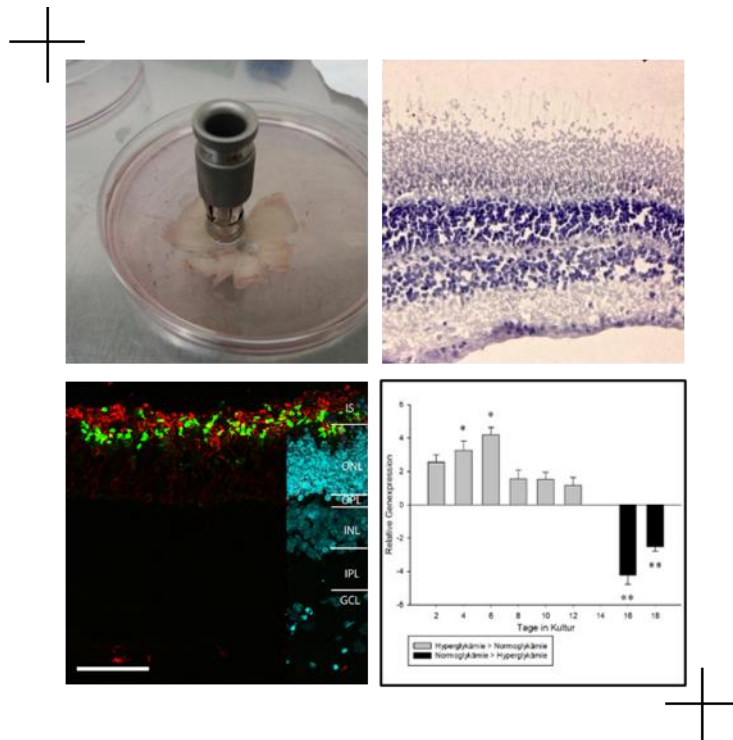


# Etablierung organotypischer porciner Netzhautkulturen als Modell für die diabetische Retinopathie

Establishment of organotypic cultures of porcine retina as a model of  
diabetic retinopathy



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung

des akademischen Grades

Doktor der Veterinärmedizin

**Dr. vet. med.**

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Christin Loyal**

# Etablierung organotypischer porciner Netzhautkulturen als Modell für die diabetische Retinopathie

---

Establishment of organotypic cultures of porcine retina as a model of  
diabetic retinopathy

---

## INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung

des akademischen Grades

Doktor der Veterinärmedizin

**Dr. vet. med.**

vorgelegt von

**Christin Loyal, Tierärztin**

angefertigt in der

AG Experimentelle Ophthalmologie, Fachbereich Medizin

vorgelegt am Fachbereich Veterinärmedizin

**Justus-Liebig-Universität Gießen**

Gießen, Januar 2025

Die vorliegende Arbeit wurde zusammen mit der Arbeitsgruppe Experimentelle Ophthalmologie der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde des Fachbereichs 11 (Medizin) der Justus-Liebig-Universität Gießen in der Zeit von Mai 2016 bis November 2024 unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. Knut Stieger angefertigt.

**Erstgutachter:**

**Prof. Dr. Dr. Stefan Arnhold**

Stellv. Vorsitzender Tierärztliche Vorprüfung

Geschäftsführender Direktor des Instituts für Veterinär-  
Anatomie, -Histologie und -Embryologie

Fachbereich 10, Veterinärmedizin

Justus-Liebig-Universität Gießen

Frankfurterstraße 98

35392 Gießen

**Zweitgutachter:**

**Prof. Dr. Dr. Knut Stieger**

AG Experimentelle Ophthalmologie

Fachbereich 11, Medizin

Justus-Liebig-Universität Gießen

Aulweg 123

35392 Gießen

## **Erklärung**

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten 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.

Gießen, den 10.01.2025

---

Christin Loyal

# Inhalt

<b>Etablierung organotypischer porziner Netzhautkulturen als Modell für die diabetische Retinopathie</b>	1
Inhalt.....	4
1 Einleitung.....	8
1.1 Anatomie des Schweineauges.....	8
1.1.1 Allgemeiner Aufbau.....	8
1.1.2 Vergleich zu anderen Wirbeltieren und zum Menschen.....	9
1.2 Aufbau der Retina.....	9
1.2.1 Photorezeptoren .....	11
1.2.2 Bipolarzellen .....	12
1.2.3 Gliazellen .....	12
1.3 Degeneration der Netzhaut.....	14
1.3.1 Hyperglykämie-induzierte Veränderungen in der Netzhaut .....	15
1.3.2 Insulinabhängige Pathomechanismen .....	17
1.4 Diabetes mellitus und Diabetische Retinopathie .....	18
1.4.1 Prävalenz und Klassifizierung .....	18
1.4.2 Klinische Manifestation und Pathomechanismen.....	20
1.4.3 Modellsysteme und gentherapeutische Ansätze .....	23
1.5 Zielsetzung.....	27
2 Material und Methoden .....	31
2.1 Verwendete Materialien .....	31
2.1.1 Chemikalien, Farbstoffe, Ausgangsmaterialien.....	31
2.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	33
2.1.3 Puffer und Medien .....	34
2.1.4 Kits .....	36
2.1.5 Primärantikörper .....	37
2.1.6 Sekundärantikörper.....	38
2.1.7 Primer .....	39
2.1.8 Enzyme .....	39
2.1.9 Größenstandards.....	40
2.1.10 Geräte und Software .....	40
2.2 Methodik .....	42
2.2.1 Spendertiere .....	42
2.2.2 Transport .....	42

2.2.3	Herstellung der organotypischen Retinakultur .....	43
2.2.4	HE-Färbung .....	49
2.2.5	Immunfärbungen.....	51
2.2.6	Konzentrationsmessungen im Nährmedium.....	55
2.2.7	Molekularbiologische Methoden, Ribonukleinsäure .....	57
3	Ergebnisse.....	64
3.1	Vorversuche zur Etablierung geeigneter Transport- und Präparationsbedingungen .....	64
3.1.1	Temperatur.....	65
3.1.2	Transportzeit .....	69
3.1.3	Explantat-Lokalisation .....	68a
3.1.4	Explantat-Größe .....	71
3.1.5	Verschiedene Immunfluoreszenz-Primäantikörper .....	73
3.2	Langzeitkultivierung der porzinen Netzhäute .....	75
3.2.1	Histomorphologische Veränderungen der retinalen Schichten über den Kulturzeitraum 76	
3.2.2	Veränderungen der retinalen Neurone und Gliazellen während der Retinakultur .....	80
3.3	Kultur der porzinen Netzhäute unter Normo- und Hyperglykämie .....	87
3.3.1	Glukosekonzentrationen im Nährmedium.....	87
3.3.2	Insulinkonzentrationen im Nährmedium .....	90
3.3.3	Morphologische Veränderungen der retinalen Neurone und Gliazellen während der Retinakultur.....	92
3.3.4	Veränderungen auf RNA-Ebene .....	100
4	Diskussion.....	106
4.1	Porzine Explantate als Modellsystem für die diabetische Retinopathie.....	106
4.1.1	Stand der Forschung.....	106
4.1.2	Einsatz von Glukose und Insulin in der <i>in-vitro</i> -Kultur .....	107
4.1.3	Hyperglykämie-induzierte Veränderungen der retinalen Neurone und Gliazellen während der Retinakultur .....	112
4.1.4	Zusammenfassung der Ereignisse während der hyperglykämischen Kultur.....	119
4.1.5	Geeignete Transport- und Präparationsbedingungen .....	120
4.1.6	Zeitlicher Überblick der porzinen Netzhautdegeneration in der Langzeitkultur .....	127
4.2	Ausblick.....	131
5	Zusammenfassung.....	134
6	Summary.....	137
7	Anhang.....	138

7.1	Literaturverzeichnis .....	138
7.2	Abbildungsverzeichnis .....	144
7.3	Tabellenverzeichnis .....	149
7.4	Abkürzungsverzeichnis .....	149
7.5	Danksagung .....	152

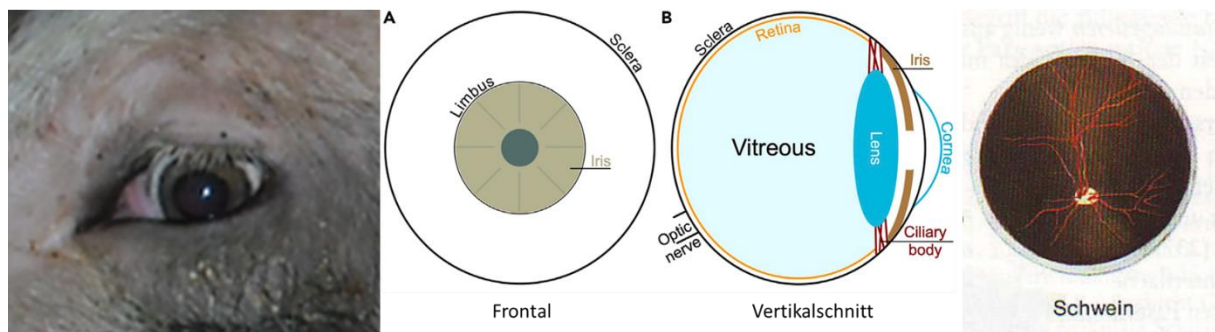
# Einleitung

# 1 Einleitung

## 1.1 Anatomie des Schweineauges

Das Sinnesorgan Auge ist durch seinen lichtdurchlässigen und hoch spezialisierten Aufbau in der Lage, Licht in sinnesphysiologische elektrische Signale umzuwandeln, die uns Menschen und Tiere in die Lage versetzen, unsere Umwelt sehend wahrzunehmen.

### 1.1.1 Allgemeiner Aufbau



**Abbildung 1-1:** Das Auge eines Schweins, links makroskopisch, mittig schematisch mit anatomischen Begrifflichkeiten in der Frontalansicht (A) und im Vertikalschnitt (B) und rechts der Augenhintergrund mit dem Discus nervi optici und den retinalen Gefäßen. Modifiziert nach Wolf et al. (Wolf et al. 2022), Nickel Band 4 Nerven und Sinne.

Als Vertreter der Wirbeltiere ist das Schweineauge zunächst nach deren klassischer Bauweise aufgebaut. Von außen nach innen wird es von mehreren Schichten ausgekleidet: der lichtdurchlässigen Cornea (Hornhaut), die im hinteren Teil in die Sklera (Lederhaut) übergeht, der blutgefäßreichen Choroidea (Aderhaut), der Iris (Regenbogenhaut), die die Pupille bildet, und schließlich der Retina (Netzhaut) mit ihren Lichtsinneszellen. Das Augennere wird in eine vordere und eine hintere Augenkammer unterteilt und enthält den Glaskörper und die Linse, die vom Ziliarkörper in ihrer Position gehalten wird. Das eintreffende Licht wird demnach durch die Cornea und die Pupille über die Linse und den Glaskörper zur Netzhaut geleitet. Von hier aus wird die Information zum *discus nervi optici* (Blinder Fleck) geleitet, der Ansatzstelle des Sehnervs, der zur

Schrinde im hinteren Teil des Gehirns zieht. Das Schweineauge bietet in seiner Größe und Anatomie einige Besonderheiten, die es von anderen Wirbeltieraugen unterscheidet.

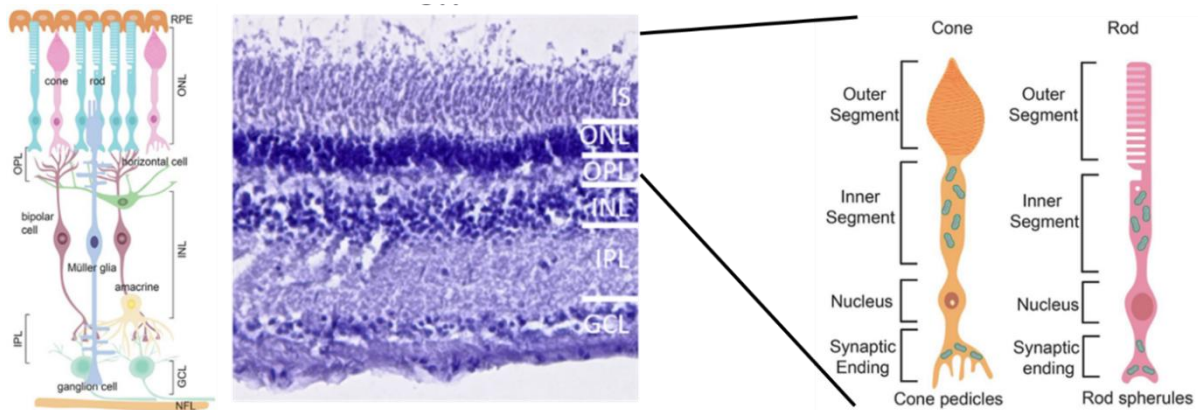
### 1.1.2 Vergleich zu anderen Wirbeltieren und zum Menschen

Das Schwein ist wie wir Menschen tagaktiv, das heißt die porcine Retina ist für das Sehen bei Tag optimiert. Demnach enthält sie eine große Population an Zapfen, deren größte Dichte sich innerhalb einer ausgedehnten Region dorsal des *discus nervi optici* befindet, die sich nach nasal und temporal erstreckt. Diese Region repräsentiert die *area centralis* (Chandler et al. 1999). Das Vorhandensein dieser Region des schärfsten Sehens, die beim Menschen der noch zapfenreicheren Makula entspricht, ist eine wichtige Ähnlichkeit zum Menschen. Weitere Ähnlichkeiten finden sich im zapfenreichen Charakter der Retina, in der ähnlichen Größe in Relation zum menschlichen Auge und in der vergleichbaren Anatomie. Das Fehlen des bei nachtaktiven Tieren verbreiteten *tapetum lucidum*, einer reflektierenden Schicht, die eintreffendes Licht bei Dunkelheit verstärkt, ist ein wichtiger Punkt, der dem Schweineauge den Titel des vielversprechendsten Großtiermodells zur Erforschung von Pathophysiologien menschlicher Augenerkrankungen verleiht (Slijkerman et al. 2015). Ein weiterer Vorteil in der *in-vivo*-Forschung ist vor allem die hohe Lebenserwartung dieser Tiere mit circa 20 Jahren, die eine Langzeitkontrolle der pathophysiologischen Ereignisse bei chronischen Erkrankungen erlaubt (Kleinwort et al. 2017). Kleinwort et al. konnten in ihrer Arbeit zudem zeigen, dass die Veränderungen in der Retina in einem transgenen Schweinemodell, bei dem die Tiere einen permanenten neonatalen Diabetes mellitus aufweisen, den klinischen Ausprägungen dieser Erkrankung beim Menschen stark ähneln (Kleinwort et al. 2017).

## 1.2 Aufbau der Retina

Betrachtet man die Retina im hinteren Teil des Auges genauer, so ist diese ein hochkomplexes Gewebe aus mehreren Schichten und spezialisierten Zelltypen. Sie entwickelt sich in der

Embryonalphase durch Ausstülpungen des Diencephalons (Zwischenhirn). Das Sehen beginnt in der Retina mit den Stäbchen- und Zapfen-Photorezeptoren, die Licht detektieren und in elektrische Signale konvertieren (Joseph et al. 2022; Ren et al. 2022).



**Abbildung 1-2:** Verschiedene Schichten und Zelltypen in der Retina (links), mittig retinale Schichten in der HE Färbung, rechts Stäbchen und Zapfen mit der Unterteilung ihrer Segmente, modifiziert nach Hanna, David et al.jpg (Joseph et al. 2022).

Zwischen der Choroidea und den Photorezeptoren befindet sich das retinale Pigmentepithel (RPE), ein einschichtiges Epithel mit vielerlei wichtigen Funktionen in der Retina. Das eingelagerte Melanin stellt eine Barriere für das eintreffende Licht dar. Als Blut-Retina-Barriere wird die Diffusion von Metaboliten durch die dichten *tight junctions* nur durch bestimmte Transporter ermöglicht. Auch Phagozytose der OS und Recycling der Chromophore für die visuellen Pigmente (Retinal) zählen zu den Aufgaben des RPE (Hurley et al. 2021). Der darunterliegende Abschnitt wird im Folgenden als Neuroretina bezeichnet. Die äußere Körnerschicht (*outer nuclear layer*, ONL) enthält die Zellkörper der Photorezeptoren mit ihren äußeren (*outer segments*, OS) und inneren Segmenten (*inner segments*, IS). Die innere Körnerschicht wird durch die Zellkörper der Horizontal-, Bipolar-, Amakrinzellen und Müllerglia gebildet. In den angrenzenden plexiformen Schichten (*outer plexiform layer*, OPL und *inner plexiform layer*, IPL) befinden sich die Verschaltungen der miteinander agierenden Zellen, die auch als Synapsen bekannt sind. Die unterste Schicht enthält die Zellkörper der Ganglienzellen, die die elektrischen Signale final an die Nervenfaserschicht

weiterleiten. Einige retinale Zellen werden in dieser Arbeit über einen längeren Zeitraum in der Netzhautkultur charakterisiert und werden aus diesem Grund nun näher beschrieben.

### 1.2.1 Photorezeptoren

Exklusiv für die Netzhaut sind die für den Sehprozess entscheidenden Photorezeptoren. Das einfallende Licht durchdringt zunächst alle anderen Schichten der Retina, bevor es schließlich von den Photorezeptoren verarbeitet werden kann. Morphologisch lassen sie sich in ein Außensegment (outer segment, OS), Innensegment (inner segment, IS), Zellkern und Axon unterscheiden (Abbildung 1-2). Es gibt zwei Typen von Photorezeptoren, die Stäbchen und die Zapfen. Stäbchen, die etwa 90 Prozent der Photorezeptordichte beim Menschen ausmachen, haben eine niedrige räumliche Auflösung, sind aber sehr licht-sensitiv und demnach für das Hell-Dunkel-Sehen zuständig, während die Zapfen die umgekehrten Charakteristika aufweisen und für das Farbsehen verantwortlich sind. Stäbchen weisen Rhodopsin als deren Pigment auf, während drei verschiedene Zapfentypen das Licht bei der jeweiligen Wellenlänge unterschiedlich reflektieren. Sie werden als S-Zapfen, M-Zapfen und L-Zapfen bezeichnet, die kurz-, mittel- beziehungsweise langwelliges Licht reflektieren, basierend auf dem jeweils vorhandenen Opsin (Tonade et al. 2021). Das Rhodopsin erfährt eine Konformationsänderung, die das einfallende Licht durch weitere Signalwege im Zusammenspiel der verschiedenen retinalen Zellen in elektrische Signale umwandelt. Das Schwein besitzt eine mittlere Photorezeptordichte von 138.000 Zellen/mm<sup>2</sup> mit einem Verhältnis von Stäbchen zu Zapfen von 3 zu 1 in zentralen Regionen und 16 zu 1 im peripheren Bereich. Die Zapfendichte beträgt im Mittel 39.000 Zapfen pro mm<sup>2</sup> im Bereich der *area centralis* (Chandler et al. 1999). Abgesehen von der beim Menschen bekannten Stelle des schärfsten Sehens, der sogenannten Makula mit der zentral gelegenen Sehgrube (Fovea), ähneln sich diese Zahlen bei Schwein und Mensch. Das menschliche Auge weist ebenfalls eine streifenähnliche Region mit hoher Zapfendichte entlang des horizontalen Meridians auf.

## 1.2.2 Bipolarzellen

Die elektrischen Impulse werden nun von den Photorezeptoren durch die Ribbon-Synapse im Bereich der OPL zu den weiterleitenden Zellen transportiert. Die Bipolarzellen, deren Zellkörper die INL durchziehen, leiten sie zu den Amakrin- und Ganglienzellen weiter (Wässle et al. 2009). Es gibt verschiedene Typen von Bipolarzellen. Einige interagieren mit Stäbchen, andere erhalten ihr Signal von den Zapfen. Sie unterscheiden sich auch morphologisch etwas in ihrer Form und der Art der Verästelung ihrer Dendriten und Axone. Insgesamt wird die Zahl der verschiedenen Typen auf etwa 12 geschätzt. Die Stäbchen sind direkt mit den sogenannten ON-Bipolarzellen verbunden, die Zapfenbipolarzellen lassen sich weiter in ON-Bipolarzellen und OFF-Bipolarzellen unterscheiden. Der Unterschied liegt in der Expression von zwei Klassen Glutamatrezeptoren begründet. Bei OFF-Bipolarzellen werden so Kanäle geöffnet, die bei einer Hyperpolarisation der Rezeptoren bei Lichteinfall ebenfalls zu einer Hyperpolarisation der Bipolarzellen führen. Dagegen kommt es bei den ON-Bipolarzellen zu einer Kanalschließung durch Glutamat, die im Folgenden zu einer Depolarisation der Bipolarzellen führt (Masland et al. 2012; Ruether et al. 2010).

## 1.2.3 Gliazellen

Die Säugetierretina kennt drei Typen von Gliazellen, zum einen die Mikroglia und zum anderen zwei Typen an Neurone unterstützenden Makroglia, die sogenannten Astrozyten und die Müllergliazellen (Bringmann et al. 2006).

Die Mikroglia sind Immunzellen aus dem Blut, die in der Retina eine wichtige Rolle im Kampf gegen schädliche Mikroorganismen innehaben und bei inflammatorischen Prozessen und Gewebsreparatur beteiligt sind. Sie befinden sich normalerweise in der Nervenzell-, Ganglienzellschicht und der IPL (Bringmann et al. 2006). Die Makroglia spielen eine entscheidende Rolle in der Homöostase retinaler Neurone, die die Netzhaut gesund und funktional halten. Dabei haben die sternförmigen Astrozyten, die räumlich fast gänzlich auf die NFL begrenzt sind, eine

enge Verbindung zu den Neuronen, aber auch den Blutgefäßen. Ihre Aufgabe liegt somit auch darin, das Blutgefäßsystem der Retina hinsichtlich des Blutflusses und der Blut-Retina-Schranke zu unterstützen (Fernández-Sánchez et al. 2015).

In dieser Arbeit wird exemplarisch für die Gliazellen das Verhalten der Müllerzellen genauer betrachtet. Die Müllerglia, die nach ihrem deutschen Entdecker Heinrich Müller benannt wurden, sind die größten Gliazellen der Wirbeltierretina. Sie durchziehen gewissermaßen die ganze Retina von der äußeren bis zur inneren Grenzmembran und interagieren mit neuronalen Somata und Endfüßen in der gesamten Netzhaut (Fernandez-Bueno et al. 2008). Dabei haben sie ebenfalls eine sternförmige Morphologie mit zwei Stammfortsätzen, die in gegensätzliche Richtungen ziehen und die Retina durchziehen. Sie ähneln durch ihre Entstehung, ihr Aussehen und ihrer Verteilung somit den Gliazellen des Cortex. Der innere Fortsatz Richtung Glaskörper bildet auf der Oberfläche mit seinen Endfüßen die Basallamina, die die innere Grenzmembran (inner limiting membrane ILM) formt. Die Fortsätze in Richtung Sklera erreichen den Subretinalraum, wo sie zahlreiche Mikrovilli entsenden (Bejarano-Escobar et al. 2017). Müllergliazellen haben eine Vielzahl von Aufgaben in der Netzhaut. Sie sind metabolisch hochaktive Zellen und spielen eine entscheidende Rolle dabei, die strukturelle Integrität der Netzhaut zu bewahren und sind in Prozesse wie den Glukose-Metabolismus, der Neurotransmitter-Aufnahme und der retinalen Glutamat-Homöostase involviert. Sie sind somit wichtige Zellen für die visuelle Funktion und auch für die Ernährung der Neuronen (Fernández-Sánchez et al. 2015; Hamon et al. 2016; Ola et al. 2011). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass sie ebenfalls bei der Phagozytose von Zelldetritus beteiligt sind (Bejarano-Escobar et al. 2017).

### 1.3 Degeneration der Netzhaut

Pathologische Zustände, wie beispielsweise genetische Erkrankungen oder metabolisch bedingte Belastungen der Zellen wie unter Hyperglykämie, führen zu verschiedenen morphologischen und funktionellen Veränderungen in der Netzhaut.

Ihr hoher Energiebedarf, der aktive Metabolismus und der kontinuierliche Kontakt mit hohen Sauerstoffleveln sowie licht-induziertem Stress verlangen eine gut regulierte Homöostase, um die retinale Funktion aufrechtzuerhalten. Dieses System gerät unter pathologischen Bedingungen somit schnell ins Wanken (Martinez-Gil et al. 2022; Masland et al. 2012; Arden et al. 2012). Neurodegenerative Erkrankungen in der Netzhaut, wie die altersbedingte Makuladegeneration (AMD), das Glaukom, die Diabetische Retinopathie und die genetisch bedingte Stäbchen-Zapfen-Dystrophie Retinitis pigmentosa (RP) haben verschiedene Ätiologien und Pathogenesen. Dennoch reagieren sie auf zellulärem und molekularem Level auf Schäden an der Netzhaut sehr ähnlich und beinhalten Signalwege, die unter kontrolliertem Zelltod und retinalen Umbauprozessen (englisch *remodeling*) zu morphologischen und funktionellen Veränderungen der Zellen führen. Hierbei sind inflammatorische Reaktionen, oxidativer Stress und die Aktivierung von apoptotischen Signalwegen gängige Abläufe in all diesen Erkrankungen (Cuenca et al. 2014). Die retinale Neurodegeneration wird als Konsequenz neuronaler Apoptose, reaktiver Glukose, Glutamat-Exzitotoxizität, Reduktion neuroprotektiver Faktoren sowie als Schädigung der neurovaskulären Verbindung beschrieben (Jonsson et al. 2016). Doch nicht nur Apoptose ist in der Retina der vorherrschende Zelltodmechanismus, denn verschiedene retinale Zellen weisen verschiedene Formen von Zelltod auf (Feenstra et al. 2013). Neurone sind per se unfähig zu proliferieren, wodurch Apoptose bei ihnen zu einem kumulativen Verlust und letztlich zur chronischen Neurodegeneration führt (Barber et al. 2011).

Heute ist bekannt, dass der Funktionsverlust und das Zugrundegehen der Neuronen infolge von degenerativen Erkrankungen mitunter reaktiven Veränderungen in den Müllergliazellen zugeschrieben werden können (Fletcher et al., 2005). Es werden ebenfalls Wege zur

Gegenregulation und zur Reparatur gestartet, währenddessen vielerlei Wachstumsfaktoren und Zytokine freigesetzt werden, die sich wiederum teilweise als schädlich für das retinale Gewebe erwiesen haben (Coughlin et al. 2017; Cuenca et al. 2014).

Der Wandel, den die Gliazellen unter pathologischen Bedingungen erfahren, wird als Gliose bezeichnet. Die Zellkerne der Müllerglia werden dabei in die äußeren Schichten verlegt und die Zellkörper werden hypertrophisch und hyperplastisch. Deren Prozesse erweitern sich bis in den subretinalen Raum und bilden dort Membranen. Die Müllergliazellen gehen letztlich durch pyroptotische Mechanismen zugrunde (Feenstra et al. 2013). Auch Astrozyten werden Veränderungen ausgesetzt, wie dem Wachstum ihrer Ausläufer, die dann bis in die neuroretinalen äußeren Schichten ziehen (Fernandez-Bueno et al. 2008). Im Zuge der Gliose werden intermediäre Filamentproteine wie das GFAP (*glial fibrillary acidic protein*), Vimentin und Nestin hochreguliert (Fernández-Sánchez et al. 2015).

### 1.3.1 Hyperglykämie-induzierte Veränderungen in der Netzhaut

Die Retina hat einen großen Energiebedarf und wird durch ihre besondere anatomische Lage vom Choroid ernährt, einem Kapillarbett innerhalb der Sklera. Sauerstoff, Glukose und andere Nährstoffe diffundieren aus dem Choroid und werden dann durch einen Monolayer von retinalen Pigmentzellen (RPE) gefiltert (Hurley et al. 2021). Glukose wird dabei als primärer retinaler Treibstoff angesehen, der die Energieproduktion aufrecht erhält (Joyal et al. 2018).

Betrachtet man nun die Auswirkungen von erhöhten Glukosekonzentrationen in der Umgebung der Netzhaut, so sind einige negative Auswirkungen bereits beschrieben.

Hyperglykämie, die beispielsweise bei Patienten mit Diabetes mellitus auftritt, verursacht bis zu vierfach erhöhte neuronale Glukosewerte. Wenn diese Konzentrationen andauern oder diese Episoden häufiger auftreten, führt der intrazelluläre Glukosemetabolismus zur Neuronenschädigung. Dieses Phänomen ist weithin unter dem Begriff Glukose-bedingte Neurotoxizität bekannt (Tomlinson et al. 2008).

Wenn man sich zunächst ansieht, wie Glukose in die Netzhaut gelangt, so wird der Transport wie bei allen eukaryotischen Zellen hauptsächlich durch Glukosetransporter (GluT Proteine) ermöglicht. Im Augenblick sind dreizehn GluT-Isoformen mit unterschiedlichen physiologischen Besonderheiten und Verteilungen im Gewebe bekannt. In der Retina wurde bereits GluT 1 in Endothel-, RPE- und Photorezeptorzellen gefunden. GluT 2 ist in Müllerzellen exprimiert und GluT 3 in der IPL (Sánchez-Chávez et al. 2012).

Metabolische Substrate, wie die Glukose, gelangen so in der inneren Retina vom Gefäßendothel zu den Astrozyten und Neuronen. In der äußeren Retina erreichen sie die Müllerzellen und Photorezeptoren vom Choroid aus über das retinale Pigmentepithel. Der Glukosemetabolismus verläuft in den Gliazellen der inneren Retina hauptsächlich über Glykolyse, in der äußeren Retina dagegen durch oxidative Phosphorylierung zu CO<sub>2</sub> und Wasser (Antonetti et al. 2006).

Ein Überschuss an Glukose bedingt eine Sättigung der Hexokinase während der Glykolyse, was die Entstehung des osmotisch wirksamen Sorbitols im sogenannten Polyolweg bedingt. Dies führt unter anderem zur Gewebsschwellung und Toxizität. Im weiteren Verlauf kommt es zu oxidativem Stress, der Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) und der Aktivierung von glykierten Reaktionsprodukten, die als *advanced glycation end products* (AGE) bekannt sind, sowie deren Rezeptoren (Tomlinson et al. 2008; Antonetti et al. 2006).

Es wird diskutiert, ob diese Schädigungen zunächst die Gefäßzellen oder die Neurone betreffen (Jonsson et al. 2016). Wenn die ersten Schäden die Endothelzellen betreffen und die Permeabilität zerstören, würde die neuronale und Gliazell-Integrität im Folgenden verloren gehen und den Eintritt von zirkulierenden Makrophagen, Antikörpern, inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, exzitotoxischen Aminosäuren oder Fettsäuren in die Retina ermöglichen. Ist die Neuroretina zuerst von der vorherrschenden Hyperglykämie betroffen, könnte die Gefäßintegrität durch den Verlust der normalen Barrierefunktion der Gliazellen oder durch die erhöhte Expression von proinflammatorischen Zytokinen oder Sauerstoffradikalen Schaden nehmen (*Reactive Oxygen Species*, ROS), die Gefäßleckagen verursachen (Antonetti et al. 2006).

### 1.3.2 Insulinabhängige Pathomechanismen

Insulin ist ein Peptidhormon, das von den  $\beta$ -Zellen des Pankreas in den Langerhansschen Inseln gebildet wird. Es ist dafür zuständig, die Blutglukose-Konzentrationen in physiologischen Bereichen zu halten, indem es die zelluläre Glukoseaufnahme vereinfacht und den Kohlenstoff-, Lipid- und Proteinstoffwechsel reguliert. Darüber hinaus wird dem Molekül auch eine Rolle bei der Zellteilung und dem -wachstum durch mitogene Effekte zugeschrieben. Es ist somit das ausschlaggebende Hormon, das die zelluläre Energieversorgung und Balance der Makronährstoffe reguliert. Insulinrezeptoren (IR) wurden neben den insulin-abhängigen Geweben wie Muskulatur, Leber und Fettgewebe auch im Gehirn nachgewiesen. Die Rezeptoren für Insulin und die Insulin-Signalproteine sind hier konzentriert im Riechzentrum, Hypothalamus, Hippocampus und auch der Retina sowie den Gefäßen des Choroids zu finden (Wilcox et al. 2005; Rajala et al. 2013). Liegt eine Insulinresistenz vor, zeigen normale oder sogar erhöhte Insulinwerte aufgrund einer ungenügenden Sensitivität der Zellen keinen adäquaten Einfluss auf die Glukoseaufnahme (Wilcox et al. 2005).

Sind die  $\beta$ -Zellen nun nicht in der Lage, die vorherrschende Insulinresistenz zu kompensieren, sind eine gestörte Glukose-Toleranz und die Entwicklung eines Diabetes die Folge. Steigen die Glukosekonzentrationen daraufhin weiter, wird die Funktion der  $\beta$  Zellen weiter verschlechtert, was in einer Verringerung der Glukosesensitivität und Verschlimmerung der Hyperglykämie mündet (Wilcox et al. 2005). Auf der anderen Seite wurde gezeigt, dass die Insulinrezeptoren trophische Signale für veränderte retinale Neurone in Kultur generieren und deren Aktivierung die Neurone nachweislich vor der Apoptose durch die Phosphoinosid-3-Kinase (PI3K) Kaskade bewahrt hat (Rajala et al. 2013, 2008). Der Autor Rajala et al. konnte weiterhin eine stress-induzierte Aktivierung der IR in der Retina, insbesondere in den Stäbchen-Photorezeptoren zeigen, was sie zum wichtigen Element für die Neuroprotektion dieser Zellen macht (Rajala et al. 2008).

Somit betrifft eine gestörte Insulinaktion auf direktem Weg die Retina und scheint die retinale Dysfunktion zu initiieren (Antonetti et al. 2006).

## 1.4 Diabetes mellitus und Diabetische Retinopathie

### 1.4.1 Prävalenz und Klassifizierung

Glukose und Insulin sind besonders im Hinblick auf einen Krankheitskomplex entscheidende Moleküle. Diabetes mellitus (DM) ist als eine Gruppe von metabolischen Erkrankungen definiert, charakterisiert durch chronische Hyperglykämie, die aus Defekten bei der Insulinsekretion, -aktion oder beiden resultieren (Kharroubi et al. 2015). Diabetes ist in unserer Zeit ein Hauptgrund für Erblindung, Nierenversagen, Herzinfarkte, Schlaganfälle und Amputationen unterer Extremitäten, wie die WHO (*World health organisation*) verlauten lässt. Die Erkrankung ist zudem umso brisanter, da die Fallzahlen in den letzten Jahren noch gestiegen sind. Die Zahl der Menschen mit Diabetes stieg von 108 Millionen in 1980 auf 422 Millionen in 2014, was einen fast vierfachen Anstieg bedeutet. Die WHO erläutert weiter, dass es zwischen 2000 und 2019 einen dreiprozentigen Anstieg der alters-standardisierten Sterblichkeitsrate gegeben hat und in den Ländern mit niedrigem bis mittlerem Einkommen diese um 13 Prozent stieg (WHO 2016). Erklärungen hierfür liegen im Wesentlichen in der immer älter werdenden globalen Bevölkerung, der Urbanisierung, steigendem Übergewicht und ungesunden Lebensweisen wie mangelnder Bewegung begründet (Zheng et al. 2012).

Die WHO hat im Jahr 2019 neue Leitlinien zur Klassifizierung von Diabetes mellitus veröffentlicht, nach denen sich die Erkrankung in sechs Typen unterteilt.

**Tabelle 1-1:** Klassifizierung von Diabetes mellitus, modifiziert nach (WHO 2019).

Typ 1 Diabetes
Typ 2 Diabetes
Hybridformen von Diabetes Langsam entwickelnder immun-medierter Diabetes bei Erwachsenen Ketosis-prone Diabetes (diabetische Ketoazidose)
Andere spezifische Typen Monogener Diabetes Monogene Defekte der $\beta$ -Zell-Funktion Monogene Defekte der Insulin-Aktion Krankheiten des exokrinen Pankreas Endokrine Störungen Medikamenten- oder chemisch induziert Infektionen Ungewöhnliche spezifische Formen von immun-mediertem Diabetes Andere genetische Syndrome, die mit Diabetes assoziiert sein können
Unklassifizierter Diabetes
Hyperglykämie zum ersten Mal während der Schwangerschaft diagnostiziert Diabetes mellitus während der Schwangerschaft Schwangerschaftsdiabetes mellitus

Neben dem Typ-1-Diabetes, der durch mangelhafte Insulinproduktion im Körper charakterisiert ist, und dem Typ-2-Diabetes, der aus dem ineffektiven Gebrauch des Körpers von Insulin resultiert (WHO 2016), werden hier ebenfalls Hybridformen, andere spezifische Typen, unklassifizierter Diabetes und Diabetes während der Schwangerschaft aufgeführt.

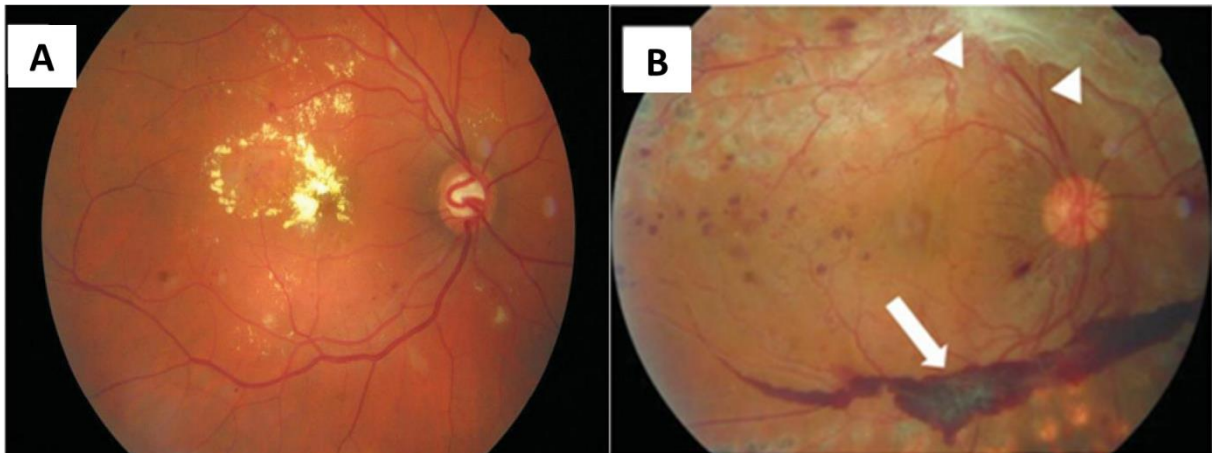
In Bezug auf das Sinnesorgan Auge, und im Spezifischen auf die Netzhaut, ist die diabetische Retinopathie von besonderer Bedeutung. Die diabetische Retinopathie ist die häufigste

mikrovaskuläre Komplikation von Diabetes und nach zwei Jahrzehnten Erkrankung werden fast alle Typ-1-Patienten sowie 80 % der mit Insulin behandelten und 50 % der Typ-2-Patienten ohne Insulin einen Grad der Retinopathie aufweisen (Stitt et al. 2016). Yau et al. schätzen die Gesamtprävalenz weltweit auf näherungsweise 93 Millionen, die DR aufweisen und 28 Millionen, die das Augenlicht gefährdende Stadien von DR zeigen (Yau et al. 2012). Es handelt sich aber nicht nur um ein häufiges gesundheitliches Problem sondern auch um ein sehr folgenschweres, denn die diabetische Retinopathie ist nicht nur der häufigste Grund vermeidbarer Erblindungen bei Individuen im Arbeitsalter (20-65 Jahre), sondern auch ein häufiger Grund für Sehverlust in älteren Populationen (Ding 2012).

Somit entstehen in diesem Zusammenhang auch immense Kosten für das Gesundheitssystem. Die jährlichen Kosten, die Patienten mit DR verursachen, hängen stark von der Schwere der Erkrankung ab, was darauf hindeutet, dass die Prävention einer Progression der DR die Kosten reduzieren kann (Heintz et al. 2010).

#### 1.4.2 Klinische Manifestation und Pathomechanismen

Klinisch äußert sich die Diabetische Retinopathie vielfältig. Eine wichtige klinische Unterteilung ist die nichtproliferative Form (NPDR) mit den Stadien mild/mäßig/schwer und die proliferative Form (PDR).



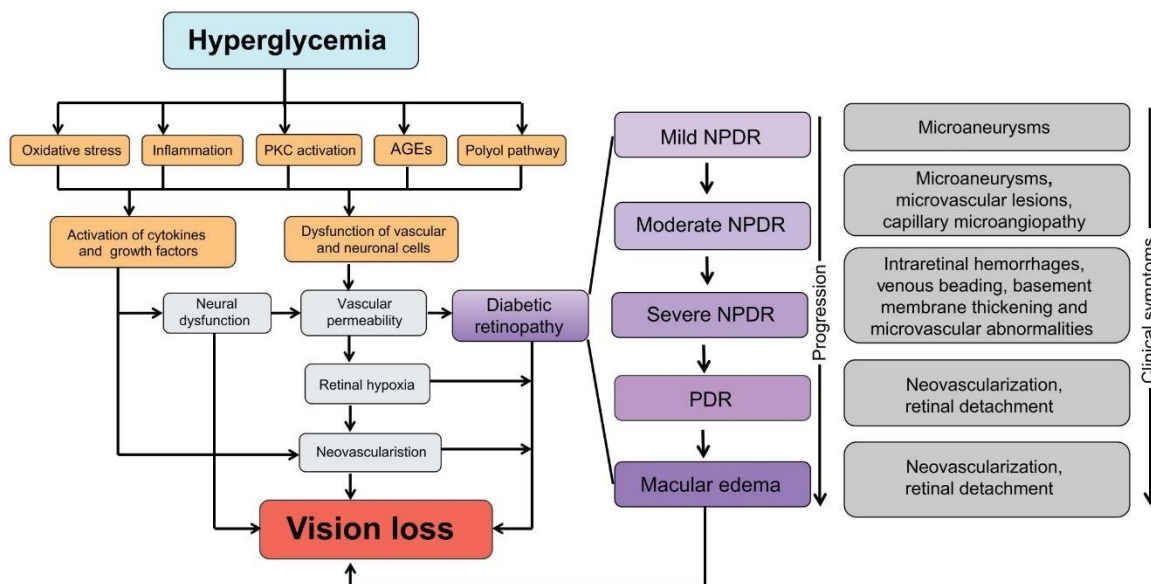
**Abbildung 1-3:** **A:** Nicht proliferative DR (NPDR) mit Makulaödem und **B:** Proliferative DR (PDR) mit Neovaskularisation, Hämorrhagien (Pfeil), Fibrose (Pfeilspitzen), modifiziert nach Stitt, Lois et al (2).jpg (Stitt et al. 2013).

Die retinalen Läsionen, die im Rahmen der DR auftreten, sind bei der NPDR durch Mikroaneurysmen, punkt- und fleckartige Hämorrhagien (die sogenannten *cotton wool spots*), die Nervenfaserschicht-Infarkte darstellen, venöse Abnormalitäten und intraretinale mikrovaskuläre Anomalien gekennzeichnet, die als IRMA bezeichnet werden und Shunt-Gefäße zwischen nicht-durchbluteten Bereichen des Kapillarbett sind (Stitt et al. 2013).

Das Stadium der PDR beinhaltet die Ausbildung von Neovaskularisation. Die neu gebildeten Gefäße sind brüchig und durchlässig und können von fibrösem Bindegewebe umhüllt werden. Durch Adhäsionen an diesem Gewebe kann es in der Folge zu Einblutungen in den Glaskörper oder sogar zur Retina-Ablösung kommen. Die PDR tritt bei circa 50 % der Patienten mit Typ-1-Diabetes und 15 % derer mit Diabetes Typ I2 auf (Stitt et al. 2013).

Wenn die Flüssigkeitsansammlungen die retinale Dicke beeinflussen und sich Zysten im retinalen Gewebe und Ablösungen der Neuroretina vom Pigmentepithel bilden, spricht man vom Diabetischen Makulaödem (DME). Diese ist der häufigste Grund für Erblindung im Rahmen des Diabetes mellitus (Abcouwer et al. 2014; Stitt et al. 2013).

Im Hinblick auf die zugrunde liegenden Pathomechanismen der Erkrankung wurde bereits auf die Bedeutung und Folgen der andauernden Hyperglykämie in der Netzhaut hingewiesen. Viele klinische Studien zeigten bereits eine starke Beziehung zwischen Hyperglykämie und diabetischen mikrovaskulären Komplikationen sowohl bei Diabetes Typ 1 als auch Typ 2. So ist einer der wichtigsten prädiktiven Faktoren für DR und DME (Diabetisches Makulaödem) der Level der glykämischen Kontrolle (Ding 2012). Tomlinson et al. sprachen in diesem Zusammenhang von der Glukose-Neurotoxizität, die erreicht wird, wenn die während eines Diabetes meist vierfach erhöhten Blutglukosewerte andauern oder wenn solche Episoden regelmäßige Ereignisse sind, denn intrazellulärer Glukose Metabolismus führt zu neuronalen Schäden (Tomlinson et al. 2008).



**Abbildung 1-4:** Schaubild der Pathomechanismen und Signalwege, die zur DR und letztlich zum Sehverlust führen und die klinischen Symptome, modifiziert nach Robinson, Barathi et al.jpg (Robinson et al. 2012).

Robinson et al. konnten in ihrem Review die wichtigsten beteiligten biochemischen Mechanismen in übersichtlicher Form darstellen, die zum Sehverlust im Rahmen der DR führen. Hier wird die Hyperglykämie als zentrale Ursache dargestellt, die zunächst zu oxidativem Stress, Entzündung, PKC-Aktivierung, der Entstehung von AGEs und dem Polyolweg führt. Gleichzeitig sind hier die

klinischen Stadien und Symptome, angeordnet nach ihrer Progression, aufgeführt (Robinson et al. 2012; Heng et al. 2013).

Die vaskuläre Permeabilität und Neovaskularisation sind hierbei eng an den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor VEGF (englisch *vascular endothelial growth factor*) gekoppelt. Die Fähigkeit von VEGF, die Permeabilität und Angiogenese zu fördern, lässt ihn durch unverhältnismäßige Ansammlung bei der vaskulären Dysfunktion im Verlaufe der schweren DR eine Rolle spielen (Abcouwer et al. 2014).

