahl sowie Schichtdickenmessungen.	47
Tabelle 14: Beispiele für AAVs, die in anderen Veröffentlichungen verschiedene retinale Zelltypen in unterschiedlichen Spezies transduzieren konnten.....	69
Tabelle 15: In dieser Arbeit suprachoroidal verwendete AAVs und Zelltypen, die in porcinen Retina Explantaten transduziert werden konnten.....	69

Literaturverzeichnis

Ajioka, Itsuki; Martins, Rodrigo A. P.; Bayazitov, Ildar T.; Donovan, Stacy; Johnson, Dianna A.; Frase, Sharon et al. (2007): Differentiated horizontal interneurons clonally expand to form metastatic retinoblastoma in mice. In: *Cell* 131 (2), S. 378–390. DOI: 10.1016/j.cell.2007.09.036.

Al Hussein Al Awamlh, Sara; Wareham, Lauren K.; Risner, Michael L.; Calkins, David J. (2021): Insulin Signaling as a Therapeutic Target in Glaucomatous Neurodegeneration. In: *International journal of molecular sciences* 22 (9). DOI: 10.3390/ijms22094672.

Allocca, Mariacarmela; Doria, Monica; Petrillo, Marco; Colella, Pasqualina; Garcia-Hoyos, Maria; Gibbs, Daniel et al. (2008): Serotype-dependent packaging of large genes in adeno-associated viral vectors results in effective gene delivery in mice. In: *The Journal of clinical investigation* 118 (5), S. 1955–1964. DOI: 10.1172/JCI34316.

Allocca, Mariacarmela; Mussolino, Claudio; Garcia-Hoyos, Maria; Sanges, Daniela; Iodice, Carolina; Petrillo, Marco et al. (2007): Novel adeno-associated virus serotypes efficiently transduce murine photoreceptors. In: *Journal of virology* 81 (20), S. 11372–11380. DOI: 10.1128/JVI.01327-07.

Anzalone, Andrew V.; Koblan, Luke W.; Liu, David R. (2020): Genome editing with CRISPR-Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. In: *Nature biotechnology* 38 (7), S. 824–844. DOI: 10.1038/s41587-020-0561-9.

Artero Castro, Ana; Rodríguez Jimenez, Francisco Javier; Jendelova, Pavla; Erceg, Slaven (2019): Deciphering retinal diseases through the generation of three dimensional stem cell-derived organoids: Concise Review. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 37 (12), S. 1496–1504. DOI: 10.1002/stem.3089.

Au, Hau Kiu Edna; Isalan, Mark; Mielcarek, Michal (2021): Gene Therapy Advances: A Meta-Analysis of AAV Usage in Clinical Settings. In: *Frontiers in medicine* 8, S. 809118. DOI: 10.3389/fmed.2021.809118.

Auricchio, Alberto; Trapani, Ivana; Allikmets, Rando (2015): Gene Therapy of ABCA4-Associated Diseases. In: *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 5 (5), a017301. DOI: 10.1101/cshperspect.a017301.

- Bahniwal, Manpreet; Little, Jonathan P.; Klegeris, Andis (2017): High Glucose Enhances Neurotoxicity and Inflammatory Cytokine Secretion by Stimulated Human Astrocytes. In: *Current Alzheimer research* 14 (7), S. 731–741. DOI: 10.2174/1567205014666170117104053.
- Bainbridge, James W. B.; Smith, Alexander J.; Barker, Susie S.; Robbie, Scott; Henderson, Robert; Balaggan, Kamaljit et al. (2008): Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. In: *N Engl J Med* 358 (21), S. 2231–2239. DOI: 10.1056/NEJMoa0802268.
- Bell, Katharina; Wilding, Corina; Funke, Sebastian; Perumal, Natarajan; Beck, Sabine; Wolters, Dominik et al. (2016): Neuroprotective effects of antibodies on retinal ganglion cells in an adolescent retina organ culture. In: *Journal of neurochemistry* 139 (2), S. 256–269. DOI: 10.1111/jnc.13765.
- Bellapianta, Alessandro; Cetkovic, Ana; Bolz, Matthias; Salti, Ahmad (2022): Retinal Organoids and Retinal Prostheses: An Overview. In: *International journal of molecular sciences* 23 (6). DOI: 10.3390/ijms23062922.
- Boije, Henrik; Shirazi Fard, Shahrzad; Edqvist, Per-Henrik; Hallböök, Finn (2016): Horizontal Cells, the Odd Ones Out in the Retina, Give Insights into Development and Disease. In: *Frontiers in Neuroanatomy* 10, S. 77. DOI: 10.3389/fnana.2016.00077.
- Carducci, Augusto; Scafetta, Gaia; Siciliano, Camilla; Carnevale, Roberto; Rosa, Paolo; Coccia, Andrea et al. (2016): GMP-grade platelet lysate enhances proliferation and migration of tenon fibroblasts. In: *Frontiers in bioscience (Elite edition)* 8, S. 84–99.
- Casson, Robert J.; Chidlow, Glyn; Wood, John P. M.; Crowston, Jonathan G.; Goldberg, Ivan (2012): Definition of glaucoma: clinical and experimental concepts. In: *Clinical & experimental ophthalmology* 40 (4), S. 341–349. DOI: 10.1111/j.1442-9071.2012.02773.x.
- Charteris, David G.; Downie, John; Aylward, G. William; Sethi, Charanjit; Luthert, Philip (2007): Intraretinal and periretinal pathology in anterior proliferative vitreoretinopathy. In: *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv für klinische und experimentelle Ophthalmologie* 245 (1), S. 93–100. DOI: 10.1007/s00417-006-0323-5.

Cheng, Shun-Yun; Punzo, Claudio (2022): Update on Viral Gene Therapy Clinical Trials for Retinal Diseases. In: *Human gene therapy* 33 (17-18), S. 865–878. DOI: 10.1089/hum.2022.159.

Colella, Pasqualina; Auricchio, Alberto (2012): Gene therapy of inherited retinopathies: a long and successful road from viral vectors to patients. In: *Human gene therapy* 23 (8), S. 796–807. DOI: 10.1089/hum.2012.123.

Corral-Domenge, Ciriaco; La Villa, Pedro de; Mansilla, Alicia; Germain, Francisco (2022): Tools and Biomarkers for the Study of Retinal Ganglion Cell Degeneration. In: *International journal of molecular sciences* 23 (8). DOI: 10.3390/ijms23084287.

Cuenca, Nicolás; Fernández-Sánchez, Laura; Campello, Laura; Maneu, Victoria; La Villa, Pedro de; Lax, Pedro; Pinilla, Isabel (2014): Cellular responses following retinal injuries and therapeutic approaches for neurodegenerative diseases. In: *Progress in retinal and eye research* 43, S. 17–75. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2014.07.001.

Da Sun; Sun, Wenyu; Gao, Song-Qi; Lehrer, Jonathan; Naderi, Amirreza; Wei, Cheng et al. (2022): Effective gene therapy of Stargardt disease with PEG-ECO/pGRK1-ABCA4-S/MAR nanoparticles. In: *Molecular therapy. Nucleic acids* 29, S. 823–835. DOI: 10.1016/j.omtn.2022.08.026.

Dalkara, Deniz; Byrne, Leah C.; Klimczak, Ryan R.; Visel, Meike; Yin, Lu; Merigan, William H. et al. (2013): In vivo-directed evolution of a new adeno-associated virus for therapeutic outer retinal gene delivery from the vitreous. In: *Science translational medicine* 5 (189), 189ra76. DOI: 10.1126/scitranslmed.3005708.

Demb, Jonathan B.; Singer, Joshua H. (2015): Functional Circuitry of the Retina. In: *Annual review of vision science* 1, S. 263–289. DOI: 10.1146/annurev-vision-082114-035334.

Di Lauro, Salvatore; Rodriguez-Crespo, David; Gayoso, Manuel J.; Garcia-Gutierrez, Maria T.; Pastor, J. Carlos; Srivastava, Girish K.; Fernandez-Bueno, Ivan (2016): A novel coculture model of porcine central neuroretina explants and retinal pigment epithelium cells. In: *Molecular vision* 22, S. 243–253.