### 1.4.3 Modellsysteme und gentherapeutische Ansätze

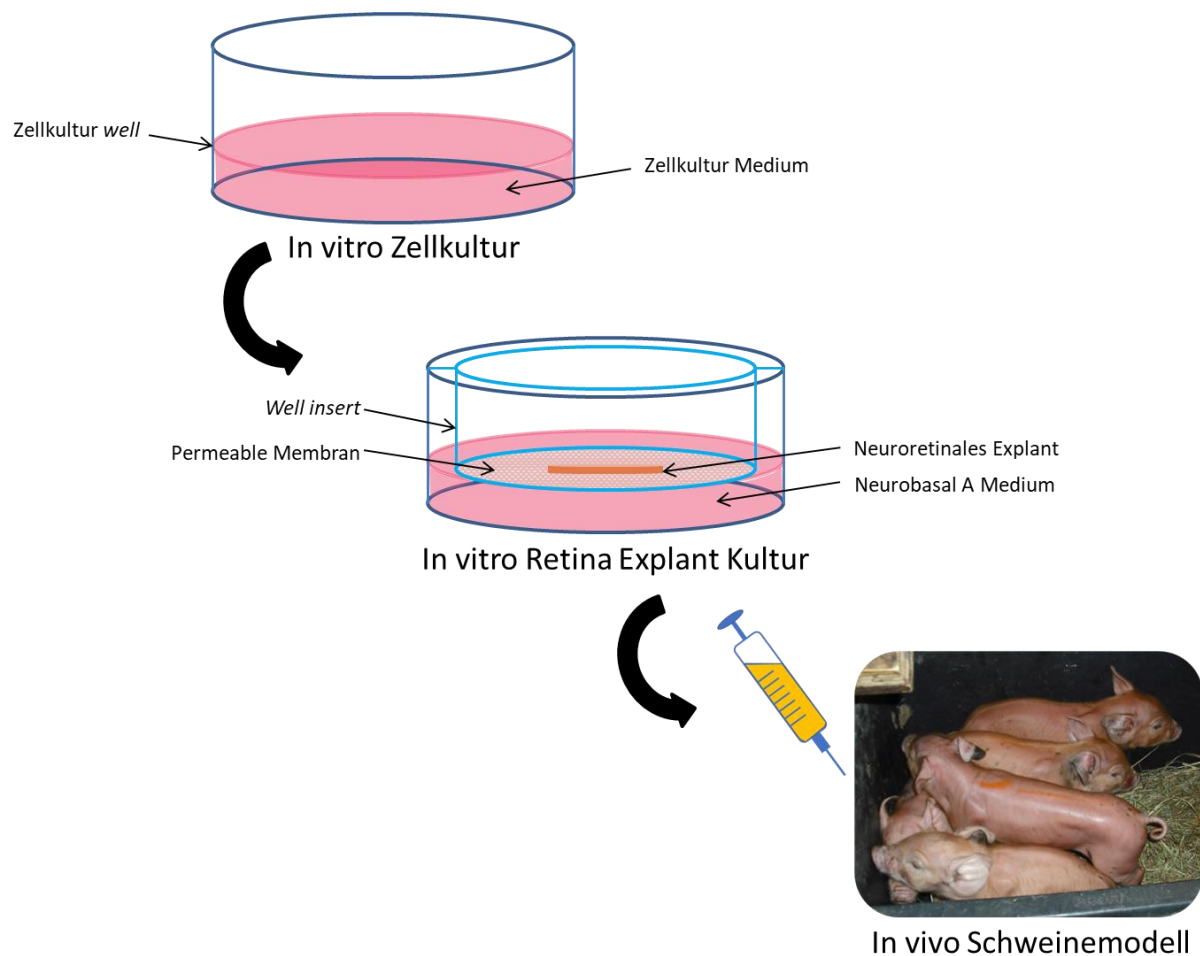
Um die genauen Mechanismen der Netzhautdegeneration zu erforschen, vor allem im Rahmen der verschiedenen Erkrankungen wie der diabetischen Retinopathie, und um Therapiemöglichkeiten zu finden, gibt es bis dato verschiedene Modellsysteme. Per definitionem weisen Modellsysteme oder -organismen spezifische Charakteristika und Vorzüge auf, aufgrund derer sie für wissenschaftliche Fragestellungen von Interesse sind und einen experimentellen Zugang zur Untersuchung von bestimmten Einzelaspekten ermöglichen (Spektrum, Lexikon der Biologie). Angefangen von einzelnen Zelllinien, über Gewebeverbände und Organoide bis hin zu höheren Lebewesen können diese Systeme vielfältig sein. Um einen kurzen Einblick zu geben, welche Modelle im Rahmen der Forschung zur diabetischen Retinopathie Anwendung finden, sollen zunächst einige *in-vivo*-Modelle vorgestellt werden.

Viele Tiermodelle wurden entwickelt, um die Ätiologie und Pathogenese der DR zu untersuchen und Therapien zu entwickeln und zu testen. Da die DR eine komplexe Erkrankung mit genetischen Einflüssen und Umwelteinflüssen ist, wurden auch die Modelltiere durch Induktion (Chirurgische Pankreatektomie, Medikamente, Ernährung, Laser oder chemische Zerstörung) oder genetische Mutation durch selektive Züchtung oder Genom-Editierung mit der Erkrankung versehen. Chemische Stoffe, die eine DR hervorriefen, waren in der Vergangenheit zum Beispiel Streptozotocin (STZ) oder Alloxan (Olivares et al. 2017; Robinson et al. 2012). Eine große Auswahl

an verschiedenen Tierarten wurde hierbei bereits genutzt, dazu gehören Nager wie Mäuse und Ratten, aber auch Katzen, Hunde, Schweine, Primaten und Nicht-Säugetiere wie beispielsweise Zebrafische (Olivares et al. 2017; Lai et al. 2013). Tiermodelle, die charakteristische Läsionen der humanen DR entwickeln, werden weiterhin eine wichtige Rolle dabei spielen, um die Pathogenese der Erkrankung besser zu verstehen und neue Therapien vor klinischen Versuchen zu testen (Robinson et al. 2012).

Auf *in-vitro*-Modellsysteme wird im Folgenden noch genauer eingegangen. Es soll nun in Kürze das Gebiet der Genom-Editierung und der Gentherapie betrachtet werden, in dem das Schweinmodell in den letzten Jahren zu einer wichtigen Säule geworden ist. Die Gentherapie ist dazu bestimmt, genetisches Material in Zellen von Patienten zu überführen, um defekte Gene zu kompensieren oder therapeutische Transgene zuzuführen. Über die letzten drei Jahrzehnte hat sie sich von initialen humanen Gentransfer-Experimenten zu zugelassenen klinischen Therapien weiterentwickelt. Es gibt verschiedene Strategien in der Gentherapie, wie die Gen-Augmentation, gen-spezifisches Targeting und die Genom-Editierung. Als gen-spezifische Targets werden verschiedene Kandidatengene zur Therapie der DR bei existierender Neovaskularisation und vaskulärer Hyperpermeabilität und zum Schutz der retinalen Blutgefäße und Neurone vor Schäden genutzt (Wang et al. 2020). Für den Gentransfer wurden in den letzten Jahren zunehmend virale Vektoren als Vehikel verwendet, allen voran AAV- und Lentivirusbasierte Vektoren (Slijkerman et al. 2015). Der Gentransfer ist sehr effizient für die Generierung von transgenen Tiermodellen verschiedener Spezies. Die Erfindung des CRISPR/Cas-Systems hat zur Entwicklung der Gentherapie von der Gen-Augmentierung zur Gen-Editierung geführt. Diese Technologie hat das Potential im Rahmen der Erforschung neuer molekularer Signalwege und Therapien im Rahmen der DR Anwendung zu finden, zum Beispiel im Targeting des hier überexprimierten VEGF (Wang et al. 2020; Kostic et al. 2016).

### 1.4.3.1 Organotypische Retinakultur



**Abbildung 1-5: Organotypische Retinakultur als intermediäres Modell zwischen der *in-vitro*-Zellkultur und *in-vivo*-Tiermodellen.** Das Netzhaut-Explantat wird auf einer permeablen Membran in einem speziellen Medium in Kultur gehalten.

Die organotypische Retinakultur erlaubt die Aufrechterhaltung der retinalen Architektur *in situ* mit dem Vorteil der einfachen Manipulation und Behandlung des Gewebes. Effekte von potentiell toxischen Metaboliten, die im diabetischen Milieu auftreten lassen sich in Abwesenheit von der metabolischen Homöostase analysieren, die beim systemischen Diabetes, so auch im *in-vivo*-Modell, eingeleitet wird. Somit lassen sich neurodegenerative Ereignisse sehr gut untersuchen (Matteucci et al. 2015). Organotypische *in-vitro*-Systeme bieten zusätzliche Methoden für weitergehende und detaillierte Analysen, die in vielen *in-vivo*-Situationen nicht möglich sind, da sie hier aufgrund ihrer Komplexität nur schwierig zu interpretieren sind. Morphologische und molekulare Analysen am

Gewebe zeigten in der Vergangenheit bereits, dass sich die meisten histotypischen und neurochemischen Charakteristika in Kultur zu ähnlichen Zeitpunkten zeigen, wie die entsprechenden Veränderungen in den *in-vivo*-Vergleichsgruppen (Café et al. 2001). Die Vergleichbarkeit zu den *in-vivo*-Bedingungen wurde von Di Lauro et al. insbesondere für die äußere Retina gezeigt (Di Lauro et al. 2016).

Im Hinblick auf die Zellkultur gibt es ebenfalls fundamentale Probleme, die den Aussagewert der Testsysteme betreffen. Lebende Organismen unterliegen einer strikt kontrollierten, stabilen Umwelt, die für die zelluläre Physiologie unabdingbar ist. Experimentelle *in-vitro*-Modelle zeigen daher dramatische Veränderungen aufgrund fehlender Nährstoffe, reduzierter Sauerstoff-Verfügbarkeit und der Ansammlungen von Abfallprodukten. Zellkulturen enthalten normalerweise wenige oder nur eine Zelllinie, die in künstlicher Umgebung ohne Interaktion zwischen den Zellen und ihrer physiologischen Umwelt kultiviert werden. Zudem ist in der Zellkultur der Differenzierungsstatus und die zelluläre Antwort völlig verschieden, verglichen mit den *in-vivo*-Bedingungen (Matteucci et al. 2015). Es wurde bereits gezeigt, dass organotypische Systeme viele zelluläre Dynamiken innerhalb der verschiedenen Zelltypen und der interzellularen Matrix erhalten, die in isolierten Zellkulturen verloren gehen (Fernandez-Bueno et al. 2012).

Es handelt sich demnach hier um ein starkes intermediäres Modellsystem zwischen den *in-vitro* Zellkulturen und *in-vivo*-Tiermodellen. Müller et al. konnte zeigen, dass die verschiedenen Zellschichten mit ihren hoch spezialisierten Zelltypen während der Kultur intakt blieben und dass Gliazellreaktionen und interzelluläre Interaktionen unter gut definierten Bedingungen untersucht werden konnten (Müller et al. 2017).

Schwierigkeiten bei diesem Modellsystem sind sicherlich die Abwesenheit von stabilisierenden Kräften wie dem intraokulären Druck, der Adhäsion zum retinalen Pigmentepithel an der äußeren Grenze und der Vitreusmembran an der inneren Grenze, die mit einer Gliose und neuronalem Zelltod verbunden ist (Åkerström et al. 2017). Des Weiteren ist die Axotomie der Ganglienzellen als Teil der Präparationstechnik, die Abwesenheit der Blutzufuhr und das Fehlen des RPE zu

nennen. (Di Lauro et al. 2016) Zudem können die retinalen Explantate nur eine gewisse Zeit in Kultur gehalten werden. Caffè et al. spricht hier von einem Zeitraum von etwa vier Wochen (Caffè et al., 2001), was chronische Langzeittherapien erschweren (Valdés et al. 2016).

In der Literatur sind bereits einige Methoden zur Kultivierung von porzinen Explantatkulturen beschrieben (Wang et al. 2011; Åkerström et al. 2017), außerdem wurden Auswirkungen von Hyperglykämie (Valdés et al. 2016, S. 461) und Hypoxie (Mueller-Buehl et al. 2021; Kuehn et al. 2017) untersucht. Auch die Effekte einer Co-Kultur zusammen mit dem RPE (Di Lauro et al. 2016; Wagner et al. 2022) und der Nutzen einer lateralen Zugkraft am Gewebe und der Platzierung der ILM auf der Kulturmembran wurden untersucht (Taylor et al. 2014).

## 1.5 Zielsetzung

Viele klinische Studien weisen eine enge Verbindung zwischen Hyperglykämie und diabetischen mikrovaskulären Komplikationen sowohl bei Typ-1-, als auch Typ-2-Diabetes nach. Eine mikrovaskuläre Hauptkomplikation von DM stellt die diabetische Retinopathie dar. Im Jahr 2010 verursachte die DR 1,9 % der mittleren und schweren Sehstörungen weltweit und 2,6 % aller Fälle von Erblindung (WHO 2016). Auf die steigende Prävalenz und die enormen Kosten für das Gesundheitswesen, die durch die diabetische Retinopathie entstehen, wurde bereits hingewiesen. Die verschiedenen biochemischen Mechanismen, die mit Hyperglykämie zusammenhängen wurden bereits mit der Pathogenese der DR in Verbindung gebracht. Diese beinhalten unter anderem oxidativen Stress, die Aktivierung des Polyol- und Hexosaminwegs, die Entstehung von AGE und die Aktivierung von Proteinkinase-C-Isoformen. Die therapeutischen Optionen sind immer noch begrenzt, da die letztlichen Wege, die den retinalen Zellschaden initiieren und die Progression zur offenen Retinopathie voranbringen, noch nicht vollends identifiziert wurden (Stitt et al. 2013).

In diesem Zusammenhang ist der Mangel an geeigneten experimentellen Modellsystemen ein wichtiger Faktor, die die Pathologien in der Netzhaut wirklichkeitsgetreu reproduzieren, insbesondere für den Typ-2-Diabetes (Valdés et al. 2016). Die Ähnlichkeiten in Größe, Anatomie und physiologischen Charakteristika des Schweineauges im Vergleich zum Menschen wurden bereits beschrieben und sind der Grund, warum porzine Modelle sehr wertvoll für die Forschung in diesem Bereich sind. Großtiermodelle wie das INSC94Y transgene Schwein wurden in den vergangenen Jahren bereits erfolgreich eingesetzt, um den Einfluss von permanenter Hyperglykämie und gestörter Insulinsekretion auf die Retina zu untersuchen (Kleinwort et al. 2017).

Retinale Explantatkulturen haben den großen Vorteil, das neuronale Gewebe der Netzhaut und somit neuronale Auswirkungen unter diabetischen Bedingungen von indirekten systemischen Effekten durch das Gefäß- oder das Immunsystem isoliert darzustellen. Im Vergleich zu *in-vivo*-Experimenten bieten die Explantatkulturen den zusätzlichen Vorteil, dass Leiden von lebendigen Tieren vermieden wird und die Zahl der benötigten Labortiere drastisch reduziert wird, in Anlehnung an das 3R-Konzept von Russel und Burch (Valdés et al. 2016). Es besteht nämlich die Möglichkeit, die Organe auf direktem Weg von lebensmittelliefernden Nutztieren aus der Fleischindustrie zu beziehen, da Augen hier ein reines Abfallprodukt darstellen, so geschehen auch in dieser Arbeit. Die Tiere werden demnach nicht für Laborzwecke gezüchtet und getötet (Wagner et al. 2020).

In dieser Studie werden im Rahmen einer Grundlagenforschung das Verhalten der porzinen Neuroretina-Explantate unter verschiedenen Kulturbedingungen im Hinblick auf die Integrität des Gewebes zum Startzeitpunkt der Fixierung, der Anfertigung der Explantate, der Beschaffenheit des Kulturmediums und dem Einfluss von erhöhten Glukosekonzentrationen im Medium untersucht. Zu verschiedenen Zeitpunkten im Verlaufe der Kultur werden Glukose- und Insulinkonzentrationsmessungen im Kulturmedium vorgenommen und das Gewebe morphologisch durch verschiedene HE- und Immunfluoreszenzfärbungen auf die Integrität der

retinalen Zellen hin überprüft und auf RNA-Ebene auf Erhöhungen und Erniedrigungen bestimmter Moleküle kontrolliert.

# Material & Methoden

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien, Farbstoffe, Ausgangsmaterialien

**Tabelle 2-1:** Chemikalien. *Alphabetische Auflistung mit Hersteller.*

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Acrylamid	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Agarose LE	Genaxxon, Ulm
Augen vom Hausschwein	Metzgerei Binder, Hauptstraße 2, 35510 Butzbach (Kirch-Göns)
$\beta$ Mercaptoethanol ( $\beta$ ME)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	PAN Biotech, Aidenbach
Dimethylsulfoxid (DMSO)	New England Biolab, Frankfurt am Main
Dinatriumphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Merck, Darmstadt
dNTPs	Fermentas, St. Leon-Rot
Eosin G Lösung	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Essigsäure 100% (Eisessig)	Merck, Darmstadt
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Applichem, Darmstadt
Eukitt Mounting Medium	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fetales Kälberserum (FKS)	PAN Biotech, Aidenbach

GelRed	Biotium, Fremont
Hämatoxylin Lösung nach Gill II	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	PAN Biotech, Aidenbach
LC Green	Biochem, Salt Lake City, USA
Loading Dye	Fermentas, St. Leon-Rot
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Promega, Mannheim
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Normal Donkey Serum (NDS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Penicillin	PAN Biotech, Aidenbach
Roswell Park Memorial Institute Medium 1640 (RPMI)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Serva DNA Stain G	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Sodium dodecyl Sulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Streptomycin	PAN Biotech, Aidenbach
Xylene/Xylol	VWR Chemicals, Darmstadt

## 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 2-2:** Verbrauchsmaterialien. Alphabetische Auflistung mit Hersteller.

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
Aluminiumfolie	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Augenscheere, gebogen, 12 cm, 9 cm	Geuder AG, Heidelberg
Deckgläschen für Objektträger	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Dewar Transportgefäß, Borosilikatglas 1L Typ 26	VWR International GmbH, Darmstadt
DNAse I set	Qiagen GmbH, Hilden
Einmalhandschuhe, Nitril	Ansell GmbH, München
Einmalkanüle 30Gx1/2; 0,30x12mm	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Falcon 15 ml und 50 ml	Tube Greiner Bio One, Frickenhausen
Färbekammer für Objektträger	Science Services GmbH, München
Membrane Slides, PEN-Membrane 2.0 $\mu\text{m}$	Leica, Wetzlar
Multidish 4 wells	Nunc, Roskilde, Dänemark
Multiply $\mu\text{Strip}$ Pro 8-strip low profile	Sarstedt, Newton, USA
Multiwell Platte 6 wells	Greiner, Kremsmünster
Objektträgerkasten mit 50 und 100 Stellplätzen	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Olympus IMMOIL-F30CImmersion Oil Type F	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Pap Pen	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt

Parafilm	VWR International GmbH, Darmstadt
Pinzetten Dumont #5, #55	Fine Science Tools, Heidelberg
Polycarbonatmembran, SPLInsert	SPL Life Sciences Co., Korea
Hanging Porengröße 0.4 µm	
Skalpelle (Einmal-Skalpelle)	FEATHER® Safety Razor Co., Japan
Spatel	Bausch & Lomb GmbH, Heidelberg
Tissue Freezing Medium ®	Reichert Jung, Unterschleißheim/ München
Tissue-Tek ® Cryomold	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen
Trepan-Griff (Universal) und	Storz Instrument GmbH, Heidelberg
Trepanmesser 6mm und 9,5mm	

### 2.1.3 Puffer und Medien

Für alle in untenstehender Tabelle aufgeführten Puffer und Medien wurde Reinstwasser verwendet, das über ein Reinstwassersystem (Satorius AG) gewonnen wurde.

**Tabelle 2-3:** Puffer und Medien. *Alphabetische Auflistung und Zusammensetzungen.*

<b>Puffer und Medien</b>	<b>Zusammensetzung</b>
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	DAPI-Stammlösung 0,1 mg/ml 1 :1000
	1x PBS
Aqua dest.	
Blockierlösung	10% NHS
	1%BSA
	1% Triton x-100

	0,02% Natriumazid
	1x PBS
DMEM +++	2% L-Glutamin
	1% Penicillin / Streptomycin
	10% FKS
	DMEM
Paraformaldehyd (PFA)	4 % PFA (Merck)
	1X PBS
	pH 7,4
Phosphate-buffered saline (PBS)	1.37 M NaCl
10x	27 mM KCl
	18 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	pH 7.4
SDS-Laufpuffer 10x	25 mM Tris-Base
	1.92 mM Glycin
	0,1% SDS
Sucrose, 10/20/30 %	10/20/30 % Sucrose (Serva)
	5 % NaN <sub>3</sub>
	1x PBS
Transportmedium	25 mM HEPES
	1x Antibiotoc-antimycotic mixture (Gibco)

	1:1 DMEM + RPMI
TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE)	1 M Tris-Base
10x	820 mM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
	10 mM EDTA
Tris-gepufferte Salzlösung (TBS)	1.5 M NaCl
10x	30 mM KCl
	250 mM Tris
	pH 7.4
Triton X-100 Stammlösung	5 % Triton X-100
	1x PBS
Zellkulturmedium	Neurobasal-A-Medium
	10% FBS
	2% B-27-Supplement (Gibco)
	1% L-Glutamin
	1x Antibiotic-antimycotic mixture (Gibco)

#### 2.1.4 Kits

**Tabelle 2-4:** Kits. Alphabetische Auflistung mit Verwendung und Hersteller.

<b>Kit</b>	<b>Verwendung</b>	<b>Hersteller</b>
Human/Canine/Porcine	Insulin	R&D Systems,
Insulin DuoSet ELISA	Konzentrationsmessung	Minneapolis, USA

<i>In Situ</i> Cell Death Detection Kit, Fluorescein	Darstellung apoptotischer Zellkerne	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Precellys Lysing Kit CK14	Lyse des retinalen Gewebes zur RNA-Extraktion	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
PrimeScript™ RT Master Mix	cDNA Synthese	Takara, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
RNeasy® Mini Kit	RNA-Isolation (weitere Gewebe, Zellen)	Qiagen, Hilden

### 2.1.5 Primärantikörper

**Tabelle 2-5:** *Verwendete Primärantikörper.*

<b>Antikörper, Verdünnung, Wirt</b>	<b>Hersteller</b>
Calbindin 1:1000 rb	Swant Inc., Marly, Schweiz
CtBP2 1:2000 ms	BD Transduction Laboratories, Heidelberg
GFAP 1:1000 rb	Merck Millipore, Darmstadt
Glutaminsynthetase 1:2500 ms	BD Transduction Laboratories, Heidelberg
LM- Opsin 1:600 gt	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, USA

PKCa 1:10000 rb	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, USA
-----------------	--

Recoverin 1:1000 rb	Merck Millipore, Darmstadt
---------------------	----------------------------

Rhodopsin 1:500 ms	Merck Millipore, Darmstadt
--------------------	----------------------------

## 2.1.6 Sekundärantikörper

***Tabelle 2-6: Verwendete Sekundärantikörper.***

<b>Antikörper, Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
Alexa Fluor 488 1:500	Molecular Probes, Eugene, USA
Alexa Fluor 594 1:500	Molecular Probes, Eugene, USA
DAPI 1:5000	Molecular Probes, Eugene, USA
PNA 488 1:200	Molecular Probes, Eugene, USA

## 2.1.7 Primer

**Tabelle 2-7:** Primersequenzen.

Protein	Primersequenz	Länge des qPCR-Produkts
gapDH forward	GGTCGGAGTGAACGGATTGG	199 bp
gapDH reverse	TCCATTGATGACAAGCTTCCC	199 bp
Glucose transporter 1 forward	GTCCTACCTGAGCATCGTGG	97 bp
Glucose transporter 1 reverse	AATCTCATCGAAGGTCCGGC	97 bp
Insulin receptor forward	TTC AACCCCAAGATGCGGCCGA	299 bp
Insulin receptor reverse	TTTAGCCCCAGCGCGGACCCTC	299 bp
VEGF forward	GATCCGCAGACGTGTAAATGTT	87 bp
VEGF reverse	CGCCTCGGCTTGTCACAT	87 bp

## 2.1.8 Enzyme

**Tabelle 2-8:** Enzyme. Alphabetische Auflistung mit Hersteller.

Enzym	Hersteller
DNase I	Fermentas, St. Leon-Rot
GoTaq Polymerase	Promega, Mannheim

PrimeScript RTase	Takara,	Saint-Germain-en-Laye,
	Frankreich	

## 2.1.9 Größenstandards

**Tabelle 2-9:** Größenstandards. Alphabetische Auflistung mit zugehörigem Hersteller.

Marker	Hersteller
GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
QIAxcell RNA rouser 200 – 6000 nt	Qiagen, Hilden

## 2.1.10 Geräte und Software

**Tabelle 2-10:** Geräte und Software. Alphabetische Auflistung mit Hersteller.

Gerät, Software	Hersteller
Autoklav DX-65	Systec GmbH, Linden
Binokular SMZ 168	Motic, Wetzlar
BioDocAnalyzer	Biometra, Göttingen
BioPhotometer	Eppendorf, Wesslingen-Berzdorf
Brutschrank	Binder, Tuttlingen
Eismaschine	Scotsman, Berlin
Elektrophorese Powersupply	Biometra, Göttingen
Fluoview FV10-ASW Version 04.01.02.02	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Gelkammer Whatman	Biometra, Göttingen

Konfokales Laser Scanning Mikroskop Fluoview FV10i	Olympus	Deutschland	GmbH, Hamburg
Kryostat MEV	SLEE medical GmbH, Mainz		
Magnetrührer	IKA, Staufen		
Mastercycler ep realplex	Eppendorf, Schönebuch/Basel		
Microsoft Excel für Windows 2016	Microsoft	Deutschland	GmbH, München
Microsoft PowerPoint für Windows 2016	Microsoft	Deutschland	GmbH, München
Microsoft Word für Windows 2016	Microsoft	Deutschland	GmbH, München
PCR Cycler T Professional Basic Gradient	Biometra, Göttingen		
pH Meter	Mettler-Toledo GmbH, Gießen		
Photoshop CS 6 extended	Adobe Systems, München		
Precellys Homogenisator	Peqlab, Erlangen		
QIAxcel System	Qiagen, Hilden		
Schüttler Certomat H	Sartorius, Göttingen		
Sigma Plot 12.0	Systat Software GmbH, Erkrath		
Sterilbank	Invitrogen, Karlsruhe		
Thermoblock	Biometra, Göttingen		
UPlanSApo	x60/1.35 Olympus	Deutschland	GmbH,
Ölimmersionsobjektiv	Hamburg		
Vortexer	VWR, Damstadt		
Waage	Ohaus, Zürich		
Wasserbad TW12	Julabo, Seelbach		

Zentrifuge 1-15 PK	Sigma, München
Zentrifuge 4K15	Sigma, München
Zentrifuge Micro 200	Hettich, Tuttlingen

## 2.2 Methodik

### 2.2.1 Spendertiere

Alle in der Studie verwendeten Augen stammen von etwa acht Monate alten gesunden Hausschweinen, die als Hybrid-Mastschweine zu Zwecken der kommerziellen Fleischgewinnung gezüchtet und gemästet wurden. Nach ordnungsgemäßer Betäubung mittels Elektrozange und anschließendem Ausbluten, wie es im Tierschutzgesetz (TierSchG) definiert ist, erfolgte unvermittelt die Enukleation durch das Fleischereipersonal.

### 2.2.2 Transport

Die Schweineaugen wurden unmittelbar nach der Enukleation entgegengenommen und in ein Behältnis mit Transportmedium überführt, das zuvor im Labor bei 8 °C gelagert wurde. Dieses Medium bestand aus 1:1 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) und Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI-1640), dem 25 mM Hydroxyethylpiperazineethanesulfonsäure (HEPES) und 10% einer antibiotisch-antimykotischer Lösung bestehend aus Penicillin, Streptomycin und Amphotericin B (Gibco, Invitrogen, Paisley, UK) zugesetzt wurde. Ein Behältnis wurde stets gekühlt, in dem es in einem mit etwas Eis befüllten zweiten Gefäß transportiert wurde, sodass das darin befindliche Nährmedium konstant bei 8 °C blieb. Gleichzeitig wurde ein weiteres Behältnis mit den restlichen Augen bei Umgebungstemperatur (RT) zum Labor gebracht. Hier wurde nun die Fixierung und Entnahme der Netzhaut-Explantate für beide Gruppen exakt gleich durchgeführt. Anschließend wurden Gewebeschnitte unmittelbar nach Ankunft im Labor und bis

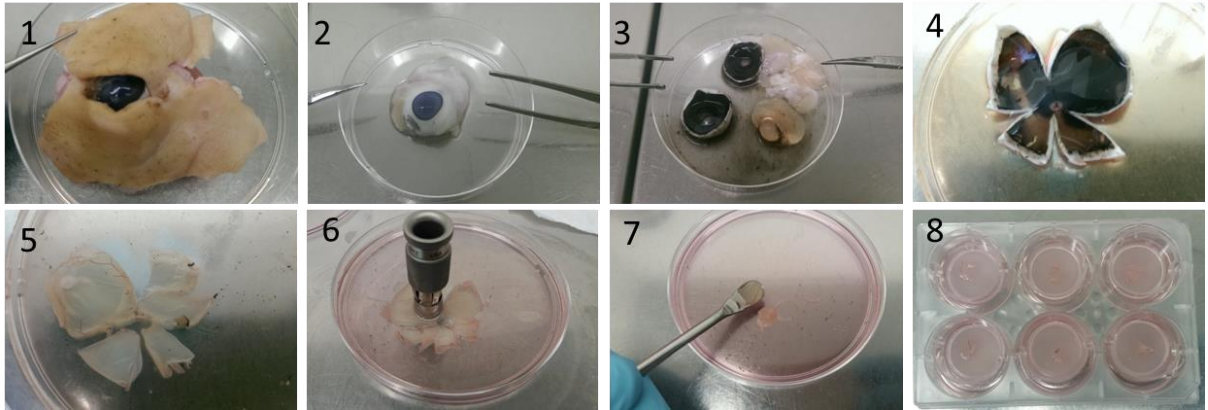
72 Stunden in Kultur gehaltene Explantate mit HE gefärbt und auf Unterschiede in der Erhaltung des Gewebes bezüglich Gewebedicke und Anzahl der Zellkerne untersucht. Um einen möglichen Einfluss der Transportzeit auf die Qualität der retinalen Gewebe zu untersuchen wurden unmittelbar nach der E nukleation einige Netzhautgewebeproben entnommen und noch vor Ort in 4 % PFA fixiert.

## 2.2.3 Herstellung der organotypischen Retinakultur

### 2.2.3.1 Präparation und Kultivierung der Neuroretina-Explantate

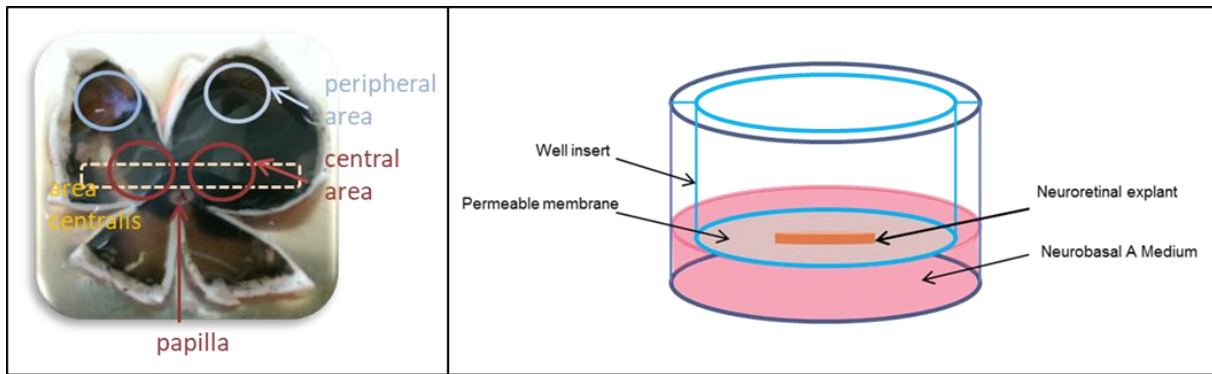
Die Präparation und Fixierung der retinalen Explantate fand innerhalb von drei Stunden nach der E nukleation unter aseptischen Bedingungen in einer *laminar flow* Sicherheitswerkbank statt. Die Augen wurden aus dem Transportmedium genommen, zwei Minuten lang in eine 70 % Ethanol-Immersion bei Raumtemperatur gebracht und kurz mit frischem DMEM mit 10 % antibiotischer-antimykotischer Lösung gewaschen, um den Mikroorganismengehalt unter der Werkbank zu minimieren. Anschließend wurden die Augen in eine große Petrischale überführt, wo sie mittels anatomischer Pinzette und Schere vom umgebenden Gewebe freipräpariert wurden, bis der Augapfel frei vorlag (Abbildung 2-1). Nachdem mithilfe einer Kanüle (Außendurchmesser 0.8 mm) eine Stichinzision vollführt und der Augapfel in seiner Position gehalten wurde, erfolgte mittels Schere ein kreisförmiger Schnitt entlang der ora serrata. Die vordere Augenkammer, die Linse und der Glaskörper wurden nun vorsichtig mit der Pinzette herausgehoben und der hintere Augenbecher bestehend aus Sklera, Choroidea, RPE und Retina, wurde auf drei, sechs, neun und zwölf Uhr Positionen mit der Schere radial eingeschnitten. Das Gewebe wurde nun in der charakteristischen Kleeblattstruktur flach mit der Retina nach unten auf dem Boden einer neuen Petrischale, die zuvor mit etwas Zellkulturmedium befüllt wurde, ausgebreitet. Nun wurde die Neuroretina vorsichtig durch Abheben der oben-liegenden Schichten mittels Pinzette vom retinalen Pigmentepithel abgelöst, wobei die Retina vom Sehnerv vorsichtig mithilfe eines Skalpells

abgetrennt wurde. Im Bereich der porzinen zapfenreichen Region, die in der englischsprachigen Literatur als *visual streak* bezeichnet wird, sowie auch aus peripheren Regionen wurden nun mittels Trepanstanze 6 x 6 mm und 9,5 x 9,5 mm große Explantate herausgestochen.



**Abbildung 2-1: 1-8. Ablauf der Präparation der porzinen Netzhäute.** Schrittweises Vorgehen der der Präparation der retinalen Explantate mit Freipräparieren, Eröffnung des Augenbechers und Isolierung des hinteren Augenbechers, gefolgt von Einschnneiden in Kleeblattstruktur, Freilegen der Retina, Anfertigen der Explantate mittels Trepanstanze und Überführung auf Polykarbonatmembran-Inserts.

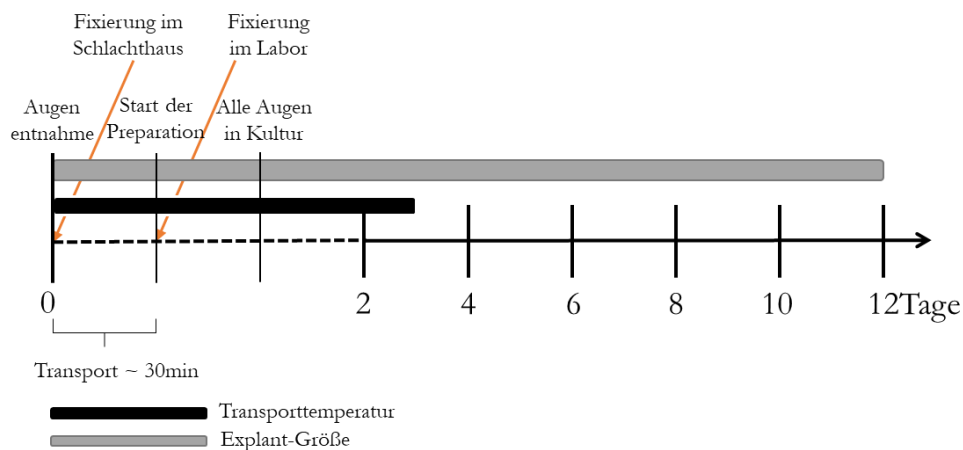
Die Neuroretina-Explantate wurden anschließend als Tag-0-Proben sofort weiterverarbeitet oder mit höchster Sorgfalt auf einem Spatel auf eine semipermeable Polykarbonatmembran (Porengröße 0,4  $\mu\text{m}$ ) in einer 6-Well-Platte überführt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Photorezeptoren der Membran anliegen. Die Wells wurden mit je 1,5 ml Zellkulturmedium befüllt, das aus Neurobasal-A-Medium mit 10% Kälberserum (PAN Biotech), 2% B-27 Supplement (Gibco), 1% L-Glutamin und 1x antibiotisch-antimykotischer Lösung (Gibco) bestand und bei 37 °C Temperatur und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Der Aufbau der *in-vitro*-Retinakultur wird in Abbildung 2-2 schematisch dargestellt.



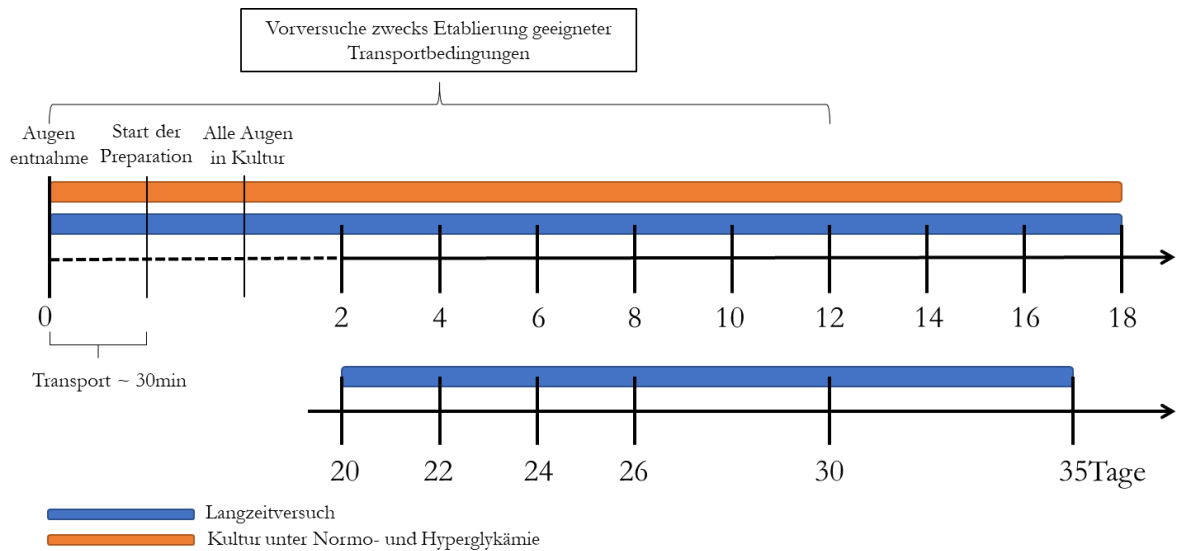
**Abbildung 2-2: Entnahmebereiche für porcine retinale Explantate auf dem hinteren porcinen Augenbecher und schematische Darstellung der in-vitro-Retina-Kultur.** A: Hinterer Augenbecher vom adulten Hausschwein. Retinale Explantate von der zapfenreichen area centralis und peripheren Bereichen mit einem Durchmesser von 9,5 mm. B: Schematischer Aufbau der in-vitro-Kultur mit Nährmedium gefüllten Well und Insert mit semipermeabler Polykarbonatmembran (Durchmesser 0,4 µm).

Die Explantate wurden in einem Vorversuch drei bis zwölf Tage in Kultur gehalten, um die Auswirkungen verschiedener arbeitstechnischer Faktoren auf die retinalen Gewebe zu untersuchen (Abbildung 2-3). Der Glukosegehalt lag dabei standardmäßig für dieses Zellkulturmedium bei 450 mg/dl. Das Medium wurde hier täglich gewechselt. Nach der Standardisierung der Arbeitsweise wurden die Explantate in einem ersten Experiment bis zu 35 Tagen in Kultur gehalten, um die Auswirkungen der *in-vitro*-Kultur auf das retinale Gewebe auf makroskopischer und Zellebene zu untersuchen. Der Glukosegehalt des Mediums lag dabei wiederum bei 450 mg/dl und der Medium-Wechsel fand ebenfalls täglich statt. Das Ernten von zwei Explantaten pro Zeitpunkt erfolgte bis Tag 26 in zwei-tägigem Rhythmus und zusätzlich an Tag 30 und 35, was zu einer Gesamtanzahl von 32 Retinastücken sowie zwei Retinaexplantaten führt, die sofort an Tag 0 entnommen wurden. In einem zweiten Experiment wurden die Explantate 18 Tage lang in Neurobasal-A-Medium mit zwei verschiedenen Glukosekonzentrationen kultiviert. Wir entschieden uns dafür, 50 % der Explantate mit 100 mg/dl Glukose zu kultivieren, was im Körper einer physiologischen Konzentration gleichkommt und dementsprechend im Folgenden als normoglykämische Kultur bezeichnet wird. Die andere Hälfte an Neuroretina-Gewebestücken wurde wiederum bei 450 mg/dl kultiviert, was *in-vivo* eine erhöhte Konzentration an Glukose in der Blutbahn und somit eine hyperglykämische Situation darstellt, wie es im Laufe einer Diabetes mellitus Erkrankung

vorkommt. Das Zellkulturmedium mit der niedrigen Glukosekonzentration wurde alle 12 Stunden gewechselt, um ein Absinken in eine kritische Konzentration unter 50 mg/dl zu verhindern. Das unveränderte Neurobasal-A-Medium (Hyperglykämie) wurde wie zuvor jeweils nach 24 Stunden und einmalig nach den ersten 12 Stunden in Kultur gewechselt. Im Zuge dieses Versuches wurden auch Glukose- und Insulin-Messungen des Kulturmediums durchgeführt. Geerntet wurden zwei bis drei Explantate pro Gruppe alle zwei Tage (n=2-3), was zu einer Gesamtzahl von 45 Retina Gewebestücken führte, die in weiteren Schritten mittels Immunhistochemie und qPCR auf kulturbedingte Unterschiede auf Zell- und RNA-Ebene untersucht werden konnten. Eine zeitliche Übersicht des Langzeitkultur-Experiments und des Versuches mit zwei unterschiedlichen Glukosekonzentrationen des Nährmediums ist in Abbildung 2-4 dargestellt.



**Abbildung 2-3: Zeitachse zur Darstellung der Vorversuche zur in-vitro-Retina-Kultur.** Die zeitliche Übersicht der jeweiligen Versuche zeigt die Dauer der Vorversuche mit Fragestellungen bezüglich der Temperatur während des Transportes (hier wurden die retinalen Gewebe drei Tage in Kultur gehalten) und der Größe der Explantate (Kulturdauer 12 Tage). Die Pfeile zeigen den jeweiligen Zeitpunkt der Fixierung für den Vorversuch zu Explantat-Veränderungen aufgrund der Transportdauer.



**Abbildung 2-4: Zeitachse zur Darstellung der in-vitro-Retina-Kultur.** Die zeitliche Übersicht der jeweiligen Versuche zeigt die Dauer des Langzeitkulturversuchs der porcinen Retina-Explantate bis Tag 35 und die Kultivierung der normo- und hyperglykämischen Schweinenetzhäute bis Tag 18.

### 2.2.3.2 Ernten der Neuroretina-Explantate

Zunächst wurde das Zellkulturmedium mit einer Pipette abgesaugt und verworfen. Im zweiten Experiment wurde danach zunächst ein medianer Schnitt durch das Gewebe mittels Skalpell durchgeführt, um ein Explantat für beide folgenden Analysemethoden nutzen zu können. Um die Explantate herum wurde die Polykarbonatmembran vorsichtig mithilfe eines Skalpells und einer anatomischen Pinzette kreisförmig durchtrennt und das Membranstück mit dem Explantat vorsichtig in eine 4-Well-Platte mit einer darin befindlichen 4 % Paraformaldehyd-Lösung überführt. Nun wurde die Membran mit der Pinzette abgehoben ohne das Gewebe zu berühren und somit zu beschädigen. Die Explantathälfte die im zweiten Experiment im Folgenden für die RNA-Analyse bestimmt war, wurde in eine RNA-later-Lösung überführt und bis zur weiteren Verarbeitung bei 8 °C gelagert.

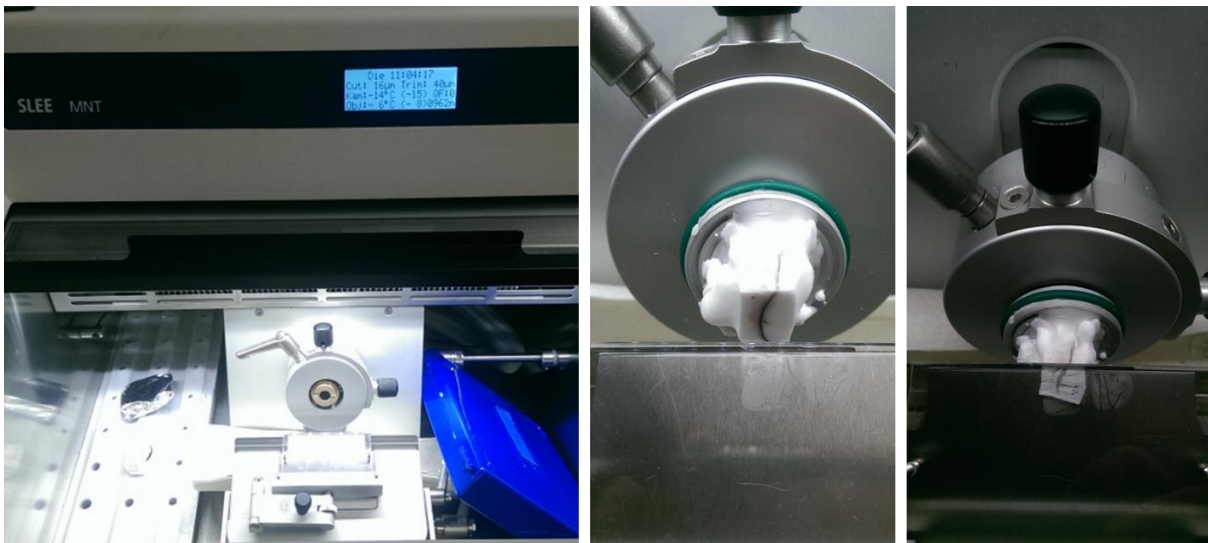
### 2.2.3.3 Vorbereitung der Retina für die Herstellung von Kryostatschnitten

Alle weiteren Schritte erfolgten auf einem Schüttler auf niedriger Stufe und unter Abdeckung der 4-Well-Platte mit einem Parafilm. Nach der Fixierung in 4 % PFA in Phosphatpuffer (PBS, pH=7,4) für 45 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Explantate zunächst 3-mal für je 20 Minuten mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine Kryoprotektionsbehandlung mittels aufsteigender Sucrosereihe, in deren Ablauf die Explantate je 60 Minuten in 500 µl einer 10%, dann 20 % und schließlich 30% Sucroslösung in PBS bei Raumtemperatur verblieben. Die Immersion in der Lösung mit der finalen Sucrosekonzentration wurde daraufhin über Nacht bei 4 °C fortgeführt. Die Kryoprotektion ist wichtig, um Schäden am Gewebe, die im Folgenden durch das Einfrieren hervorgerufen werden könnten, zu minimieren. Nach dem Aufwärmen auf Raumtemperatur wurde die Hälfte der Lösung nun durch ein Gefriermedium ersetzt und die Explantate für zwei Stunden darin geschwenkt. Die Lösung wurde daraufhin abgesaugt und 500 µl des Gefriermediums hinzugefügt und nach weiteren ein bis zwei Stunden wurden die Explantate vorsichtig auf einem Spatel in Cryomold-Gefäße, die zuvor mit Gefriermedium gefüllt wurden, überführt. Unter einem Lichtmikroskop wurde die korrekte Lage der Gewebestücke in den Cryomolds kontrolliert und störende Luftblasen entfernt, um anschließend das Schockgefrieren auf einem Metallblock in flüssigem Stickstoff durchführen zu können.

### 2.2.3.4 Herstellung von Kryostatschnitten

Die Blöcke mit der darin eingebetteten Retina wurden zum Zwecke der Schnitthanfertigung zunächst aus den Cryomolds genommen und im Kryomikrotom bei -16 °C auf einem Metallteller mit darauf befindlichem Filterpapier durch Gefrieren befestigt. Der Winkel sollte dabei so gewählt sein, dass die Schnitte durch die Retina vertikal erfolgen können, um alle retinalen Schichten anzuschneiden. Nun wurden jeweils 10 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt (Abbildung 2-5) und

auf Superfrost Objektträger gebracht. Die Vollständigkeit der retinalen Schichten wurde mittels Binokularmikroskop überprüft und die Objektträger bei -20 °C gelagert.



**Abbildung 2-5: Anfertigen der retinalen Gewebsschnitte im Anschluss an die in-vitro-Kultur mittels Kryotom.** Die Abbildung zeigt einen Gewebblock mit eingebetteter Retina, der mittels Kryotom in 10 µm dicke Scheiben geschnitten wird.

## 2.2.4 HE-Färbung

Eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurde vorgenommen, um den Erhalt und die Dicke der retinalen Schichten im Lichtmikroskop beurteilen zu können. Hämatoxylin bildet stark basische Chelate von tief blauvioletter Farbe in wässriger Lösung mit Metallionen, die von sauren Zellstrukturen (DNA, RNA) gebunden werden und diese selektiv anfärben. Eosin wird in Zellen von den mehr basischen Plasmaproteinen gebunden und erzeugt im mikroskopischen Zellbild eine eher helle, rosa Färbung, was einen guten Farbkontrast darstellt.

### 2.2.4.1 Färbeprotokoll

Für die Färbung unter Luftabzug wurden die Objektträger zunächst 30 Minuten bei Raumtemperatur angetaut und anschließend einmal für zehn Minuten in 1 x PBS gewaschen. Nun

folgte die Immersion in Hämatoxylin für 20 bis 30 Sekunden und vorsichtiges Eintauchen in lauwarmes Leitungswasser, wo die Objektträger nun zehn Minuten gewaschen wurden. Die Gegenfärbung mit Eosin-G-Lösung mit einem Tropfen Eisessig erfolgte für zehn bis fünfzehn Sekunden. Im Folgenden wurden die Gewebeschnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (2x 70%, 1x 80%, 1x90%, 1x96%, 2x100%) für je ein bis zwei Minuten entwässert und anschließend zweimal für je fünf Minuten in Xylene getränkt. Der originale Aufbau der Färbereihe ist in Abbildung 2-6 dargestellt. Abschließend wurden die Objektträger getrocknet, mit einigen Tropfen Eukitt versehen und möglichst unter Vermeidung von Luftblasen eingedeckt und zum Aushärten gelagert.