Duenker, N.; Valenciano, A. I.; Franke, A.; Hernández-Sánchez, C.; Dressel, R.; Behrendt, M. et al. (2005): Balance of pro-apoptotic transforming growth factor-beta and anti-apoptotic insulin effects in the control of cell death in the postnatal mouse retina. In:

The European journal of neuroscience 22 (1), S. 28–38. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2005.04183.x.

Dyer, M. A.; Cepko, C. L. (2001): Regulating proliferation during retinal development. In: *Nature reviews. Neuroscience* 2 (5), S. 333–342. DOI: 10.1038/35072555.

Eiraku, Mototsugu; Takata, Nozomu; Ishibashi, Hiroki; Kawada, Masako; Sakakura, Eriko; Okuda, Satoru et al. (2011): Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. In: *Nature* 472 (7341), S. 51–56. DOI: 10.1038/nature09941.

Gonzalez-Cordero, Anai; Goh, Debbie; Kruczek, Kamil; Naeem, Arifa; Fernando, Milan; Kleine Holthaus, Sophia-Martha et al. (2018): Assessment of AAV Vector Tropisms for Mouse and Human Pluripotent Stem Cell-Derived RPE and Photoreceptor Cells. In: *Human gene therapy* 29 (10), S. 1124–1139. DOI: 10.1089/hum.2018.027.

Grünert, Ulrike; Martin, Paul R. (2020): Cell types and cell circuits in human and non-human primate retina. In: *Progress in retinal and eye research*, S. 100844. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2020.100844.

Han, Ian C.; Cheng, Justine L.; Burnight, Erin; Ralston, Christy L.; Fick, Jessica L.; Thomsen, Gabriella J. et al. (2020): Retinal Tropism and Transduction of Adeno-Associated Virus (AAV) Varies by Serotype and Route of Delivery (Intravitreal, Subretinal or Suprachoroidal) in Rats. In: *Human gene therapy*. DOI: 10.1089/hum.2020.043.

Hartung, Thomas; Balls, Michael; Bardouille, Claudia; Blanck, Olivier; Coecke, Sandra; Gstraunthaler, Gerhard; Lewis, David (2002): Good Cell Culture Practice. ECVAM Good Cell Culture Practice Task Force Report 1. In: *Alternatives to laboratory animals : ATLA* 30 (4), S. 407–414. DOI: 10.1177/026119290203000404.

Haverkamp, Silke; Reinhard, Katja; Peichl, Leo; Mietsch, Matthias (2022): No evidence for age-related alterations in the marmoset retina. In: *Frontiers in Neuroanatomy* 16, S. 945295. DOI: 10.3389/fnana.2022.945295.

Jones, B. W.; Pfeiffer, R. L.; Ferrell, W. D.; Watt, C. B.; Marmor, M.; Marc, R. E. (2016): Retinal remodeling in human retinitis pigmentosa. In: *Experimental eye research* 150, S. 149–165. DOI: 10.1016/j.exer.2016.03.018.

Jones, Bryan W.; Marc, Robert E. (2005): Retinal remodeling during retinal degeneration. In: *Experimental eye research* 81 (2), S. 123–137. DOI: 10.1016/j.exer.2005.03.006.

- Klettner, Alexa; Hamann, Timothy; Schlüter, Karen; Lucius, Ralph; Roider, Johann (2014): Retinal pigment epithelium cells alter the pro-inflammatory response of retinal microglia to TLR-3 stimulation. In: *Acta ophthalmologica* 92 (8), e621-9. DOI: 10.1111/aos.12472.
- Kuehn, Sandra; Hurst, Jose; Jashari, Adelina; Ahrens, Kathrin; Tsai, Teresa; Wunderlich, Ilan M. et al. (2016): The novel induction of retinal ganglion cell apoptosis in porcine organ culture by NMDA - an opportunity for the replacement of animals in experiments. In: *Alternatives to laboratory animals : ATLA* 44 (6), S. 557–568. DOI: 10.1177/026119291604400608.
- Li, Minghui; Gao, Lixiong; Zhao, Ling; Zou, Ting; Xu, Haiwei (2022): Toward the next generation of vascularized human neural organoids. In: *Medicinal research reviews*. DOI: 10.1002/med.21922.
- Lüllmann-Rauch, Renate; Asan, Esther (2019): Taschenlehrbuch Histologie. 6., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- Lytvynchuk, Lyubomyr; Ebbert, Annabelle; Studenovska, Hana; Nagymihály, Richárd; Josifovska, Natasha; Rais, David et al. (2022): Subretinal Implantation of Human Primary RPE Cells Cultured on Nanofibrous Membranes in Minipigs. In: *Biomedicines* 10 (3). DOI: 10.3390/biomedicines10030669.
- Maguire, Albert M.; Simonelli, Francesca; Pierce, Eric A.; Pugh, Edward N.; Mingozzi, Federico; Bennicelli, Jeannette et al. (2008): Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. In: *N Engl J Med* 358 (21), S. 2240–2248. DOI: 10.1056/NEJMoa0802315.
- Maliha, Ana M.; Kuehn, Sandra; Hurst, José; Herms, Fenja; Fehr, Michael; Bartz-Schmidt, Karl U. et al. (2019): Diminished apoptosis in hypoxic porcine retina explant cultures through hypothermia. In: *Scientific reports* 9 (1), S. 4898. DOI: 10.1038/s41598-019-41113-4.
- Marc, Robert E.; Jones, Bryan W. (2003): Retinal Remodeling in Inherited Photoreceptor Degenerations. In: *MN* 28 (2), S. 139–148. DOI: 10.1385/MN:28:2:139.
- Martinez-Fernandez de la Camara, Cristina; Nanda, Anika; Salvetti, Anna Paola; Fischer, M. Dominik; MacLaren, Robert E. (2018): Gene therapy for the treatment of X-linked

retinitis pigmentosa. In: *Expert opinion on orphan drugs* 6 (3), S. 167–177. DOI: 10.1080/21678707.2018.1444476.

Masri, Rania A.; Lee, Sammy C. S.; Madigan, Michele C.; Grünert, Ulrike (2019): Particle-Mediated Gene Transfection and Organotypic Culture of Postmortem Human Retina. In: *Translational vision science & technology* 8 (2), S. 7. DOI: 10.1167/tvst.8.2.7.

McCarty, Douglas M. (2008): Self-complementary AAV vectors; advances and applications. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 16 (10), S. 1648–1656. DOI: 10.1038/mt.2008.171.

McClements, Michelle E.; Barnard, Alun R.; Charbel Issa, Peter; MacLaren, Robert E. (2020): Assessment of AAV Dual Vector Safety in the *Abca4*^{-/-} Mouse Model of Stargardt Disease. In: *Translational vision science & technology* 9 (7), S. 20. DOI: 10.1167/tvst.9.7.20.

McClements, Michelle E.; MacLaren, Robert E. (2013): Gene therapy for retinal disease. In: *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine* 161 (4), S. 241–254. DOI: 10.1016/j.trsl.2012.12.007.

Mohamed, Hoda E.; Asker, Mervat E.; Kotb, Nahla S.; El Habab, Akram M. (2020): Human platelet lysate efficiency, stability, and optimal heparin concentration required in culture of mammalian cells. In: *Blood research* 55 (1), S. 35–43. DOI: 10.5045/br.2020.55.1.35.

Mollick, Tanzina; Mohlin, Camilla; Johansson, Kjell (2016): Human neural progenitor cells decrease photoreceptor degeneration, normalize opsin distribution and support synapse structure in cultured porcine retina. In: *Brain research* 1646, S. 522–534. DOI: 10.1016/j.brainres.2016.06.039.

Mulisch, Maria; Welsch, Ulrich (2015): *Romeis - Mikroskopische Technik*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Müller, Brigitte (2019): Organotypic Culture of Adult Mouse Retina. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1940, S. 181–191. DOI: 10.1007/978-1-4939-9086-3_13.