**Abbildung 2-6: Aufbau der HE-Färbung.** Gezeigt werden die Gefäße mit den für die HE-Färbung benötigten Reagenzien in der Reihenfolge des verwendeten Färbeprotokolls.

#### 2.2.4.2 Morphologische Beurteilung und Quantifizierung der retinalen Schichtdicke

Der Zusammenhalt und die Abgrenzbarkeit der verschiedenen Schichten der porzinen Netzhaut wurden nun morphologisch unter dem Lichtmikroskop beurteilt und es wurden mehrere Aufnahmen pro Kulturzeitpunkt angefertigt. Die Dicke des gesamten Gewebes wurde nun maßstabsgetreu in der Vertikalen durch das Gewebe an je drei unterschiedlichen Stellen per Adobe-Photoshop gemessen, tabellarisch in Microsoft Excel festgehalten, Mittelwerte und Standardabweichungen ermittelt und in SigmaPlot graphisch dargestellt.

## 2.2.5 Immunfärbungen

Ein wichtiger Bestandteil dieser Arbeit und Grundlage verschiedener Analysemethoden sind die verschiedenen immunhistochemischen Färbungen, die im Folgenden beschrieben werden.

### 2.2.5.1 Färbeprotokoll

Die neuroretinalen Gewebeschnitte wurden mit phenotypspezifischen Markern, id est. Rhodopsin (RHO), LM-Opsin, glial fibrillary acidic protein (GFAP), Glutaminsynthetase (GS), Proteinkinase C alpha (PKC $\alpha$ ) und C-terminales Bindeprotein 2 (CtBP2) immunhistochemisch markiert. Hierzu wurden die Gefrierschnitte zunächst aufgetaut, getrocknet und mit einem PapPen umrandet und anschließend dreimal in 1x PBS gewaschen. Alle Waschschrirte erfolgten auf einem Rüttler auf niedriger Stufe. Danach wurden sie für eine Stunde in einer speziellen Lösung präinkubiert, die aus PBS mit 10 % normal donkey serum (NDS), 1 % bovine serum albumin und 0.5 % Triton X-100 bestand. Nach kurzem Abspülen der Objektträger mit 1x PBS und Trocknung wurden spezifische Kombinationen aus Primärantikörpern in ihrer jeweiligen Verdünnung in PBS mit 0.5 % Triton X-100 und 3 % normal donkey serum auf die Objektträger aufgetragen und diese nun über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Es wurde bei jeder Färbung auch eine Negativkontrolle angefertigt, auf die statt dieser Lösung lediglich 1xPBS aufgetragen wurde. Nach dreimaligem Waschen in 1x PBS für je zehn Minuten erfolgte die einstündige Inkubation bei Raumtemperatur und unter Lichtabschluss in einer feuchten Kammer mit den korrespondierenden Sekundärantikörpern in einer 1:200 Verdünnung, die an die Fluoreszenzfarbstoffe Alexa Fluor 488 und 594 konjugiert wurden. Zuvor wurde die Lösung fünf Minuten bei 13000 g bei Raumtemperatur zentrifugiert um eventuelle Präzipitate zu entfernen, die das Färberesultat beeinträchtigen könnten. Eine Gegenfärbung mit DAPI in einer 1:5000 Verdünnung wurde im gleichen Schritt durchgeführt. Nach abschließendem dreimaligem Waschen in 1x PBS für je zehn Minuten wurden die Schnitte nun mithilfe eines speziellen Einbettmediums eingedeckt.

### 2.2.5.2 Verwendete Antikörper

In einem Vorversuch wurden zunächst verschiedene Primärantikörper auf ihre Kompatibilität mit der Schweineretina getestet. Als immunhistochemischer Marker für Photorezeptoren wurden anti-Rhodopsin, anti-LM-Opisin, anti-Recoverin und PNA getestet. Der gegen das Protein Rhodopsin gerichtete Antikörper wurde in einer 1:500 Verdünnung verwendet und markiert somit die Photorezeptoren und insbesondere deren obere Segmente und Perikaryen. LM-Opisin ist in den L- und M-Zapfen vorhanden, die rotes und grünes Licht verarbeiten, und markiert diese in einer 1:600 Verdünnung. Der Antikörper gegen Recoverin wurde 1:1000 verdünnt und markiert Stäbchen und Zapfen sowie speziesabhängig auch Bipolarzellen. PNA 488 ist ein bereits gelabelter Antikörper, der gegen Peanut Agglutinin gerichtet ist und färbt insbesondere die Zapfen-Schäfte, oberen Segmente und Zapfen-Endfüßchen. Es wurde den Sekundärantikörpern in einer 1:200 Verdünnung hinzugefügt. Um die retinalen Gliazellen darzustellen, wurden Antikörper gegen das saure Gliafaserprotein (GFAP) und die Glutaminsynthetase (GS) verwendet. GFAP ist in den Astrozyten und Endfüßchen der Müllerzellen exprimiert, wo es mittels einer 1:000 Verdünnung des entsprechenden Antikörpers markiert wird. Spezifisch für die Müllerzellen ist das Protein GS und wird 1:2500 verdünnt mit dem anti-GS Antikörper dargestellt. Um auch weitergeschaltete Neurone wie die Bipolarzellen sichtbar zu machen, wurden Primärantikörper gegen PKC $\alpha$ , CtBP2 und Calbindin verwendet. Die Proteinkinase C alpha ist spezifisch für die Stäbchenbipolarzellen und wurde in einer 1:10.000 Verdünnung markiert. CtBP2 ist ein Protein in den Endfüßen der Photorezeptoren im Bereich der Synapse, wo die Erregungsweiterleitung zu den Bipolarzellen stattfindet. Diese wird auch als Ribbon-Synapse bezeichnet und zeigt eine hufeisenförmige Form, wenn sie mit dem anti-CtBP2 Antikörper markiert wird (hier in einer 1:2000 Verdünnung). Der anti-Calbindin Antikörper färbt speziesabhängig Amakrin-, Horizontal- und Gliazellen sowie teilweise Zapfen sowie Bipolarzellen und wurde in einer 1:1000 Verdünnung verwendet.

### 2.2.5.3 Kernzählungen

Die Quantifizierung der Zellkerne in ONL und INL wurde durchgeführt, um die Degeneration der retinalen Zellen über die Dauer der Kultur und bedingt durch die verschiedenen Glukosekonzentrationen im Nährmedium zu erkennen und darzustellen. Hierfür wurde ein 100 µm breiter repräsentativer Bereich eines 10 µm dicken Gewebeschnittes in der DAPI-Färbung ausgewählt und die angefärbten Zellkerne mittels Zählwerkzeug in Adobe Photoshop markiert und somit numerisch erfasst. Jeweils drei Zählungen pro Erntezeitpunkt aus unterschiedlichen Schnitten wurden durchgeführt, tabellarisch dokumentiert (Excel) und graphisch dargestellt (Sigma Plot).

### 2.2.5.4 TUNEL-Assay

Für die Visualisierung apoptotischer Zellkerne wurde ein TdT-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) assay durchgeführt, wobei ein in-situ cell death detection kit verwendet wurde. DNA-Doppelstrangbrüche, die während apoptotischer Prozesse entstehen, können hier in einer enzymatischen Reaktion dargestellt werden, indem die entstandenen freien 3'-OH Enden in einer enzymatischen Reaktion gelabelt werden. Hierbei greift im ersten Schritt der TUNEL-Färbung die terminale Desoxynucleotidyltransferase (TdT) an, wodurch es zur Polymerisierung der markierten Nucleotide kommt (TUNEL Reaktion, Watanabe et al. 2012). In einem zweiten Schritt werden mithilfe der TdT Fluorescein-dUTP Moleküle angehängt, die durch die Fluoreszenzmikroskopie dargestellt werden können (Gavrieli et al. 1992; Schaper et al. 1999).

Die Objektträger mit den retinalen Gewebeschnitten wurden für diesen Assay zunächst auf Raumtemperatur gebracht und getrocknet und die Schnitte dann mit einem wasserabweisenden Pap-Pen umrandet, um ein Verlaufen der später aufgetragenen Lösungen zu verhindern. Nach einem kurzen Waschschrift in PBS und anschließender Permeabilisierung in 0,1 % Triton-X100 in 0,1 % Natriumcitrat für zwei Minuten auf Eis wurden die Objektträger getrocknet. Anschließend

folgten erneut zwei Waschschritte in PBS für jeweils fünf Minuten. Nun wurden 50 µl des TUNEL Reaktionsgemisches mit einer Pipette aufgetragen. Als Negativkontrolle diente ein Gewebeschnitt, auf den nur die Label-Lösung ohne das Enzym terminale Deoxynucleotidyltransferase aufgetragen wurde. Als Positivkontrolle wurden Gewebeschnitte für zehn Minuten mit einer RNase freien rekombinanten DNase I in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) und 1 mg/ml BSA vorbehandelt, um DNA-Doppelstrangbrüche zu induzieren. Nun wurden die Objektträger mit Parafilm bedeckt um eine Austrocknung zu verhindern und eine gleichmäßige Inkubation zu erreichen und für 60 Minuten bei 37 °C in einer feuchten, lichtdichten Färbekammer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS erfolgte eine Gegenfärbung mit DAPI für fünf Minuten bei Raumtemperatur in der Färbekammer und erneutes Waschen in PBS. Im letzten Schritt wurden die Objektträger mit einem speziellen Eindeckmedium eingedeckt und sofort mikroskopiert, da die Fluoreszenz rasch abnimmt. Die Quantifizierung der TUNEL-positiven Zellkerne erfolgte an vertikalen Gewebeschnitten (10 µm Dicke) in einem definierten Zähl-Intervall von 150 µm Länge in Adobe Photoshop. Die Auszählung erfolgte manuell mit einem Zählwerkzeug und beinhaltete die äußere und innere nukleäre Schicht der Retina. Nur die zentrale Region im jeweiligen Schnitt wurde analysiert. TUNEL-positive Zellkerne wurden als Prozentzahl aller mit DAPI markierten Zellkerne in ONL und INL im jeweiligen Bereich angegeben. Es wurden mindestens zwei Schnitte pro Zeitpunkt und Gruppe ausgezählt und ein Mittelwert gebildet.

#### 2.2.5.5 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Die immunhistochemischen Aufnahmen wurden an einem speziellen konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop, dem Fluoview FV10i von Olympus, erstellt. Dieses ist mit Argon und HeNe Lasern und insgesamt drei verschiedenen Laserdioden (405 nm, 559 nm und 635 nm) ausgestattet. Das zu untersuchende Präparat wird mit diesen bestrahlt und die eingelagerten Fluoreszenzfarbstoffe somit angeregt, Licht in der jeweiligen spezifischen Wellenlänge abzugeben, welches nun eingefangen, gefiltert und somit einzeln dargestellt werden kann. Diese gezielte Detektion der

einzelnen Farbstoffe geschieht mithilfe einer Lochblende und erlaubt das genaue Einstellen der jeweils richtigen Fokusebene für die Aufnahme der einzelnen Schichten. Später können die einzelnen Ebenen zu einem Bild rekonstruiert und die Farbstoffe übereinandergelegt dargestellt werden. Für diese Arbeit wurden im Mittel zehn Z-Stack Aufnahmen von 0,7  $\mu\text{m}$  Dicke angefertigt und zu einem Bild überlagert. Die Aufnahmen wurden unter Verwendung von Olympus Immersion Öl in 10- oder 60-facher Vergrößerung angefertigt.

#### 2.2.5.6 Bildbearbeitung

Die weiterführende Bearbeitung der Bilder und die Erstellung von Zusammenstellungen wurden mit Adobe Photoshop CS5 (San Jose, CA, USA) vorgenommen. Hierfür wurden die Helligkeit und der Kontrast so angepasst, dass die Intensität der angefärbten Zellen und Strukturen für alle Aufnahmen vergleichbar wurde und die Unschärfe reduziert. Der Maßstab wurde übernommen und optisch korrigiert und ein Randstreifen mit der korrespondierenden DAPI-Zellkernfärbung unterlegt.

#### 2.2.6 Konzentrationsmessungen im Nährmedium

Um einen Überblick über die Glukose- und Insulinabnahmen im Nährmedium über den Tag und im Verlaufe der Kultur zu bekommen, wurden in regelmäßigen Abständen deren Konzentrationen im Nährmedium gemessen. Für die *in-vitro*-Kultur der porzinen retinalen Explantate unter Normo- und Hyperglykämie wurden während der ersten acht Tage alle 12 Stunden vor- und nach dem Mediumwechsel sowie bis Tag 16 vor dem Erneuern des Mediums Proben des Kulturmediums zur Konzentrationsmessung entnommen.

### 2.2.6.1 Glukosemessung mittels Blutzuckermessgerät

Der Gehalt an Glukose im Nährmedium wurde jeweils unmittelbar mittels Teststreifen und dem AccuCheck Blutzuckermessgerät von Aviva gemessen. Hierfür wurden mittels Pipette circa 10 µl direkt aus dem Well entnommen und auf den Teststreifen pipettiert, der daraufhin in das Messgerät eingeführt wurde. Die Werte wurden abgelesen und dokumentiert.

### 2.2.6.2 Insulinmessung mittels ELISA

Für die Insulinmessung wurde ein ELISA mit dem Human/Canine/Porcine Insulin Duo Set Kit von RD-Systems durchgeführt. Die Wells der Mikrotiterplatten wurden mit einem monoklonalen *Capture*-Antikörper beschichtet, der gegen eine definierte Antikörperbindungsstelle des Insulinmoleküls gerichtet ist. Jeweils 100 µl einer Standardlösung und der Probenlösung wurden daraufhin in die Wells pipettiert und für zwei Stunden bei 18 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden je 100 µl Detektionsantikörper in einem Enzym-Konjugat mit Biotin unter gleichen Bedingungen inkubiert. Nicht gebundenes Konjugat wurde in drei Waschschritten entfernt und in einer weiteren Inkubation wurden je 100 µl/Well eines 1:40 Streptavidin-Peroxidase-Enzymkomplex an den biotinylierten anti- Insulin-Antikörper gebunden. Nach drei weiteren Waschschritten wurden nun 100 µl/Well der Substratlösung zugegeben und die Farbentwicklung nach einer definierten Zeit mit einer Stopplösung gestoppt, von der jeweils 50 µl pro Well pipettiert wurden. Die Farbintensität war nun proportional zur Insulin-Konzentration in der Probe. Die Extinktion wurde bei 450 nm mit einer Referenz von 630 nm mittels Mikrotiterplattenleser gemessen.

## 2.2.7 Molekularbiologische Methoden, Ribonukleinsäure

Um die kulturbedingten Veränderungen auch auf RNA-Ebene darstellen zu können, wurden die retinalen Gewebe ebenfalls auf RNA-Ebene untersucht.

### 2.2.7.1 RNA-Extraktion

Um Unterschiede in der Expression verschiedener Moleküle zu untersuchen, die eine Rolle in der frühen Entstehung von hyperglykämiebedingten Netzhautschädigungen spielen, wurde zunächst RNA aus dem kultivierten Gewebe extrahiert. Hierfür wurden die Gewebestücke aus dem Gefäß mit RNAlater entnommen, gepoolt und gewogen, wobei das angestrebte Gewicht zwischen 10 und 15 mg betrug. Anschließend wurden die Retinas in Precellys Probengefäßen für 25 Sekunden bei 2800 g in einem Precellys Homogenisator homogenisiert. Die Gesamt-mRNA wurde mittels RNeasy Micro Kit nach dem QIAGEN-Protokoll aufgereinigt. Die Elution erfolgte in 15 µl RNase freiem Wasser. Ein DNase I Verdau wurde mithilfe eines DNase I Sets nach Herstellerangaben bei jeder RNA-Isolation direkt auf der Säule durchgeführt, um eine Kreuzkontamination mit genomischer DNA zu verhindern. Die Konzentration der gewonnenen RNA wurde photometrisch ermittelt. 10 µl der im Verhältnis 1:10 mit RNase freiem Wasser verdünnten RNA wurden in eine Messküvette pipettiert und die Absorption wurde bei 260 nm am Eppendorf-BioPhotometer abgelesen. Das Verhältnis der Absorption von 260 nm und 280 nm wird als zusätzliches Maß für die Reinheit der RNA angesehen. Die RNA kann als „rein“ bezeichnet werden, wenn dieser Wert über 2,0 liegt.

### 2.2.7.2 RNA-Qualitätsnachweis

Die so aus der Retina gewonnene RNA wurde nun mittels QIAxcel-RNA-System auf ihre Qualität hin überprüft. Mit einem speziellen Elektrophorese-System werden RNA-Fragmente detektiert, die

durch eine Gelmatrix wandern und auf die ScreenGel Software übermittelt werden. Die RNA wird nun in Banden in ihre Bestandteile zerlegt dargestellt. Diese bestehen unter anderem aus der rRNA mit ihren 5S, 18S und 28S Untereinheiten und der mRNA. Von einer guten Qualität der RNA-Probe kann ausgegangen werden, wenn eindeutige Banden im Bereich der 18S und 28S rRNA erkennbar sind, da diese den Hauptanteil in der Zelle ausmacht.

### 2.2.7.3 Reverse Transkription

Die cDNA wurde aus der Gesamt-RNA mithilfe des PrimeScript RT Master Mix Kits von Takara nach Herstellerangaben synthetisiert. Für den Prozess der Umschreibung ist das Enzym Reverse Transkriptase entscheidend, eine RNA abhängige DNA-Polymerase.

Standard Ansätze (10  $\mu$ l):

1. 1  $\mu$ l random 6mers  
1  $\mu$ l DNTP Mix  
x  $\mu$ l RNA je nach Konzentration in der Probe  
H<sub>2</sub>O zum Auffüllen
2. 4  $\mu$ l 5xPuffer  
0,5  $\mu$ l RNase Inhibitor  
1  $\mu$ l Prime Script RTase  
H<sub>2</sub>O zum Auffüllen

## 2.2.7.4 Quantitative PCR

### 2.2.7.4.1 Primerdesign

Alle Primerpaare wurden anhand der jeweiligen Gensequenz in NCBI (National Center für Biotechnology Information) selbst designt. Es wurden nach Möglichkeit exon-übergreifende Bereiche ausgewählt, um nur cDNA zu vervielfältigen, die auf mRNA zurückgeht und um somit die Amplifikation von genomischer DNA auszuschließen. In der genomischen DNA liegen nämlich Abschnitte, die als Introns bezeichnet werden und nicht kodiert sind, was die entstehenden PCR-Produkte verfälschen könnte. Ein GC-Gehalt von etwa 50 % wurde angestrebt und eine Dimer-Bildung wurde möglichst ausgeschlossen. Außerdem wurde ein Temperaturgradient mit dem Standard-qPCR-Ansatz und cDNA der Tag-0-Retina durchgeführt, um die jeweils optimale Annealing-Temperatur zu bestimmen. Hierbei wurde ein größerer Temperaturbereich bezüglich des Ct-Werts, der Schmelzkurvenanalyse und den Agarosegelbanden getestet und die Temperatur ausgewählt, unter der die besten Resultate gewonnen werden konnten.

### 2.2.7.4.2 PCR-Protokoll und Gelelektrophorese

Um die DNA der *genes of interest* vervielfältigen und quantifizieren zu können, wurde eine quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR) an dem real-time PCR system Mastercycler ep realplex von Eppendorf durchgeführt. Generell verläuft eine PCR in drei Phasen: der Denaturierung der doppelsträngigen DNA in zwei Einzelstränge, dem Annealing der Primer an ihren komplementären Sequenzen und letztlich die Elongation. Hier werden die zugefügten dNTPs von der thermostabilen DNA-Polymerase komplementär an die Primer angehängt und die Gensequenzen somit synthetisiert. Diese Phasen werden automatisch in vielen aufeinanderfolgenden Zyklen wiederholt, in dieser Studie wurden 35 Zyklen voreingestellt. Im Unterschied zur klassischen PCR ist bei einer qPCR die Quantifizierung der DNA-Fragmente durch einen zusätzlich integrierten Fluoreszenzfarbstoff möglich. Hierfür wurde der Farbstoff

SYBR-Green verwendet, der dem Reaktionsansatz zu Beginn beigemischt wird und mit der DNA interkaliert, was sein Absorptionsspektrum im Verlaufe der Reaktion verändert. Das Fluoreszenzsignal erscheint nun als ansteigende Kurve am Bildschirm, wobei der Anstieg proportional zur Menge des vorhandenen PCR-Produkts ist. Das initiale Überschreiten der Hintergrundfluoreszenz, also der Punkt an dem der steile Anstieg des Fluoreszenzsignals beginnt, wird als Ct-Wert (Cycle threshold) bezeichnet. Je kleiner dieser Wert ist, desto größer ist die Menge an DNA, ausgehend von der stabilen Effizienz der PCR. Am Ende der Reaktion wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, anhand derer überprüft wird, ob nicht mehr als ein PCR-Produkt amplifiziert wurde. Die Produkte werden im Verlaufe der Reaktion unterschiedlich schnell aufgeschmolzen, wobei der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt wird und das Signal somit abnimmt. Die Schmelzkurve reichte von 55-95 °C mit einer Erhöhung von 0,5°C pro 30 s. Bei der Durchführung der qPCR wurden die MIQE-Guidelines (Bustin et al., 2009) eingehalten. Unbehandelte Tag-0-Retinas wurden als Kontrollgruppe verwendet und Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (gapDH) als *housekeeping gene*. Dieses Referenzgen wird ubiquitär exprimiert und weist ein ähnliches Expressionslevel für alle Proben auf, weshalb es als interne Kontrolle zur Standardisierung und Quantifizierung der Messwerte dient. GapDH spielt bei der Energiegewinnung durch die Glykolyse eine wichtige Rolle und wurde in der Literatur während der Entwicklung der Retina als stabil beschrieben (Rocha-Martins et al., 2012). Außerdem wurde die GoTaq-Polymerase von Promega verwendet, deren Temperaturoptimum bei 72 bis 75 °C und die Syntheserate bei etwa 1000 bp pro Minute lag. Da die mRNA-Isolation der retinalen Explantate, die an Tag 14 unter Hyperglykämie geerntet wurden, nicht erfolgreich war konnten hier keine qPCR-Ergebnisse generiert werden.

Standard qPCR-Ansatz (10 µL):

1 µl cDNA

0,4 µl forward Primer [10 mM]

0,4 µl reverse Primer [10 mM]  
1,6 µl dNTPs [1,25 mM]  
2 µl 5x GoTaq Flexi Buffer (farblos)  
1 µl GoTaq-Polymerase  
1,2 µl MgCl<sub>2</sub> [25 mM]  
0,8 µl SYBR Green  
2,5 µl ddH<sub>2</sub>O

Standard qPCR Programm:

Denaturierung 95 °C 1 min

Annealing X °C 30 s

Elongation 72 °C 30 s x 35 (40)

95 °C 30 s

60 °C 15 s

95 °C 15 s

Im Anschluss an die qPCR im Mastercycler werden die Ansätze zusätzlich auf ein Agarosegel aufgetragen und mittels Agarosegelelektrophorese und DNA-Färbung auf Größe und Menge der DNA untersucht. Das Polysaccharid Agarose bildet je nach seiner eingesetzten Konzentration Polymere mit unterschiedlicher Porengröße, wenn man es in Lösung erhitzt und erkalten lässt. So können Moleküle von einer Größe zwischen 150 und 20.000 bp aufgetrennt werden. Hier wurden 2 % Agarose (w/v) verwendet, die in TBE-Puffer gelöst wurden. Zum Anfärben der DNA wurde der Farbstoff GelRed verwendet, der direkt in die Agarose-Lösung pipettiert wurde. Die Gellösung wurde dann in entsprechende Gelschlitten gegossen und der Probenkamm eingesetzt. Nachdem das Gel fest geworden war, konnte der Kamm gezogen werden. Außerdem wurden die Proben mit einem speziellen DNA-Auftragspuffer versetzt, bevor sie in die Gel-Taschen geladen wurden. Als Laufpuffer diente TBE-Puffer und als Größenmarker wurde der Gene Ruler 100bp Plus von

Fermentas eingesetzt. Schließlich wurden die Gele im Biodoc Analyse Gerät von Biometra unter UV-Licht betrachtet und digitalisiert.

#### 2.2.7.4.3 Berechnung des fold change mittels $\delta\delta$ -CT-Methode

Der sogenannte *fold change* der mRNA-Hoch- und Herabregulation der verschiedenen Gene wurde mit der delta-delta-Ct-Methode (DDCt) generiert, um deren relative Genexpression zu analysieren. Der Ct-Wert ist definiert als die Zyklusanzahl, die benötigt wird, um den Grenzwert für ein deutliches Fluoreszenzsignal überschreiten zu können. Dabei wird die Expression des Zielgens jeweils auf ein nicht reguliertes und konstant exprimiertes Referenzgen bezogen. Der so entstandene Delta-Ct-Wert wird wiederum mit der Tag-0-Expression korreliert, was schließlich zum Delta-Delta-Ct-Wert führt, der in die Formel  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  eingesetzt wird, um die Differenz der Expression aus den beiden untersuchten Gruppen zu ermitteln. Auch der Standardfehler wurde auf diese Weise ermittelt und die statistische Signifikanz der Differenz beider Gruppen mittels t-test überprüft. Die Kalkulationen wurden in Microsoft Excel und die entsprechenden Abbildungen mit der SigmaPlot-12-Software von Systat erstellt.

$$\Delta Ct = Ct \text{ Zielgen} - Ct \text{ Referenzgen}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \Delta Ct \text{ Kontrolle}$$

$$\text{Ratio} = 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$$

# Ergebnisse

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Vorversuche zur Etablierung geeigneter Transport- und Präparationsbedingungen

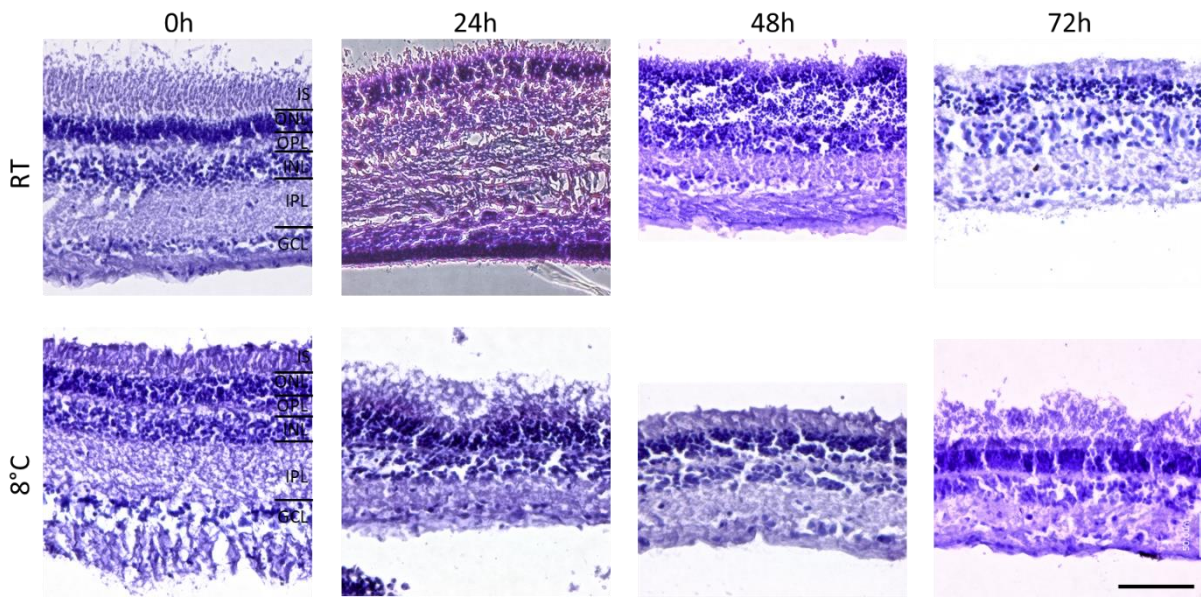
Die Etablierung geeigneter Bedingungen für die porzine retinale Explantatkultur *in-vitro* erfolgte in mehreren Versuchen mit jeweils unterschiedlichen Fragestellungen, die im Folgenden dargestellt werden. Im Hinblick auf den Transport der Schweineaugen nach der Enukleation vom Schlachthaus zum Labor wurde sowohl der Einfluss der Temperatur des Transportmediums als auch der Transportzeit auf den Erhalt des retinalen Gewebes untersucht. Hierfür wurde das Gewebe nach der Präparation mit Hämatoxylin-Eosin sowie immunhistochemisch gefärbt und die Zellkerne gezählt und graphisch erfasst. In untenstehender Tabelle (Tabelle 3-1) sind die Versuche in übersichtlicher Form mit den durchgeführten Analysemethoden aufgeführt.

**Tabelle 3-1:** Versuche zur Etablierung der porzinen retinalen Explantatkultur mit unterschiedlichen Fragestellungen und durchgeführten Analysemethoden.

Versuch	Fragestellung	Erntetage	HE	Immunfluoreszenz	Zellkernzählung	TUNEL
1	Transporttemperatur	0, 1, 2, 3	✓	✓	✓	✗
2	Transportzeit	0	✓	✓	✓	✗
3	Explantat-Lokalisation	0, 2, 4, 6, 8, 10, 12	✓	✗	✓	✗
4	Explantat-Größe	0, 2, 4, 6, 8	✓	✗	✓	✗
5	Porzine Immunfluoreszenzmarker	0	✓	✓	✗	✗
6	Langzeitkultur	0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 30, 35	✓	✓	✓	✓
7	Glukose-Konzentrationen	2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18	✗	✓	✓	✓

### 3.1.1 Temperatur

Die im lokalen Schlachthaus entnommenen Schweineaugen wurden in einem Gefäß mit Schraubverschluss sowohl bei 8 °C Medium-Temperatur als auch bei Umgebungstemperatur (RT) zum Labor transportiert und nach Präparation und Fixierung bis 72 Stunden in Kultur gehalten. Nach dem Ernten, der Fixierung und der weiteren Verarbeitung wurden die Explantate mit HE und mit ausgewählten Immunfluoreszenzmarkern gefärbt und auf Unterschiede in der Qualität des Gewebes und auch bezüglich Erhaltung einzelner Zellen und Anzahl der Zellkerne hin untersucht. Einen ersten Überblick über die Beschaffenheit der Retina nach der Präparation sowie nach 24, 48 und 72 Stunden in Kultur ermöglicht die HE-Färbung (Abbildung 3-1). Zu jedem Zeitpunkt lassen sich die retinalen Schichten aufgrund der unterschiedlich starken Anfärbung von nukleären und plexiformen Schichten gut voneinander abgrenzen. Die Dicke der Gewebeschnitte in der Vertikalen nimmt in beiden Gruppen mit der Kulturdauer kontinuierlich ab. Auch die Kompaktheit beziehungsweise der Zusammenhalt der Zellen und ihrer Fortsätze nimmt mit der Zeit ab, erscheint jedoch nach 72 Stunden in Kultur noch dichter und stärker bei den Geweben, die von den Schweineaugen stammen, die bei 8 °C zum Labor transportiert wurden.

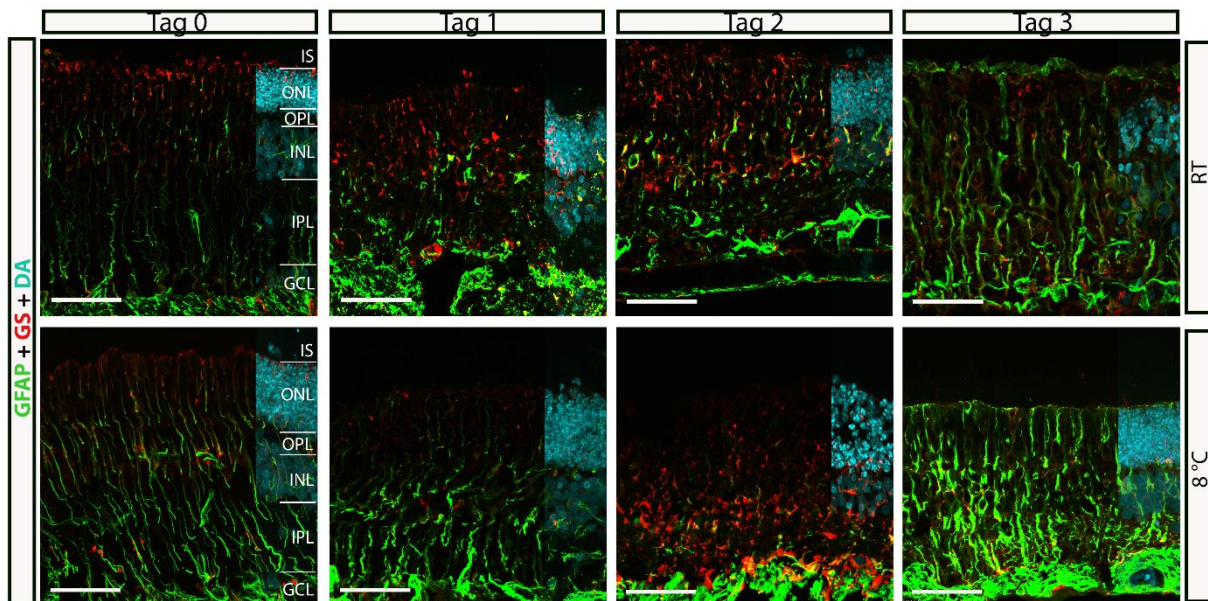


**Abbildung 3-1: Auswirkungen der Transporttemperatur auf die Gewebequalität. HE.** Im Bereich der porzinen retinalen area centralis erscheinen die nukleären Schichten kompakter in der 8 °C Gruppe (insbesondere nach 72 Stunden in Kultur). Maßstab 100 µm.

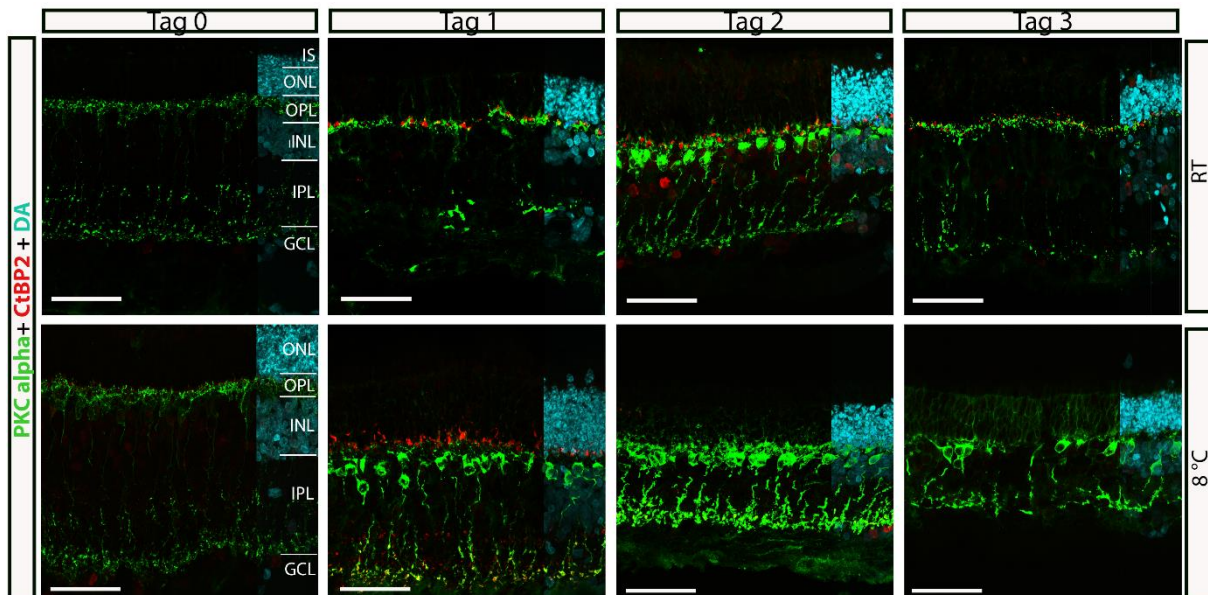
Als Immunfluoreszenzmarker wurden Antikörper gegen retinale Gliazellen, Stäbchenbipolarzellen und die Ribbon-Synapsen eingesetzt, um eventuelle Gliose-Vorgänge und den Erhalt von neuronalen Zellen zu untersuchen. Abbildung 3-2 zeigt die deutlich in Grün und Rot dargestellten Müllerzellen und Astrozyten, die zum Zeitpunkt der Fixierung direkt nach der Präparation noch als sehr feine vertikale Strukturen erkennbar sind und bei beiden Gruppen bis in die OPL hineinziehen. Erst nach 48 Stunden erreichen diese bei beiden Gruppen exzentrischer gelegene Schichten wie ONL und innere Segmente der Photorezeptoren und zeigen sich nach 72 Stunden als den Großteil des Gewebes durchziehende intensiv gefärbte Strukturen. Unterschiede zwischen den beiden Gruppen lassen sich hier kaum erkennen.

In Abbildung 3-3 lassen sich die Stäbchenbipolarzellen (grün) ebenfalls zu allen Zeitpunkten in beiden Gruppen in ihrer typischen dendritischen Form darstellen. Ihre Zellkörper und Fortsätze erscheinen in der 8 °C Gruppe nach 24 und 72 Stunden in Kultur dichter und intakter. Die mit CtBP2 markierten Synapsen zwischen Photorezeptoren und Bipolarzellen (rot) sind hingegen nach

24 und 72 Stunden bei den Präparaten deutlicher sichtbar, die bei Raumtemperatur transportiert wurden.

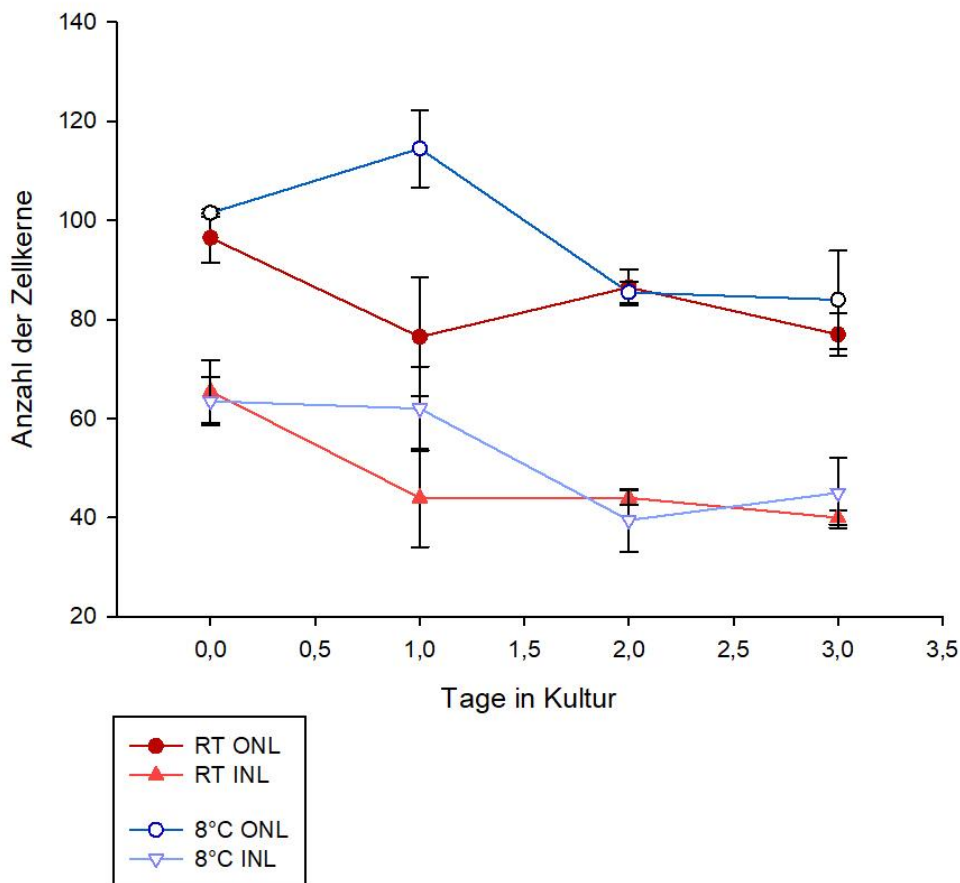


**Abbildung 3-2: Auswirkungen der Transporttemperatur auf die retinalen Gliazellen. Immunfluoreszenz.** Die mit GFAP in Grün markierten Müllerzellen und Astrozyten (Müllerzellen sind ebenfalls mit GS in Rot sichtbar gemacht) zeigen keine deutlichen Unterschiede ihrer Gliazell-Aktivität bei unterschiedlichen Transporttemperaturen. Maßstab 100 µm.



**Abbildung 3-3: Auswirkungen der Transporttemperatur auf die retinalen Stäbchenbipolarzellen. Immunfluoreszenz.** Die Stäbchenbipolarzellen (PKCa, grün) erscheinen in der 8 °C Gruppe nach 24 und 72 Stunden besser erhalten. Die mit CtBP2 markierten Synapsen zwischen Photorezeptoren und Bipolarzellen (rot) sind hingegen bei den Präparaten deutlicher sichtbar, die bei Raumtemperatur transportiert wurden. Maßstab 100 µm.

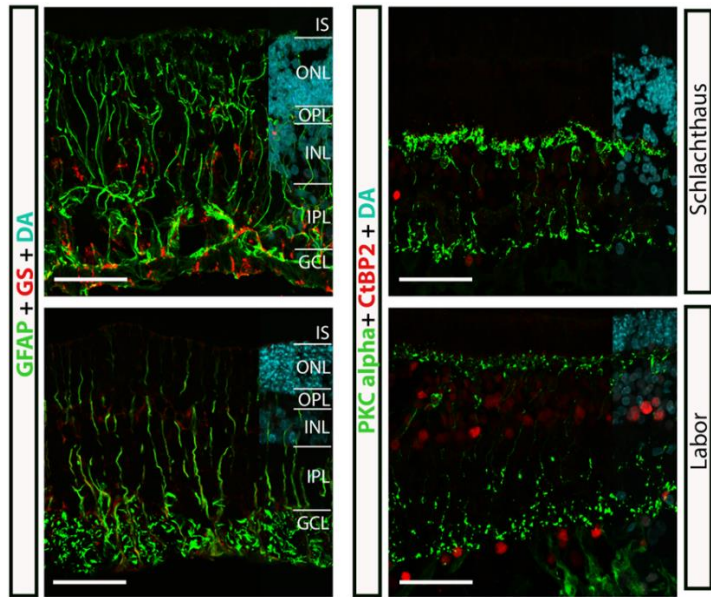
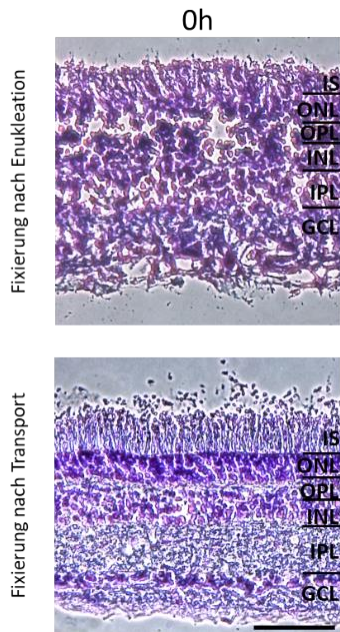
Die manuell erfasste Anzahl der Zellkerne in ONL und INL sinkt in beiden Gruppen über den Kulturzeitraum nahezu kontinuierlich (Abbildung 3-4). Die Zahl war in der ONL an allen Kulturtagen minimal höher bei der 8 °C Gruppe außer an Tag 2, an dem gleich viele Nuklei gezählt wurden. In der INL lagen an Tag 0 und 2 höhere Zählwerte für die RT-Gruppe vor. Eine deutliche Differenz zwischen den beiden Gruppen lässt sich nach 24 Stunden in Kultur feststellen. Hier werden im festgelegten Zählausschnitt der bei Raumtemperatur transportierten Retina im Mittel 77 Zellkerne und bei 8 °C 115 Zellkerne in der ONL, beziehungsweise 44 und 62 Zellkerne in der INL gemessen.



**Abbildung 3-4: Lineare Quantifizierung der Zellkerne in ONL und INL bei verschiedenen Transporttemperaturen.** Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte ( $n=2$ ) und die zugehörigen SD. Außer nach 24 Stunden in Kultur unterscheiden sich die retinalen Gewebe im Hinblick auf die Zellkernanzahl nur wenig. N.s. ( $t$ -test).

### 3.1.2 Transportzeit

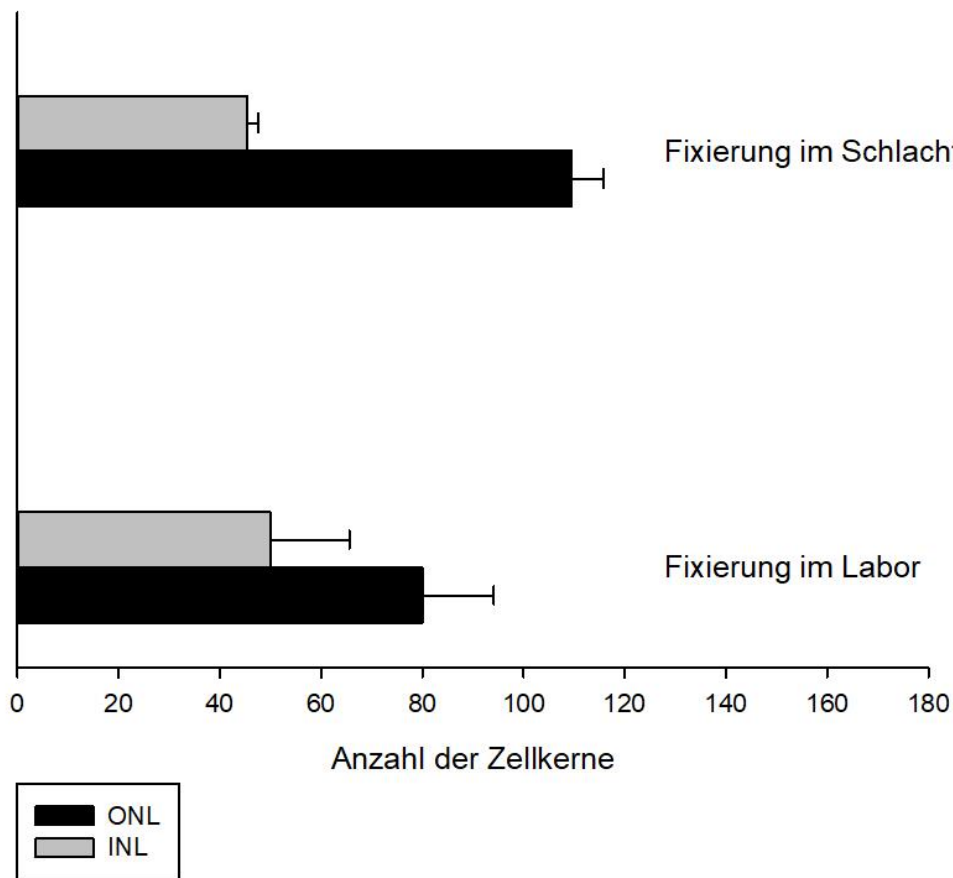
Eine weitere methodische Fragestellung war der Einfluss der Transportzeit auf die Qualität der retinalen Gewebe. Um eventuelle degenerative Prozesse darzustellen, die in der Zeit zwischen E nukleation und Ankunft im Labor ablaufen, wurden unmittelbar nach der E nukleation einige Netzhaut-Gewebeprouben entnommen und noch vor Ort fixiert und mit den Tag-0-Pruben verglichen, die im Labor fixiert wurden. Es wurden ebenfalls HE- und Immunfärbungen durchgeführt. In der HE-Färbung (Abbildung 3-5) lassen sich bei beiden retinalen Schnitten die Schichten gut erkennen. Die obere nukleäre Schicht und die Segmente der Photorezeptoren lassen sich bei dem Gewebeschnitt, der im Labor fixiert wurde, besser darstellen. Die Reaktion der Gliazellen auf gewebsschädigende Reize, die auf der linken Seite von Abbildung 3-6 dargestellt sind, ist auf beiden Aufnahmen etwa gleich stark ausgeprägt. Ebenfalls der Erhalt der mit PKC-alpha dargestellten Stäbchenbipolarzellen ist vergleichbar zwischen den Fixierungszeitpunkten der Explantate. Die Dendriten erscheinen auf dem oberen Bild (Fixierung im Schlachthaus) etwas deutlicher und verzweigter.



**Abbildung 3-5: Auswirkungen der Transportzeit auf die Beschaffenheit der retinalen Schichten. HE.** Die retinalen Schichten lassen sich bei beiden Gewebeschnitten gut darstellen. Maßstab 100µm.

**Abbildung 3-6: Auswirkungen der Transportzeit auf die verschiedenen retinalen Zellen. Immunfluoreszenz.** Die Gliose ist gleich stark ausgeprägt (Gliazellen in Grün, GFAP und Rot, GS) und der Erhalt der Stäbchenbipolarzellen (grün, PKCa) ist vergleichbar. Maßstab 100µm.

Bei der Zellkernzählung aus der DAPI-Färbung wird jedoch ein Unterschied in der Anzahl an Zellkernen der Photorezeptoren der ONL sichtbar, wie Abbildung 3-7 zeigt. Die Differenz der Zellkerne der weiteren neuronalen Zellen in der INL ist hingegen klein. In der ONL liegt der Unterschied im Mittel bei fast 30 gezählten Kernen, wobei die Differenz für die INL bei circa 6 Kernen liegt.



**Abbildung 3-7: Zellkernanzahl bei Fixierung des retinalen Gewebes direkt nach der E nukleation und nach dem Transport zum Labor.** Im Hinblick auf die ONL lassen sich bei Fixierung der Explantate im Schlachthaus etwas mehr Zellkerne zählen. Die Anzahl an Nuklei in der INL unterscheidet sich hingegen kaum. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte ( $n=2$ ) und die zugehörigen SD. N.s. ( $t$ -test).

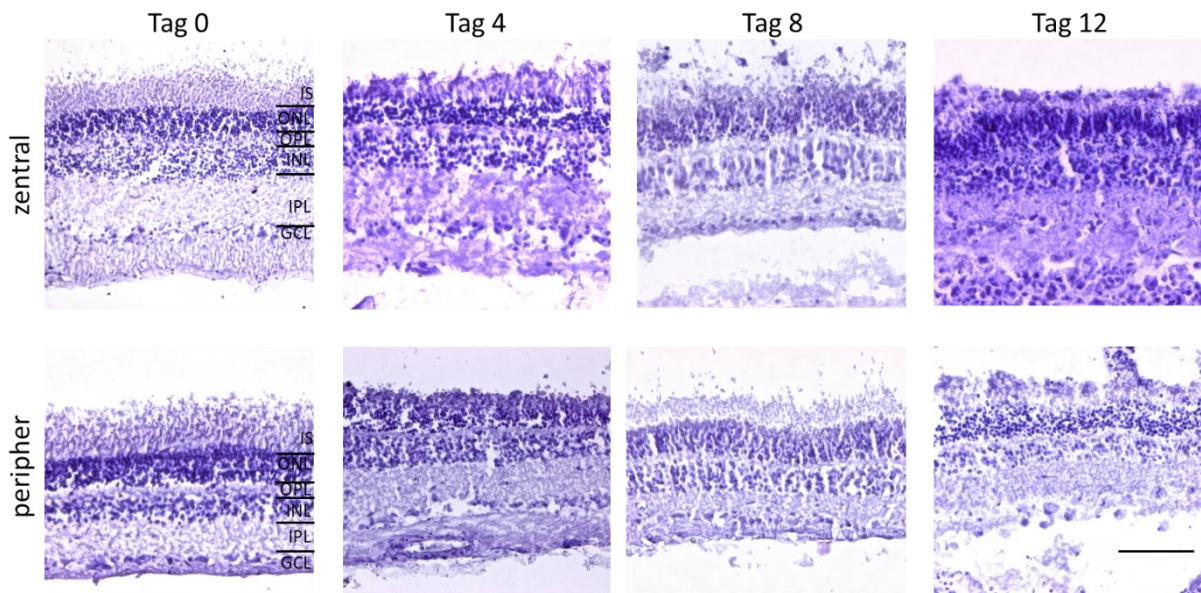
### 3.1.3 Explantat-Lokalisation

Des Weiteren wurden in einem Vorversuch zentrale und periphere Bereiche der Neuroretina ausgewählt sowie Trepanstanzen mit 6 mm und 9,5 mm Durchmesser verwendet, um Netzhaut-Explantate zu gewinnen. Diese wurden dann 8 bis 12 Tage in Kultur gehalten und die Gewebeschnitte anschließend in der HE und Immunfärbung mikroskopisch auf ihre Qualität hin untersucht und die Zellkerne in der DAPI-Färbung manuell gezählt.

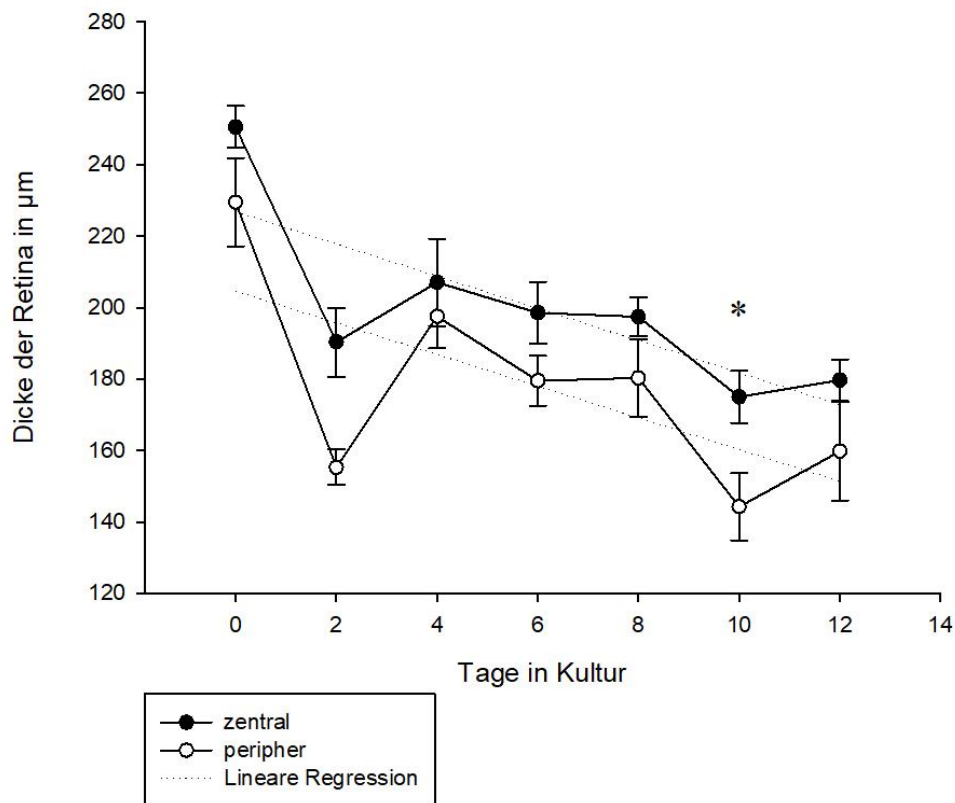
In dieser Studie wurde die schweinetypische zapfenreiche area centralis lokalisiert und Explantate aus diesem spezifischen Bereich für die weiteren Experimente verwendet. Als Vergleich dazu

wurden in den Vorversuchen auch Explantate aus umliegenden, peripheren Bereichen entnommen und ebenfalls kultiviert, gefärbt und mikroskopisch (HE) auf die Anzahl der Zellkerne hin untersucht.

In der histologischen Untersuchung in Abbildung 3-8 wird sofort der Unterschied in der Dicke des Gewebes sichtbar. Diese wurde maßstabgetreu in einer Vertikalen durch die gesamte Retina an unterschiedlichen Stellen in der zentralen und peripheren Netzhaut gemessen und es wurde je ein Mittelwert gebildet, wie in Abbildung 3-9 erkennbar. Zu jedem Zeitpunkt in Kultur ist das Gewebe im Durchschnitt um 22  $\mu\text{m}$  im Mittel dicker. Darüber hinaus zeigt sich bei beiden Bereichen ein Abfall der Dicke im Verlaufe der Kultur, der allerdings jeweils an Tag 2 deutlich stärker ist.

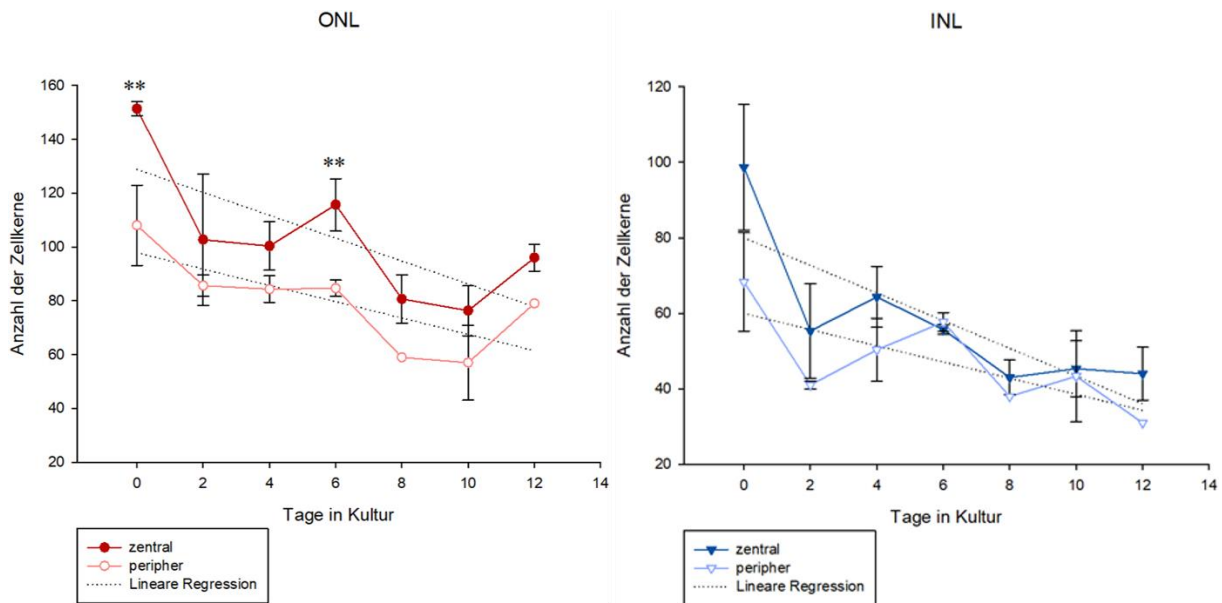


**Abbildung 3-8: Auswirkungen der Explantat-Lokalisation auf die Gewebedicke. HE.** In peripheren Bereichen der Netzhaut ist die Dicke der Retina, gemessen in der Vertikalen durch den Gewebeschnitt, herabgesetzt. Maßstab 100 $\mu\text{m}$ .



**Abbildung 3-9: Auswirkungen der Explantat-Lokalisation auf die Dicke der Retina.** Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte ( $n=2$ ), die zugehörigen SD und die lineare Regression. Im Bereich der porzinen area centralis wies das retinale Gewebe zu allen Zeitpunkten in Kultur eine höhere Dicke auf als in peripheren Netzhautbereichen mit einer durchschnittlichen Differenz von  $22 \mu\text{m}$ . \*  $p < 0,05$  (t-test).

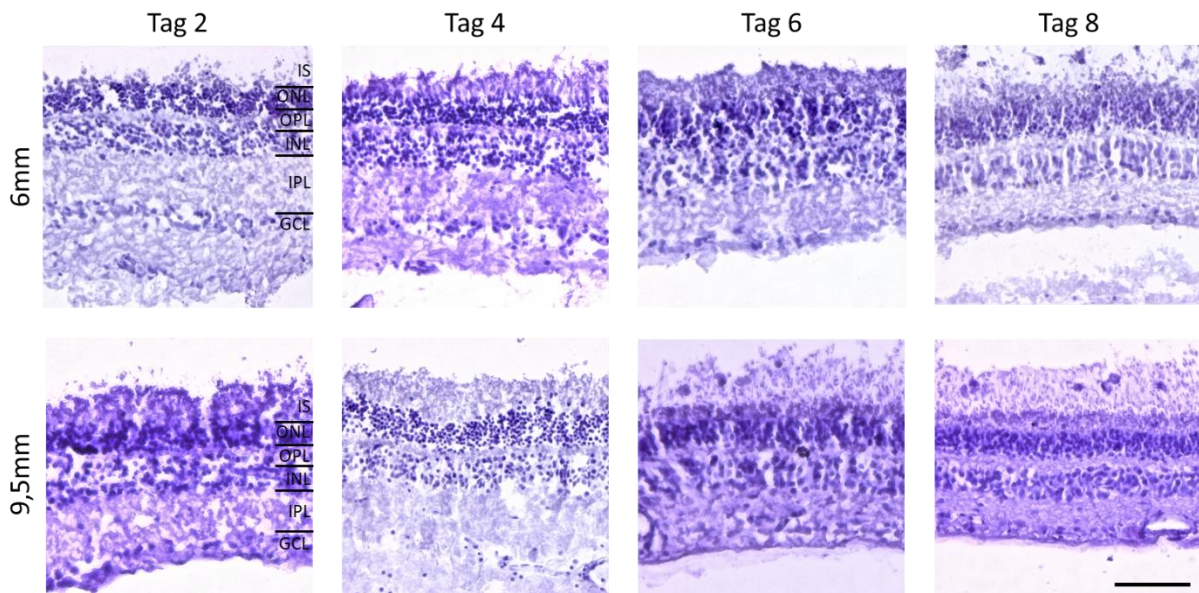
Zu den meisten Zeitpunkten in der Retinakultur konnte eine höhere Zellkernzahl in den zentralen Bereichen der Retina ermittelt werden (Abbildung 3-10). Die Ausnahme ist an Tag 6 in der INL festzustellen, wo im peripheren Retinagewebe im Zählbereich zwei Zellkerne mehr vorhanden waren. Die Differenz zwischen den zentralen und peripheren Bereichen liegt zu den sonstigen Zeitpunkten im Mittel bei circa 24 Zellkernen in der ONL und 11 Kernen in der INL.



**Abbildung 3-10: Auswirkungen der Explantat-Lokalisation auf die Zellkernanzahl.** Dargestellt sind für die ONL und INL jeweils die entsprechenden Mittelwerte ( $n=2$ ), die zugehörigen SD und die lineare Regression. Im Bereich der porzänen area centralis ließ sich in der ONL und in der INL (bis auf Tag 6) eine höhere Zahl an Zellkernen erkennen.  $**p<0,01$  ( $t$ -test).

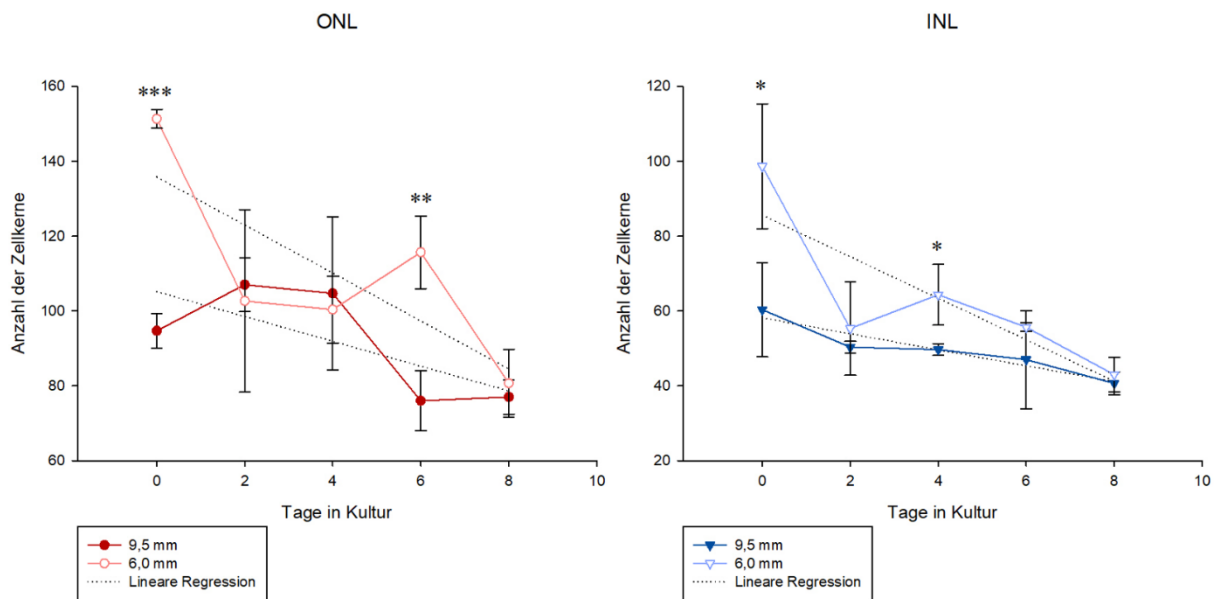
### 3.1.4 Explantat-Größe

Auch die retinalen Explantate mit verschiedenen Durchmessern wurden miteinander verglichen. Im Hinblick auf die Dicke und den Erhalt der verschiedenen retinalen Schichten fiel in der HE-Färbung kein wesentlicher Unterschied zwischen den verschiedenen Größen auf, wie man in Abbildung 3-11 erkennen kann.



**Abbildung 3-11: Auswirkungen der Explantat-Größe auf die retinalen Schichten. HE.** Über die Kulturdauer von acht Tagen lässt sich in der HE-Färbung kein großer qualitativer Unterschied zwischen den beiden Explantat-Größen im Hinblick auf die Erhaltung des retinalen Gewebes und der Abgrenzbarkeit der verschiedenen Schichten darstellen. Maßstab 100µm.

Die manuelle Zählung der Zellkerne in der DAPI-Zählung kann ebenfalls als Indikator für die Qualität des retinalen Gewebes herangezogen werden. Auch hier war die Differenz der gezählten Kerne minimal (Abbildung 3-12). Lediglich bei den unmittelbar nach der E nukleation und Präparation fixierten Retinas (Tag-0-Präparaten) lässt sich eine signifikant höhere Zellkernzahl bei den 6mm Explantaten erkennen. Die Differenz liegt hier bei circa 50 Zellkernen in der ONL und ungefähr 40 Nuklei in der INL. Auch bei den an Tag 6 geernteten Netzhäuten sind in der ONL circa 30 Zellkerne mehr vorhanden. Die Anzahl an Nuklei der ONL an Tag 0 liegt bei den 9,5 mm großen Retina-Explantaten bei circa 95, was etwas weniger Zellkernen entspricht als die Zählung der an Tag 2 geernteten Netzhäuten mit 107 Nuklei. Darüber hinaus kann festgestellt werden, dass in der inneren nukleären Schicht zu jedem Zeitpunkt mehr Zellkerne in dem 6 mm großen Explantat gezählt werden konnten, wenngleich der Unterschied zu den übrigen Zeitpunkten gering ausfiel.

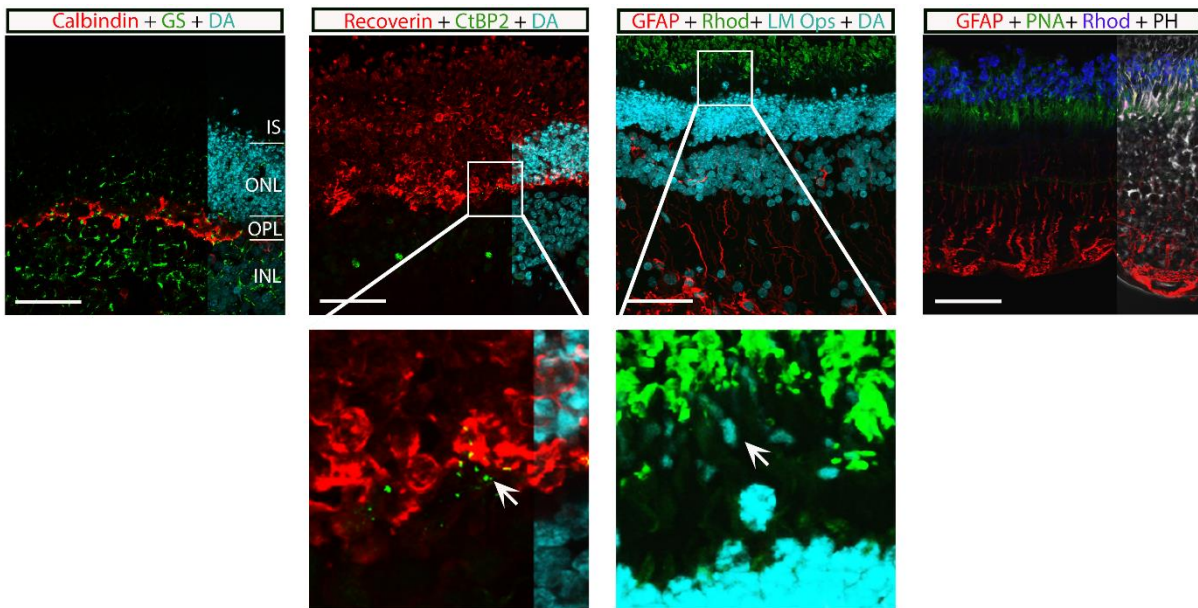


**Abbildung 3-12: Auswirkungen der Explantat-Größe auf die Zellkernanzahl.** Im Hinblick auf die im retinalen Gewebe erhaltenen Zellkerne, die ein Indikator für den Erhalt der Zellen sein können, lässt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden verschiedenen Explantat-Größen von 6 und 9,5 mm nur an Tag 0 und 6 der Kultur feststellen. Zu diesen Zeitpunkten ist die Anzahl der Zellkerne in der ONL und INL im 6 mm großen Explantat signifikant höher. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte ( $n=2$ ), die zugehörigen SD und die lineare Regression. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  ( $t$ -test).

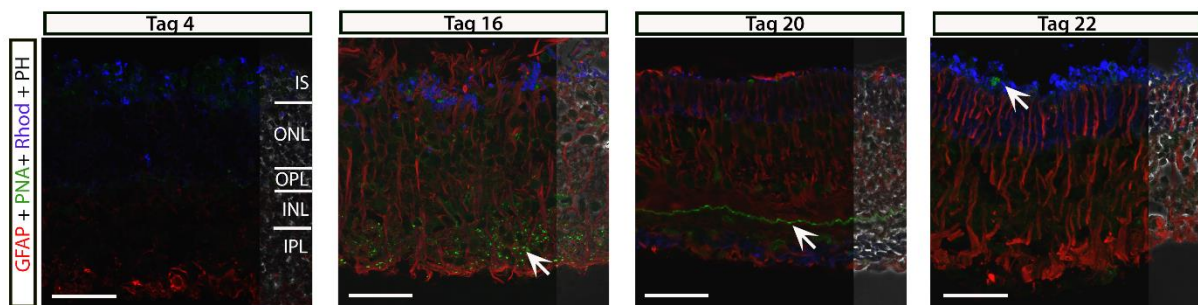
### 3.1.5 Verschiedene Immunfluoreszenz-Primärantikörper

Abbildung 3-13 zeigt die mit den verschiedenen Primärantikörper markierten retinalen Zellen. Calbindin (rot) markiert in der porzinen Retina die Horizontalzellen deutlich, die der seitlichen Informationsweiterleitung von Signalen aus den Photorezeptoren an die Bipolarzellen dienen. Zapfen und Bipolarzellen werden nicht markiert und auch Gliazellen weisen kein positives Signal auf, was die parallele Anfärbung mit GS (grün) zeigt, die ihrerseits sehr deutlich ausfällt. Auch beim Schwein färbt der gegen Recoverin gerichtete Antikörper Stäbchen und Zapfen, sowohl deren Perikaryen, die inneren und oberen Segmente, als auch besonders intensiv die Endfüßchen. Bipolarzellen werden hier mit dem anti-Recoverin-Antikörper nicht markiert. Die mit anti-CtBP2 markierten Ribbon-Synapsen (Pfeil) sind in Grün dargestellt. Auch einzelne Zellkerne in der INL werden mit diesem Antikörper angefärbt. In den beiden rechten Bildern handelt es sich um Dreifachfärbungen. LM-Opsin wurde im gleichen Wellenbereich wie die DAPI-Färbung markiert

(355nm) und zeigt die Zapfen in Hellblau (Pfeil). Rhodopsin als stäbchen-spezifisches Protein wurde hier im Bereich der oberen Segmente in Grün gefärbt und die Gliazellen stellen sich in Rot dar. In der letzten Färbung (Abbildung 3-13, rechtes Bild) zeigte sich Rhodopsin deutlich in Dunkelblau und GFAP konnte ebenfalls gut sichtbar in Rot dargestellt werden. Ein weiterer Marker für Zapfen ist PNA, das auch in der porzinen Retina deutlich die Zapfen mit deren oberen und inneren Segmenten sowie weniger intensiv auch deren Perikaryen, Axone und Endfüßchen markiert. Diese Färbung wurde bis zum Kulturtag 35 durchgeführt und zeigte an anderen Kulturtagen abweichende Färbeergebnisse. (Siehe Abbildung 3-14). So zeigte sich beispielsweise an Tag 4 nahezu kein Signal im Wellenbereich von 488 nm, während nach 16 Tagen in Kultur eine eher diffusere Anfärbung in den unteren Schichten vorliegt, wie beispielsweise von den Zellen der Ganglienzellschicht (siehe Pfeil). An Tag 20 wiederum wies die IPL eine besonders deutliche Fluoreszenz auf (siehe Pfeil) und im Gewebeschnitt des Erntetages 22 ließen sich nur sehr wenige positive Signale im Bereich der Zapfen OS feststellen (siehe Pfeil).



**Abbildung 3-13: Anfärbung der porzinen retinalen Zellen mit verschiedenen Primärantikörpern. Immunfluoreszenz.** Calbindin markiert Horizontalzellen (rot), GS die Müllerzellen (grün). Die kompletten Strukturen der Photorezeptoren können mit Recoverin dargestellt werden (rot), während die Ribbon-Synapsen mit anti-CTBP2 markiert werden ( $\times 5$  Vergrößerung, Pfeil, grün). Die L- und M-Zapfen werden mit dem anti-LM-Opisin Antikörper angefärbt ( $\times 5$  Vergrößerung, Pfeil, hellblau), die oberen Segmente der Stäbchen mit anti-Rhodopsin (grün) und Gliazellen mittels anti-GFAP in Rot. PNA488 markiert obere Segmente der Zapfen (grün). Maßstab  $100 \mu\text{m}$ .



**Abbildung 3-14: Unterschiedliche Färbeergebnisse mit dem Zapfen-Marker PNA 488. Immunfluoreszenz.** PNA markierte in der porzinen Retina an den verschiedenen Kulturtagen verschiedene retinale Strukturen in unterschiedlichen Schichten. Die Pfeile zeigen die jeweils stärkste Anfärbung des Zapfen-Markers. Maßstab  $100 \mu\text{m}$ .

### 3.2 Langzeitkultivierung der porzinen Netzhäute

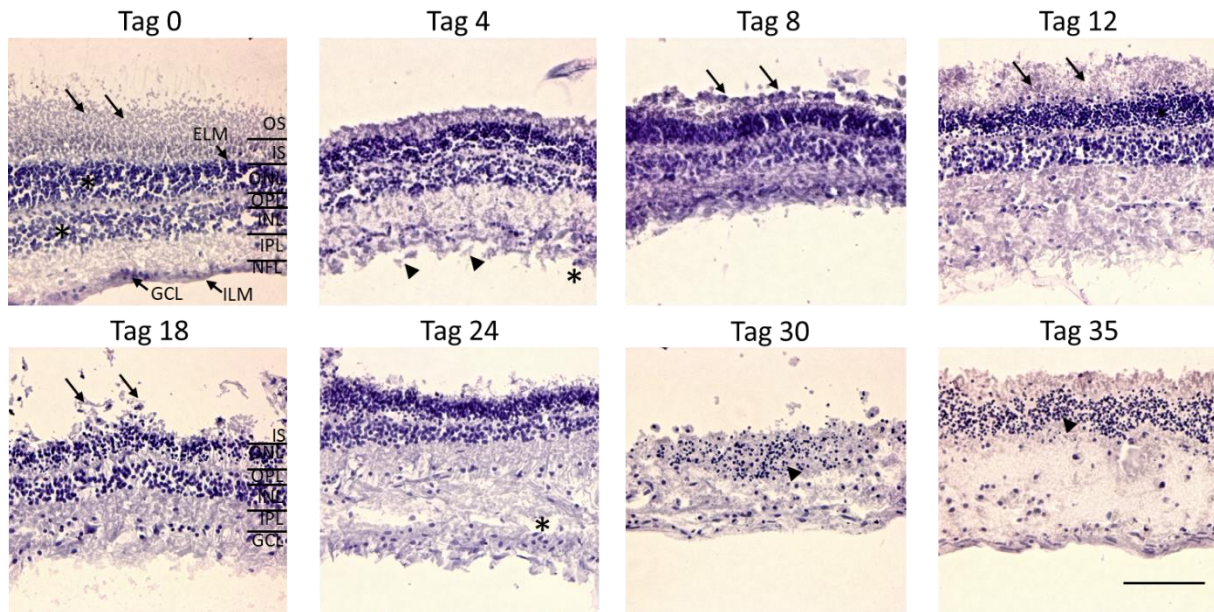
Um kulturbedingte Veränderungen per se auf morphologischer und zellulärer Ebene über die Zeit darzustellen und herauszufinden, bis zu welchem exakten Zeitpunkt die Viabilität der Zellen für

weitere Analysen ausreicht, wurde eine Langzeitkultur angelegt. Die porzinen retinalen Explantate wurden über 35 Tage in Kultur gehalten (die genauen Erntetage sind in Tabelle 3-1 aufgeführt) und die Gewebeproben auf ihre Qualität hin untersucht, was im Folgenden dargestellt wird.

### 3.2.1 Histomorphologische Veränderungen der retinalen Schichten über den Kulturzeitraum

Die bis zum jeweiligen Erntezeitpunkt in Kultur gehaltenen Explantate wurden als Gewebeschnitte wie in den Vorversuchen mit HE gefärbt und in der Lichtmikroskopie im Hinblick auf die Morphologie und den Erhalt der retinalen Schichten untersucht. Abbildung 3-15 zeigt einige ausgewählte Schnitte zu verschiedenen Zeitpunkten der *in-vitro*-Kultur. Die frisch präparierte Tag-0-Netzhaut dient als Kontrollgewebe für die Explantatkulturen und zeigt einen typischen Aufbau einer gesunden porzinen Netzhaut mit klar voneinander abgrenzbaren Schichten. Die inneren und äußeren Segmente der Photorezeptoren und die äußere limitierende Membran (ELM) sind vorhanden, die OS weisen allerdings erste Zeichen einer Degeneration auf (Abbildung 3-15, Tag 0, schwarze Pfeile). Das gesamte Gewebe ist kompakt, zeigt aber auch kleine aufgelockerte Bereiche in den Körnerzellschichten (Abbildung 3-15, Tag 0, \*). Die Nervenfaserschicht sowie die innere limitierende Membran sind gut darstellbar und vollständig. Teilweise lassen sich einige leicht blasig erscheinende Zellkerne in der Ganglienzellschicht finden. Im Unterschied dazu zeigt sich nach vier Tagen in Kultur bereits eine Ablösung der NFL mitsamt ILM (Abbildung 3-15, Tag 4, Pfeilspitzen), wodurch auch Zellkerne der GCL stellenweise an der apikalen Seite der Retina freiliegen (Abbildung 3-15, Tag 4, \*). Zudem zeigen sich die nukleären Schichten aufgelockerter und die Photorezeptorsegmente verkürzt. Am Kulturtag 8 sind in diesem Bereich teils abgehobene Zellhaufen erkennbar (Abbildung 3-15, Tag 8, schwarze Pfeile), die an große Zellkerne erinnern. Sonst ist das retinale Gewebe als kompakt und die retinalen Schichten als gut voneinander abgrenzbar zu bezeichnen. Nach 12 Tagen in der Retinakultur zeigen die Photorezeptorsegmente nun eine beinahe homogene Struktur und haben ihre typische Morphologie gänzlich eingebüßt (Abbildung 3-15, Tag 12, schwarze Pfeile). Weitere Veränderungen des Gewebes lassen sich zu

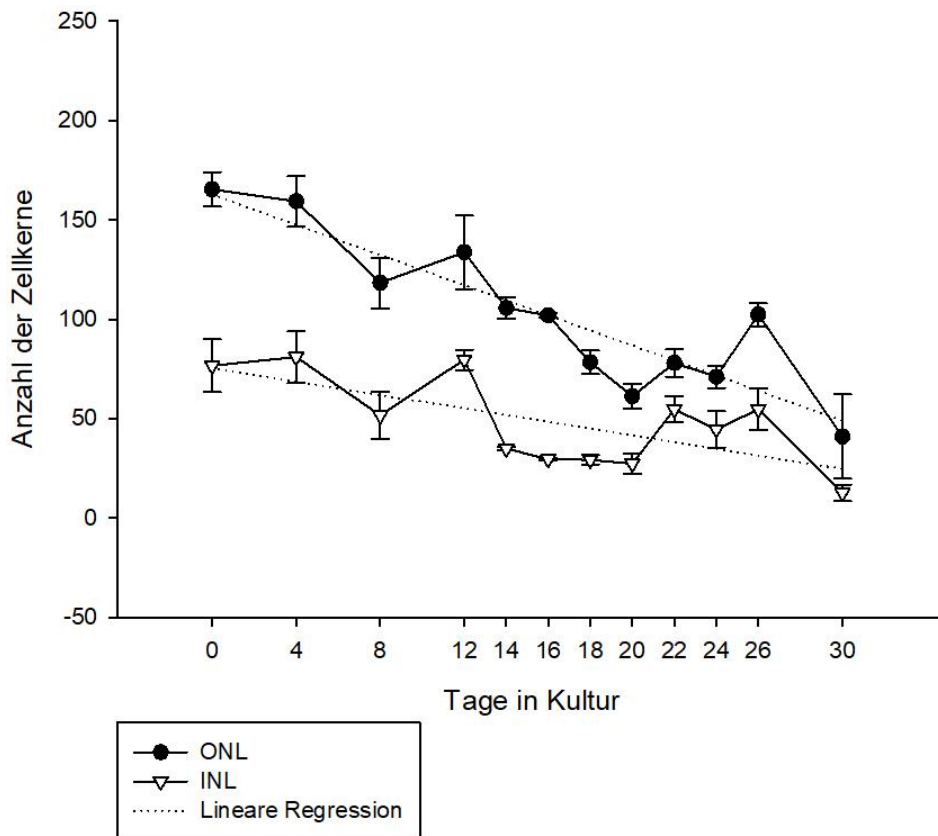
diesem Zeitpunkt noch nicht ausmachen, während die Anzahl an Zellkernen nach 14 Tagen insgesamt geringer scheint. Im Bereich der OS sind auch hier dicke runde Zellbestandteile zu finden. An Kulturtag 16 ist das retinale Gewebe stärker aufgelockert, insbesondere im Bereich der Photorezeptorsegmente und der IPL. Auch die Anzahl an Zellkernen scheint sich nochmal verkleinert zu haben. Bestandteile der OS und IS sind an Tag 18 nur noch vereinzelt zu finden (Abbildung 3-15, Tag 18, schwarze Pfeile) und Zellkerne der ONL zeigen sich hier in exponierter Lage. Die restlichen Schichten sind jedoch immer noch gut abgrenzbar und kompakt, genauso wie auch an Tag 20. Nach 22 und 24 Kulturtagen sind die retinalen Schichten ebenfalls noch intakt. Auch hier sind die Segmente der Photorezeptoren kaum noch vorhanden, wohingegen die nukleären Schichten wieder mehr Zellkerne aufzuweisen scheinen. Das Gewebe ist hier kompakt und lediglich im Bereich der IPL etwas aufgelockert (Abbildung 3-15, Tag 24, \*). Nach 26 Tagen sind wieder weniger Zellkerne insgesamt erkennbar. Der nächste Erntezeitpunkt in der Langzeitkultur war Tag 30, an dem in den mit HE gefärbten Präparaten erstmalig keine Unterscheidung mehr zwischen der oberen und der inneren nukleären Schicht mehr möglich war (Abbildung 3-15, Tag 30 und 35, Pfeilspitzen). Die Zellkerne erschienen hier disseminiert und von ihrer Anzahl her weniger. Das restliche Gewebe war hier aber noch intakt. Ein ähnliches Bild zeigte sich am letzten Kulturtag (Tag 35).



**Abbildung 3-15: Histomorphologische Untersuchung der retinalen porzinen Explantate in Langzeitkultur. HE.** Das Tag-0-Präparat als Kontrollgewebe weist nur leichte Zeichen der Degeneration in den OS auf (schwarze Pfeile). In den darauffolgenden Tagen sind die NFL und ILM abgelöst und die Photorezeptorsegmente verkürzt sowie zunehmend degenerativ verändert. An Kulturtag 30 und 35 ist der typische retinale Schichtaufbau in der HE-Färbung nicht mehr zu erkennen (Pfeilspitzen). Maßstab 100 µm.

Bei der Zellkernzählung der Präparate aus der Langzeitkultur in der DAPI-Färbung zeigt sich ein allmähliches Absinken der Zellkerne im Verlaufe der Kulturdauer. Der Verlauf ist dabei allerdings nicht wie der einer Geraden, sondern weist zwischenzeitlich immer wieder auch Anstiege auf. In Abbildung 3-16 wird deutlich, dass sich die Verläufe in der ONL und INL sehr ähneln und die Linien nahezu parallel verlaufen. Initial sinken die Zellkernzahlen bis zum 8. Tag in Kultur zunächst von im Mittel 165 auf 118 gezählten Kernen in der ONL und von durchschnittlich 77 auf 52 Nuklei in der INL. An Tag 12 liegen die Zahlen nun wieder höher und ähneln den Werten, die an Tag vier ermittelt wurden. Im Anschluss sinken die Zellkernzahlen bis zum 20. Tag in der porzinen Retinakultur nun nahezu linear bis auf 61 Kerne in der ONL und 27 in der INL. Der Abstieg ist hierbei für die obere nukleäre Schicht steiler als für die Kerne der INL. Für den 22. und 26. Tag der *in-vitro*-Kultur sehen wir erneut höhere Zellkernzahlen als an dem jeweiligen Vortag. Die Zählung der Nuklei für die geernteten Retina-Explantate nach 30 Tagen in Kultur gestaltete sich bereits als schwierig, da die Unterscheidung zwischen Zellkernen der ONL und INL schon nicht

mehr in allen Präparaten möglich war. Klar wurde, dass die Nuklei beider Schichten hier die niedrigsten Zahlen aufweisen, die in der ONL bei durchschnittlich 41 und im Bereich der INL bei 13 Zellkernen liegen. Nach 35 Kulturtagen war die Auszählung nicht mehr möglich und ist daher in Abbildung 3-16 nicht mit aufgeführt. Es lässt sich jedoch festhalten, dass hier tendenziell fast ausschließlich Zellkerne auffindbar waren, die am ehesten der INL zugeteilt werden können.



**Abbildung 3-16: Zellkernanzahl in ONL und INL im Verlauf der Langzeitkultur.** Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte ( $n=3$ ), die zugehörigen SD und die lineare Regression. Die Zellkernzahlen von ONL und INL laufen nahezu parallel. Nach einem initial steilen Absinken der Zellkerne ist an Tag 12 ein Anstieg erkennbar, wonach die Werte bis zum Tag 20 in Kultur linear absinken, an Tag 22 und 26 einen erneuten Peak aufweisen und nach 30 Tagen der *in-vitro*-Kultur ihren niedrigsten Wert erreichen.  $r^2$  (ONL) 0,8089,  $r^2$  (INL) 0,4619.

Hinsichtlich der Beschaffenheit der Zellkerne in der DAPI-Färbung sind immer wieder vereinzelt Zellkerne zu sehen, die fragmentiert und aufgelöst oder gar aufgedunsen scheinen. Ab dem 14. Tag der Kultur sind nicht mehr nur vereinzelt derart veränderte Zellkerne zu finden, sondern diese lassen sich nun häufig und mit den folgenden Kulturtagen zunehmend erkennen.

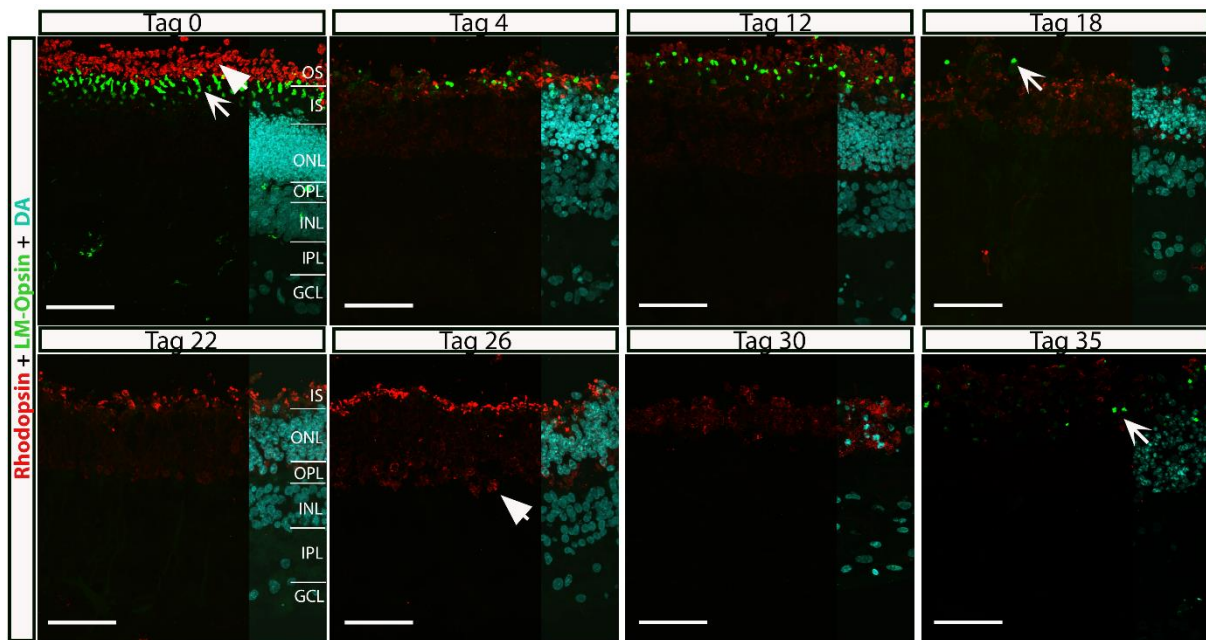
### 3.2.2 Veränderungen der retinalen Neurone und Gliazellen während der Retinakultur

Um die Auswirkungen der Langzeitkultur auf zellulärer Ebene zu untersuchen, wurden die Gewebeschnitte der Kontrollgewebe und bis zum Tag 35 geernteten Explantate mit verschiedenen immunhistochemischen Markern gefärbt und die Bilder analysiert.

#### 3.2.2.1 Rhodopsin und LM-Opisin/PNA

Als Marker für die Stäbchen und Zapfen wurden Primärantikörper gegen Rhodopsin und LM-Opisin verwendet. In dem frisch nach der Präparation fixierten retinalen Gewebe sind die oberen Segmente der Stäbchen sehr deutlich und dicht gepackt in Rot markiert und weisen eine eher rundliche Form auf (Abbildung 3-17, Tag 0, Rhodopsin, Pfeilspitze). Die in Grün angefärbten inneren Segmente der Rot- und Grün-Zapfen liegen ebenfalls dicht und in einer Reihe beieinander und haben eine längliche Form, die gut abgrenzbar ist (Abbildung 3-17, Tag 0, LM-Opisin, Pfeil). Ab dem vierten Tag in der Retinakultur liegen die markierten Segmente der Stäbchen und Zapfen, wie in Abbildung 3-17 erkennbar, teilweise in der gleichen horizontalen Ebene. Die Signaldichte beider Photorezeptoren hat zu diesem Zeitpunkt bereits stark abgenommen und sinkt bis zum folgenden Erntezeitpunkt weiter. Die Form der Zapfensegmente ist zudem deutlich abgerundet. Ab dem zwölften Tag in Kultur ist das Rhodopsinsignal nun immer deutlicher auch im Bereich der ONL zu finden, während LM-Opisin noch zahlreich und deutlich, aber ab diesem Zeitpunkt nicht mehr in linearer Lokalisierung zu finden ist. Ab dem Kulturtag 16 ist das Signal für beide PRS weiter deutlich reduziert und die dargestellten Segmente der Stäbchen sind weniger deutlich in ihrer Form abgrenzbar. In den kommenden Tagen sinken beide Signale weiter (Abbildung 3-17, Tag 18, Pfeil), bis schließlich keine Zapfensegmente mehr erkennbar sind (Abbildung 3-17, Tag 22). Bis zum Tag 24 zeigt die rhodopsinpositive Fluoreszenz weiter eine deutliche Lokalisation im Bereich der PRS, wohingegen man an Tag 26 auch ein deutliches Signal im Bereich der OPL erkennen kann (Abbildung 3-17, Tag 26, Pfeil). Teilweise sind einige Stäbchensegmente auch oberhalb des

Gewebe in frei exponierter Lage zu finden. Nach 30 Tagen in Kultur sind kaum noch Bestandteile der PRS zu finden, wohingegen wir am Kulturtag 35 in einigen Gewebeschnitten etwas LM-Opsonpositives Signal finden konnten (Abbildung 3-17, Tag 35, Pfeil).

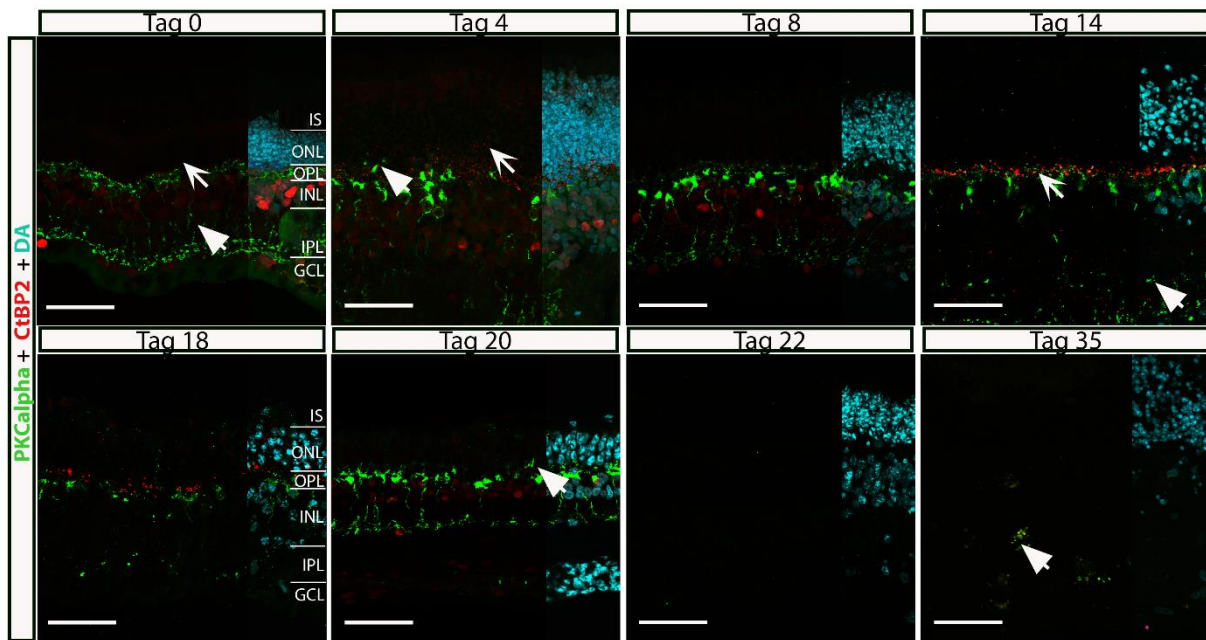


**Abbildung 3-17: Stäbchen- und L-M-Zapfen-Segmente der porzinen Retina in der Langzeitkultur. Immunfluoreszenz.** Das Kontrollgewebe weist getrennt voneinander liegende Schichten von intakten oberen und inneren Segmenten der beiden Photorezeptortypen auf (Abbildung 3-17, Tag 0, Rhodopsin, Pfeilspitze und LM-Opson, Pfeil). In den kommenden Tagen sinkt die Anzahl an Stäbchen- und Zapfensegmenten deutlich, die sich teilweise nun auf einer horizontalen Ebene befinden, bis nur noch am Kulturtag 18 vereinzelte positive Zapfensignale zu finden sind (Abbildung 3-17, Tag 18, Pfeil). Nach 26 Tagen ist das rhodopsinpositive Signal auch im Bereich der OPL sichtbar (Abbildung 3-17, Tag 26, Pfeilspitze) und ist zu den letzten beiden Erntetagen beinahe gänzlich verschwunden. Maßstab 100µm.