Müller, Brigitte; Wagner, Franziska; Lorenz, Birgit; Stieger, Knut (2017): Organotypic Cultures of Adult Mouse Retina: Morphologic Changes and Gene Expression. In:

Investigative ophthalmology & visual science 58 (4), S. 1930–1940. DOI: 10.1167/iovs.16-20718.

Mussolino, C.; Della Corte, M.; Rossi, S.; Viola, F.; Di Vicino, U.; Marrocco, E. et al. (2011): AAV-mediated photoreceptor transduction of the pig cone-enriched retina. In: *Gene Ther* 18 (7), S. 637–645. DOI: 10.1038/gt.2011.3.

Nakano, Tokushige; Ando, Satoshi; Takata, Nozomu; Kawada, Masako; Muguruma, Keiko; Sekiguchi, Kiyotoshi et al. (2012): Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs. In: *Cell stem cell* 10 (6), S. 771–785. DOI: 10.1016/j.stem.2012.05.009.

Ochakovski, G. Alex; Bartz-Schmidt, K. Ulrich; Fischer, M. Dominik (2017): Retinal Gene Therapy: Surgical Vector Delivery in the Translation to Clinical Trials. In: *Frontiers in neuroscience* 11, S. 174. DOI: 10.3389/fnins.2017.00174.

Palfi, Arpad; Chadderton, Naomi; Millington-Ward, Sophia; Post, Iris; Humphries, Pete; Kenna, Paul F.; Farrar, G. Jane (2022): AAV-PHP.eB transduces both the inner and outer retina with high efficacy in mice. In: *Molecular therapy. Methods & clinical development* 25, S. 236–249. DOI: 10.1016/j.omtm.2022.03.016.

Pavlou, Marina; Schön, Christian; Ocelli, Laurence M.; Rossi, Axel; Meumann, Nadja; Boyd, Ryan F. et al. (2021): Novel AAV capsids for intravitreal gene therapy of photoreceptor disorders. In: *EMBO molecular medicine* 13 (4), e13392. DOI: 10.15252/emmm.202013392.

Peynshaert, Karen; Devoldere, Joke; Forster, Valérie; Picaud, Serge; Vanhove, Christian; Smedt, Stefaan C. de; Remaut, Katrien (2017): Toward smart design of retinal drug carriers: a novel bovine retinal explant model to study the barrier role of the vitreoretinal interface. In: *Drug Delivery* 24 (1), S. 1384–1394. DOI: 10.1080/10717544.2017.1375578.

Preibisch, Stephan; Saalfeld, Stephan; Tomancak, Pavel (2009): Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 25 (11), S. 1463–1465. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp184.

Pulman, Juliette; Sahel, José-Alain; Dalkara, Deniz (2022): New Editing Tools for Gene Therapy in Inherited Retinal Dystrophies. In: *The CRISPR journal* 5 (3), S. 377–388. DOI: 10.1089/crispr.2021.0141.

Pupo, Amaury; Fernández, Audry; Low, Siew Hui; François, Achille; Suárez-Amarán, Lester; Samulski, Richard Jude (2022): AAV vectors: The Rubik's cube of human gene therapy. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. DOI: 10.1016/j.ymthe.2022.09.015.

Reichenbach, A.; Robinson, S. R. (1995): Phylogenetic constraints on retinal organisation and development. In: *Progress in retinal and eye research* 15 (1), S. 139–171. DOI: 10.1016/1350-9462(95)00008-9.

Rettinger, Christina L.; Kaini, Ramesh R.; Burke, Teresa A.; Wang, Heuy-Ching (2021): Neurotrophic Factors Secreted by Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Retinal Progenitors Promote Retinal Survival and Preservation in an Adult Porcine Neuroretina Model. In: *Journal of ocular pharmacology and therapeutics : the official journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics* 37 (5), S. 301–312. DOI: 10.1089/jop.2020.0088.

Rettinger, Christina L.; Wang, Heuy-Ching (2018): Quantitative Assessment of Retina Explant Viability in a Porcine Ex Vivo Neuroretina Model. In: *Journal of ocular pharmacology and therapeutics : the official journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics* 34 (7), S. 521–530. DOI: 10.1089/jop.2018.0021.