### 3.2.2.2 PKC-alpha und CtBP2

Als weiterleitende neuronale Zellen wurden die Stäbchenbipolarzellen untersucht, die mit dem gegen die PKC-alpha gerichteten Primärantikörper markiert wurden. Zusätzlich wurden mittels CtBP2-positivem Signal die Ribbonsynapsen zwischen Photorezeptoren und Bipolarzellen dargestellt. Im Kontrollgewebe sind die in Grün markierten Stäbchenbipolarzellen deutlich zu erkennen und von ihren in der OPL liegenden Dendriten bis zu den Endfüßchen, die in der IPL lokalisiert sind, gut zu verfolgen (Abbildung 3-18, Tag 0, Pfeilspitze). An den Ursprüngen dieser

Dendriten sind in der OPL darüber hinaus kleine rot markierte Punkte zu erkennen, die die Ribbons der Photorezeptoren zeigen. Auch einige Zellkerne der INL und GCL weisen ein CtBP2-positives Signal auf. Nach vier Tagen in der Retinakultur sind erste wenige Zellfortsätze der Stäbchenbipolarzellen und auch Ribbon-Synapsen im Bereich der ONL zu erkennen (Abbildung 3-18, Tag 4, Pfeil und -spitze). Die dargestellten weiterleitenden Neurone scheinen außerdem nicht mehr so dicht gepackt und auch deren Axone sind weniger gut zu erkennen als in den frischen Präparaten. Die Axon-Endfüßchen zeigten sich bereits etwas weniger bauchig und verästelt in ihrer Morphologie. Nach acht Tagen haben die CtBP2-positiven Signale deutlich abgenommen, wohingegen sie am Kulturtag 12 und 14 sehr deutlich darstellbar sind (Abbildung 3-18, Tag 14, Pfeil). Zellbestandteile der Stäbchenbipolarzellen sind ab Tag 12 auch in anderen Schichten der porzinen Retina auffindbar, insbesondere in tiefer liegenden Schichten wie der GCL und NFL (Abbildung 3-18, Tag 14, Pfeilspitze). Das PKC-alpha-positive Signal und die vertikalen Strukturen, die die Axone der Bipolarzellen darstellen, nehmen in den darauffolgenden Tagen immer weiter ab und sind lediglich an Tag 20 wieder vermehrt und deutlicher vorhanden. An diesem Kulturtag lassen sich wiederum auch Zellfortsätze in der ONL erkennen (Abbildung 3-18, Tag 20, Pfeilspitze). Ab dem Tag 22 in Kultur ist das Signal für die Stäbchenbipolarzellen sowie das der Ribbon-Synapsen verschwunden. Lediglich einige rundliche PKC-alpha-positive Strukturen sind an Tag 35 auffindbar (Abbildung 3-18, Tag 35, Pfeilspitze).

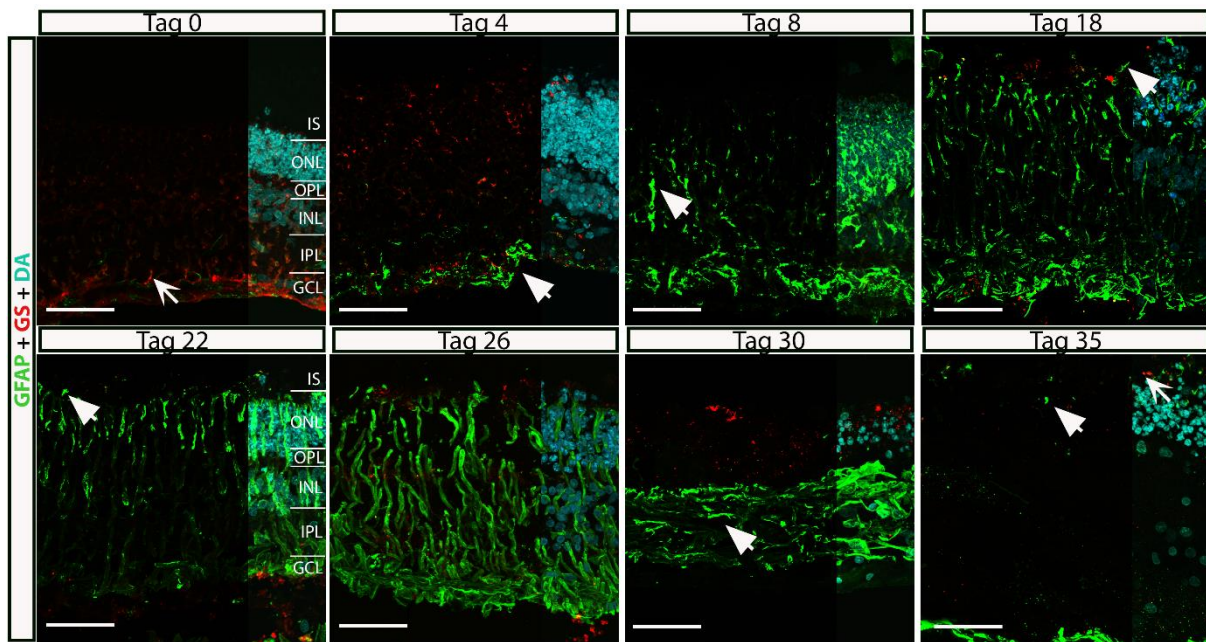


**Abbildung 3-18: Stäbchenbipolarzellen und Ribbon-Synapsen der porzinen Retina in der Langzeitkultur. Immunfluoreszenz.** Neurone (grün) und Ribbons (rot) sind im Kontrollgewebe gut zu erkennen und weisen eine intakte Morphologie auf (Abbildung 3-18, Tag 0, Pfeil und Pfeilspitze). Ab dem vierten Tag in Kultur zeigen sich PKC-alpha-positive Zellfortsätze und Ribbon-Synapsen in der ONL (Abbildung 3-18, Tag 4, Pfeil und Pfeilspitze). Bis hin zu Tag 20 sind die Stäbchenbipolarzellen mit zeitlich abnehmendem Signal detektierbar und auch CtBP2-positives Signal ist zu erkennen. Zu späteren Zeitpunkten sind diese Strukturen nicht mehr auffindbar, oder nur noch einzelne Spuren davon (Abbildung 3-18, Tag 35, Pfeilspitze). Maßstab 100µm.

### 3.2.2.3 GFAP und GS

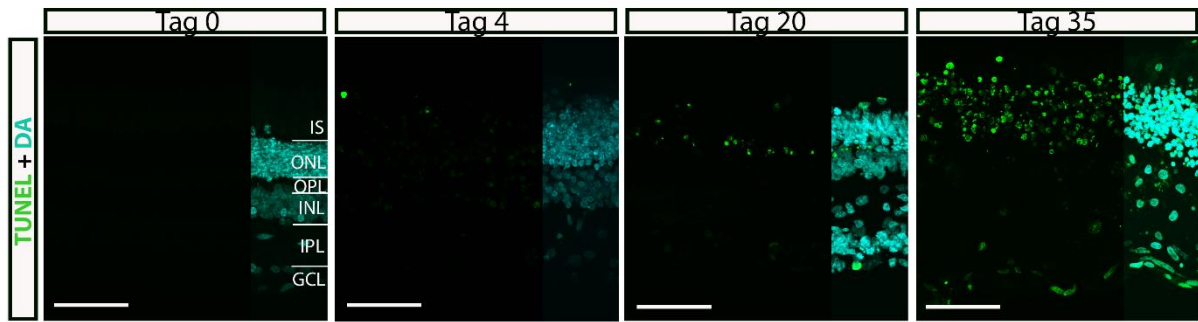
Die retinalen Gliazellen in Form von Astrozyten und Müllerzellen, welches mit dem gegen das GFAP gerichteten Primärantikörper markiert wird, wurden ebenfalls auf Veränderungen an den verschiedenen Zeitpunkten in Kultur hin untersucht. Mit dem zweiten eingesetzten Antikörper gegen die GS werden lediglich die Müllerzellen angefärbt und können somit separat analysiert werden. Im Tag-0-Präparat, welches das Kontrollgewebe darstellt, ist insgesamt nur wenig Signal vorhanden. Die in Rot dargestellten Müllerzellen zeigen sich in rundlicher bis länglicher Form in den unteren Schichten der Retina, insbesondere in der NFL und Ganglienzellschicht mit wenigen Fortsätzen in die IPL und nur sehr wenig in höher liegenden Schichten. (Abbildung 3-19, Tag 0, Pfeil). Auch nach vier Tagen in der Explantatkultur beschränkt sich das Gliazell-Signal auf die unteren Schichten, hier ist allerdings schon mehr grün leuchtender Fluoreszenzfarbstoff in diesem

Bereich erkennbar (Abbildung 3-19, Tag 4, Pfeilspitze), während die Müllerzellen auch in höheren Schichten noch deutlicher angefärbt sind. An Tag acht der retinalen *in-vitro* Kultur lassen sich erstmals vertikale Gliazellfortsätze detektieren, die in einigen Gewebeschnitten bis in die ONL hineinragen (Abbildung 3-19, Tag 8, Pfeilspitze). Die Glutaminsynthetase ist hier nur in sehr geringer Menge zu finden, während das GS-positive Signal in den nächsten Tagen wieder sehr deutlich zu finden ist. Ab Kulturtag 14 reichen zudem die GFAP-positiven Zellfortsätze auch in höhere Schichten hinein und durchziehen das gesamte retinale Gewebe bis in die ONL und teilweise auch in die PRS (Abbildung 3-19, Tag 18, Pfeilspitze). Dieses Bild bleibt über die nächsten Kulturtage in allen zwischenzeitlich geernteten Retinaexplantaten bestehen und die Fortsätze zeigen sich im Verlaufe der Kultur noch länger und dichter (Abbildung 3-19, Tag 26). Das spezifische Müllerzell-Signal ist bis zum Tag 26 ebenfalls in allen Schichten vorhanden und ändert seine Intensität nicht. An Tag 30 lässt sich nun beobachten, dass jegliches GFAP-positive Signal ausschließlich in untere retinale Schichten zwischen der OPL und GCL zurückgedrängt ist und sich in einer amorphen bis horizontal-länglichen Form zeigt (Abbildung 3-19, Tag 30, Pfeilspitze). Die Glutaminsynthetase hingegen ist weiterhin in allen retinalen Schichten sichtbar. Nach 35 Tagen in der Langzeitkultur sind die retinalen Gliazellen bis auf wenige rundliche Restsignale im Bereich der PRS, ONL und auch NFL verschwunden (Abbildung 3-19, Tag 35, Pfeil und -spitze).

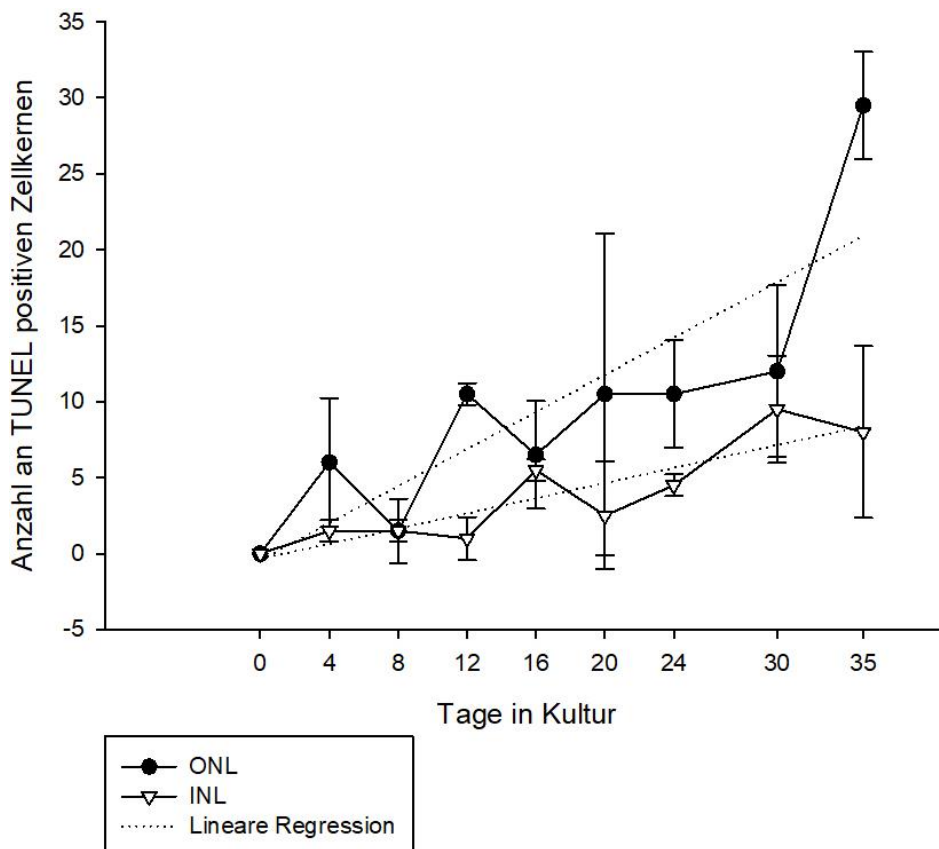


**Abbildung 3-19: Gliazellen der porzinen Retina in der Langzeitkultur. Immunfluoreszenz.** Im Kontrollgewebe sind ausschließlich Müllerzellen (Abbildung 3-19, Tag 0, GS, Pfeil) in der GCL und NFL zu finden. Im Verlaufe der *in-vitro*-Kultur breitet sich das GFAP-Signal, welches Astrozyten und Müllerzellen zeigt, von unteren Schichten in höher gelegene Areale immer weiter aus. An Tag 8 sieht man die länglichen Zellfortsätze (Abbildung 3-19, Tag 8, Pfeilspitze), die von Tag 14 bis 26 auch bis in die PRS reichen (Abbildung 3-19, Tag 18, Pfeilspitze). Am Kulturtag 30 beschränkt sich das GFAP-positive Signal auf die Schichten unterhalb der OPL (Abbildung 3-19, Tag 30, Pfeilspitze) und ist nach 35 Tagen in Kultur bis auf wenige Reste (Abbildung 3-19, Tag 35, Pfeilspitze) verschwunden. Maßstab 100  $\mu\text{m}$ .

Mittels des durchgeführten TUNEL-Assays, der die in Apoptose befindlichen Zellkerne der porzinen Retina in der Langzeitkultur fluoreszieren lässt, ließ sich in der Lasermikroskopie ein Überblick über den Anstieg an degenerierten retinalen Nuklei gewinnen. In Abbildung 3-20 sind beispielhaft vier Zeitpunkte dargestellt, die diesen Anstieg der grün leuchtenden Signale, insbesondere im Bereich der ONL, verdeutlichen. Im Kontrollgewebe der frisch präparierten Retina konnten in den mikroskopierten Gewebeschnitten nahezu keine TUNEL-positiven Zellkerne auffindig gemacht werden. Diese sind erstmals nach vier Tagen in Kultur, insbesondere in der ONL, sichtbar und steigen in den darauffolgenden Tagen weiter an. Ab Kulturtag acht ließen sich auch apoptotische Ganglienzellen nachweisen. Zu den letzten beiden Erntezeitpunkten (Tag 30 und 35) scheint der programmierte Zelltod in einem Großteil der Nuklei in allen drei nukleären Schichten begonnen zu haben.



**Abbildung 3-20: Apoptotische Zellkerne der porzinen Retina in der Langzeitkultur. Immunfluoreszenz.** Das Kontrollgewebe weist nahezu keine TUNEL-positive Zellkerne auf. Nach vier Tagen Retinakultur lassen sich erste apoptotische Kerne in der ONL erkennen. Die Anzahl steigt in den darauffolgenden Kulturtagen stetig an, bis nach 30 und 35 Tagen in Kultur nahezu alle Zellkerne ein positives TUNEL Signal aufweisen. Maßstab 100  $\mu\text{m}$ .



**Abbildung 3-21: Graphische Darstellung der TUNEL-positiven Zellkerne in der ONL und INL im Verlaufe der Langzeitkultur (in Relation zur Gesamtzahl an Zellkernen), die entsprechenden SD und die lineare Regression.** Der Anstieg von apoptotischen Zellkernen stellt sich für ONL und INL unterschiedlich dar und reicht von initial 6 (ONL) und 1,5 (INL) Kernen bis 29,5 (ONL) und 8 Nuklei (INL).  $n=2$  Explantate.  $r^2$  (ONL) 0,7104,  $r^2$  (INL) 0,7883.

In Abbildung 3-21 sind die ermittelten Werte der manuell ausgezählten apoptotischen Zellkerne für die jeweiligen Erntetage graphisch dargestellt. Die Verläufe des Anstiegs an TUNEL-positiven Nuklei sind für die ONL und INL recht unterschiedlich. Der Anstieg in der INL verläuft mit Ausnahme von Tag 16 und Tag 35 nahezu linear. Die Anzahl der in Apoptose befindlichen Nuklei steigt hier von im Mittel 1,5 an Tag vier bis 9,5 nach 30 Tagen in Kultur und sinkt am letzten Kulturtag wieder leicht auf acht gezählte Zellkerne ab. In der ONL wurden an Tag vier im Mittel sechs TUNEL-positive Nuklei gezählt. Bis zum 20. Tag in der Retinakultur werden abwechselnd mehr und wieder weniger Kerne gezählt. Danach steigt die Zahl auf 12 positive Nuklei in der ONL linear an und erfährt am letzten Kulturtag einen deutlichen Peak auf im Mittel 29,5 apoptotische Zellkerne.

### 3.3 Kultur der porzinen Netzhäute unter Normo- und Hyperglykämie

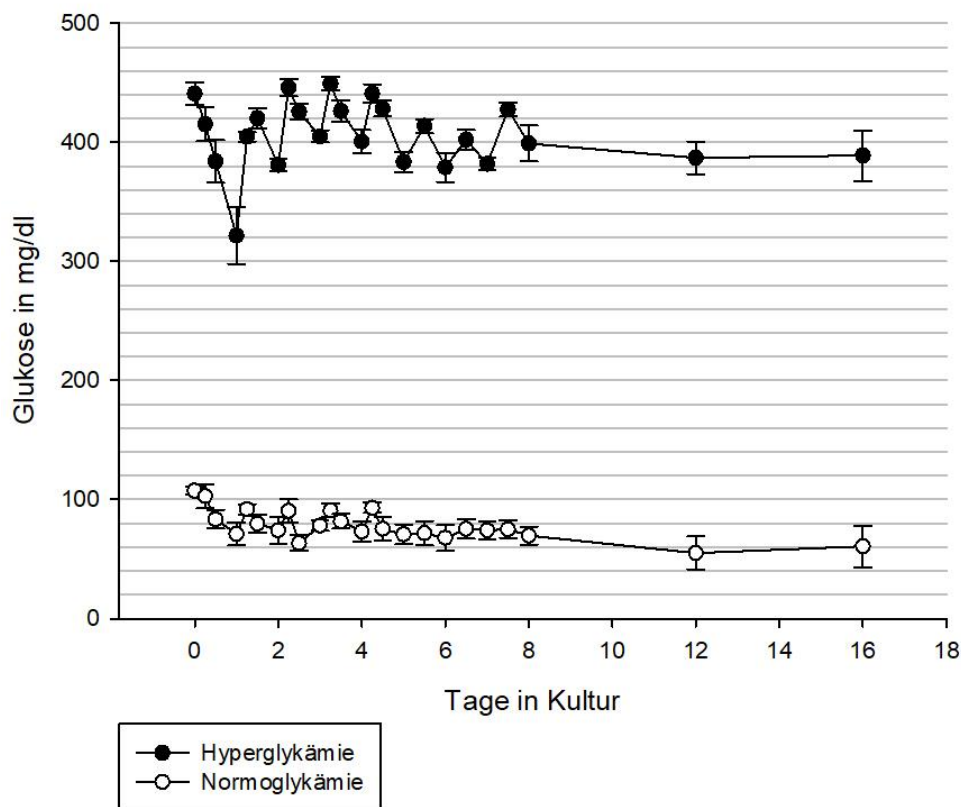
In der folgenden Versuchsreihe wurden die Netzhautexplantate nun mit zwei verschiedenen Konzentrationen über 18 Tage in Kultur gehalten. Die mit 100 mg/dl im physiologischen Bereich der Blutglukosekonzentration des Menschen und des Schweins liegenden Explantate werden im Folgenden als Normoglykämie-Gruppe bezeichnet. Das Standardmedium mit einer Glukosekonzentration von 450 mg/dl wurde für die Vergleichsgruppe, der Hyperglykämie-Gruppe, verwendet.

#### 3.3.1 Glukosekonzentrationen im Nährmedium

Über die gesamte Dauer der Retinakultur wurde der Glukosespiegel des Nährmediums über den Tag und im Verlaufe der Medienwechsel beobachtet, um den Verbrauch an Nährstoffen in Form von Glukose durch die Netzhautexplantate zu quantifizieren und den Verbleib der Glukosewerte im Toleranzbereich zu überwachen. Bis zum 8. Kulturtag wurde jeweils vor und nach dem Wechsel des Nährmediums gemessen. An Tag 12 und 16 wurde der Glukosespiegel noch einmal vor dem

Erneuern des Mediums gemessen, um den Verbleib dieses Spiegels im gewünschten Toleranzbereich zu kontrollieren. An den ersten vier Tagen der Retinakultur wurde der Glukosespiegel dreimal innerhalb von 12 Stunden im Abstand von sechs Stunden gemessen. Die Abbildung 3-22 zeigt, dass der Spiegel am Tag der Präparation (Tag 0) der unter hyperglykämischen Bedingungen kultivierten Netzhäute von initial 450 mg/dl, die im Nährmedium vorhanden sind bis zum Messzeitpunkt auf 441 mg/dl im Mittel sank. Diese erste Messung erfolgte nachdem alle Explantate in die jeweiligen Wells überführt und mit Nährmedium bedeckt waren. Sechs Stunden später wurden noch 415 mg gemessen und nach weiteren sechs Stunden, kurz bevor das Medium zum ersten Mal gewechselt wurde, betrug der Glukosewert noch 384 mg/dl. Innerhalb der ersten 12 Stunden sank die Konzentration an Glukose demnach um circa 60 mg pro Deziliter des Nährmediums. Unter physiologischen Glukosekonzentrationen sank der gemessenen Spiegel von initial 107 mg/dl auf 102 mg und schließlich circa 83 mg vor dem ersten Wechsel des Nährmediums. Somit verringerte sich die Glukosekonzentration hier um fast 25 mg/dl in den ersten 12 Stunden. Nach weiteren 12 Stunden, also nach einem Tag in Kultur, betrug der neue Messwert unter Hyperglykämie 322 mg/dl. Über Nacht sank also der Glukosewert um annähernd 120 mg/dl, was den niedrigsten Wert aller Messungen darstellt, wie man in Abbildung 3-22 erkennen kann. Bei den normoglykämisch kultivierten Netzhäuten wurden 71 mg/dl gemessen. Zu den an diesem Tag folgenden Messzeitpunkten lagen die Werte bei beiden Gruppen jeweils knapp unterhalb der am Vortag erhaltenen Werte. Nach 24 Stunden lag der Glukosespiegel bei 381 mg unter Hyperglykämie, respektive bei 74 mg/dl unter Normoglykämie. Demnach sanken die Werte bei beiden Gruppen am zweiten Tag weniger stark als noch am Vortag. Nachdem die Netzhautexplantate drei Tage in Kultur gehalten wurden, lagen die Glukosewerte erneut über dem Wert des Vortags, sowohl bei erhöhter als auch bei physiologischer Glukosekonzentration im Nährmedium. In den kommenden Tagen lagen die Glukosewerte dann wiederum niedriger. In der Hyperglykämie-Gruppe wurden bis zum 16. Tag in Kultur bei der ersten Messung des Tages Werte zwischen 380 und 400 mg/dl und in der zweiten Gruppe, bei der die Kultivierung unter

normoglykämischen Bedingung stattfand, Werte zwischen 55 und 74 mg/dl im Mittel ermittelt. Zu den zwischenzeitlichen Messzeitpunkten während des Tages wurden nur geringe Schwankungen der Werte zwischen den einzelnen Tagen festgestellt. Das Kulturmedium mit hohem Glukosegehalt wies hier bei der zweiten Messung des Tages nach sechs Stunden an Tag 1 eine Konzentration von 405 mg/dl Glukose auf, während an Tag 2 bis 4 eine Konzentration von mindestens 440 mg/dl gemessen wurde. Nach 12 Stunden lag der Glukosegehalt an Tag 1 bis 8 meist zwischen 420 und 430 mg/dl, lediglich nach fünf beziehungsweise sechs Tagen der Retinakultur lagen diese Werte leicht darunter. Unter Normoglykämie wurden an Tag 1 bis 4 nach sechs Stunden jeweils circa 90 mg/dl und nach 12 Stunden zwischen 70 und 80 mg/dl Glukose im Nährmedium gemessen. Letztlich blieben die Glukosekonzentrationen im Kulturmedium während der 16-tägigen Kulturdauer für die hyperglykämisch ernährten Netzhäute in einem Bereich von 380 bis 450 mg/dl Glukose, mit Ausnahme des nach 24 Stunden in Kultur gemessenen Wertes von 322 mg Glukose pro Deziliter. Währenddessen sanken die Werte unter Normoglykämie im Mittel während den ersten acht Tagen in Kultur nicht unter 70 mg/dl und sanken nach 12 Tagen auf ein Minimum von 55 mg/dl während nach 16 Tagen 60 mg/dl Glukose gemessen werden konnten.

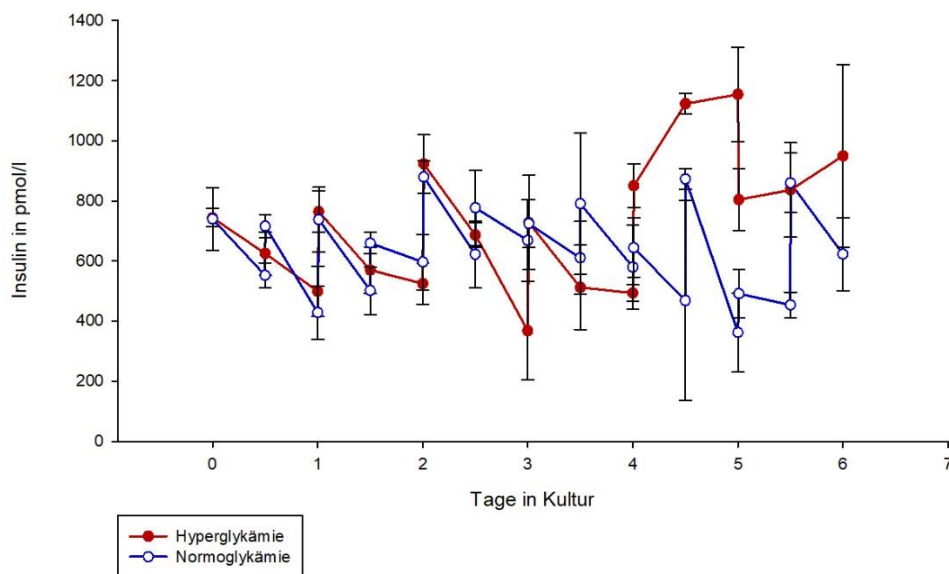


**Abbildung 3-22: Glukosekonzentrationen im Nährmedium über die Kulturdauer.** Dargestellt ist der Glukosegehalt in mg/dl im Kulturmedium als Mittelwert ( $n=3$ ) mit den zugehörigen SD, gemessen jeweils vor dem Mediumwechsel. Während der 16-tägigen Kulturdauer lag die Konzentration für die hyperglykämisch ernährten Netzhäute in einem Bereich von 380 bis 450 mg/dl Glukose, mit Ausnahme des nach 24 Stunden in Kultur gemessenen Wertes von 322 mg Glukose pro Deziliter. Die Werte unter Normoglykämie sanken im Mittel während der ersten acht Tage in Kultur nicht unter 70 mg/dl und fielen nach 12 Tagen auf ein Minimum von 55 mg/dl während nach 16 Tagen 60 mg/dl Glukose gemessen wurden. Der Glukoseverbrauch der retinalen Zellen in Form von Schwankungen in den gemessenen Glukosekonzentrationen nimmt über die Zeit ab.

### 3.3.2 Insulinkonzentrationen im Nährmedium

Mittels speziellem ELISA wurden außerdem die Insulinkonzentrationen im Nährmedium über sechs Tage jeweils vor und nach dem Mediumwechsel gemessen. Abbildung 3-23 zeigt die errechneten Werte für beide Gruppen an kultivierten Netzhäuten mit den beiden unterschiedlichen Glukosekonzentrationen. Die zum jeweils gleichen Zeitpunkt erzeugten Messwerte stellen die ermittelten Insulinkonzentrationen im Medium vor und nach dessen Wechsel dar. Mit Ausnahme der an Tag 5 bei der ersten Messung des Tages erhaltenen Insulinkonzentrationen stieg der Wert

nach dem Austauschen des Kulturmediums stets um durchschnittlich 345 pmol bei der Hyperglykämie-Gruppe und im Mittel um 210 pmol/l bei den unter Normoglykämie kultivierten Retinas an. Im Übrigen gleichen sich die Insulinkonzentrationen in beiden Gruppen bis zum vierten Tag in Kultur und divergieren dann an den letzten beiden gemessenen Tagen etwas auseinander. Für die hyperglykämischen Netzhäute konnten an Tag 5 und 6 mit Ausnahme von der zweiten Messung an Tag 5 stets höhere Insulinkonzentrationen errechnet werden als für die unter Normoglykämie kultivierten Retinas. Dieser Unterschied in der Konzentration lag an diesen beiden Tagen bei durchschnittlich 313 pmol/l.

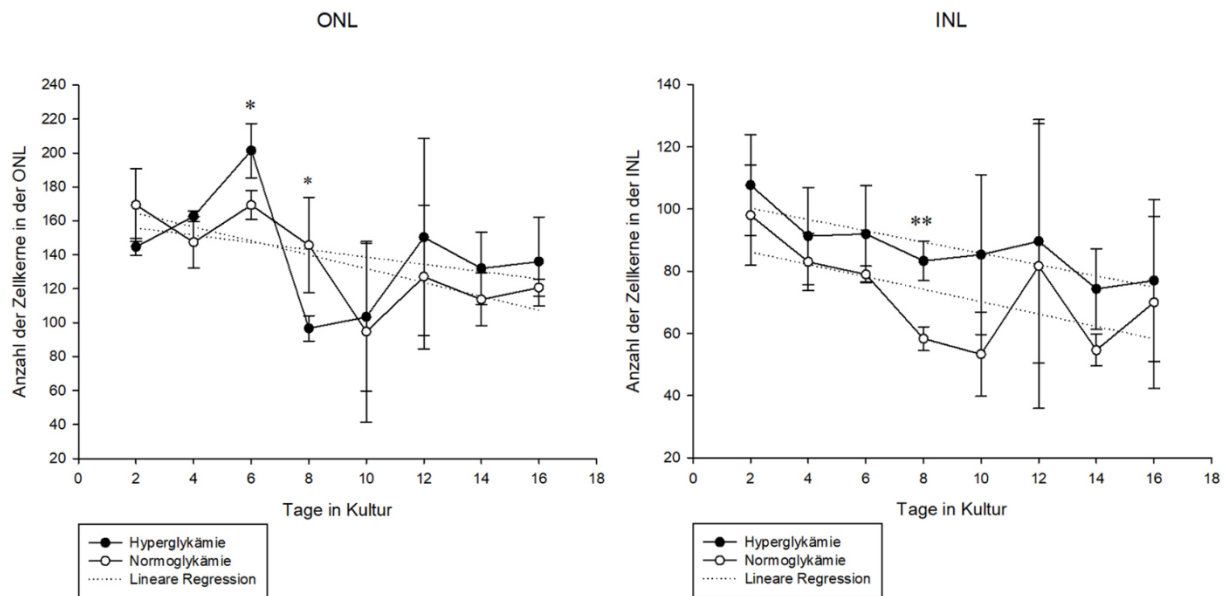


**Abbildung 3-23: Insulinkonzentrationen im Nährmedium über die Kulturdauer.** Dargestellt ist der mittels ELISA errechnete Gehalt an Insulin im Kulturmedium als Mittelwert ( $n=3$ ) mit den zugehörigen SD. Im sechstägigen Messintervall stiegen die Konzentrationen an Insulin nach dem Mediumwechsel durchschnittlich um 345 pmol bei der Hyperglykämie-Gruppe und im Mittel um 210 pmol/l bei den unter Normoglykämie kultivierten Retinas. An den ersten vier Tagen unterschieden sich die Werte zwischen den beiden Gruppen nur geringfügig. Ab dem vierten Tag in Kultur lagen die Werte durchschnittlich um 313 pmol/l höher bei den Netzhäuten, die in dem Medium mit erhöhter Glukosekonzentration kultiviert wurden.

### 3.3.3 Morphologische Veränderungen der retinalen Neurone und Gliazellen während der Retinakultur

#### 3.3.3.1 Anzahl an Zellkernen

Die Anzahl der mit DAPI markierten Photorezeptorzellkörper in der äußeren nukleären Schicht zeigte sich unter hyperglykämischen Bedingungen höher, mit Ausnahme von Tag 2 und 8 der Retinakultur (Abbildung 3-24). Im Mittel wurden 19 zusätzliche Nuklei zu den verschiedenen Kulturzeitpunkten im Zählbereich detektiert. Die Zellkerne anderer retinaler Zellen wie Bipolar-, Horizontal-, Amakrin- und Gliazellen, die in der inneren nukleären Schicht lokalisiert sind, waren in dieser Gruppe ebenfalls in größerer Zahl zu finden. Genauer gesagt wurden hier im Durchschnitt 15 zusätzliche Nuklei im definierten Bereich gezählt. Schwankungen nach oben und unten erschienen über die gesamte Kulturperiode, wie in Abbildung 3-24 erkennbar, in vergleichbarem Maße zwischen den beiden Gruppen ausgebildet. Der Verlust an Zellkernen über die Zeit erschien in der INL linearer zu verlaufen, was sich besonders in der linearen Regression und dem dazugehörigen  $r^2$ -Wert zeigt. Dieser liegt für die Messwerte der INL deutlich höher, die ermittelten Mittelwerte an gezählten Nuklei liegen also näher an der Regressionsgeraden. Beginnend bei durchschnittlich 108 Zellkernen an Tag 2 fällt die Anzahl an Zellkernen bis schließlich 77 verbleibenden Nuklei an Tag 16 der *in-vitro*-Kultur unter Hyperglykämie. Auch unter normoglykämischen Bedingungen erschien der Verlust an Kernen über die Zeit annähernd linear zu verlaufen, von anfänglich 98 bis schließlich im Schnitt 70 Zellkernen. Im Gegensatz dazu zeigten die Zellkerne der Photorezeptoren eine initiale, steile Reduktion nach sechs Tagen, die bis zum 10. Tag andauert. Zwischen Tag 10 und 16 blieb die Zahl an Nuklei dann jedoch in beiden Gruppen relativ stabil und weist an Tag 12 einen leichten Peak in ONL und INL unter beiden Glukosekonzentrationen auf.

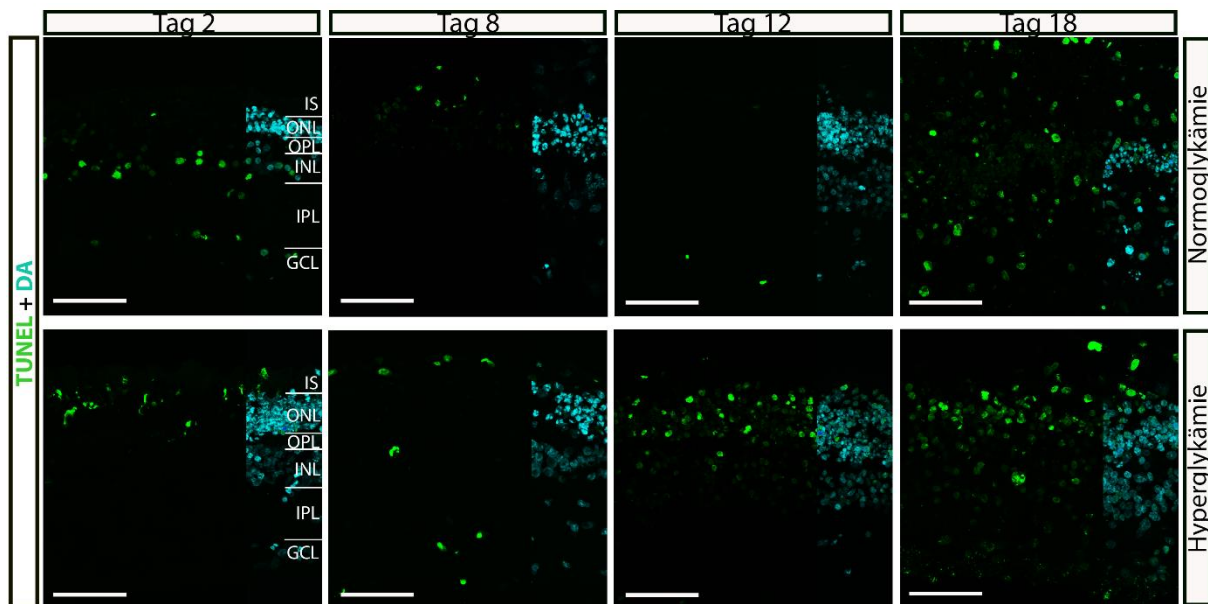


**Abbildung 3-24: Vergleich der Zellkernanzahl in ONL und INL über die Kulturdauer in unterschiedlichen Glukosekonzentrationen.** Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte ( $n=3$ ), die zugehörigen SD und die lineare Regression. Die mit DAPI gefärbten Zellkerne von ONL und INL wurden manuell in einem Bereich von  $150\ \mu\text{m}$  Länge und einer Dicke von  $10\ \mu\text{m}$  bestehend aus zehn übereinandergelegten Einzelaufnahmen gezählt. Außer an Tag 2 und 8 war die Anzahl an Nuklei in der ONL höher unter hyperglykämischen Bedingungen. Die Kerne der INL waren unter Hyperglykämie zu allen Zeitpunkten der Retinakultur zahlreicher. Die Schwankungen der Zellkernanzahl über die Zeit ähnelten sich zwischen den beiden Gruppen mit unterschiedlicher Glukosekonzentration. Lineare Regression ONL:  $r^2=0,1004$  (Hyperglykämie),  $0,5656$  (Normoglykämie) und INL:  $r^2=0,7348$  (Hyperglykämie),  $0,3748$  (Normoglykämie). \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$  (t-test).

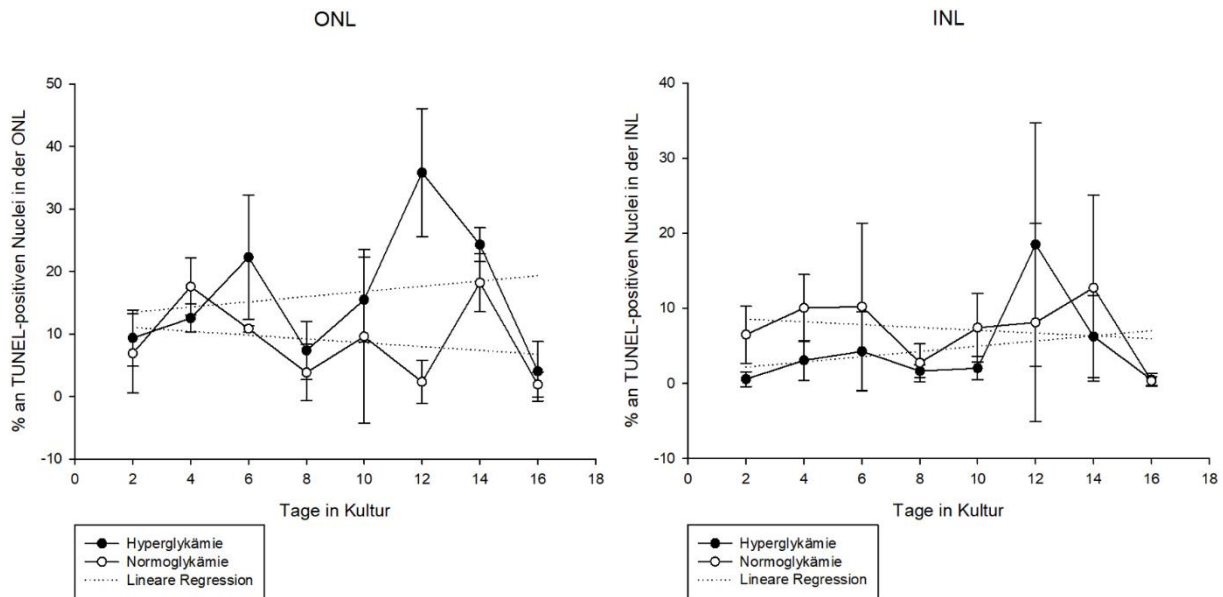
### 3.3.3.2 TUNEL

Ein TUNEL-Assay aus vertikalen Schnitten durch die retinalen Explantate wurde durchgeführt, um die Anzahl an apoptotischen Zellkernen zu jedem Erntezeitpunkt zu ermitteln. Abbildung 3-25 zeigt die TUNEL-gefärbten Retinaschnitte an den Kulturtagen 2, 8, 12 und 18, vergleichend zwischen den beiden Gruppen mit verschiedenen Glukosekonzentrationen. Während die Anzahl an grün leuchtenden Zellkernen an den ersten Tagen in Kultur noch vergleichbar zwischen beiden Gruppen erscheint (Abbildung 3-25, Tag 2), wird zu späteren Erntezeitpunkten ein Unterschied, insbesondere in der ONL, deutlich. Hier sind unter Hyperglykämie mehr TUNEL-positive Nuklei erkennbar. Am letzten Tag der *in-vitro*-Kultur war eine klare Abgrenzung von ONL und INL nicht

mehr möglich, es wurden aber bei beiden Gruppen zahlreiche apoptotische Zellkerne in nahezu allen retinalen Schichten erkannt.



**Abbildung 3-25: Apoptotische Zellkerne der porcinen Retina über die Kulturdauer in unterschiedlichen Glukosekonzentrationen. TUNEL.** Unter hyperglykämischen Bedingungen sind beispielsweise an Tag 8 und 12 mehr TUNEL-positive Zellkerne im Bereich der ONL zu finden. Maßstab 100  $\mu\text{m}$ .

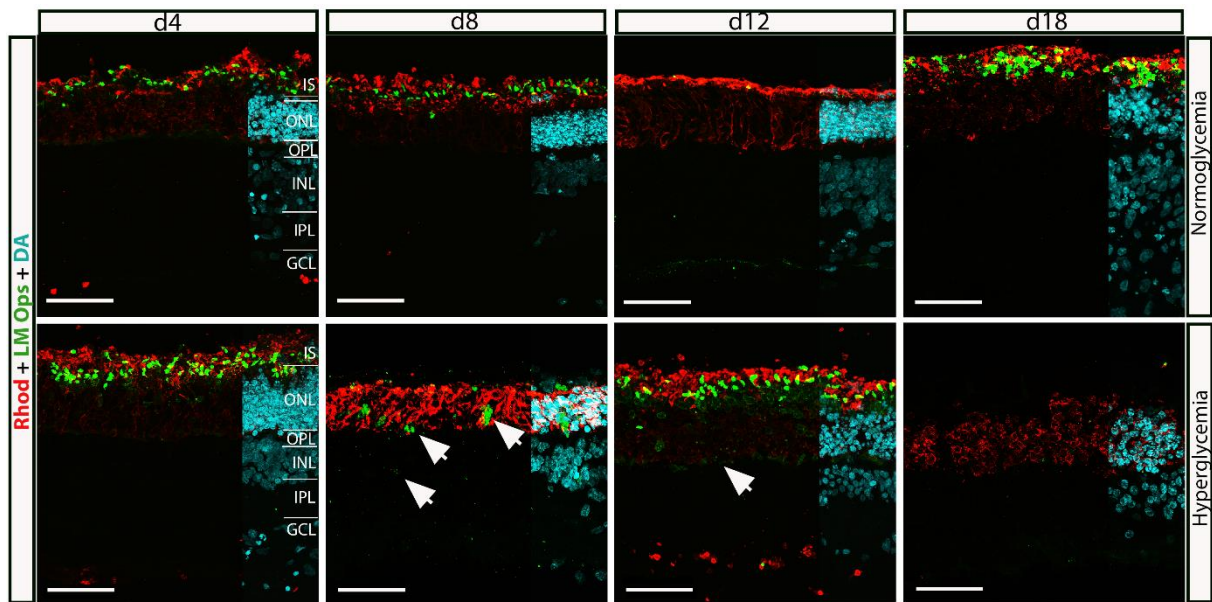


**Abbildung 3-26: Graphische Darstellung der TUNEL-positiven Zellkerne in der ONL und INL über die Kulturdauer in unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (in Relation zur Gesamtzahl an Zellkernen).** Aufgeführt sind die jeweiligen Mittelwerte, die entsprechenden SD und die lineare Regression. In der ONL liegt die Prozentzahl an apoptotischen Zellkernen mit Ausnahme von Tag 4 höher unter Hyperglykämie. Im Gegensatz dazu sind in der INL unter normoglykämischen Bedingungen mehr TUNEL-positive Zellkerne vorhanden, mit Ausnahme von Tag 12. Im Verlauf der Kulturdauer steigt die Zahl an apoptotischen Zellkernen in Relation zur Gesamtzellkernzahl nicht wesentlich an.  $n=3$  Explantate. N.s. ( $t$ -test).

Die Zahl der TUNEL-positiven Zellkerne wurde in Relation zur mit der DAPI-Zählung erfassten Gesamtzellkernanzahl in Prozent ermittelt und in Abbildung 3-26 graphisch dargestellt. Im Bereich der ONL zeigte sie sich an den meisten Kulturtagen um im Mittel 4% höher bei der Gruppe, die mit hohen Glukosekonzentrationen kultiviert wurde, mit Ausnahme des retinalen Gewebes von Tag 4. Hier sind die apoptotischen Zellkerne unter Normoglykämie im Verhältnis zur Gesamtzellkernzahl um etwa 5 % höher. Im Bereich der INL jedoch weisen die retinalen Gewebe, die unter niedrigen Glukosekonzentrationen kultiviert wurden, mit Ausnahme vom Kulturtag 12, höhere Prozentzahlen an TUNEL-positiven Zellkernen auf. Hier liegt der Durchschnitt der Differenz zwischen beiden Gruppen bei 5 %. Am Kulturtag 12 zeigte sich unter Hyperglykämie in beiden nukleären Schichten ein deutlicher Peak, der jeweils die höchste ermittelte Prozentzahl an apoptotischen Zellkernen über die Kulturdauer darstellt. Im Verhältnis zur Anzahl an den zuvor in der DAPI-Färbung gezählten Zellkernen wuchs die Zahl an TUNEL-positiven Zellkernen im Verlauf der Retinakultur nicht signifikant.

### 3.3.3.3 Rhodopsin und LM-Opisin

Um die Stäbchen- und Zapfen-Photorezeptoren in den porzinen retinalen Explantaten zu visualisieren, wurden deren jeweilige Photopigmente mit spezifischen fluoreszierenden Antikörpern gelabelt. Beide Photorezeptorzelltypen konnten zu nahezu allen untersuchten Zeitpunkten unter den verschiedenen Kulturbedingungen detektiert werden (Abbildung 3-27). Die Rhodopsin-Immunreaktivität war in den äußeren Segmenten der Photorezeptoren sowie in der ONL sichtbar. Zu fortgeschrittenen Kulturzeitpunkten wurde eine stärkere Immunreaktivität in der ONL beobachtet, insbesondere im die Zellkerne umgebenden Zytoplasma. Noch deutlicher wurde dieses Signal in der Hyperglykämie-Gruppe sichtbar (Abbildung 3-27, Tag 8 und 18). An Tag 18 der hyperglykämischen Kultur erschienen alle äußeren Segmente der Photorezeptoren verloren und das Rhodopsin-Signal auf die ONL begrenzt. LM-Opisin ist das Opisin im Lichtspektrum für lange und mittlere Wellenlängen. Die Immunreaktivität wurde in den äußeren Segmenten und insbesondere in den inneren Segmenten gefunden. In der OPL war ebenfalls ein leichtes LM-Opisin-Signal zu einigen Kulturzeitpunkten erkennbar, wie in Abbildung 3-27 in der Aufnahme von Tag 12 in der Hyperglykämie-Gruppe gezeigt (Pfeilspitze). Das Signal nahm an den folgenden Kulturtagen ab und ab Tag 8 erschien verbleibendes Opisin-Photopigment über die gesamte hyperglykämisch kultivierte Retina verteilt (Abbildung 3-27, Tag 8, Pfeilspitzen). An Tag 12 und ebenfalls an Tag 16 der *in-vitro*-Kultur fehlte das LM-Opisin-Signal nahezu vollständig unter Normoglykämie, während es in der hyperglykämisch kultivierten Retina noch deutlich detektierbar war. Allerdings konnte an Tag 18, dem letzten Kulturtag, das LM-Opisin-Signal lediglich in der Normoglykämie-Gruppe beobachtet werden. Beide Photorezeptortypen erschienen in den retinalen Explantaten, die unter normoglykämischen Bedingungen kultiviert wurden und an Tag 12 geerntet wurden, nahezu vollständig zerstört.



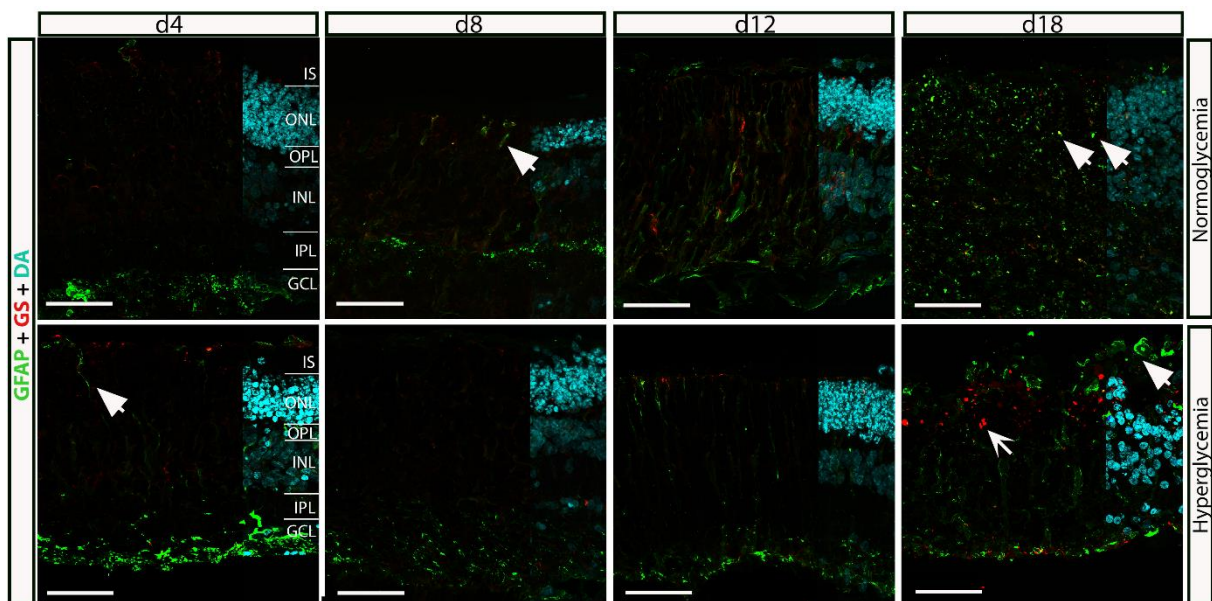
**Abbildung 3-27: Stäbchen- und L-M-Zapfen-Segmente der porzinen Retina über die Kulturdauer in unterschiedlichen Glukosekonzentrationen. Immunfluoreszenz.** Rhodopsin- (rot) und LM-Opsin-Signal (grün) zeigen die Morphologie der Stäbchen- und Zapfen-Protorezeptoren. Es konnten Unterschiede in der Morphologie beider Rezeptortypen zu den unterschiedlichen Kulturzeitpunkten dargestellt werden, die keine Präferenz für eine bestimmte Glukosekonzentration aufwiesen. Maßstab 100µm.

#### 3.3.3.4 PKC alpha und CtBP2

Die neuronalen Stäbchenbipolarzellen wurden in der OPL, INL und IPL mit Antikörpern gegen Proteinkinase-C-alpha (PKC $\alpha$ ) visualisiert. Im Allgemeinen behielten diese Zellen ihre typische Form in beiden Gruppen bis zum 16. Tag der Explantatkultur. Danach fand ein progressiver Verlust in der Zelldichte und der Anzahl an Dendriten statt. Dendritisches *Sprouting* in die ONL wurde an Tag 10 in beide Gruppen erkennbar, welches bis Tag 16 unter Normoglykämie und nur bis Tag 14 unter hyperglykämischen Kulturbedingungen fortbestand (Abbildung 3-28, Tag 18, Inserts, Pfeile). Während der ersten Tage in Kultur wurde eine deutliche Färbung des C-terminalen Bindeproteins 2 (CtBP2) in der ONL der retinalen Explantate, die sowohl unter normo- als auch unter hyperglykämischen Bedingungen kultiviert wurden, beobachtet. Dieses Protein markiert Ribbon-Synapsen zwischen Photorezeptoren und Bipolarzell-Dendriten in der OPL und weist eine typische Hufeisenform auf (Abbildung 3-28, Inserte, Pfeile). Eine leichte Verlagerung des CtBP2-Signals in die ONL erschien im retinalen Gewebe der Normoglykämie-Gruppe vom vierten



plexiforme Schicht (IPL) vor. Mit fortschreitender Kulturdauer wurden diese Fortsätze dichter und länger und reichten durch die INL hindurch bis zur ONL. Interessanterweise starteten diese Ereignisse früher in der Hyperglykämie-Gruppe, nämlich am vierten Kulturtag, an dem erste GFAP-positive Signale im Bereich der GCL erschienen. In der Normoglykämie-Gruppe waren erste Gliazellfortsätze an Tag 8 erkennbar (Abbildung 3-29, Tag 4 und 8, Pfeilspitzen). Diese vertikalen Projektionen entsprechen zellulären reaktiven Gliose-Ereignissen mit dem Ziel, retinale Zellen vor weiteren Schäden zu bewahren und das Gewebe nach pathologischem Geschehen zu reparieren. Zu späteren Phasen der Kultur (zwischen Tag 14 und 18) wurden unter normoglykämischen Bedingungen Spuren von GFAP als disseminierte punktförmige Signale gelabelt. In der Hyperglykämie-Gruppe fanden sich an Tag 18 große runde Gliazellfortsätze zwischen den äußeren und inneren Segmenten der Photorezeptoren (Abbildung 3-29, Tag 18, Pfeilspitzen).



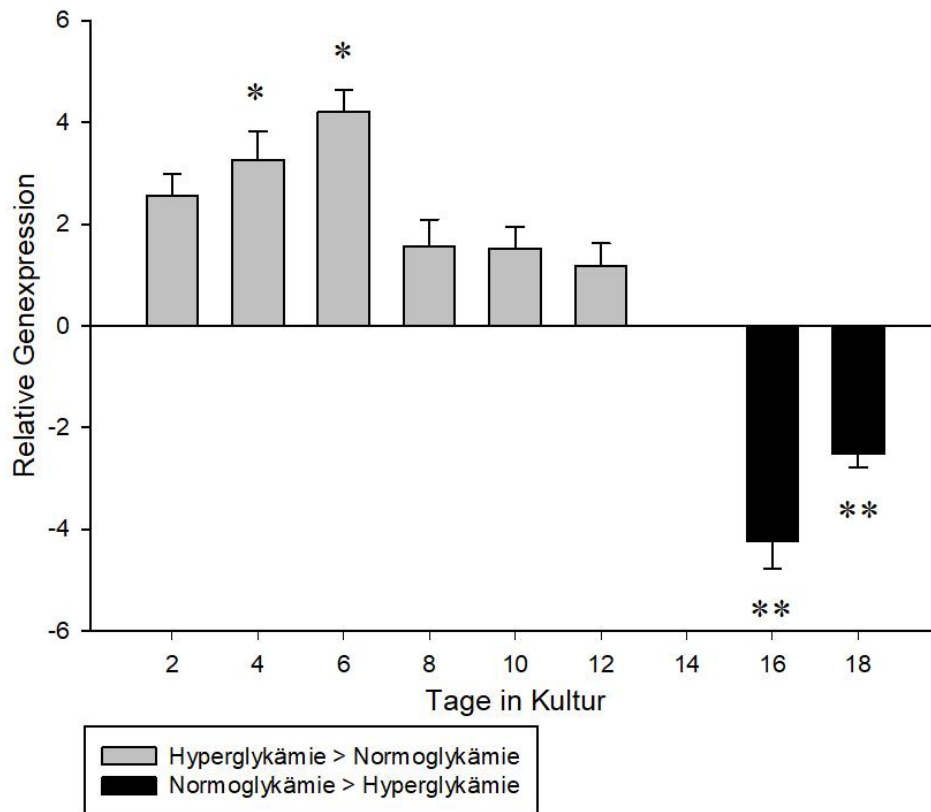
**Abbildung 3-29: Gliazellen der porzinen Retina über die Kulturdauer in unterschiedlichen Glukosekonzentrationen. Immunfluoreszenz.** Vermehrte Gliose-Ereignisse (GFAP, grün und GS, rot) starten früher unter Hyperglykämie und Proteinreste der Gliazellen zeigen zugrunde gebende Gliazellen unter normoglykämischen Kulturbedingungen (Tag 18). Maßstab 100µm.

### 3.3.4 Veränderungen auf RNA-Ebene

Im Hinblick auf verschiedene Moleküle, die bei den initialen Signalwegen bei der Entstehung von Diabetes eine entscheidende Rolle spielen, wurden qPCR-Analysen durchgeführt. Dadurch sollte die Genexpression der vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren (VEGF), des Insulinrezeptors (INSR), des Glukosetransporters 1 (GluT1) sowie eines Proteins aus dem Signalweg des programmierten Zelltodes, der Caspase 3, quantifiziert werden.

#### 3.3.4.1 VEGF

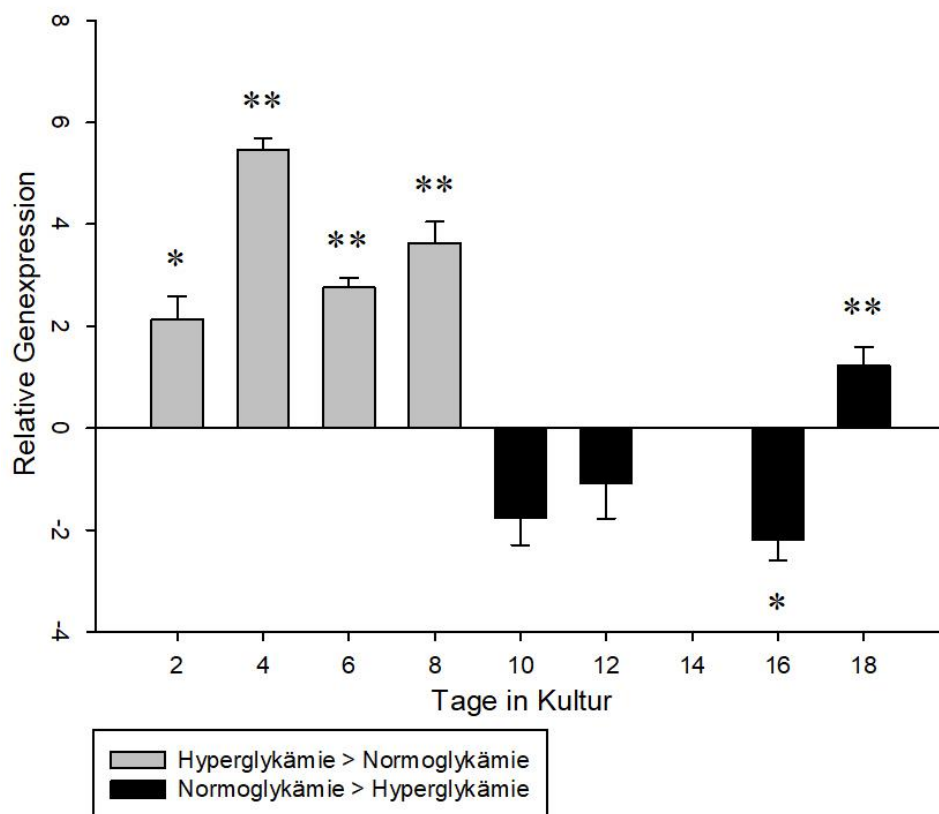
VEGF war in den retinalen Explantaten, die unter hyperglykämischen Bedingungen kultiviert wurden, bis Tag 12 hochreguliert, an Tag 4 und 6 zudem mit statistischer Signifikanz (Abbildung 3-30). Die höchste Hochregulation wurde an Tag 6 der Retinakultur mit einer vierfachen mRNA-Konzentrationsänderung erreicht. An den letzten beiden Kulturtagen wurde, verglichen mit dem RNA-Gehalt an Tag 0, signifikant weniger VEGF exprimiert ( $p < 0,01$ ).



**Abbildung 3-30: Genexpressionsstudie zu VEGF.** Dargestellt ist die relative Genexpression von VEGF, berechnet aus dem Ct-Wert, bezogen auf ein Referenzgen, korreliert mit der Tag-0-Expression ( $=\Delta\Delta Ct$ ) und die jeweiligen SD. Der Vascular endothelial growth factor VEGF ist unter erhöhten Glukosekonzentrationen bis zum Tag 12 in Kultur hochreguliert.  $n=3$  Explantate.  $*p<0,05$ ,  $**p<0,01$  (t-test).

### 3.3.4.2 INSR

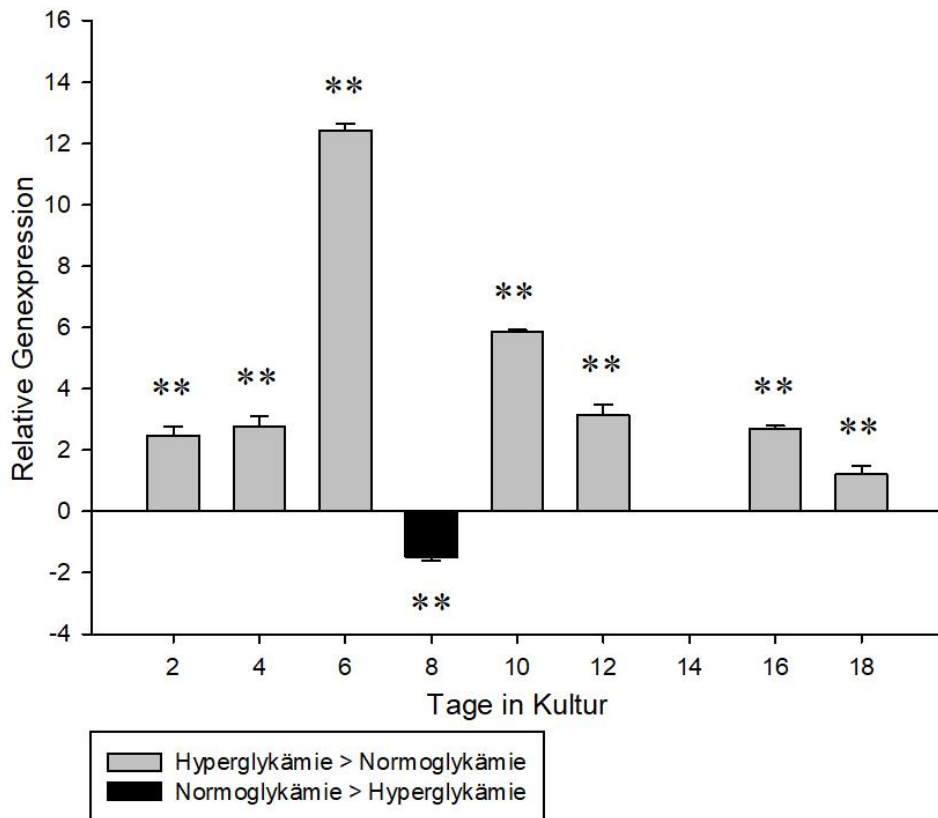
Der INSR war unter Hyperglykämie bis zum achten Tag der *in-vitro*-Kultur signifikant hochreguliert, wie in Abbildung 3-31 erkennbar ist. An Tag 4 wurde hier eine nahezu sechsfache mRNA-Konzentrationsänderung erreicht. Zu den darauffolgenden Kulturzeitpunkten konnte ein niedrigerer Gehalt an INSR-mRNA unter hyperglykämischen Kulturbedingungen quantifiziert werden. Hier wurde eine statistische Signifikanz an den beiden letzten Tagen in Kultur erreicht.



**Abbildung 3-31: Genexpressionsstudie zu INSR.** Dargestellt ist die relative Genexpression von INSR, berechnet aus dem Ct-Wert, bezogen auf ein Referenzgen, korreliert mit der Tag-0-Expression ( $=\Delta\Delta Ct$ ) und die jeweiligen SD. Der Insulinrezeptor ist unter Hyperglykämie bis zum Tag 8 in der Explantatkultur hochreguliert.  $n=3$  Explantate. \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$  (t-test).

### 3.3.4.3 GluT1

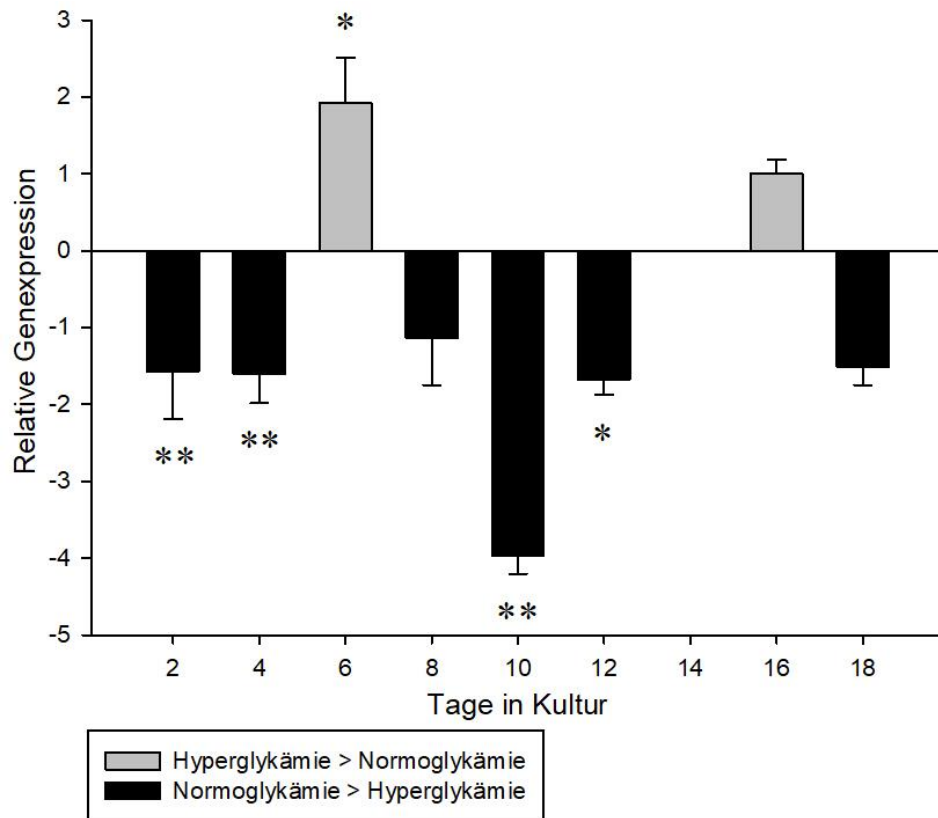
GluT1 zeigte sich unter hyperglykämischen Kulturbedingungen zu allen Zeitpunkten, mit Ausnahme von Tag 8, hochreguliert (Abbildung 3-32). Eine statistische Signifikanz ( $p<0,01$ ) wurde ebenfalls durchgehend erreicht. Es konnten bis zu zwölffache Änderungen der mRNA, die aus dem porzinen retinalen Gewebe nach sechs Tagen in Kultur isoliert wurde, gezeigt werden.



**Abbildung 3-32: Genexpressionsstudie zu *Glut1*.** Dargestellt ist die relative Genexpression von *Glut1*, berechnet aus dem Ct-Wert, bezogen auf ein Referenzgen, korreliert mit der Tag-0-Expression ( $=\Delta\Delta Ct$ ) und die jeweiligen SD. Der Glukose-Transporter-1 ist bei erhöhten Glukosekonzentrationen im Nährmedium zu allen Zeitpunkten der Retinakultur hochreguliert, mit Ausnahme von Tag 8.  $n=3$  Explantate.  $**p<0,01$  (t-test).

#### 3.3.4.4 Caspase 3

Die Caspase 3 wurde zu den meisten Zeitpunkten der Retinakultur unter normoglykämischen Kulturbedingungen hochreguliert (Abbildung 3-33). Diese Hochregulierung erwies sich bis auf Tag 8 und 18 als statistisch signifikant. Meistens wurde hier die eineinhalb- bis zweifache Menge an mRNA erreicht, während an Tag 10 eine fast vierfache Konzentrationsänderung ermittelt werden konnte. Lediglich an Tag 6 und 16 zeigte sich ein höherer mRNA-Gehalt für Caspase 3 in den Explantaten aus der Hyperglykämie-Gruppe. Hier liegt am sechsten Kulturtag eine statistische Signifikanz vor.



**Abbildung 3-33: Genexpressionsstudie zu Caspase 3.** Dargestellt ist die relative Genexpression von Caspase 3, berechnet aus dem Ct-Wert, bezogen auf ein Referenzgen, korreliert mit der Tag-0-Expression ( $=\Delta\Delta Ct$ ) und die jeweiligen SD. Caspase 3 weist zu den meisten Zeitpunkten eine Hochregulierung bei niedrigen Glukosekonzentrationen auf. An Tag 6 und 16 ist der mRNA-Gehalt unter Hyperglykämie höher.  $n=3$  Explantate. \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$  (t-test).

# Diskussion

## 4 Diskussion

### 4.1 Porzine Explantate als Modellsystem für die diabetische Retinopathie

#### 4.1.1 Stand der Forschung

**R**etinale Explantate aus dem Schweineauge wurden bereits als geeignete intermediäre Modellsysteme für die diabetische Retinopathie vorgestellt. Auch wenn Zellkulturmodelle schnelle Screenings mit hohem Durchsatz ermöglichen, sind sie in ihrer Möglichkeit limitiert, *in-vivo*-Situationen zu reproduzieren. Auf der anderen Seite bieten Tiermodelle hier zwar verlässlichere Ergebnisse, haben aber Nachteile in ihrer Effizienz und der experimentellen Kontrolle. Organotypische Kulturmodelle der Retina bieten eine Möglichkeit, eine Brücke zwischen beiden Methoden zu errichten, indem sie die natürliche Umgebung simulieren, während ein hohes Maß an experimenteller Kontrolle bestehen bleibt (Rettinger et al. 2018).

*In-vivo*-Situationen mit Organkulturmethoden nachzubilden bietet eine exzellente Möglichkeit, zelluläre Prozesse, molekulare Signalwege und Zell-Zell-Interaktionen sowie strukturelle und synaptische Organisationen zu untersuchen (Schnichels et al. 2019). So ist immer noch unklar, warum retinale Neurone und andere retinale Zellen so sensibel gegenüber hohen Glukosewerten sind (Schnichels et al. 2021) und wird daher auch mithilfe dieses Modellsystems gegenwärtig weiter untersucht.

Zelldegenerationsmodelle wie die Neurodegeneration durch Hypoxie wurden durch die Behandlung mit Cobaltchlorid initiiert und Ganglienzellapoptose durch Zugabe von NMDA herbeigeführt (Kuehn et al. 2017). Hypoxie-bedingte Neurodegeneration und die Bedeutung von Hypothermie wurde von Maliha et al. genauer betrachtet (Maliha et al. 2019). Im Hinblick auf die degenerativen Auswirkungen von oxidativem Stress wurden porzine Augen Hydrogenperoxid ausgesetzt (Hurst et al. 2017) und mit einer speziellen Kulturmethode mit physikalischer Unterstützung an der inneren

Grenze auf oxidativen Stress und mitochondriale Funktion hin untersucht (Åkerström et al. 2017). Auch Linnéa et al. kultivierten adulte Retina-Explantate mit der ILM auf der Kulturmembran und verglichen das neuronale Überleben und Müllerzellreaktionen mit anderen Kulturmethoden (Taylor et al. 2014). Zur besseren Erforschung der Interaktionen zwischen dem retinalen Pigmentepithel und der Neuroretina wurden Versuche ebenfalls an porzinen Retinaexplantaten durchgeführt (Tamiya et al. 2010; Di Lauro et al. 2016; Wagner et al. 2022). Die adulte porzine Retina kann weiterhin als Modell zur Untersuchung der photorezeptorspezifischen Degenerationsprozesse genutzt werden (Taylor et al. 2014). Auch um Interaktionen zwischen Immunmediatoren, verschiedenen Zelltypen und dem Komplementsystem zu untersuchen, wurde das Modell bereits eingesetzt (Mueller-Buehl et al. 2021; Mohlin et al. 2014). Der neuronale Zelltod in der INL und ONL während der DR wurde durch die Zugabe von 2-deoxy-glucose (2-DG) reproduziert (Valdés et al. 2016). Im Hinblick auf mögliche Therapien von degenerativen Erkrankungen der Retina spielt die porzine Retina eine wichtige Rolle. Die Effektivität von anti-VEGF-Behandlungen wurde durch den Vergleich verschiedener Medikamente in RPE/Choroid-Organokulturen (Klettner et al. 2014; Schnichels et al. 2021) überprüft sowie neuroprotektive Effekte von speziellen Antikörpern weiter untersucht (Bell et al. 2016).

#### 4.1.2 Einsatz von Glukose und Insulin in der *in-vitro*-Kultur

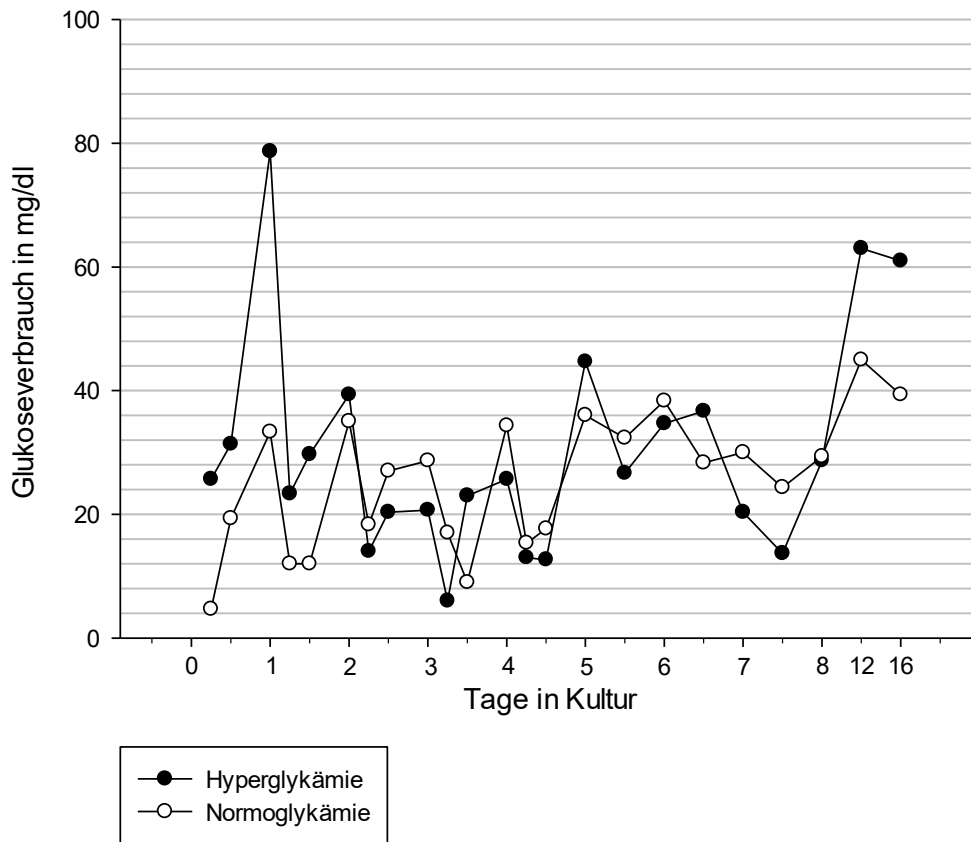
##### 4.1.2.1 Vergleich der Glukosekonzentrationen im Kulturmedium

Ein wichtiger Aspekt dieser Arbeit war die Studie der Auswirkungen einer erhöhten Glukosekonzentration im Kulturmedium auf das retinale Gewebe. Eine chronische Hyperglykämie *in-vivo* ist wie bereits erwähnt der größte pathogenetische Faktor der diabetischen Retinopathie und die meisten (Meta-)Analysen heben die Krankheitsdauer und die Glykämie-Level als wichtigste Risikofaktoren für den Beginn und das Voranschreiten der Krankheit hervor (Hammes et al. 2018). Liu et al. arbeiteten in ihren Versuchen mit Glukosekonzentrationen von 5,5 mM, was 99 mg/dl entspricht, für die euglykämischen Kulturbedingungen und 25 nM, also 451 mg/dl, um ein

hyperglykämisches Milieu zu schaffen (Liu et al. 2016). Reine Müllerzellkulturen wurden von Layton et al. unter „diabetischen“ Glukose-Leveln von 15 mM, entsprechend 270 mg/dl, untersucht. Hier wurden GFAP-Expressionsänderungen im Vergleich zur Kultur in 5 mM Glukose, was einer Konzentration von 90 mg/dl gleichkommt, erfasst. Zudem wurde der Einfluss von Insulin im Kulturmedium untersucht (Layton et al. 2006). In einem Nagermodell von Valdés et al. wurde im serumfreien Kulturmedium eine Konzentration von 34 mM Glukose, entsprechend 613 mg/dl, gewählt, um den Einfluss der erhöhten Glukose mit und ohne Zugabe von Insulin auf die Zelltodraten in der ONL und INL zu untersuchen (Valdés et al. 2016). HREC- und RPE-Zellen wurden Konzentrationen von 25 mmol/l (450mg/dl) ausgesetzt, um die Zellvitalität und Apoptose zu untersuchen (Gong et al. 2017). Aufsteigende Glukosekonzentrationen von 5,5 mmol/l (Kontrollgruppe), 10, 20 und 30 mmol/l wurden in Versuchen von Mu et al. in einer Müllerzelllinie verwendet, was in Milligramm pro Deziliter 99 (Kontrollgruppe), 180, 360 sowie 540 entspricht. Hier wurde die Expressionsänderung von PEDF und VEGF analysiert (Mu et al. 2009).

Die physiologische Blut-Glukosekonzentration beim gesunden Schwein *in-vivo* liegt laut Studien im Bereich zwischen 65 und 95 mg/dl (Buzzard et al. 2012; Koopmans et al. 2005). Daher wurde in dieser Arbeit als Ausgangskonzentration 100 mg/dl Glukose im Kulturmedium für die normoglykämische Kultur gewählt. Das verwendete Neurobasal-A-Kulturmedium enthält ursprünglich 450 mg/dl, was somit dem 4,5-fachen an Glukose, verglichen zur *in-vivo*-Plasmakonzentrationen, entspricht. Dieser Glukosegehalt liegt in Bereichen, die auch bei *in-vivo*-Versuchen an Schweinen mit induziertem Diabetes mellitus im Blutplasma erreicht werden und wurde somit als hyperglykämische Kulturbedingung herangezogen. Bellinger et al. riefen zum Beispiel mit der chemischen Substanz Alloxan einen Diabetes bei ihren Versuchsschweinen hervor, wodurch die Glukoselevel vor der Fütterung zwischen 300 und 400 mg/dl lag (Bellinger et al. 2006).

#### 4.1.2.2 Verbrauch von Glukose und von Insulin durch die retinalen Zellen



**Abbildung 4-1: Glukoseverbrauch des retinalen Gewebes über die Kulturdauer.** Dargestellt ist der Glukoseverbrauch in mg/dl errechnet aus den Mittelwerten der gemessenen Glukosekonzentrationen im Kulturmedium in den jeweiligen Messintervallen. Während der sechzehntägigen Kulturdauer lag der Verbrauch der hyperglykämisch ernährten Netzhäute zu Beginn und am Ende der Kultur höher als bei den Netzhäuten, die im normoglykämischen Medium kultiviert wurden.

In den ersten 12 Stunden sank der Glukosewert in der hyperglykämischen Gruppe um 60 mg/dl und in der normoglykämischen Gruppe um 25 mg/dl. Somit verbrauchten die retinalen Explantate der hyperglykämischen Gruppe 35 mg mehr Glukose pro Deziliter in den ersten 12 Stunden. In den nächsten 12 Stunden (nach Mediumwechsel) sank die Konzentration um 120 mg unter Hyperglykämie, respektive um 30 mg pro Deziliter unter Normoglykämie. Hier gibt es also einen Unterschied von 90 mg/dl im Glukoseverbrauch zwischen beiden Gruppen. Abbildung 4-1 wurde anhand der gemessenen Glukosekonzentrationen im Verlauf der Kultur aus Abbildung 3-22 erstellt, indem das Absinken der Glukose vom letzten Mediumwechsel bis zum jeweiligen

Messzeitpunkt errechnet wurde. Sie verdeutlicht, dass der Verbrauch zu den ersten sechs Messzeitpunkten bis zur ersten Messung an Tag 2 der Retinakultur jeweils höher in der Hyperglykämie-Gruppe ausfiel. Bis Tag 8 unterschieden sich die Werte in der Folge nicht mehr deutlich voneinander, bis der Verbrauch zu späteren Zeitpunkten an Tag 12 und 16 erneut um 18, respektive 22 mg/dl, in dem Kulturmedium mit höheren Glukosekonzentrationen höher lag. Zieht man Rückschlüsse von der verbrauchten Glukose auf den Bedarf an Glukose, und somit die Vitalität des retinalen Gewebes, so scheint die höhere Glukosekonzentration zumindest zu Beginn die Vitalität der Explantate positiv zu beeinflussen. Die Plasmaglukosekonzentration *in-vivo* steht unter strikter hormonaler Kontrolle und das Schwein ist dadurch in der Lage, die Plasmaglukose-Homöostase perfekt aufrechtzuerhalten (Koopmans et al. 2005).

Im lebenden Organismus wird die Absorption der oral mit der Nahrung zugeführten Glukose durch gastrische Entleerung und gastrointestinale Motilität beeinflusst und gastrointestinale Hormone und neuronaler Input modifizieren die Insulinantwort, wodurch die Insulinsekretion einige Zeit nach der Glukoseaufnahme folgt (Wilcox et al. 2005). Das in dieser Arbeit verwendete Zellkulturmedium enthält durch die Zugabe eines für das Überleben der neuronalen Zellen konzipierten Zusatzes (B-27) bereits Insulin. Laut Hersteller beinhaltet dieser Zusatz Insulin in einer Konzentration von circa 58 nM. Darüber hinaus ist auch im zugeführten fetalen Kälberserum Insulin enthalten. Kultiviert man neuronales Gewebe ohne Insulin wurden in Versuchen einiger Autoren signifikant ansteigende Zelltodraten in der INL und ONL ermittelt, was verdeutlicht, dass die Anwesenheit von Insulin in der Retina eine Schlüsselrolle beim Überleben der Zellen, vor allem in der inneren Retina, spielt (Valdés et al. 2016). Außerdem wurde bereits gezeigt, dass Insulin vor einer Verdickung des Choroid schützt und die GAG-Synthese der Sklera anregt (Sheng et al. 2013, S. 439). Andererseits führt wiederum eine erhöhte Insulinkonzentration im Medium ebenfalls zu erhöhten Zelltodraten neuronaler Zellen in Kultur (Rhee et al. 2013). Die Autoren setzen hier eine Insulinkonzentration von 4,3 mM, was 4800 pmol/l entspricht, in einer *in-vitro*-Kultur neuronaler Stammzellen ein. Der physiologische Plasma-Insulinspiegel beim Menschen schwankt zwischen 5

bis 30 mU/L, was circa 35 bis 208 pmol/l entspricht. Die Nüchtern-Insulin-Plasmawerte liegen beim Minipig in der Kontrollgruppe einer Studie zur hochkalorischen Fütterung bei  $23 \pm 21$  pM, was 23 pmol/l entspricht (Olholm Larsen et al. 2002). Um die genaue Konzentration zu Beginn und im Verlaufe der Kulturzeit zu kennen, wurden Insulinmessungen durchgeführt. Der Insulinspiegel, dem unsere retinalen Explantate ausgesetzt waren, lag demnach im frischen Medium bei 700 bis 900 pmol/l in den ersten vier Tagen der Kultur und sank sowie stieg an Tag 5 und 6 in Bereiche zwischen 400 und 1200 pmol/l. Mit dem Wechsel des Kulturmediums stiegen durch die Zusätze im Medium fast immer auch die Insulinkonzentrationen wieder an und sanken bis zum nächsten Wechsel deutlich ab, was darauf schließen lässt, dass Insulin im vitalen retinalen Gewebe an die entsprechenden Rezeptoren bindet und somit dem Medium entzogen wird. Bis zu Tag 4 der Retinakultur glichen sich die gemessenen Konzentrationen zwischen der Normoglykämie- und der Hyperglykämiegruppe weitestgehend, was die Vermutung nahelegt, dass die retinalen Gewebe beider Gruppen zu Beginn Insulin in gleichem Maße binden. An Tag 5 und 6 wurden bis auf eine Ausnahme höhere Konzentrationen unter hyperglykämischen Bedingungen gemessen, was vermuten lässt, dass die Explantate, die mit höheren Glukosekonzentrationen kultiviert wurden, dem Medium nun weniger Insulin entziehen, weil hier physiologische Prozesse möglicherweise durch eine abnehmende Vitalität des Gewebes eingestellt werden. Im lebenden Organismus gelangt Insulin jedoch nicht nur über die Blutbahn aus dem Pankreas zur Netzhaut, sondern wird auch lokal in der Netzhaut produziert, insbesondere im RPE. Dieses System der Bildung von de-novo-Insulin, das mitunter neuroprotektive Aufgaben innehat, geht mit voranschreitendem Diabetes verloren (Jones et al. 2022). In weiteren Versuchen könnte diese lokale Insulinbildung ebenfalls für die Beurteilung des Glukosemetabolismus und die Vitalität der retinalen Explantate herangezogen werden, etwa durch die Messung des Expressionslevels via qPCR von Insulin im neuroretinalen Gewebe, das in serum- und insulinfreiem Medium kultiviert wurde.

### 4.1.3 Hyperglykämie-induzierte Veränderungen der retinalen Neurone und Gliazellen während der Retinakultur

#### 4.1.3.1 Morphologische Veränderungen

Im Hinblick auf die Anzahl der angefärbten Nuklei waren die Zellkerne der Photorezeptoren, außer an Tag 2 und 8 der Retinakultur, und der Zellen der INL zahlreicher in den retinalen Geweben, die unter hyperglykämischen Bedingungen kultiviert wurden. Die Photorezeptoren scheinen dabei insbesondere in den ersten sechs Tagen der Kultur einen rasanten Zelltod zu erfahren, was die Empfindlichkeit dieser hoch spezialisierten Zellen gegenüber äußeren Einflüssen zeigt. Die generelle Abnahme der Zellkerne über die Zeit der Kultur zeigt das allmähliche Absterben des Gewebes durch apoptotische Prozesse.

In der Immunfluoreszenzfärbung konnten die kompletten Zellkörper visualisiert und nach ihrer Morphologie beurteilt werden. Die Veränderungen der Stäbchen und Zapfen über die Zeit waren hier sehr deutlich, aber wiesen keine deutliche Präferenz für eine bestimmte Glukosekonzentration auf. Ab dem 12. Kulturtag scheinen die Zapfen in der normoglykämisch kultivierten Gruppe noch mehr apoptotische Vorgänge zu erfahren. Im Gegensatz dazu wurden bereits dramatische Verluste der Zapfen-Photorezeptoren unter hohen Glukosekonzentrationen beobachtet (Valdés et al. 2016). Lediglich am letzten Tag unserer retinalen Kultur (Tag 18) konnten sich in unseren Experimenten ähnliche Beobachtungen machen lassen, da auch hier noch Zapfenreste in der Normoglykämie-Gruppe zu finden waren, während die Gewebe, die unter erhöhten Glukosewerten kultiviert wurden, kein Zapfensignal mehr aufwiesen. Natürlich zeigen die Ergebnisse der Immunfluoreszenzaufnahmen hierzu nur eine Tendenz auf und sind aufgrund der individuellen Unterschiede der Präparate und verschiedener Einflüsse der Gewinnung, Präparation, Färbung und Anfertigung der Gewebsschnitte schwierig zu quantifizieren oder gar zu generalisieren.

Die Stäbchenbipolarzellen wiesen in ihrer morphologischen Erscheinung keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen auf. Diese Beobachtung deckt sich mit anderen Experimenten zur Kultur unter diabetischen Bedingungen, bei denen PKC alpha-Immunreaktivität keine signifikante Veränderung der Anzahl an Stäbchenbipolarzellen aufdeckte (Valdés et al. 2016). Bis zum letzten Kulturtag konnten die Zellkörper der Bipolarzellen in der ONL, die Dendriten in der OPL und Axone in der IPL in ihrer typischen Form sichtbar gemacht werden, während andere Autoren bereits früher Veränderungen detektierten. So wurden in einer organotypischen humanen Neuroretinakultur bereits nach sechs Tagen veränderte axonale Verästlungsmuster und Axonterminale gefunden (Fernandez-Bueno et al. 2012). Mit drei verschiedenen Präparationsmethoden wurde jeweils an Tag 8 der porzinen Retinakultur ein signifikanter Verlust an Bipolarzellen gefunden (Wagner et al. 2020). Sprouting in die ONL wurde in beiden Gruppen ab Tag 10 beobachtet, das unter normoglykämischen Bedingungen zwei Tage länger anhielt als in der Vergleichsgruppe, bis Tag 16. Dieses Phänomen trat bei den oben genannten Autoren an Tag 9 (Fernandez-Bueno et al. 2012) und von Tag 1 bis 10 auf (Müller et al. 2017). CtBP2 immunreaktive Ribbon-Synapsen waren wie auch bei Müller et al. über die gesamte Kulturdauer in der OPL und IPL detektierbar (Müller et al. 2017) und wurden mit andauernder Kultur weiter in die ONL verschoben, was unter normoglykämischen Bedingungen zwei Tage, nämlich an Tag 4 der Retinakultur, eher beobachtet wurde. An Tag 18, dem letzten Kulturtag, war diese Beobachtung am stärksten ausgeprägt.

Im Rahmen des Diabetes mellitus wird die Aktivierung der Müllerzellen *in-vivo*, wie wir sie in den Immunfluoreszenzaufnahmen sehen, schon frühzeitig und bereits vor den vaskulären Veränderungen in Gang gesetzt (Bringmann et al. 2006), schätzungsweise nach circa eineinhalb Monaten (Hammes et al. 2018). Die Beobachtung, dass Gliose-Ereignisse in den hier kultivierten retinalen Geweben früher in der Hyperglykämie-Gruppe stattfanden, geben Grund zur Annahme, dass erhöhte Glukose hier einen Effekt auf das Einsetzen von Gewebsreparaturmechanismen hat. Aktivierte Müllerglia wurden bereits in früheren Versuchen unserer Gruppe (Müller et al. 2017)

und anderer Autoren (Rettinger et al. 2018) nach vier Tagen detektiert, die im Kulturmedium mit der handelsüblichen, verglichen mit *in-vivo*-Konzentrationen jedoch erhöhten Glukosewerten, kultiviert wurden. Unter physiologischen Glukosekonzentrationen tritt die Gliose also erst vier Tage später ein. In dieser Gruppe sind hingegen bereits zugrunde gegangene Gliazellen in Form von gelabelten Proteinresten zwischen Tag 14 und 18 detektierbar, was darauf schließen lässt, dass eine große Anzahl an Gliazellen ab Tag 14 nicht mehr funktionsfähig sind. Unter erhöhten Glukosekonzentrationen konnte lediglich eine weitere Ausbreitung der Gliazellfortsätze in höhere Schichten und ein gewisser Verlust der genauen Abgrenzbarkeit der Zellen sowie auch große runde Zellhaufen an Tag 18, die eine Schwellung der restlichen Gliazellen zeigen, beobachtet werden. Diese Schwellung könnte ein Hinweis auf Einzelzellnekrose sein, da man beim programmierten Zelltod eher eine Schrumpfung der Zelle und ihrer Bestandteile beobachtet. Rettinger et al. konnten bei dieser Glukosekonzentrationen im regulären Kulturmedium ebenfalls GFAP-Signal in allen retinalen Schichten und eine Desorganisation der Müllerzellfasern ab Tag 14 feststellen (Rettinger et al. 2018). Mittels quantitativer Proteom-Analysen wurden unter erhöhten Glukosewerten im Kulturmedium porziner Müllerzellen eine initiale Beteiligung von retinalen Müllerzellen bei Diabetes mellitus gezeigt. Hier fand vor allem ein Remodeling der Extrazellulärmatrix statt (Sagmeister et al. 2021). Die Verwendung von erhöhten Glukosekonzentrationen im Kulturmedium wurde darüber hinaus als Voraussetzung für phänotypische Veränderungen der Müllerzellen und des RPE durch den Entzug von Insulin dargestellt (Layton et al. 2006).

#### 4.1.3.2 Apoptose-Nachweis

Ein weiterer interessanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen der Explantate mit unterschiedlicher Glukosekonzentration im Nährmedium in Bezug auf die Vitalität der retinalen Zellen konnte durch die Auswertung der apoptotischen Zellkerne ausgemacht werden, wie bereits in den Ergebnissen der TUNEL-Färbung dargestellt wurde. Hier liegt die Prozentzahl an

apoptotischen Zellkernen in der ONL mit Ausnahme von Tag 4 unter Hyperglykämie höher. Insbesondere die Photorezeptoren scheinen also früher in Apoptose zu gehen, wenn die sie umgebende Glukose über eine kritische Konzentration ansteigt, was mit der frühen Neurodegeneration bei Diabetes mellitus korreliert werden kann. Vier Tage erhöhte Glukose war auch bei Valdés et al. und Müller et al. ausreichend, um retinale Zelltodraten ansteigen zu lassen. Auch hier bezog sich diese Beobachtung hauptsächlich auf die Photorezeptorzellen der ONL, die sich ebenfalls hoch sensitiv für die Störung der intrazellulären Glukose-Homöostase zeigten (Valdés et al. 2016; Müller et al. 2017). In der *in-vitro*-Kultur sind wichtige Gründe hierfür wohl auch das Fehlen des RPE und der hierdurch bedingte Verlust der äußeren Segmente der Photorezeptoren. Allerdings sind in der INL unter normoglykämischen Bedingungen mehr apoptotische Zellkerne vorhanden, mit Ausnahme von Tag 12. Andere retinale Zellen wie die Bipolarzellen und Gliazellen scheinen demnach eher auf niedrige Glukose mit programmiertem Zelltod zu reagieren. Generell ist bekannt, dass in der Kultur unter Glukose-Standardkonzentrationen in der INL weniger apoptotische Nuklei zu finden sind als in der ONL. Müller et al. konnten in ihrer vierzehntägigen Kulturdauer fast keine TUNEL-positiven Nuklei detektieren, woraus sie schlossen, dass hier fast keine nekrotischen oder apoptotischen Degenerationsprozesse abliefen (Müller et al. 2017). Andere Autoren sahen wiederum einen signifikanten Anstieg der TUNEL-positiven Zellen ab 240 min nach E nukleation (Svare et al. 2021) und unter Hyperglykämie (Valdés et al. 2016). Betrachtet man die Zahl an apoptotischen Zellkernen über die Kulturdauer in Relation zur Gesamtzellkernzahl wird deutlich, dass die Apoptose in unseren Versuchen recht gleichförmig verläuft, das heißt, dass sie von Beginn der Kulturdauer an immer einen ähnlich hohen Anteil der Zellen betrifft und diese kontinuierlich verringert. Im Gegensatz dazu zeigten sich bei anderen Autoren eine gesteigerte Apoptose zwischen Tag 4 und 8 (Müller et al. 2017) und ein Abfall der Zelltodraten an Tag 14 (Rettinger et al. 2018), vermutlich durch einen signifikanten Zellverlust in den Zellkernschichten.