Russell, W. M. S.; Burch, R. L. (1959): The principles of humane experimental technique. Online verfügbar unter <http://117.239.25.194:7000/jspui/bitstream/123456789/1342/1/priliminary%20%20and%20%20contents.pdf>.

Salman, Ahmed; Kantor, Ariel; McClements, Michelle E.; Marfany, Gemma; Trigueros, Sonia; MacLaren, Robert E. (2022): Non-Viral Delivery of CRISPR/Cas Cargo to the Retina Using Nanoparticles: Current Possibilities, Challenges, and Limitations. In: *Pharmaceutics* 14 (9). DOI: 10.3390/pharmaceutics14091842.

Sanchez, Irene; Martin, Raul; Ussa, Fernando; Fernandez-Bueno, Ivan (2011): The parameters of the porcine eyeball. In: *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 249 (4), S. 475–482. DOI: 10.1007/s00417-011-1617-9.

Schindelin, Johannes; Arganda-Carreras, Ignacio; Frise, Erwin; Kaynig, Verena; Longair, Mark; Pietzsch, Tobias et al. (2012): Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. In: *Nature methods* 9 (7), S. 676–682. DOI: 10.1038/nmeth.2019.

Schnichels, Sven; Kiebler, Tobias; Hurst, José; Maliha, Ana M.; Löscher, Marina; Dick, H. Burkhard et al. (2019): Retinal Organ Cultures as Alternative Research Models. In: *Alternatives to laboratory animals : ATLA* 47 (1), S. 19–29. DOI: 10.1177/0261192919840092.

Schnichels, Sven; Paquet-Durand, François; Löscher, Marina; Tsai, Teresa; Hurst, José; Joachim, Stephanie C.; Klettner, Alexa (2020): Retina in a dish: Cell cultures, retinal explants and animal models for common diseases of the retina. In: *Progress in retinal and eye research*, S. 100880. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2020.100880.

Schnichels, Sven; Schultheiss, Maximilian; Klemm, Patricia; Blak, Matthias; Herrmann, Thoralf; Melchinger, Marion et al. (2021): Cyclosporine A Protects Retinal Explants against Hypoxia. In: *International journal of molecular sciences* 22 (19). DOI: 10.3390/ijms221910196.

Simpson, Chiab P.; Bolch, Susan N.; Zhu, Ping; Weidert, Frances; Dinculescu, Astra; Lobanova, Ekaterina S. (2019): Systemic Delivery of Genes to Retina Using Adeno-Associated Viruses. In: *Advances in experimental medicine and biology* 1185, S. 109–112. DOI: 10.1007/978-3-030-27378-1_18.

Singh, Deepti; Chen, Xiaoyu; Xia, Tina; Ghiassi-Nejad, Maryam; Tainsh, Laurel; Adelman, Ron A.; Rizzolo, Lawrence J. (2020): Partially Differentiated Neuroretinal Cells Promote Maturation of the Retinal Pigment Epithelium. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 61 (13), S. 9. DOI: 10.1167/iovs.61.13.9.

Slijkerman, Ralph W. N.; Song, Fei; Astuti, Galuh D. N.; Huynen, Martijn A.; van Wijk, Erwin; Stieger, Knut; Collin, Rob W. J. (2015): The pros and cons of vertebrate animal models for functional and therapeutic research on inherited retinal dystrophies. In: *Progress in retinal and eye research* 48, S. 137–159. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2015.04.004.

Spiegel, Samuel J.; Sadun, Alfredo A. (2022): Solutions to a Radical Problem: Overview of Current and Future Treatment Strategies in Leber's Hereditary Optic Neuropathy. In: *International journal of molecular sciences* 23 (21), S. 13205. DOI: 10.3390/ijms232113205.

Stieger, Knut; Lorenz, Birgit (2010): Gene therapy for vision loss -- recent developments. In: *Discovery medicine* 10 (54), S. 425–433.