#### 4.1.3.3 Veränderungen auf RNA-Ebene und Expressionslevel

Um zu überprüfen, ob VEGF unter unseren Kulturbedingungen, ähnlich wie im Verlaufe der Erkrankung mit Diabetes mellitus, eine Hochregulierung erfährt und um in diesem Zusammenhang die Rolle der Glukosekonzentration des Kulturmediums aufzudecken, wurde der VEGF-Genexpressionslevel ermittelt. Bei Patienten mit diabetischem Makulaödem wurden bereits vor Jahrzehnten erhöhte VEGF-Level im Glaskörper gemessen (Funatsu et al. 2002). VEGF ist unter erhöhten Glukosekonzentrationen bis zum Tag 12 in Kultur hochreguliert, was verdeutlicht, dass das retinale Gewebe auch in unserer *in-vitro*-Versuchsreihe auf die vermehrte Glukose mit der Ausschüttung des Gefäßwachstumsfaktors reagiert. Diese Beobachtung deckt sich mit der Literatur, in der Hyperglykämie ebenfalls in beiden Typen von Diabetes mit einer vermehrten Expression von HIF-1 und VEGF assoziiert ist (Kondo et al. 2004). Es wurde ebenso gezeigt, dass die VEGF-Expression in einer Müllerzellkultur konzentrationsabhängig mit ansteigenden Glukoseleveln zunahm, sowohl via Westernblot als auch via PCR-Analyse (Mu et al. 2009, S. 2148). Hyperglykämie führt ebenfalls zu vermehrter SP1-Expression (*specificity protein*) während der proliferativen DR, was wiederum die VEGF-Expression positiv reguliert (Gong et al. 2017).

Darüber hinaus sollte in Erfahrung gebracht werden, inwiefern sich im retinalen Gewebe die Expression der Rezeptoren für die Aufnahme von Insulin verändert und ob eine stressinduzierte Reaktion zum Zwecke der Neuroprotektion bei den unterschiedlichen Glukosewerten aber gleichen Insulinkonzentrationen im Kulturmedium vorgenommen wird. Daher wurde mittels qPCR auch der IR quantifiziert. Insulin bindet an dessen extrazelluläre  $\alpha$ -Untereinheit, um durch die Zellmembran ins Zellinnere zu gelangen (Wilcox et al. 2005). Der IR zeigte sich hier bis Tag 8 der Explantatkultur vermehrt exprimiert. Bis zu diesem Zeitpunkt scheint das Gewebe demnach in der Lage zu sein, adäquat auf die hohe Glukosekonzentration zu reagieren, die demnach auch eine gewisse Stressinduktion hervorruft. Andere Autoren haben bereits darüber diskutiert, ob

oxidativer Stress und Entzündung eine Insulinresistenz durch verminderte Sensitivität und Degradation von IR sowie dessen Substrat IRS hervorrufen (Rhee et al. 2013).

Hinsichtlich des Haupttransportmoleküls von Glukose sollte dessen Expressionsänderung unter Hyperglykämie untersucht werden. Es wurde bereits gezeigt, dass der retinale GluT1 in experimentellem Diabetes und erhöhten Glukosekonzentrationen bei der Kultur von retinalen Endothelzellen erniedrigt ist. Dies scheint mit dessen gesteigerter Degradation, wahrscheinlich durch einen ubiquitinabhängigen Mechanismus assoziiert zu sein (Fernandes et al. 2011). Auch die Translokation von GluT4 ist unter diabetischen Bedingungen erniedrigt (Jones et al. 2022). In unserem Versuch zeigte sich der Glukose-Transporter-1 jedoch bei erhöhten Glukosekonzentrationen im Nährmedium zu allen Zeitpunkten der Retinakultur hochreguliert, mit Ausnahme von Tag 8. GLUT-Transporter schleusen Glukose mittels Konzentrationsgradient durch die Plasmamembran (Carreras et al. 2015). Übertragen auf diesen Versuch bedeutet dies, dass die vorhandenen Transporter jeweils mehr Glukose in die Zellen lassen und zudem hier noch in größerer Zahl vorhanden sind. Einige Zellen scheinen demnach mehr Glukose in Kultur zu benötigen. Hier hat zum Beispiel in einem Tiermodell mit supprimiertem Glukose-Transporter gezeigt, dass in der Retina ein Glukosemangel einen großen Einfluss auf die Vitalität der Stäbchen-Photorezeptoren hat (Swarup et al. 2019). *In-vivo* ist die Passage über den GluT1 durch eine Reihe von Stimuli und Faktoren reguliert, einschließlich Serum, Wachstumsfaktoren und Inhibitoren der oxidativen Phosphorylierung. Hierbei bewirkt der PI3K/Proteinkinase-B-Signalweg eine Erhöhung des GluT1-Transportes in die Plasmamembran und seiner Aktivität (Fernandes et al. 2011). Das Fehlen des RPE und all dieser Faktoren in der Neuroretinakultur haben sicherlich einen Einfluss auf die Expression der Glukosetransporter und deren Hoch- sowie Herabregulierung in unterschiedlich aufgebauten Studien. Es wäre interessant, unter vergleichbaren Bedingungen zudem den GluT4 zu untersuchen. Dieser fungiert in der Retina auch dazu, die Stabilität der Glukoseversorgung unter hyperglykämischen Bedingungen zu gewährleisten. Dies geschieht trotz

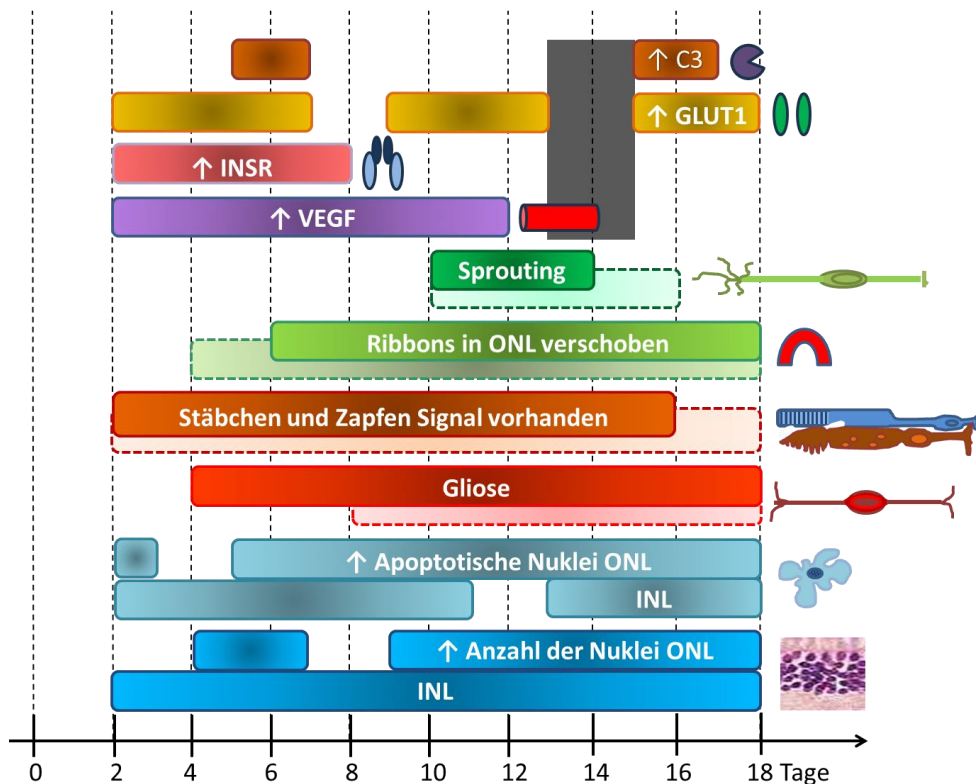
Rezeptorreichtum an GluT1, da die Affinität für Glukose bei GluT1 niedriger ist als für GluT4 (Sánchez-Chávez et al. 2012).

Die Aktivität von Caspase 3 ist ein bekanntes Kennzeichen der klassischen Apoptose. Ein signifikanter Anstieg der Casp3 wurde bereits in INL und ONL nach Behandlung mit hohen Glukosewerten beschrieben (Valdés et al. 2016). Auch andere Stressoren, wie beispielsweise durch CoCl induzierte Hypoxie, zeigten in Versuchen erhöhte Caspase-Expressionen (Kuehn et al. 2017; Maliha et al. 2019). In unserem Versuch wurde keine eindeutige Präferenz für eine Glukosekonzentration festgestellt. Im Gegenteil zeigt die Genexpressionsstudie für Caspase 3 an den meisten Zeitpunkten eine Hochregulierung bei niedrigen Glukosekonzentrationen, die aber mit Ausnahme von Tag 10 nur eine ein- bis zweifache Herunterregulierung hervorruft. An Tag 10 der Kultur wird hier eine nahezu vierfach erniedrigte Expression ermittelt. An Tag 6 und 16 ist der mRNA-Gehalt von Caspase 3 unter Hyperglykämie höher. Hier muss erwähnt werden, dass ein Anstieg der Apoptose durch Hyperglykämie bereits als caspaseunabhängig beschrieben wurde, wohingegen andere Studien auch Caspaseabhängige Mechanismen beschrieben (Matteucci et al. 2015). Betrachtet man diese Informationen zusammen, könnte die größtenteils fehlende Hochregulierung des Apoptose-Markers Caspase 3 entweder durch die Dominanz anderer Apoptosemechanismen bedingt sein oder sich die normoglykämische Kultur als geringgradig größeren Stressoren, bezogen auf die klassische Apoptose der retinalen Zellen, herausstellen. An dieser Stelle wäre es interessant, weitere Apoptose-Enzyme und auch an der Zellnekrose beteiligte Moleküle hinsichtlich ihrer Genexpression unter Hyperglykämie zu untersuchen.

Eine Ausweitung dieser Versuchsreihe mit einer größeren Stichprobenanzahl und weiteren Molekülen aus den verschiedenen glukoseabhängigen Signalwegen wäre hinsichtlich dieser Ergebnisse interessant.

#### 4.1.4 Zusammenfassung der Ereignisse während der hyperglykämischen Kultur

Einige Veränderungen im porzinen retinalen Gewebe in der hyperglykämischen Explantatkultur konnten demnach im direkten Vergleich zur Kultur unter physiologischen Glukosekonzentrationen im Nährmedium festgehalten werden. In Abbildung 4-2 sind diese über die Kulturdauer zusammengefasst dargestellt. Bezogen auf die Genexpressionsstudien zeigen sich der Glukosetransporter 1 (mit Ausnahme von Tag 8) und VEGF (außer an Tag 16 und 18) unter erhöhten Glukosekonzentrationen hochreguliert. Der Insulinrezeptor ist hier bis Tag 8 erhöht. Die Caspase hingegen scheint unter diesen Bedingungen eher weniger exprimiert zu sein. Im Hinblick auf die retinalen Zellen kann das Sprouting der Stäbchen-Bipolarzellen lediglich bis Tag 14 beobachtet werden, wohingegen dieses Phänomen in der Vergleichsgruppe zwei Tage länger anhält. Die Ribbonsynapsen hingegen weisen erst zwei Tage später, nämlich an Tag 6, eine Verschiebung in die ONL auf. Eine deutliche Veränderung in Bezug auf die Photorezeptoren mit Präferenz zu einer Glukosekonzentration gab es nicht, es lässt sich jedoch festhalten, dass das Rhodopsin und Zapfen-Opsin-Signal in der Hyperglykämie-Gruppe am letzten Kulturtag verschwunden war, während es in der Vergleichsgruppe noch deutlich sichtbar gemacht werden konnte. Die Gliose der Müllerzellen setzte erstaunlicherweise vier Tage früher ein, nämlich bereits nach 4 Tagen. Zudem konnten insgesamt mehr Zellkerne in der hyperglykämischen Gruppe gezählt werden, von denen sich jedoch auch zu den meisten Zeitpunkten mehr Zellkerne in Apoptose befanden.



**Abbildung 4-2: Zeitliche Darstellung der Ereignisse in Bezug auf die Veränderungen im retinalen Gewebe unter hyperglykämischen Bedingungen.** Dargestellt sind die unter Hyperglykämie erhöhten Expressionen und Zellkerne (↑) und morphologischen Veränderungen der Zellen im Vergleich zur Normoglykämie-Gruppe (gestrichelte Balken). Während die Caspase 3 (C3) nur an Tag 6 und 16 unter Hyperglykämie hochreguliert ist, zeigt sich GluT1 außer an Tag 8 stets erhöht, der INSR zu Beginn (Tag 2 bis 8) hochreguliert und VEGF zu den ersten sechs Messzeitpunkten (Tag 2-12) erhöht. Sprouting der Stäbchen-Bipolarzellen konnte von Tag 10 bis 14 beobachtet werden, wohingegen es unter normoglykämischen Bedingungen bis Tag 16 anhält. Die Ribbon-Synapsen weisen eine Verschiebung in die ONL nach sechs Tagen auf. Das Signal für die Photorezeptoren konnte unter Normoglykämie zwei Tage länger sichtbar gemacht werden, ergo bis Tag 18 der Kultur. Die Gliose setzte unter HG 4 Tage früher ein und zeigte sich hier ab Tag 4. Die apoptotischen Zellkerne waren unter HG in der ONL, außer an Tag 4, und in der INL, mit Ausnahme von Tag 12, zahlreicher. Auch die Anzahl der gezählten Nuklei war höher in der Hyperglykämie-Gruppe, abgesehen von Tag 2 und 8 in der ONL.

#### 4.1.5 Geeignete Transport- und Präparationsbedingungen

Um die im lokalen Schlachthaus enukleierten Schweineaugen im bestmöglichem Zustand zum Labor zu transportieren, wo die weitere Verarbeitung stattfand, erfolgte zunächst eine eingehende Literaturrecherche. Eine Stellschraube stellte die Temperatur des Mediums während des Transportes dar. Sollte sich herausstellen, dass eine Kühlung der Augen für eine Transportzeit von 30 Minuten eine bessere Qualität der retinalen Explantate liefert, müssen Maßnahmen ergriffen werden, um die Lagertemperatur des Mediums von 8 °C über den Zeitraum der Hin- und Rückfahrt

zwischen Labor und Schlachthaus zu halten und zu kontrollieren (Sheng et al. 2013). Ebenfalls von Interesse war die initiale Gewebsdegeneration der einzelnen retinalen Schichten in der Zeit zwischen E nukleation und somit dem Ende der aktiven Versorgung mit Nährstoffen sowie Sauerstoff und dem Beginn der Präparation im Labor. Beim Anfertigen der Explantate selbst wurde zu Anfang eine Trepanstanze mit einem Durchmesser von 6 mm verwendet. Es stellte sich aber bald heraus, dass die Handhabung einfacher und die Menge an zu untersuchendem Material größer ist, wenn hierfür eine Stanze mit 9,5 mm Durchmesser verwendet wird. Demnach wurde in einem weiteren Experiment getestet, welche Auswirkungen die Größe der retinalen Explantate auf deren Qualität hat, da durch die geringere Manipulation des stanzenfernen Gewebes unter Umständen eine bessere oder zumindest vergleichbare Qualität zu erwarten wäre. Um Unterschiede in der Dicke der Explantate und der Zellkernanzahl (insbesondere in der ONL, in der die Zellkerne der Photorezeptoren liegen) zu untersuchen, wurden ebenfalls peripher gewonnene Bereiche mit denen aus der porzinen area centralis verglichen. Zuletzt wurden verschiedene Antikörper gegen retinale Strukturen auf ihre Anwendbarkeit beim Schwein getestet und eine geeignete Auswahl daraus für die folgenden Immunfärbungen getroffen.

#### 4.1.5.1 Transporttemperatur

Die HE-Färbung lieferte zunächst keine nennenswerten Unterschiede in der Gewebsbeschaffenheit und der Abgrenzbarkeit der retinalen Schichten. Allerdings schienen die nukleären Schichten nach 72 Stunden in Kultur kompakter bei den Augen zu sein, die bei 8 °C transportiert wurden, das heißt der Abstand der einzelnen Nuklei zueinander schien somit hier geringer. Müllerzellen und Astrozyten zeigen in der GFAP- und GS-Immunfärbung keine unterschiedlich starken Gliose-Vorgänge. Dies zeigt, dass die von den Gliazellen ausgehende Reaktion auf gewebsschädigende Reize zunächst nicht von der Temperatur des Gewebes während des Transportes beeinflusst wird. Allerdings lässt sich ein geringer Unterschied bei den neuronalen, signalweiterleitenden Stäbchenbipolarzellen erkennen, die nach 24 und 72 Stunden in Kultur ihre

spezifische Form deutlicher in der Gruppe zeigen, die bei Umgebungstemperatur transportiert wurden. Nach der mikroskopischen Beurteilung der Netzhäute und einzelner Zellen bestand demnach vorerst keine Notwendigkeit, das Transportmedium aktiv während des Transportes zu kühlen. Auch die Ergebnisse der Zellkernzählung, die nur für die Explantate, die nach 24 Stunden in Kultur geerntet wurden, auseinander divergierende Werte zwischen den beiden Gruppen lieferten. Als Konsequenz wurde bei den folgenden Transporten auf eine aktive Kühlung, beispielsweise durch Eis oder Kühlaggregate mit gleichzeitiger Erfassung der Temperatur des Mediums, verzichtet. Hier bestünden außerdem Risiken, wie ein zu starkes Absinken der Temperatur des Mediums einerseits, was wiederum zu Gewebsschäden führen könnte, und andererseits zu unterschiedlichen Kühlergebnissen an den Transporttagen. Die Umgebungstemperatur im Transportfahrzeug lag hingegen für alle Tage konstant bei 20 °C und die Temperatur des Transportmediums lag nach Erreichen des Labors bei immerhin noch 13 °C im Mittel. Eine neuroprotektive Hypothermie wird in der Literatur mit unter 37 °C angegeben, allerdings sind hierfür die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen nicht vollständig bekannt (Maliha et al. 2019).

#### 4.1.5.2 Transportzeit

Um sofort nach der E nukleation ablaufende degenerative Prozesse der Retina bis zum Beginn der Präparation in etwa darstellen zu können, wurden Gewebsschnitte verglichen, die entweder nach dem Entnehmen der Augen noch direkt vor Ort im Schlachthaus oder nach Ankunft im Labor fixiert wurden. Die inneren und äußeren Segmente der Photorezeptoren ließen sich in der im Labor fixierten Retina in der HE-Färbung besser darstellen, was der Erwartung widersprach, dass degenerative Prozesse der sensiblen Photorezeptorsegmente sehr früh ablaufen, wenn die Sauerstoff- und Nährstoffzufuhr abrupt unterbunden wird. Die äußeren Segmente der Photorezeptoren sind die Hauptregionen für Energiemetabolismus und Glykolyse, weshalb auf deren Inhibition normalerweise die Photorezeptordegeneration folgt (Ren et al. 2022). Bei dem mit

HE gefärbten Präparat könnte es jedoch auch nach der Fixierung im Schlachthaus zu präparations- oder transportbedingten Schäden gekommen sein, die nur sehr schwierig voneinander abzugrenzen sind. Auch das Erscheinungsbild der Glia- und Stäbchenbipolarzellen weist keine signifikanten Unterschiede auf. Dies gibt Grund zur Annahme, dass die regulär im Labor nach der Präparation fixierten Explantate, die im Folgenden als Tag-0-Präparate dienen, einer Qualität entsprechen, die sehr nahe an die Situation direkt nach der E nukleation herankommt. Der einzige größere Unterschied bestand in der Anzahl der Zellkerne in der ONL von im Mittel 30 Kernen, die den stärkeren Einfluss von äußeren destruktiven Faktoren für die sensiblen Photorezeptorzellen verdeutlicht. Die Zeit nach der E nukleation spielte in einem Schweinemodell von Svare et al. ebenfalls hinsichtlich des Überlebens des retinalen Gewebes eine Rolle. 90 Minuten nach der E nukleation blieben die Gewebe, verglichen mit Untersuchungen nach 240 Minuten hier größtenteils intakt, wonach bereits Schäden im Gewebe detektiert werden konnten (Svare et al. 2021). In unseren Versuchen waren alle Explantate spätestens nach drei Stunden, also nach 180 Minuten, final präpariert und in Kultur gebracht. Um die ermittelten Photorezeptorzellverluste zu reduzieren, wäre eine noch schnellere Verarbeitung demnach wünschenswert.

#### 4.1.5.3 Präparationsprotokoll

Das Protokoll zur Präparation der porzinen Retinas beinhaltet hinsichtlich Rezeptur des Kulturmediums, Konzentrationen, Zugabe von Serum, Länge der Kultur und Orientierung des Gewebes zur Membran viele Variablen für das Verhalten des Gewebes (Rettinger et al. 2018). Die einzelnen durchgeführten Schritte von der Eröffnung des Augapfels bis hin zur fertigen Retinakultur sind angelehnt an verschiedene Autoren wie Chandler et al. und Wang et al., die bereits erfolgreich retinale Explantate kultivierten (Chandler et al. 1999; Wang et al. 2011) sowie weitere Gruppen, die im Folgenden Erwähnung finden. Einige herauszuhebende Aspekte sind zum einen die Anordnung der Neuroretina in Kleeblattform, die entsteht, wenn das zunächst runde Explantat an vier gegenüber liegenden Stellen leicht eingeschnitten wird, um den vollständigen Kontakt des

*in-vivo* leicht gewölbten Gewebes zur flachen Membran zu gewährleisten. Die beiden oberen Anteile fallen hierbei größer aus als die unteren, um den darin befindlichen mittleren Bereich der area centralis zu schonen. Diese Technik wurde bereits zuvor angewandt, um retinale Explantate aus der Region des visual streaks zu erhalten (Wagner et al. 2022; Mueller-Buehl et al. 2021). Ein weiterer wichtiger Aspekt war die Orientierung der Retina zur Membran. Wir entschieden uns für die klassische Methode, bei der die Photorezeptorseite nach unten, also mit Kontakt zur Polykarbonatmembran, ausgerichtet wird. Hierbei sollten die retinalen Sinneszellen mit ihrer hohen metabolischen Rate durch den physikalischen Kontakt zur Retina gestützt und demnach auch geschützt werden, nachdem eben dieser Schutz durch den Verlust des RPE und der choroidalen Zirkulation entfällt (Taylor et al. 2014). Diese Ausrichtung zur Kulturmembran wurde in den meisten porzinen Retinakulturen gewählt (Kuehn et al. 2017; Mueller-Buehl et al. 2021; Rettinger et al. 2018). Frei schwimmende Explantate, die keinerlei physikalischen Schutz erfuhren, zeigten im Übrigen schnelle Desintegration und eine Pyknose der Mehrheit an Zellen nach zwei Tagen in Kultur (Taylor et al. 2014). Taylor et al. zeigten durch entgegengesetzte Ausrichtung der Retina jedoch nicht nur ein verbessertes Überleben der Ganglienzellen, sondern durch lateralen Zug am Gewebe auch eine bessere Vitalität der Photorezeptoren (Taylor et al. 2014). Daher könnte die dort gewählte Technik auch mit dem Hintergrund unserer Fragestellung und verschiedenen Glukosekonzentrationen im Nährmedium getestet werden. Abschließend ist zu erwähnen, dass für das Handling mit der sehr fragilen und dünnen Retina größte Sorgfalt, Präzision und auch etwas Übung erforderlich sind.

#### 4.1.5.4 Lokalisation und Größe der Explantate

In dieser Arbeit wurden zapfenreiche, zentrale Bereiche der Netzhaut für die verschiedenen Experimente verwendet, aus dem Bereich der porzinen area centralis. Um den Unterschied in der Dicke der retinalen Schichten und der Zellzahl, insbesondere der Zapfen, darzustellen, wurden ebenfalls Explantate aus peripheren Bereichen gewonnen. Über einen Kulturzeitraum von Tag 0

bis 12 konnte stets ein größerer Abstand im vertikalen Schnitt von den oberen Segmenten der Photorezeptoren bis zum unteren Rand der Nervenfaserschicht, und somit eine höhere Dicke des retinalen Gewebes, gemessen werden. Aus der Zellkernzählung ließ sich darüber hinaus eine deutlich höhere Zellzahl, insbesondere an Photorezeptoren erkennen, was die große Differenz an Zellkernen in der ONL zeigt. Hier scheinen die Zapfen, die in der peripheren Region nur spärlich vorhanden sind, einen großen Anteil an der Differenz auszumachen. Die Zapfendichte beim Schwein ist bekanntermaßen in der Region dorsal zum discus opticus nach nasal und temporal erhöht. Zudem ist die Zahl aller Photorezeptoren zentral höher als peripher ohne eine nennenswerte Differenz zwischen nasalen und peripheren Regionen (Chandler et al. 1999). Hinsichtlich des Durchmessers der Neuroretinaexplantate ließen sich sowohl in der HE-Färbung als auch in der Zellkernzählung, außer an Tag 0 und 6, keine großen Unterschiede in der Qualität des Gewebes erkennen. In anderen Gruppen wurde größtenteils mit 6 mm großen Explantaten gearbeitet (Åkerström et al. 2017; Kuehn et al. 2017; Maliha et al. 2019), dennoch wurde für alle folgenden Experimente die Trepanstanze mit dem Durchmesser von 9,5 mm für die Anfertigung der Explantate ausgewählt. So wurde einerseits ein größeres Gewebestück für die Analysen der Färbungen und eine größere Anzahl von Zellmaterial für die folgenden Analysen auf RNA-Ebene sichergestellt. Außerdem war der randferne Bereich im Verhältnis ebenfalls größer, in dem somit von weniger Gewebeschäden durch Manipulation während des Stanzens und einem damit verbundenen Quetschen der Retina auszugehen ist.

#### 4.1.5.5 Geeignete Antikörper zur Immunfärbung

Antikörper zur Immunhistologie- oder Westernblot-Prozeduren sind gewöhnlich nicht für die Eignung an porzinem Gewebe getestet (Schnichels et al. 2019), wonach wir zunächst verschiedene Antikörper testeten. Grundsätzlich labeln einige Antikörper im porzinen Gewebe auch Zelltypen entsprechend zur humanen Retina, wohingegen in murinen Geweben andere Zellspezifitäten gezeigt wurden (Guduric-Fuchs et al. 2009). Der Primärantikörper gegen retinales Calbindin färbte

in der porzinen Retina lediglich die Horizontalzellen, während der Anti-Recoverin-Antikörper die Photorezeptoren von ihren oberen Segmenten bis zu den Endfüßchen darstellt. Beide lassen sich demnach beim Schwein für entsprechende Fragestellungen bezüglich dieser Zellen gut einsetzen. Guduric-Fuchs et al. wiesen Recoverin in Stäbchen und Zapfen nach und gaben an, dass hier nicht wie beim Menschen und bei der Maus auch Bipolarzellen gefärbt wurden. Calbindin-Immunreaktivität hingegen wurde beim Schwein, jedoch nicht bei der Maus-Retina gezeigt (Guduric-Fuchs et al. 2009). PNA färbte in einigen Gewebeschnitten zwar die oberen und inneren Segmente der Zapfen sehr deutlich und präzise an, erwies sich aber im Gesamten als kein zuverlässiger Antikörper zur Darstellung dieses Zelltyps, da auch im Bereich der Ganglienzellschicht oder der IPL positives Signal zu finden war oder in einigen Schnitten ein Fluoreszenzsignal gänzlich fehlte, obwohl alle Präparate zum gleichen Zeitpunkt und auf die gleiche Weise gefärbt wurden. Für die weiteren Immunfluoreszenzfärbungen entschieden wir uns für die Antikörperkombinationen Rhodopsin und LM-Opsin, GFAP und GS sowie PKC alpha zusammen mit CtBP2. Die gegen die Stäbchen- und Zapfen-Photorezeptoren gerichteten Antikörper Rhodopsin und LM-Opsin ließen eine deutliche Unterscheidung dieser beiden Zelltypen zu und lieferten jeweils präzise Färbeergebnisse im Bereich der inneren und oberen Segmente. Die Kombination aus GFAP und GS erwies sich in diversen Studien als gute Methode zur Darstellung der retinalen Gliazellen und zeigte sich auch in unseren Versuchen als gut geeignet, um Müllerzellen und Astrozyten, auch mit ihren feinsten Zellfortsätzen, zu präsentieren. Um weitere neuronale Zellen, die der Signalweiterleitung von den Photorezeptoren in Richtung des Sehnervs dienen, zu verfolgen, wurde letztlich das gegen die Stäbchenbipolarzellen gerichtete Anti-PKC-alpha in Verbindung mit dem Antikörper, der gegen CtBP2 gerichtet ist, eingesetzt. Auch diese beiden Antikörper zeigten in der porzinen Retina gute Färbeergebnisse. Mit der Auswahl dieser sechs Primärantikörper lassen sich somit mehrere Zelltypen in der porzinen Retina darstellen, die verschiedene Aufgaben erfüllen und auf äußere degenerative Reize unterschiedlich schnell reagieren.

#### 4.1.6 Zeitlicher Überblick der porzinen Netzhautdegeneration in der Langzeitkultur

Eine wichtige methodische Fragestellung war, wie bereits erwähnt, die ideale Dauer der porzinen Retinakultur, bevor die zu weit fortgeschrittene Netzhautdegeneration eine Auswertung der verschiedenen Zellveränderungen unbrauchbar macht. In anderen Kulturmodellen lagen uns hierfür bereits Zeiträume von sieben bis zehn Tagen vor, in denen *ex-vivo*-Kulturen lebendig blieben, um die molekularen Mechanismen retinaler Erkrankungen zu untersuchen (Schnichels et al. 2019). In Studien, die die Effekte von Stressoren wie CoCl<sub>2</sub> (Kuehn et al. 2017) oder Co-Kulturen mit RPE (Wagner et al. 2022; Di Lauro et al. 2016) untersuchten, befanden sich die Gewebe in der Regel acht Tage in Kultur. Rettinger et al. entwickelten für ihre Retinakultur optimale Bedingungen, um die porzinen Explantate bis zu 14 Tagen in Kultur zu halten (Rettinger et al. 2018).

##### 4.1.6.1 Makroskopische Veränderungen der porzinen Retina

Wie bereits beschrieben, lassen sich erste Anzeichen von degenerativen Veränderungen in der Kontrollnetzhaut, betreffend die OS und GCL, auf die *ex-vivo*-Situation und die Präparation selbst zurückführen, bei der die Neuroretina von der Pigmentepithelschicht getrennt wird. Die Veränderungen nach vier Tagen mit Ablösung der NFL, Auflockerung der nukleären Schichten und verkürzten Photorezeptorsegmenten sind als dezent zu werten und werden als Verkürzung und Degeneration der OS, Veränderungen der IS zu sphärischen Strukturen sowie dicht gepackten Nuklei in ONL und INL in früheren Versuchen in ähnlicher Weise beobachtet (Müller et al. 2017; Rettinger et al. 2018). Nach einer Woche bis zum 12. Tag in Kultur lassen sich außer in Apoptose und Oncosis befindliche Zellkerne in den nukleären Schichten in unserem Versuch keine zusätzlichen Veränderungen finden. Die laminaire Struktur der Neuroretina ging bei anderen Kollegen hier bereits stückweise verloren, wobei ab Tag 11 die Unterscheidung in die einzelnen Schichten bereits nicht mehr möglich war (Rettinger et al. 2018). Die ersten schwerwiegenderen Veränderungen ließen sich ab Tag 12 beobachten, als die Morphologie der Photorezeptorsegmente

gänzlich verloren scheint und diese bis Tag 18 nur noch vereinzelt erkennbar sind. Bis zum 26. Kulturtag ließen sich die einzelnen retinalen Schichten allerdings noch deutlich voneinander unterscheiden. Zeichen retinaler Degeneration, wie den Verlust der retinalen Lamination und Verzerrung wurden in der Literatur bereits früher in porzinen Neuroretinaexplantaten beschrieben, wie zum Beispiel an Tag 14 (Rettinger et al. 2018).

Die Zellkernzählung brachte zudem die Erkenntnis, dass die Nuklei der ONL einen insgesamt über die Kulturdauer gesehen etwas steileren Abstieg erfahren als die Zellkerne der INL. Es gehen mehr Photorezeptorzellkerne verloren als Nuklei der restlichen retinalen Zellen. Diese Beobachtung verdeutlicht erneut die Herausforderung, die die isolierte Retinakultur an diese sensiblen Sinneszellen stellt. Photorezeptoren sind die primären Energiekonsumenten der Retina (Joyal et al. 2018). Dass es immer wieder Anstiege in den gezählten Zellkernen gibt, wie beispielsweise an Tag 12 und 26, kann auf die unterschiedliche Qualität der Explantate zurückgeführt werden. Hier spielen wiederum die E nukleation, Präparation und Kultur eine Rolle. Die Standardabweichung zwischen den gezählten Arealen pro Explantat ( $n=3$ ) ist dabei als gering zu werten.

Die ab Tag 14 vermehrt zu findenden morphologischen Veränderungen der Zellkerne sind auf eine Chromatinkondensation und -fragmentation zurückzuführen, was wiederum Zeichen von zunehmender Apoptose sind. Eher geschwollene Nuklei weisen hingegen auf nekrotische Vorgänge in den Zellen hin (Oncosis).

#### 4.1.6.2 Zellspezifische Veränderungen

##### 4.1.6.2.1 Photorezeptoren

Das Absinken der Signaldichte für die oberen Segmente der Stäbchen und inneren Segmente der Zapfen sowie das allmähliche Abrunden der Zapfensegmente ab dem vierten Kulturtag sind erste zelltypische Degenerationsanzeichen. In einem humanen Retinakulturmodell wurden bereits ab Tag 3 Veränderungen der Zapfen gezeigt, die ebenfalls eine rundliche Schwellung der IS beinhalten,

bis hin zu noch deutlicherer Schwellung und Verlust der Zapfen-IS an Tag 9 (Fernandez-Bueno et al. 2012). In einer weiteren Arbeit zeigten sich nach neun Tagen Verluste der Photorezeptor-OS und eine Verkürzung und Schwellung der IS. Die Zellkörper der Photorezeptoren zeigten weiterhin in der ONL rosettenähnliche Strukturen und eine Verschiebung ihrer Nuklei in die IS-Region (Di Lauro et al. 2016). In unserer Retinakultur lässt sich erst an Tag 12 eine Verschiebung der Stäbchen-OS in tiefere Schichten, nämlich in der ONL, zeigen. Ab dem 16. Kulturtag lässt sich eine weitere Verschlechterung der Retinazellintegrität feststellen, die durch das immer schwächer werdende Signal der Photorezeptoren und verminderte Abgrenzbarkeit gekennzeichnet wird. Wichtig für unsere weitere Arbeit war die Tatsache, dass die Zapfen bis Tag 20 und Stäbchen sogar bis Tag 26 der Kultur nachweisbar waren.

Die anhand des TUNEL-Assays visualisierten apoptotischen Zellkerne der Photorezeptoren waren bis zum 30. Kulturtag, auf die Gesamtzahl der Zellkerne gesehen, recht moderat und erfahren erst am letzten Kulturtag, Tag 35, einen deutlichen Peak. Daher scheint die Zelldegeneration der Photorezeptoren, bezogen auf apoptotische Vorgänge, bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht weit genug fortgeschritten zu sein, um eine Auswertung weiterer Daten für diesen Zelltyp zu beeinträchtigen.

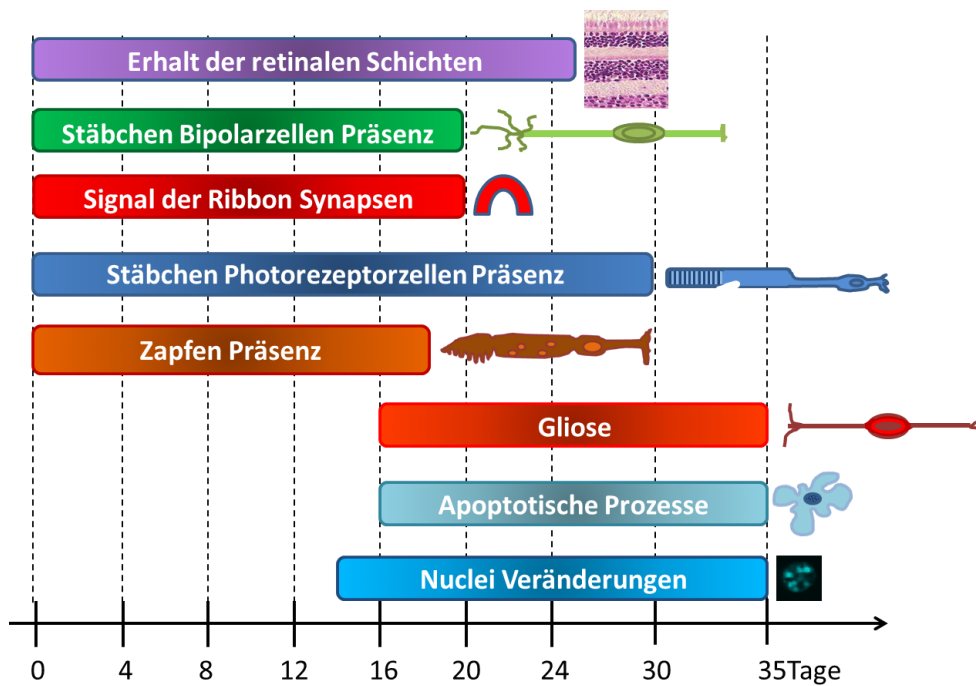
#### 4.1.6.2.2 Signalweiterleitende Zellen

Die Stäbchen-Bipolarzellen und ihre Ribbon-Synapsen ließen sich noch 20 Tage nach Isolierung der Neuroretina in den Explantaten visualisieren. Nach vier Tagen in Kultur zeigt sich ihre Morphologie durch die Kultur schon etwas verändert. Dieses Bild mit weniger komplex verästelten Axonen wiesen humane Retinaexplantate in einem ähnlichen Langzeitversuch auch bereits nach sechs Tagen in Kultur auf (Fernandez-Bueno et al. 2012). Dendritisches Sprouting wurde wie bei Müller et al. vereinzelt nach vier Tagen schon beobachtet, was darauf schließen lässt, dass erste Verbindungen zwischen den neuronalen Zellen hier schon unterbrochen waren (Müller et al. 2017). Die Reaktion der Stäbchenbipolarzellen fiel durch das Suchen neuer Verbindungen jedoch adäquat

aus und zeugt somit von der Vitalität der Zellen. Nach acht Tagen in Kultur gibt es in der Literatur bereits signifikant erniedrigte Zahlen von PKC $\alpha$ + Zellen (Wagner et al. 2020), während im hier dargestellten Versuch zu diesem Zeitpunkt lediglich das Signal für die Ribbon-Synapsen abgenommen zu haben scheint. Die Tatsache, dass das CTBP2-positive Signal an den darauffolgenden Tagen wieder vermehrt sichtbar wird, ist überraschend und könnte in der Unterschiedlichkeit der Gewebe oder Anomalien in der Immunfärbung in der Probe von Tag 8 begründet sein. Ab Tag 12 sehen wir eine kontinuierliche Abnahme der Stäbchenbipolarzellen und zunehmend Signalverschiebungen in andere Schichten, die zum einen Sprouting-Ereignisse darstellen, zum anderen auch teilweise degenerierte Zellbestandteile zeigen. Diese liegen dann in tieferen Schichten und haben keinen Kontakt mehr zu den morphologisch intakt scheinenden Bipolarzellen. Im humanen Langzeitversuch von Fernandez-Bueno et al. konnte gegen Ende ihrer Kultur, ergo nach neun Tagen, schon eine Retraktion der Axonterminalen und ektopische Synapsen in andere Schichten gefunden werden (Fernandez-Bueno et al. 2012).

#### 4.1.6.3 Zusammenfassung der Veränderungen im porzinen Gewebe in der Langzeitkultur

Um den für die weiteren Versuche wichtigen Langzeitversuch in übersichtlicher Form zusammenzufassen, sind in Abbildung 4-3 die wesentlichen Ereignisse der 35-tägigen porzinen Retinakultur dargestellt. Hier wird sofort ersichtlich, dass an Tag 14 der Kultur sowohl die untersuchten retinalen Zellen und die Morphologie der Schichten noch vollständig intakt waren, als auch degenerative Ereignisse wie Gliose, Apoptose und Veränderungen des Zellkerns noch nicht nennenswert begonnen haben. Die Photorezeptoren und signalweiterleitenden Bipolarzellen der Stäbchen in der Schweineretina sind darüber hinaus noch bis zum 18. Kulturtag vorhanden. Zudem starten gliotische Reaktionen und apoptotische Vorgänge erst so richtig nach 16 Tagen. Daher entschlossen wir uns, die Auswirkungen von hyperglykämischen Kulturbedingungen während einer 18-tägigen Kultur zu untersuchen.



**Abbildung 4-3: Zeitliche Darstellung der Ereignisse in Bezug auf den Erhalt des retinalen Gewebes während der Langzeitkultur.** Während die retinalen Schichten noch nach 26 Tagen erhalten waren, sind die Zapfen bis Tag 18 und die signalweiterleitenden Zellen bis Tag 20 in Kultur nachweisbar. Das Photorezeptorsignal der Stäbchen hingegen ist bis Tag 20 visualisierbar. Gliose und Apoptose zeigen sich nach 16 Tagen gehäuft und Veränderungen der Zellkerne sind nach 14 Tagen vermehrt zu finden.

## 4.2 Ausblick

Ein umfassendes Knowhow in Bezug auf die Techniken zur optimalen Kultivierung porziner Retinaexplantate kann dieses intermediäre Modell zu einem wichtigen Baustein in der Erforschung von Netzhauterkrankungen wie dem Diabetes mellitus machen. Erste Veränderungen im retinalen Gewebe und dessen Zellen durch die hyperglykämische Kultur konnten festgehalten werden. Einige Stellschrauben sind gefunden worden, um diese Ergebnisse in weiteren Versuchen zu überprüfen und auszuweiten. So scheint zum einen der Einsatz von serumfreiem Medium eine gute Alternative zu sein, um variable Beimengungen im Kulturmedium zu evakuieren (Café et al. 2001). Zum anderen könnte eine Co-Kultur mit dem RPE den Erhalt der Photorezeptoren fördern und daher möglicherweise eine bessere Betrachtung der Veränderungen durch modifizierte Kulturbedingungen möglich machen (Di Lauro et al. 2016). Mehrere Glukosekonzentrationen im Nährmedium sollten auf ihre Auswirkungen auf das retinale Gewebe hin überprüft werden. So

könnte beispielsweise die Konzentration für die Normoglykämie-Gruppe, die zwar den physiologischen Werten *in-vivo* entspricht, unter Kulturbedingungen bereits zu niedrig sein, um eine adäquate Versorgung der Zellen durch Diffusion zu gewährleisten. Weitere retinale Zellen wie Amakrinzellen oder Ganglienzellen könnten in Zukunft auf ihre Veränderungen als Reaktion auf vermehrte Glukose hin untersucht werden. Zudem sollten die Genexpressionsstudien sowohl auf zusätzliche Zeitpunkte als auch auf andere Schlüsselmoleküle, die bei der diabetischen Retinopathie eine Rolle spielen, ausgeweitet werden und durch proteomische Studien ergänzt werden. Die porzine Explantatkultur kann letztlich mit anderen Modellen, wie Zellkulturen und humanem Spendergewebe, dazu beitragen, bestmögliche wissenschaftliche Ergebnisse und eine gleichzeitige Reduzierung von Tierversuchen zu erreichen (Schnichels et al. 2021).

# Zusammenfassung

## 5 Zusammenfassung

Die diabetische Retinopathie als häufigste mikrovaskuläre Komplikation von Diabetes mellitus ist vor allem durch eine chronische Hyperglykämie charakterisiert. Häufiger Sehverlust bis hin zur vollständigen Erblindung stellen zunehmend eine große Belastung für unser Gesundheitssystem dar. Bis dato gibt es noch einen großen Bedarf an geeigneten experimentellen Modellsystemen zur weiteren Erforschung der zugrunde liegenden Pathomechanismen und guten Therapieoptionen. Die porzine Retinakultur stellt durch die Ähnlichkeit in Größe, Anatomie und physiologischen Charakteristika im Vergleich zum Menschen und die Fähigkeit von Explantatkulturen der isolierten Darstellung neuronaler Auswirkungen diabetischer Bedingungen ein starkes intermediäres Modellsystem zwischen den *in-vitro*-Zellkulturen und *in-vivo*-Tiermodellen dar. Es sollten in dieser Arbeit im Rahmen einer Grundlagenforschung verschiedene Kulturbedingungen und die dadurch resultierenden morphologischen Veränderungen und RNA-Expressionen bestimmter Moleküle im retinalen Gewebe untersucht werden. Hier spielten der Startzeitpunkt der Fixierung, die Anfertigung der Explantate, die Beschaffenheit des Kulturmediums und der Einfluss von erhöhten Glukosekonzentrationen im Medium eine Rolle. Die Untersuchungen ergaben, dass in einem Langzeitversuch über 35 Tage die untersuchten Photorezeptoren und signalweiterleitenden Bipolarzellen der Stäbchen in der Schweineretina bis zum 18. Kulturtag vorhanden waren. Zudem erlauben die noch intakte Morphologie der Schichten und erst beginnende degenerative Ereignisse wie Gliose, Apoptose und Veränderungen des Zellkerns eine gute Evaluierung der spezifischen Veränderungen bis zu diesem Zeitpunkt. Einige Schlüssel-moleküle wie GluT1 und VEGF sind unter erhöhten Glukosekonzentrationen an den meisten Erntezeitpunkten und der IR zu Beginn der Kultur hochreguliert. Im Hinblick auf die retinalen Zellen in immunhistochemischen Aufnahmen hält das Sprouting der Stäbchen-Bipolarzellen hier zwei Tage kürzer an als unter normoglykämischen Bedingungen, während die Ribbonsynapsen erst zwei Tage später eine Verschiebung in die ONL aufweisen. Rhodopsin und das Zapfen-Op-sin-Signal

konnten in der Hyperglykämie-Gruppe am letzten Kulturtag im Gegensatz zur Vergleichsgruppe nicht mehr sichtbar gemacht werden. Die Gliose setzte erstaunlicherweise vier Tage früher ein. Zudem konnten mehr Zellkerne insgesamt in der hyperglykämischen Gruppe gezählt werden, von denen sich jedoch auch zu den meisten Zeitpunkten mehr Zellkerne in Apoptose befanden. Unter Verwendung der porzinen Retinakultur können weitere Schlüssel-moleküle der Hyperglykämie-induzierten frühen Pathogenesemechanismen der Erkrankung auf morphologischem, genetischem und proteomischem Level untersucht werden und als zusätzliches Modellsystem zu einer Reduktion der Versuche an lebenden Tieren beitragen.

# Summary

## 6 Summary

**D**iabetic retinopathy as the most popular microvascular disorder complication of diabetes mellitus is characterized by chronic hyperglycemia in particular. Prevalent vision loss and complete blindness progressively burden our health system. However, there is still a definitive need for model systems to investigate pathogenic mechanisms and therapeutic options. The porcine retinal culture is a strong intermediate model between cell culture and animal testing due to similarities in size, anatomy and physiological features, compared to the human eye, and the ability of organotypic explants to isolate neuronal changes from diabetic circumstances. In this study, we enhance fundamental research by investigating morphological alterations and genomic changes of important molecules in retinal tissue cultivated under different conditions. In this regard, the starting point of fixation, the creation of retinal explants, the composition of the culture medium and the influence of increased glucose concentrations became important. We found that in a long period culture, photoreceptor and signal-transducing rod bipolar cells of the porcine retina were stable for 18 days. Also, intact morphology of retinal layers and beginning degenerating events like gliosis, apoptosis and nuclear changes allow a good evaluation of specific changes until that time. Some key molecules like GluT1 and VEGF were mostly upregulated and IR is higher expressed at early time points of hyperglycemic culture. With regard to the retinal cells in immunohistochemical pictures we see that sprouting of rod bipolar cells ended 2 days earlier compared to normoglycemic culture conditions, while ribbon synapses showed a translocation to the ONL for 2 more days. Rhodopsin and cone opsin could not be visualized at the last culture day, in contrast to the control group. Interestingly, gliosis of Müller cells started 4 days earlier and we counted higher amounts of nuclei in the hyperglycemic group, which showed more apoptotic events at the same time. With this method, further key molecules of the hyperglycemia induced early onset of the disease can be analyzed on the morphological, genetic and proteomic level and can contribute to reduce the experiments on living animals as a supplementing model system.

## 7 Anhang

### 7.1 Literaturverzeichnis

Abcouwer et al. (2014): Diabetic retinopathy: loss of neuroretinal adaptation to the diabetic metabolic environment. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1311, S. 174–190. DOI: 10.1111/nyas.12412.

Åkerström et al. (2017): The Role of Mitochondria, Oxidative Stress, and the Radical-binding Protein A1M in Cultured Porcine Retina. In: *Current eye research* 42 (6), S. 948–961. DOI: 10.1080/02713683.2016.1254247.

Antonetti et al. (2006): Diabetic retinopathy: seeing beyond glucose-induced microvascular disease. In: *Diabetes* 55 (9), S. 2401–2411. DOI: 10.2337/db05-1635.

Arden et al. (2012): The pathogenesis of early retinal changes of diabetic retinopathy. In: *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology* 124 (1), S. 15–26. DOI: 10.1007/s10633-011-9305-y.

Barber et al. (2011): The significance of vascular and neural apoptosis to the pathology of diabetic retinopathy. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 52 (2), S. 1156–1163. DOI: 10.1167/iovs.10-6293.

Bejarano-Escobar et al. (2017): Müller glia and phagocytosis of cell debris in retinal tissue. In: *Journal of anatomy* 231 (4), S. 471–483. DOI: 10.1111/joa.12653.

Bell 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.

Bellinger et al. (2006): Swine Models of Type 2 Diabetes Mellitus: Insulin Resistance, Glucose Tolerance, and Cardiovascular Complications.

Bringmann et al. (2006): Müller cells in the healthy and diseased retina. In: *Progress in retinal and eye research* 25 (4), S. 397–424. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2006.05.003.

Buzzard et al. (2012): Evaluation of blood parameters as an early assessment of health status in nursery pigs.

Café et al. (2001): Mouse retina explants after long-term culture in serum free medium.

Carreras et al. (2015): Expression of glucose transporters in the prelaminar region of the optic-nerve head of the pig as determined by immunolabeling and tissue culture. In: *PloS one* 10 (6), e0128516. DOI: 10.1371/journal.pone.0128516.

Chandler et al. (1999): Photoreceptor density of the domestic pig retina.

Coughlin et al. (2017): Müller cells and diabetic retinopathy. In: *Vision research* 139, S. 93–100. DOI: 10.1016/j.visres.2017.03.013.

Cuenca et al. (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.

Di Lauro et al. (2016): A novel coculture model of porcine central neuroretina explants and retinal pigment epithelium cells.

Ding, et al. (2012): Current epidemiology of diabetic retinopathy and diabetic macular edema. In: *Current diabetes reports* 12 (4), S. 346–354. DOI: 10.1007/s11892-012-0283-6.

Feenstra et al. (2013): Modes of Retinal Cell Death in Diabetic Retinopathy. In: *Journal of clinical & experimental ophthalmology* 4 (5), S. 298. DOI: 10.4172/2155-9570.1000298.

Fernandes et al. (2011): Reactive oxygen species downregulate glucose transport system in retinal endothelial cells. In: *American journal of physiology. Cell physiology* 300 (4), C927-36. DOI: 10.1152/ajpcell.00140.2010.

Fernandez-Bueno et al. (2008): Müller and macrophage-like cell interactions in an organotypic\_Fernandez-Bueno\_2008.

Fernandez-Bueno et al. (2012): Time course modifications in organotypic culture of human neuroretina. In: *Experimental eye research* 104, S. 26–38. DOI: 10.1016/j.exer.2012.08.012.

Fernández-Sánchez et al. (2015): Astrocytes and Müller Cell Alterations During Retinal Degeneration in a Transgenic Rat Model of Retinitis Pigmentosa. In: *Frontiers in cellular neuroscience* 9, S. 484. DOI: 10.3389/fncel.2015.00484.

Funatsu et al. (2002): Prediction of macular edema exacerbation after phacoemulsification in patients with nonproliferative diabetic retinopathy.

Gong et al. (2017): Differentially Expressed MicroRNAs in the Development of Early Diabetic Retinopathy. In: *Journal of diabetes research* 2017, S. 4727942. DOI: 10.1155/2017/4727942.

Guduric-Fuchs et al. (2009): Immunohistochemical study of the pig retinal development.

Hammes et al. (2018): Diabetic retinopathy: hyperglycaemia, oxidative stress and beyond. In: *Diabetologia* 61 (1), S. 29–38. DOI: 10.1007/s00125-017-4435-8.

Hamon et al. (2016): Müller glial cell-dependent regeneration of the neural retina: An overview across vertebrate model systems. In: *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 245 (7), S. 727–738. DOI: 10.1002/dvdy.24375.

Heintz et al. (2010): Prevalence and healthcare costs of diabetic retinopathy: a population-based register study in Sweden. In: *Diabetologia* 53 (10), S. 2147–2154. DOI: 10.1007/s00125-010-1836-3.

Heng et al. (2013): Diabetic retinopathy: pathogenesis, clinical grading, management and future developments. In: *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 30 (6), S. 640–650. DOI: 10.1111/dme.12089.

- Hurley et al. (2021): Retina Metabolism and Metabolism in the Pigmented Epithelium: A Busy Intersection. In: *Annual review of vision science* 7, S. 665–692. DOI: 10.1146/annurev-vision-100419-115156.
- Hurst et al. (2017): A Novel Porcine Ex Vivo Retina Culture Model for Oxidative Stress Induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- Jones et al. (2022): Autonomous regulation of retinal insulin biosynthesis in diabetes. In: *Neuropeptides* 94, S. 102258. DOI: 10.1016/j.npep.2022.102258.
- Jonsson et al. (2016): Vascular Changes and Neurodegeneration in the Early Stages of Diabetic Retinopathy: Which Comes First? In: *Ophthalmic research* 56 (1), S. 1–9. DOI: 10.1159/000444498.
- Joseph et al. (2022): Beyond Genetics: The Role of Metabolism in Photoreceptor Survival, Development and Repair. In: *Frontiers in cell and developmental biology* 10, S. 887764. DOI: 10.3389/fcell.2022.887764.
- Joyal et al. (2018): Retinal energy demands control vascular supply of the retina in development and disease: The role of neuronal lipid and glucose metabolism. In: *Progress in retinal and eye research* 64, S. 131–156. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2017.11.002.
- Kharroubi et al. (2015): Diabetes mellitus: The epidemic of the century. In: *World journal of diabetes* 6 (6), S. 850–867. DOI: 10.4239/wjd.v6.i6.850.
- Kleinwort et al. (2017): Retinopathy with central oedema in an INS C94Y transgenic pig model of long-term diabetes. In: *Diabetologia* 60 (8), S. 1541–1549. DOI: 10.1007/s00125-017-4290-7.
- Klettner, Alexa; Recber, Muhammed; Roeder, Johann (2014): Comparison of the efficacy of aflibercept, ranibizumab, and bevacizumab in an RPE/choroid organ culture. In: *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 252 (10), S. 1593–1598. DOI: 10.1007/s00417-014-2719-y.
- Kondo et al. (2004): Altered insulin signaling in retinal tissue in diabetic states. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (36), S. 37997–38006. DOI: 10.1074/jbc.M401339200.
- Koopmans et al. (2005): Diurnal rhythms in plasma cortisol, insulin, glucose, lactate and urea in pigs fed identical meals at 12-hourly intervals. In: *Physiology & behavior* 84 (3), S. 497–503. DOI: 10.1016/j.physbeh.2005.01.017.
- Kostic et al. (2016): Animal modelling for inherited central vision loss. In: *The Journal of pathology* 238 (2), S. 300–310. DOI: 10.1002/path.4641.
- Kuehn et al. (2017): Degenerative effects of cobalt-chloride treatment on neurons and microglia in a porcine retina organ culture model. In: *Experimental eye research* 155, S. 107–120. DOI: 10.1016/j.exer.2017.01.003.
- Lai et al. (2013): Animal models of diabetic retinopathy: summary and comparison. In: *Journal of diabetes research* 2013, S. 106594. DOI: 10.1155/2013/106594.
- Layton et al. (2006): The effect of insulin and glucose levels on retinal glial cell activation and pigment epithelium-derived fibroblast growth factor-2.

Liu et al. (2016): Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR analysis of retinal pigment epithelium cells under hypoxia and/or hyperglycemia. In: *Gene* 580 (1), S. 41–46. DOI: 10.1016/j.gene.2016.01.001.

Maliha 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.

Martinez-Gil et al. (2022): Cellular and molecular alterations in neurons and glial cells in inherited retinal degeneration. In: *Frontiers in neuroanatomy* 16, S. 984052. DOI: 10.3389/fnana.2022.984052.

Masland et al. (2012): The neuronal organization of the retina. In: *Neuron* 76 (2), S. 266–280. DOI: 10.1016/j.neuron.2012.10.002.

Matteucci et al. (2015): Primary retinal cultures as a tool for modeling diabetic retinopathy: an overview. In: *BioMed research international* 2015, S. 364924. DOI: 10.1155/2015/364924.

Mohlin et al. (2014): Autophagy and ER-stress contribute to photoreceptor degeneration in cultured adult porcine retina. In: *Brain research* 1585, S. 167–183. DOI: 10.1016/j.brainres.2014.08.055.

Mu et al. (2009): Effect of high glucose concentration on VEGF and PEDF expression in cultured retinal Müller cells. In: *Molecular biology reports* 36 (8), S. 2147–2151. DOI: 10.1007/s11033-008-9428-8.

Mueller-Buehl et al. (2021): Hypoxic Processes Induce Complement Activation via Classical Pathway in Porcine Neuroretinas. In: *Cells* 10 (12). DOI: 10.3390/cells10123575.

Müller et al. (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.

Ola et al. (2011): Influence of insulin on glutamine synthetase in the Müller glial cells of retina. In: *Metabolic brain disease* 26 (3), S. 195–202. DOI: 10.1007/s11011-011-9245-y.

Olholm Larsen et al. (2002): High-Fat High-Energy Feeding Impairs Fasting Glucose and Increases Fasting Insulin Levels in the Göttingen Minipig.

Olivares et al. (2017): Animal Models of Diabetic Retinopathy. In: *Current diabetes reports* 17 (10), S. 93. DOI: 10.1007/s11892-017-0913-0.

Rajala et al. (2008): Loss of neuroprotective survival signal in mice lacking insulin receptor gene in rod photoreceptor cells. In: *The Journal of biological chemistry* 283 (28), S. 19781–19792. DOI: 10.1074/jbc.M802374200.

Rajala et al. (2013): Insulin receptor signaling in cones. In: *The Journal of biological chemistry* 288 (27), S. 19503–19515. DOI: 10.1074/jbc.M113.469064.

Ren et al. (2022): Diabetic retinopathy: Involved cells, biomarkers, and treatments. In: *Frontiers in pharmacology* 13, S. 953691. DOI: 10.3389/fphar.2022.953691.

Rettinger et al. (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.

Rhee et al. (2013): Insulin concentration is critical in culturing human neural stem cells and neurons. In: *Cell death & disease* 4, e766. DOI: 10.1038/cddis.2013.295.

Robinson et al. (2012): Update on animal models of diabetic retinopathy: from molecular approaches to mice and higher mammals. In: *Disease models & mechanisms* 5 (4), S. 444–456. DOI: 10.1242/dmm.009597.

Ruether et al. (2010): PKCalpha Is Essential for the Proper Activation and Termination of Rod Bipolar Cell Response.

Sagmeister et al. (2021): High glucose treatment promotes extracellular matrix proteome remodeling in Müller glial cells. In: *PeerJ* 9, e11316. DOI: 10.7717/peerj.11316.

Sánchez-Chávez et al. (2012): Insulin stimulated-glucose transporter Glut 4 is expressed in the retina. In: *PloS one* 7 (12), e52959. DOI: 10.1371/journal.pone.0052959.

Schnichels 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 et al. (2021): Retina in a dish: Cell cultures, retinal explants and animal models for common diseases of the retina. In: *Progress in retinal and eye research* 81, S. 100880. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2020.100880.

Sheng et al. (2013): In vitro effects of insulin and RPE on choroidal and scleral components of eye growth in chicks. In: *Experimental eye research* 116, S. 439–448. DOI: 10.1016/j.exer.2013.08.005.

Slijkerman et al. (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.

Stitt et al. (2013): Advances in our understanding of diabetic retinopathy. In: *Clinical science (London, England : 1979)* 125 (1), S. 1–17. DOI: 10.1042/CS20120588.

Stitt et al. (2016): The progress in understanding and treatment of diabetic retinopathy. In: *Progress in retinal and eye research* 51, S. 156–186. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2015.08.001.

Svare et al. (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.

Swarup et al. (2019): Modulating GLUT1 expression in retinal pigment epithelium decreases glucose levels in the retina: impact on photoreceptors and Müller glial cells. In: *American journal of physiology. Cell physiology* 316 (1), C121-C133. DOI: 10.1152/ajpcell.00410.2018.

Tamiya, Shigeo; Liu, LanHsin; Kaplan, Henry J. (2010): Epithelial-mesenchymal transition and proliferation of retinal pigment epithelial cells initiated upon loss of cell-cell contact. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 51 (5), S. 2755–2763. DOI: 10.1167/iovs.09-4725.

Taylor et al. (2014): Feet on the Ground: Physical Support of the Inner Retina Is a Strong Determinant for Cell Survival and Structural Preservation In Vitro.

Tomlinson et al. (2008): Glucose neurotoxicity. In: *Nature reviews. Neuroscience* 9 (1), S. 36–45. DOI: 10.1038/nrn2294.

Tonade et al. (2021): Photoreceptor cells and RPE contribute to the development of diabetic retinopathy. In: *Progress in retinal and eye research* 83, S. 100919. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2020.100919.

Valdés et al. (2016): Organotypic retinal explant cultures as in vitro alternative for diabetic retinopathy studies. In: *ALTEX* 33 (4), S. 459–464. DOI: 10.14573/altex.1603111.

Wagner 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.

Wagner et al. (2022): Impact of Primary RPE Cells in a Porcine Organotypic Co-Cultivation Model. In: *Biomolecules* 12 (7). DOI: 10.3390/biom12070990.

Wang et al. (2011): Organotypic culture of full-thickness adult porcine retina. In: *Journal of visualized experiments : JoVE* (49). DOI: 10.3791/2655.

Wang et al. (2020): Updates on Gene Therapy for Diabetic Retinopathy. In: *Current diabetes reports* 20 (7), S. 22. DOI: 10.1007/s11892-020-01308-w.

Wässle et al. (2009): Cone contacts, mosaics, and territories of bipolar cells in the mouse retina. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29 (1), S. 106–117. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4442-08.2009.

WHO (2016): Global report on diabetes.

WHO (2019): Classification of diabetes mellitus 2019.

Wilcox et al. (2005): May CBR 040505.indd.

Wolf et al. (2022): Protocol to quantify enzymatic effects on vitreous liquefaction in porcine eyes using a transwell-plate system. In: *STAR protocols* 3 (4), S. 101754. DOI: 10.1016/j.xpro.2022.101754.

Yau et al. (2012): Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. In: *Diabetes care* 35 (3), S. 556–564. DOI: 10.2337/dc11-1909.

Zheng et al. (2012): The worldwide epidemic of diabetic retinopathy. In: *Indian journal of ophthalmology* 60 (5), S. 428–431. DOI: 10.4103/0301-4738.100542.

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1-1:</b> Das Auge eines Schweins, links makroskopisch, mittig schematisch mit anatomischen Begrifflichkeiten in der Frontalansicht (A) und im Vertikalschnitt (B) und rechts der Augenhintergrund mit dem Discus nervi optici und den retinalen Gefäßen. Modifiziert nach Wolf et al. (Wolf et al. 2022), Nickel Band 4 Nerven und Sinne.....	8
<b>Abbildung 1-2:</b> Verschiedene Schichten und Zelltypen in der Retina (links), mittig retinale Schichten in der HE Färbung, rechts Stäbchen und Zapfen mit der Unterteilung ihrer Segmente, modifiziert nach Hanna, David et al.jpg (Joseph et al. 2022).....	10
<b>Abbildung 1-3: A:</b> Nicht proliferative DR (NPDR) mit Makulaödem und <b>B:</b> Proliferative DR (PDR) mit Neovaskularisation, Hämorrhagien (Pfeil), Fibrose (Pfeilspitzen), modifiziert nach Stitt, Lois et al (2).jpg (Stitt et al. 2013).....	21
<b>Abbildung 1-4:</b> Schaubild der Pathomechanismen und Signalwege, die zur DR und letztlich zum Sehverlust führen und die klinischen Symptome, modifiziert nach Robinson, Barathi et al.jpg (Robinson et al. 2012). .....	22
<b>Abbildung 1-5: Organotypische Retinakultur als intermediäres Modell zwischen der in-vitro-Zellkultur und in-vivo-Tiermodellen.</b> Das Netzhaut-Explantat wird auf einer permeablen Membran in einem speziellen Medium in Kultur gehalten.....	25
<b>Abbildung 2-1: 1-8. Ablauf der Präparation der porzinen Netzhäute.</b> Schrittweises Vorgehen der der Präparation der retinalen Explantate mit Freipräparieren, Eröffnung des Augenbechers und Isolierung des hinteren Augenbechers, gefolgt von Einschneiden in Kleeblattstruktur, Freilegen der Retina, Anfertigen der Explantate mittels Trepanstanze und Überführung auf Polykarbonatmembran-Inserts. ....	44
<b>Abbildung 2-2: Entnahmebereiche für porzine retinale Explantate auf dem hinteren porzinen Augenbecher und schematische Darstellung der in-vitro-Retina-Kultur.</b> A: Hinterer Augenbecher vom adulten Hausschwein. Retinale Explantate von der zapfenreichen area centralis und peripheren Bereichen mit einem Durchmesser von 9,5 mm. B: Schematischer Aufbau der in-vitro-Kultur mit Nährmedium gefüllten Well und Insert mit semipermeabler Polykarbonatmembran (Durchmesser 0,4 µm).....	45
<b>Abbildung 2-3: Zeitachse zur Darstellung der Vorversuche zur in-vitro-Retina-Kultur.</b> Die zeitliche Übersicht der jeweiligen Versuche zeigt die Dauer der Vorversuche mit Fragestellungen bezüglich der Temperatur während des Transportes (hier wurden die retinalen Gewebe drei Tage in Kultur gehalten) und der Größe der Explantate (Kulturdauer 12 Tage). Die Pfeile zeigen den jeweiligen Zeitpunkt der Fixierung für den Vorversuch zu Explantat-Veränderungen aufgrund der Transportdauer. ....	46
<b>Abbildung 2-4: Zeitachse zur Darstellung der in-vitro-Retina-Kultur.</b> Die zeitliche Übersicht der jeweiligen Versuche zeigt die Dauer des Langzeitkulturversuchs der porzinen Retina-Explantate bis Tag 35 und die Kultivierung der normo- und hyperglykämischen Schweinenetzhäute bis Tag 18. ....	47
<b>Abbildung 2-5: Anfertigen der retinalen Gewebsschnitte im Anschluss an die in-vitro-Kultur mittels Kryotom.</b> Die Abbildung zeigt einen Gewebeblock mit eingebetteter Retina, der mittels Kryotom in 10 µm dicke Scheiben geschnitten wird.....	49
<b>Abbildung 2-6: Aufbau der HE-Färbung.</b> Gezeigt werden die Gefäße mit den für die HE-Färbung benötigten Reagenzien in der Reihenfolge des verwendeten Färbeprotokolls. ....	50
<b>Abbildung 3-1: Auswirkungen der Transporttemperatur auf die Gewebequalität. HE.</b> Im Bereich der porzinen retinalen area centralis erscheinen die nukleären Schichten kompakter in der 8 °C Gruppe (insbesondere nach 72 Stunden in Kultur). Maßstab 100 µm.....	66
<b>Abbildung 3-2: Auswirkungen der Transporttemperatur auf die retinalen Gliazellen. Immunfluoreszenz.</b> Die mit GFAP in Grün markierten Müllerzellen und Astrozyten (Müllerzellen sind	

ebenfalls mit GS in Rot sichtbar gemacht) zeigen keine deutlichen Unterschiede ihrer Gliazell-Aktivität bei unterschiedlichen Transporttemperaturen. Maßstab 100 µm. ....	67
<b>Abbildung 3-3: Auswirkungen der Transporttemperatur auf die retinalen Stäbchenbipolarzellen. Immunfluoreszenz.</b> Die Stäbchenbipolarzellen (PKC $\alpha$ , grün) erscheinen in der 8 °C Gruppe nach 24 und 72 Stunden besser erhalten. Die mit CtBP2 markierten Synapsen zwischen Photorezeptoren und Bipolarzellen (rot) sind hingegen bei den Präparaten deutlicher sichtbar, die bei Raumtemperatur transportiert wurden. Maßstab 100 µm. ....	67
<b>Abbildung 3-4: Lineare Quantifizierung der Zellkerne in ONL und INL bei verschiedenen Transporttemperaturen.</b> Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte (n=2) und die zugehörigen SD. Außer nach 24 Stunden in Kultur unterscheiden sich die retinalen Gewebe im Hinblick auf die Zellkernanzahl nur wenig. N.s. (t-test). .	68
<b>Abbildung 3-5: Auswirkungen der Transportzeit auf die Beschaffenheit der retinalen Schichten. HE.</b> Die retinalen Schichten lassen sich bei beiden Gewebeschnitten gut darstellen. Maßstab 100µm. ...	70
<b>Abbildung 3-6: Auswirkungen der Transportzeit auf die verschiedenen retinalen Zellen. Immunfluoreszenz.</b> Die Gliose ist gleich stark ausgeprägt (Gliazellen in Grün, GFAP und Rot, GS) und der Erhalt der Stäbchenbipolarzellen (grün, PKC $\alpha$ ) ist vergleichbar. Maßstab 100µm.....	70
<b>Abbildung 3-7: Zellkernanzahl bei Fixierung des retinalen Gewebes direkt nach der E nukleation und nach dem Transport zum Labor.</b> Im Hinblick auf die ONL lassen sich bei Fixierung der Explantate im Schlachthaus etwas mehr Zellkerne zählen. Die Anzahl an Nuklei in der INL unterscheidet sich hingegen kaum. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte (n=2) und die zugehörigen SD. N.s. (t-test). ....	68
<b>Abbildung 3-8: Auswirkungen der Explantat-Lokalisation auf die Gewebedicke. HE.</b> In peripheren Bereichen der Netzhaut ist die Dicke der Retina, gemessen in der Vertikalen durch den Gewebeschnitt, herabgesetzt. Maßstab 100µm. ....	69
<b>Abbildung 3-9: Auswirkungen der Explantat-Lokalisation auf die Dicke der Retina.</b> Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte (n=2), die zugehörigen SD und die lineare Regression. Im Bereich der porzinen area centralis wies das retinale Gewebe zu allen Zeitpunkten in Kultur eine höhere Dicke auf als in peripheren Netzhautbereichen mit einer durchschnittlichen Differenz von 22 µm. * p<0,05 (t-test).....	70
<b>Abbildung 3-10: Auswirkungen der Explantat-Lokalisation auf die Zellkernanzahl.</b> Dargestellt sind für die ONL und INL jeweils die entsprechenden Mittelwerte (n=2), die zugehörigen SD und die lineare Regression. Im Bereich der porzinen area centralis ließ sich in der ONL und in der INL (bis auf Tag 6) eine höhere Zahl an Zellkernen erkennen. **p<0,01 (t-test). ....	71
<b>Abbildung 3-11: Auswirkungen der Explantat-Größe auf die retinalen Schichten. HE.</b> Über die Kulturdauer von acht Tagen lässt sich in der HE-Färbung kein großer qualitativer Unterschied zwischen den beiden Explantat-Größen im Hinblick auf die Erhaltung des retinalen Gewebes und der Abgrenzbarkeit der verschiedenen Schichten darstellen. Maßstab 100µm.....	72
<b>Abbildung 3-12: Auswirkungen der Explantat-Größe auf die Zellkernanzahl.</b> Im Hinblick auf die im retinalen Gewebe erhaltenen Zellkerne, die ein Indikator für den Erhalt der Zellen sein können, lässt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden verschiedenen Explantat-Größen von 6 und 9,5 mm nur an Tag 0 und 6 der Kultur feststellen. Zu diesen Zeitpunkten ist die Anzahl der Zellkerne in der ONL und INL im 6 mm großen Explantat signifikant höher. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte (n=2), die zugehörigen SD und die lineare Regression. * p<0,05, **p<0,01 (t-test). ....	73
<b>Abbildung 3-13: Anfärbung der porzinen retinalen Zellen mit verschiedenen Primärantikörpern. Immunfluoreszenz.</b> Calbindin markiert Horizontalzellen (rot), GS die Müllerzellen (grün). Die kompletten Strukturen der Photorezeptoren können mit Recoverin dargestellt werden (rot), während die Ribbon-Synapsen mit anti-CTBP2 markiert werden (x5 Vergrößerung, Pfeil, grün). Die L- und M-Zapfen werden mit dem anti-LM-Opsin Antikörper angefärbt (x5 Vergrößerung, Pfeil, hellblau), die oberen Segmente der Stäbchen mit anti-Rhodopsin (grün) und Gliazellen mittels anti-GFAP in Rot. PNA488 markiert obere Segmente der Zapfen (grün). Maßstab 100 µm. ....	75
<b>Abbildung 3-14: Unterschiedliche Färbeergebnisse mit dem Zapfen-Marker PNA 488. Immunfluoreszenz.</b> PNA markierte in der porzinen Retina an den verschiedenen Kulturtagen	

verschiedene retinale Strukturen in unterschiedlichen Schichten. Die Pfeile zeigen die jeweils stärkste Anfärbung des Zapfen-Markers. Maßstab 100  $\mu\text{m}$ . ..... 75

**Abbildung 3-15: Histomorphologische Untersuchung der retinalen porzinen Explantate in Langzeitkultur. HE.** Das Tag-0-Präparat als Kontrollgewebe weist nur leichte Zeichen der Degeneration in den OS auf (schwarze Pfeile). In den darauffolgenden Tagen sind die NFL und ILM abgelöst und die Photorezeptorsegmente verkürzt sowie zunehmend degenerativ verändert. An Kulturtag 30 und 35 ist der typische retinale Schichtaufbau in der HE-Färbung nicht mehr zu erkennen (Pfeilspitzen). Maßstab 100  $\mu\text{m}$ . ..... 78

**Abbildung 3-16: Zellkernanzahl in ONL und INL im Verlauf der Langzeitkultur.** Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte ( $n=3$ ), die zugehörigen SD und die lineare Regression. Die Zellkernzahlen von ONL und INL laufen nahezu parallel. Nach einem initial steilen Absinken der Zellkerne ist an Tag 12 ein Anstieg erkennbar, wonach die Werte bis zum Tag 20 in Kultur linear absinken, an Tag 22 und 26 einen erneuten Peak aufweisen und nach 30 Tagen der *in-vitro*-Kultur ihren niedrigsten Wert erreichen.  $r^2$  (ONL) 0,8089,  $r^2$  (INL) 0,4619. .... 79

**Abbildung 3-17: Stäbchen- und L-M-Zapfen-Segmente der porzinen Retina in der Langzeitkultur. Immunfluoreszenz.** Das Kontrollgewebe weist getrennt voneinander liegende Schichten von intakten oberen und inneren Segmenten der beiden Photorezeptortypen auf (Abbildung 3-17, Tag 0, Rhodopsin, Pfeilspitze und LM-Opsin, Pfeil). In den kommenden Tagen sinkt die Anzahl an Stäbchen- und Zapfensegmenten deutlich, die sich teilweise nun auf einer horizontalen Ebene befinden, bis nur noch am Kulturtag 18 vereinzelte positive Zapfensignale zu finden sind (Abbildung 3-17, Tag 18, Pfeil). Nach 26 Tagen ist das rhodopsinpositive Signal auch im Bereich der OPL sichtbar (Abbildung 3-17, Tag 26, Pfeilspitze) und ist zu den letzten beiden Erntetagen beinahe gänzlich verschwunden. Maßstab 100 $\mu\text{m}$ . 81

**Abbildung 3-18: Stäbchenbipolarzellen und Ribbon-Synapsen der porzinen Retina in der Langzeitkultur. Immunfluoreszenz.** Neurone (grün) und Ribbons (rot) sind im Kontrollgewebe gut zu erkennen und weisen eine intakte Morphologie auf (Abbildung 3-18, Tag 0, Pfeil und Pfeilspitze). Ab dem vierten Tag in Kultur zeigen sich PKC-alpha-positive Zellfortsätze und Ribbon-Synapsen in der ONL (Abbildung 3-18, Tag 4, Pfeil und Pfeilspitze). Bis hin zu Tag 20 sind die Stäbchenbipolarzellen mit zeitlich abnehmendem Signal detektierbar und auch CtBP2-positives Signal ist zu erkennen. Zu späteren Zeitpunkten sind diese Strukturen nicht mehr auffindbar, oder nur noch einzelne Spuren davon (Abbildung 3-18, Tag 35, Pfeilspitze). Maßstab 100 $\mu\text{m}$ . ..... 83

**Abbildung 3-19: Gliazellen der porzinen Retina in der Langzeitkultur. Immunfluoreszenz.** Im Kontrollgewebe sind ausschließlich Müllerzellen (Abbildung 3-19, Tag 0, GS, Pfeil) in der GCL und NFL zu finden. Im Verlaufe der *in-vitro*-Kultur breitet sich das GFAP-Signal, welches Astrozyten und Müllerzellen zeigt, von unteren Schichten in höher gelegene Areale immer weiter aus. An Tag 8 sieht man die länglichen Zellfortsätze (Abbildung 3-19, Tag 8, Pfeilspitze), die von Tag 14 bis 26 auch bis in die PRS reichen (Abbildung 3-19, Tag 18, Pfeilspitze). Am Kulturtag 30 beschränkt sich das GFAP-positive Signal auf die Schichten unterhalb der OPL (Abbildung 3-19, Tag 30, Pfeilspitze) und ist nach 35 Tagen in Kultur bis auf wenige Reste (Abbildung 3-19, Tag 35, Pfeilspitze) verschwunden. Maßstab 100  $\mu\text{m}$ . ..... 85

**Abbildung 3-20: Apoptotische Zellkerne der porzinen Retina in der Langzeitkultur. Immunfluoreszenz.** Das Kontrollgewebe weist nahezu keine TUNEL-positiven Zellkerne auf. Nach vier Tagen Retinakultur lassen sich erste apoptotische Kerne in der ONL erkennen. Die Anzahl steigt in den darauffolgenden Kulturtagen stetig an, bis nach 30 und 35 Tagen in Kultur nahezu alle Zellkerne ein positives TUNEL Signal aufweisen. Maßstab 100  $\mu\text{m}$ . ..... 86

**Abbildung 3-21: Graphische Darstellung der TUNEL-positiven Zellkerne in der ONL und INL im Verlaufe der Langzeitkultur (in Relation zur Gesamtzahl an Zellkernen), die entsprechenden SD und die lineare Regression.** Der Anstieg von apoptotischen Zellkernen stellt sich für ONL und INL unterschiedlich dar und reicht von initial 6 (ONL) und 1,5 (INL) Kernen bis 29,5 (ONL) und 8 Nuklei (INL).  $n=2$  Explantate.  $r^2$  (ONL) 0,7104,  $r^2$  (INL) 0,7883. .... 86

**Abbildung 3-22: Glukosekonzentrationen im Nährmedium über die Kulturdauer.** Dargestellt ist der Glukosegehalt in mg/dl im Kulturmedium als Mittelwert ( $n=3$ ) mit den zugehörigen SD, gemessen jeweils vor dem Mediumwechsel. Während der 16-tägigen Kulturdauer lag die Konzentration für die hyperglykämisch ernährten Netzhäute in

einem Bereich von 380 bis 450 mg/dl Glukose, mit Ausnahme des nach 24 Stunden in Kultur gemessenen Wertes von 322 mg Glukose pro Deziliter. Die Werte unter Normoglykämie sanken im Mittel während der ersten acht Tage in Kultur nicht unter 70 mg/dl und fielen nach 12 Tagen auf ein Minimum von 55 mg/dl während nach 16 Tagen 60 mg/dl Glukose gemessen wurden. Der Glukoseverbrauch der retinalen Zellen in Form von Schwankungen in den gemessenen Glukosekonzentrationen nimmt über die Zeit ab..... 90

**Abbildung 3-23: Insulinkonzentrationen im Nährmedium über die Kulturdauer.** Dargestellt ist der mittels ELISA errechnete Gehalt an Insulin im Kulturmedium als Mittelwert (n=3) mit den zugehörigen SD. Im sechstägigen Messintervall stiegen die Konzentrationen an Insulin nach dem Mediumwechsel durchschnittlich um 345 pmol bei der Hyperglykämie-Gruppe und im Mittel um 210 pmol/l bei den unter Normoglykämie kultivierten Retinas. An den ersten vier Tagen unterschieden sich die Werte zwischen den beiden Gruppen nur geringfügig. Ab dem vierten Tag in Kultur lagen die Werte durchschnittlich um 313 pmol/l höher bei den Netzhäuten, die in dem Medium mit erhöhter Glukosekonzentration kultiviert wurden. .... 91

**Abbildung 3-24: Vergleich der Zellkernanzahl in ONL und INL über die Kulturdauer in unterschiedlichen Glukosekonzentrationen.** Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte (n=3), die zugehörigen SD und die lineare Regression. Die mit DAPI gefärbten Zellkerne von ONL und INL wurden manuell in einem Bereich von 150 µm Länge und einer Dicke von 10 µm bestehend aus zehn übereinandergelegten Einzelaufnahmen gezählt. Außer an Tag 2 und 8 war die Anzahl an Nuklei in der ONL höher unter hyperglykämischen Bedingungen. Die Kerne der INL waren unter Hyperglykämie zu allen Zeitpunkten der Retinakultur zahlreicher. Die Schwankungen der Zellkernanzahl über die Zeit ähnelten sich zwischen den beiden Gruppen mit unterschiedlicher Glukosekonzentration. Lineare Regression ONL:  $r^2=0,1004$  (Hyperglykämie),  $0,5656$  (Normoglykämie) und INL:  $r^2=0,7348$  (Hyperglykämie),  $0,3748$  (Normoglykämie). \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$  (t-test)..... 93

**Abbildung 3-25: Apoptotische Zellkerne der porzinen Retina über die Kulturdauer in unterschiedlichen Glukosekonzentrationen. TUNEL.** Unter hyperglykämischen Bedingungen sind beispielsweise an Tag 8 und 12 mehr TUNEL-positive Zellkerne im Bereich der ONL zu finden. Maßstab 100 µm. .. 94

**Abbildung 3-26: Graphische Darstellung der TUNEL-positiven Zellkerne in der ONL und INL über die Kulturdauer in unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (in Relation zur Gesamtzahl an Zellkernen).** Aufgeführt sind die jeweiligen Mittelwerte, die entsprechenden SD und die lineare Regression. In der ONL liegt die Prozentzahl an apoptotischen Zellkernen mit Ausnahme von Tag 4 höher unter Hyperglykämie. Im Gegensatz dazu sind in der INL unter normoglykämischen Bedingungen mehr TUNEL-positive Zellkerne vorhanden, mit Ausnahme von Tag 12. Im Verlauf der Kulturdauer steigt die Zahl an apoptotischen Zellkernen in Relation zur Gesamtzellkernzahl nicht wesentlich an. n=3 Explantate. N.s. (t-test). .... 95

**Abbildung 3-27: Stäbchen- und L-M-Zapfen-Segmente der porzinen Retina über die Kulturdauer in unterschiedlichen Glukosekonzentrationen. Immunfluoreszenz.** Rhodopsin- (rot) und LM-Opsin-Signal (grün) zeigen die Morphologie der Stäbchen- und Zapfen-Protorezeptoren. Es konnten Unterschiede in der Morphologie beider Rezeptortypen zu den unterschiedlichen Kulturzeitpunkten dargestellt werden, die keine Präferenz für eine bestimmte Glukosekonzentration aufwiesen. Maßstab 100µm. .... 97

**Abbildung 3-28: Stäbchenbipolarzellen und Ribbon-Synapsen der porzinen Retina über die Kulturdauer in unterschiedlichen Glukosekonzentrationen. Immunfluoreszenz.** Die Morphologie der Stäbchenbipolarzellen (PKCa, grün) von der OPL bis zur IPL war in beiden Gruppen der Explantate, die mit verschiedenen Glukosekonzentrationen kultiviert wurden, vergleichbar. Sprouting-Ereignisse fanden ab Tag 10 bis Tag 14 in der Hyperglykämie-Gruppe und bis Tag 16 unter Normoglykämie statt. Die Ribbon-Synapsen (CtBP2, rot, Pfeile) waren während der gesamten Kulturdauer detektierbar und das immunpositive Signal war ab Tag 4 (Normoglykämie), beziehungsweise von Tag 6 an (Hyperglykämie) in die ONL verschoben, mit einem deutlichen Höhepunkt dieses Geschehens an Tag 18. Maßstab 100µm. Insert-Vergrößerungsfaktor 10. .... 98

**Abbildung 3-29: Gliazellen der porzinen Retina über die Kulturdauer in unterschiedlichen Glukosekonzentrationen. Immunfluoreszenz.** Vermehrte Gliose-Ereignisse (GFAP, grün und GS, rot) starten früher unter Hyperglykämie und Proteinreste der Gliazellen zeigen zugrunde gehende Gliazellen unter normoglykämischen Kulturbedingungen (Tag 18). Maßstab 100µm. .... 99

<b>Abbildung 3-30: Genexpressionsstudie zu VEGF.</b> Die relative Genexpression ist der Ct-Wert, bezogen auf ein Referenzgen, korreliert mit der Tag-0-Expression ( $=\Delta\Delta Ct$ ). Der Vascular endothelial growth factor VEGF ist unter erhöhten Glukosekonzentrationen bis zum Tag 12 in Kultur hochreguliert. ....	101
<b>Abbildung 3-31: Genexpressionsstudie zu INSR.</b> Die relative Genexpression ist der Ct-Wert, bezogen auf ein Referenzgen, korreliert mit der Tag 0 Expression ( $=\Delta\Delta Ct$ ). Der Insulinrezeptor ist unter Hyperglykämie bis zum Tag 8 in der Explantatkultur hochreguliert. ....	102
<b>Abbildung 3-32: Genexpressionsstudie zu GluT1.</b> Die relative Genexpression ist der Ct-Wert, bezogen auf ein Referenzgen, korreliert mit der Tag-0-Expression ( $=\Delta\Delta Ct$ ). Der Glukose-Transporter-1 ist bei erhöhten Glukosekonzentrationen im Nährmedium zu allen Zeitpunkten der Retinakultur hochreguliert, mit Ausnahme von Tag 8. ....	103
<b>Abbildung 3-33: Genexpressionsstudie zu Caspase 3.</b> Die relative Genexpression ist der Ct-Wert, bezogen auf ein Referenzgen, korreliert mit der Tag-0-Expression ( $=\Delta\Delta Ct$ ). Caspase 3 weist zu den meisten Zeitpunkten eine Hochregulierung bei niedrigen Glukosekonzentrationen auf. An Tag 6 und 16 ist der mRNA-Gehalt unter Hyperglykämie höher. ....	104
<b>Abbildung 4-1: Glukoseverbrauch des retinalen Gewebes über die Kulturdauer.</b> Dargestellt ist der Glukoseverbrauch in mg/dl errechnet aus den Mittelwerten der gemessenen Glukosekonzentrationen im Kulturmedium in den jeweiligen Messintervallen. Während der sechzehntägigen Kulturdauer lag der Verbrauch der hyperglykämisch ernährten Netzhäute zu Beginn und am Ende der Kultur höher als bei den Netzhäuten, die im normoglykämischen Medium kultiviert wurden. ....	109
<b>Abbildung 4-2: Zeitliche Darstellung der Ereignisse in Bezug auf die Veränderungen im retinalen Gewebe unter hyperglykämischen Bedingungen.</b> Dargestellt sind die unter Hyperglykämie erhöhten Expressionen und Zellkerne ( $\uparrow$ ) und morphologischen Veränderungen der Zellen im Vergleich zur Normoglykämie-Gruppe (gestrichelte Balken). Während die Caspase 3 (C3) nur an Tag 6 und 16 unter Hyperglykämie hochreguliert ist, zeigt sich GluT1 außer an Tag 8 stets erhöht, der INSR zu Beginn (Tag 2 bis 8) hochreguliert und VEGF zu den ersten sechs Messzeitpunkten (Tag 2-12) erhöht. Sprouting der Stäbchen-Bipolarzellen konnte von Tag 10 bis 14 beobachtet werden, wohingegen es unter normoglykämischen Bedingungen bis Tag 16 anhält. Die Ribbon-Synapsen weisen eine Verschiebung in die ONL nach sechs Tagen auf. Das Signal für die Photorezeptoren konnte unter Normoglykämie zwei Tage länger sichtbar gemacht werden, ergo bis Tag 18 der Kultur. Die Gliose setzte unter HG 4 Tage früher ein und zeigte sich hier ab Tag 4. Die apoptotischen Zellkerne waren unter HG in der ONL, außer an Tag 4, und in der INL, mit Ausnahme von Tag 12, zahlreicher. Auch die Anzahl der gezählten Nuklei war höher in der Hyperglykämie-Gruppe, abgesehen von Tag 2 und 8 in der ONL. ....	120
<b>Abbildung 4-3: Zeitliche Darstellung der Ereignisse in Bezug auf den Erhalt des retinalen Gewebes während der Langzeitkultur.</b> Während die retinalen Schichten noch nach 26 Tagen erhalten waren, sind die Zapfen bis Tag 18 und die signalweiterleitenden Zellen bis Tag 20 in Kultur nachweisbar. Das Photorezeptorsignal der Stäbchen hingegen ist bis Tag 20 visualisierbar. Gliose und Apoptose zeigen sich nach 16 Tagen gehäuft und Veränderungen der Zellkerne sind nach 14 Tagen vermehrt zu finden. ....	131

## 7.3 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1-1:</b> Klassifizierung von Diabetes mellitus, modifiziert nach (WHO 2019).....	19
<b>Tabelle 2-1:</b> Chemikalien. Alphabetische Auflistung mit Hersteller. ....	31
<b>Tabelle 2-2:</b> Verbrauchsmaterialien. Alphabetische Auflistung mit Hersteller. ....	33
<b>Tabelle 2-3:</b> Puffer und Medien. Alphabetische Auflistung und Zusammensetzungen. ....	34
<b>Tabelle 2-4:</b> Kits. Alphabetische Auflistung mit Verwendung und Hersteller.....	36
<b>Tabelle 2-5:</b> Verwendete Primärantikörper. ....	37
<b>Tabelle 2-6:</b> Verwendete Sekundärantikörper. ....	38
<b>Tabelle 2-7:</b> Primersequenzen.....	39
<b>Tabelle 2-8:</b> Enzyme. Alphabetische Auflistung mit Hersteller. ....	39
<b>Tabelle 2-9:</b> Größenstandards. Alphabetische Auflistung mit zugehörigem Hersteller.....	40
<b>Tabelle 2-10:</b> Geräte und Software. Alphabetische Auflistung mit Hersteller. ....	40
<b>Tabelle 3-1:</b> Versuche zur Etablierung der porzinen retinalen Explantatkultur mit unterschiedlichen Fragestellungen und durchgeführten Analysemethoden. ....	64

## 7.4 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
μ	Mikro- (10 <sup>6</sup> )
2-DG	2-deoxy-glucose
3R	<i>replace, reduce, refine</i>
AAV	Adeno-assoziierte Viren
AGE	<i>advanced glycation endproducts</i>
AMD	Altersbedingte Makuladegeneration
bp	Basenpaare
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CoCl	Kobaltchlorid
CRISPR	<i>clusterd regularly interspaced short palindromic repeats</i>
Ct	<i>Cycle threshold</i>

CtBP2	<i>c-terminal-binding protein 2</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DDCt	delta delta Ct
DM	Diabetes mellitus
DME	Diabetisches Makula-Ödem
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DR	Diabetische Retinopathie
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ELM	Äußere limitierende Membran
et al	Und andere
GAG	Glycosaminoglycane
gapDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GCL	Ganglienzellschicht
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
Glut	Glucose Transporter
GS	Glutaminsynthetase
HE	Hämatoxylin Eosin
HEPES	2--ethansulfonsäure
HG	Hyperglykämie
HIF-1	Hypoxie-induzierter Faktor
HREC	<i>human retinal endothelial cells</i>
ILM	Innere limitierende Membran
INL	Innere nukleäre Schicht
INSR	Insulinrezeptor

IPL	Innere plexiforme Schicht
IR	Insulinrezeptor
IRS	Insulinrezeptor-Substrat
IS	Innere Segmente
L	Liter
M	molar (mol/L)
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MIQE	minimum information necessary for evaluating qPCR experiments
n	Nano-
NCBI	National Center für Biotechnology Information
NDMA	Dimethylnitrosamin
NDS	<i>normal donkey serum</i>
NFL	Nervenfaserschicht
Nm	Nanometer
NPDR	Nicht proliferative Diabetische Retinopathie
ONL	Äußere nukleäre Schicht
OPL	Äußere plexiforme Schicht
OS	Äußere Segmente
PDS	<i>peptic digest-starch</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDR	Proliferative Diabetische Retinopathie
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKC $\alpha$	Protein kinase C-alpha
PNA	<i>Peanut Agglutinin</i>
PRS	Photorezeptor Segmente

qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i>
RHO	Rhodopsin
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RP	Retinitis pigmentosa
RPE	Retinales Pigmentepithel
RT	Raumtemperatur
SD	<i>standard deviation</i> (Standardabweichung)
STZ	Streptozotocin
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TierSchG	Tierschutzgesetz
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
WHO	<i>world health organisation</i>

## 7.5 Danksagung

Für die Übernahme dieser Doktorarbeit als Betreuer und erster Doktorvater im Fachbereich Veterinärmedizin möchte ich Herrn Professor Dr. Dr. Stefan Arnhold sehr herzlich danken.

Meinem zweiten Doktorvater Herrn Professor Dr. Dr. Knut Stieger möchte ich in besonderer Form für die Ermöglichung der Zusammenarbeit in der Arbeitsgemeinschaft „Experimentelle Ophthalmologie“ am Fachbereich Medizin und die Überlassung dieses Themas danken. Seine Hilfsbereitschaft in wissenschaftlichen Fragestellungen, sein Vertrauen in meine Arbeit und die jahrelange, geduldige und freundliche Unterstützung haben diese Arbeit überhaupt erst möglich gemacht.

Ich danke auch Frau Dr. Claudia López Yomayuza für die Betreuung meiner Arbeit in den ersten Jahren und die professionelle und freundliche Einarbeitung in sämtliche Arbeitstechniken im Labor. Sie hatte stets ein offenes Ohr für mich und hat den Aufbau dieser Doktorarbeit und deren Gelingen durch ihre vielen guten Ideen entscheidend mitgeprägt.

Dem gesamten Team der Arbeitsgemeinschaft „Experimentelle Ophthalmologie“ gilt mein aufrichtiger Dank für die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgemeinschaft und das kollegiale und freundliche Miteinander. Dazu zählen auch Frau Prof. Dr. Dr. Birgit Lorenz als damalige Direktorin der Klinik für Augenheilkunde, Herr PD Dr. Markus Preising als Laborleiter, Frau Annabella Janise-Libawski, die mich im Laboralltag stets tatkräftig und geduldig unterstützte, Frau Dr. Brigitte Müller, die mir vor allem in den Bereichen Histologie und Mikroskopie eine wundervolle Mentorin war und Herr Dr. Tobias Wimmer, dem ich für seine herausragende Unterstützung bei wissenschaftlichen Fragestellungen und bei der statistischen Auswertung dieser Arbeit danke. Meinen lieben Kolleginnen Dr. Franziska Serafin, Constanze Stumpf und Jessica Grebe möchte ich in besonderer Form für die vielen schönen gemeinsamen Momente in der Augenklinik und die daraus entstandene Freundschaft danken.

Herrn Julian Lelle danke ich für die kompetente und fleißige Korrektur der Grammatik dieser Arbeit.

Für die finanzielle Ermöglichung meiner Dissertation möchte ich mich für die Bereitstellung der Stipendien bei der von Behring-Röntgen-Stiftung in Marburg und der Justus-Liebig-Universität in Gießen bedanken.

Abschließend möchte ich mich herzlich bei meiner Familie bedanken, zu der neben meinen Eltern und meiner Schwester mein Lebensgefährte Pascal und meine wunderbaren Kinder Félicie und Elinor zählen, die mich stets ermutigt haben, den Weg bis zum Ende zu gehen und mich dafür viele Stunden entbehren mussten. Danke für euren Rückhalt und eure bedingungslose Liebe, ohne die ich es nie bis hierhin geschafft hätte.