- Svare, Frida; Åkerström, Bo; Ghosh, Fredrik (2021): It's About Time: Time-Dependent Tissue Damage in the Adult Porcine Retina After Enucleation. In: *Cells, tissues, organs* 210 (1), S. 58–65. DOI: 10.1159/000514795.
- Taylor, Linnéa; Arnér, Karin; Taylor, Ingrid Holmgren; Ghosh, Fredrik (2014): Feet on the ground: Physical support of the inner retina is a strong determinant for cell survival and structural preservation in vitro. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 55 (4), S. 2200–2213. DOI: 10.1167/iovs.13-13535.
- Thanos, S.; Kacza, J.; Seeger, J.; Mey, J. (1994): Old dyes for new scopes: the phagocytosis-dependent long-term fluorescence labelling of microglial cells in vivo. In: *Trends in neurosciences* 17 (5), S. 177–182. DOI: 10.1016/0166-2236(94)90098-1.
- Tomlinson, David R.; Gardiner, Natalie J. (2008): Glucose neurotoxicity. In: *Nat Rev Neurosci* 9 (1), S. 36–45. DOI: 10.1038/nrn2294.
- Tornabene, Patrizia; Ferla, Rita; Llado-Santaularia, Manel; Centrulo, Miriam; Dell'Anno, Margherita; Esposito, Federica et al. (2022): Therapeutic homology-independent targeted integration in retina and liver. In: *Nature communications* 13 (1), S. 1963. DOI: 10.1038/s41467-022-29550-8.
- Touhami, Sara; Béguier, Fanny; Yang, Tianxiang; Augustin, Sébastien; Roubéix, Christophe; Blond, Frederic et al. (2022): Hypoxia Inhibits Subretinal Inflammation Resolution Thrombospondin-1 Dependently. In: *International journal of molecular sciences* 23 (2), S. 681. DOI: 10.3390/ijms23020681.
- Trapani, Ivana (2018): Dual AAV Vectors for Stargardt Disease. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1715, S. 153–175. DOI: 10.1007/978-1-4939-7522-8_11.
- van der Valk, J.; Brunner, D.; Smet, K. de; Fex Svenningsen, A.; Honegger, P.; Knudsen, L. E. et al. (2010): Optimization of chemically defined cell culture media--replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. In: *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 24 (4), S. 1053–1063. DOI: 10.1016/j.tiv.2010.03.016.
- van der Valk, J.; Mellor, D.; Brands, R.; Fischer, R.; Gruber, F.; Gstraunthaler, G. et al. (2004): The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell

and tissue culture. In: *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 18 (1), S. 1–12. DOI: 10.1016/j.tiv.2003.08.009.

Vecino, Elena; Rodriguez, F. David; Ruzafa, Noelia; Pereiro, Xandra; Sharma, Sansar C. (2016): Glia-neuron interactions in the mammalian retina. In: *Progress in retinal and eye research* 51, S. 1–40. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2015.06.003.

Veleri, Shobi; Lazar, Csilla H.; Chang, Bo; Sieving, Paul A.; Banin, Eyal; Swaroop, Anand (2015): Biology and therapy of inherited retinal degenerative disease: insights from mouse models. In: *Disease models & mechanisms* 8 (2), S. 109–129. DOI: 10.1242/dmm.017913.

Wagner, Franziska (2019): Genexpressionsstudien zur Etablierung der adulten murinen organotypischen Retinakultur als Modell für gentherapeutische Ansätze. Dissertation. Justus-Liebig-Universität, Gießen. Online verfügbar unter <https://core.ac.uk/download/pdf/237217493.pdf>.

Wagner, Natalie; Reinehr, Sabrina; Gammel, Maurice R.; Greulich, Andrea; Hurst, José; Dick, H. Burkhard et al. (2020): Novel Porcine Retina Cultivation Techniques Provide Improved Photoreceptor Preservation. In: *Frontiers in neuroscience* 14, S. 556700. DOI: 10.3389/fnins.2020.556700.

Weber, Michel; Rabinowitz, Joseph; Provost, Nathalie; Conrath, Hervé; Folliot, Sébastien; Briot, Delphine et al. (2003): Recombinant adeno-associated virus serotype 4 mediates unique and exclusive long-term transduction of retinal pigmented epithelium in rat, dog, and nonhuman primate after subretinal delivery. In: *Molecular Therapy* 7 (6), S. 774–781. DOI: 10.1016/S1525-0016(03)00098-4.

Wiley, Luke A.; Burnight, Erin R.; Kaalberg, Emily E.; Jiao, Chunhua; Riker, Megan J.; Halder, Jennifer A. et al. (2018): Assessment of Adeno-Associated Virus Serotype Tropism in Human Retinal Explants. In: *Human gene therapy* 29 (4), S. 424–436. DOI: 10.1089/hum.2017.179.

Xi, Zhouhuan; Öztürk, Bilge E.; Johnson, Molly E.; Turunç, Serhan; Stauffer, William R.; Byrne, Leah C. (2022): Quantitative single-cell transcriptome-based ranking of engineered AAVs in human retinal explants. In: *Molecular therapy. Methods & clinical development* 25, S. 476–489. DOI: 10.1016/j.omtm.2022.04.014.

Yang, Grace S.; Schmidt, Michael; Yan, Ziyang; Lindbloom, Jonathan D.; Harding, Thomas C.; Donahue, Brian A. et al. (2002): Virus-mediated transduction of murine retina with adeno-associated virus: effects of viral capsid and genome size. In: *Journal of virology* 76 (15), S. 7651–7660. DOI: 10.1128/jvi.76.15.7651-7660.2002.

Publikationsverzeichnis

Posterpräsentationen:

Weller, M., Müller, B., Stieger, K., 2020. *Pig Retinal Explants as Model System for Gene Therapy of the Eye*. GGL Conference on Life Sciences, Gießen.

Weller, M., Müller, B., Stieger, K., 2021. *Pig Retinal Explants as an intermediary model between in vitro and in vivo approaches for gene therapy*. GGL Conference on Life Sciences, Gießen.

Weller, M., Müller, B., Stieger, K., 2022. *Long-term porcine retinal explants as an alternative to in vivo experimentation*. ARVO Annual Meeting, Denver, Colorado, USA and online.

Weller, M., Müller, B., Stieger, K., 2022. *Long term porcine retinal explants as an alternative to in vivo experimentation*. GGL Conference on Life Sciences, Gießen.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

Ort und Datum

Unterschrift

Danksagung

Ich danke zuerst und vor allem Prof. Dr. Dr. Knut Stieger für das Überlassen des Themas dieser Arbeit, die wissenschaftlichen Diskussionen und die herausragende Unterstützung und Betreuung während der letzten Jahre.

Ein großer Dank gebührt Dr. Brigitte Müller für die wunderbare wissenschaftliche Betreuung, ihre Geduld, die stetige Unterstützung und Aufmunterung.

Ich danke Prof. em. Dr. Birgit Lorenz sowie PD Dr. k.m.n. Lyubomyr Lytvynchuk für die Bereitstellung der Labor- und Büroräume, als die AG Experimentelle Ophthalmologie noch an der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde tätig war. Ein Dank gebührt auch PD Dr. Markus Preising für die Leitung des Labors dort.

Ein besonderer Dank geht an das wundervolle Team der AG Experimentelle Ophthalmologie mit Dr. Tobias Wimmer, Annabella Janise-Libawski, Bärbel Fühler, Bettina Gill und Kerstin Walther. Die Arbeit mit Euch macht immer Spaß und die Hilfsbereitschaft und Unterstützung ist Gold wert!

Ich danke zudem allen ehemaligen und derzeitigen Doktorand*innen und Student*innen während meiner Promotionszeit, weil die Arbeit gemeinsam deutlich leichter von der Hand ging und der Austausch zu allen möglichen Themen immer sehr bereichernd war. Im Besonderen gilt dieser Dank Fatimah Alabudeeb, mit der ich gemeinsam die letzten drei Jahre dieses Abenteuer Promotion erleben durfte.

Ganz besonders danke ich natürlich meiner Familie und meinem Freund Philipp für den stetigen Rückhalt und die unendliche Geduld! Ihr wart immer interessiert, habt an mich geglaubt, mich mit Nervennahrung versorgt und auch sonst unterstützt.