

**Subretinale Implantation primärer humaner RPE-Zellen ins Schweineauge -
Morphologische Charakterisierung von Retina und Implantat.**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Ebbert, Annabelle Florentina

aus Gießen

Gießen 2023

Aus der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde
unter der kommissarischen Leitung von PD Dr. k.m.n. Lyubomyr Lytvynchuk, PhD
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Dr. med. vet. Knut Stieger

Gutachterin: Prof. Dr. Katrin Susanne Lips

Tag der Disputation: 10.07.2023

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | EINLEITUNG..... | 1 |
| 1.1 | Aufbau des menschlichen Auges | 1 |
| 1.1.1 | Schichten und Nervenzellen der Retina..... | 2 |
| 1.1.2 | Gliazellen der Retina | 4 |
| 1.1.3 | Fovea Centralis und Makula lutea | 6 |
| 1.1.4 | Das retinale Pigmentepithel..... | 7 |
| 1.1.5 | Die Blutversorgung der Retina und Diffusionsbarrieren..... | 11 |
| 1.2 | Immunprivileg des Auges | 12 |
| 1.3 | Retinale Degeneration und neuronaler Umbau (retinales Remodeling) | 14 |
| 1.4 | Das Schweineauge als Tiermodell - Unterschiede zum menschlichen Auge | 15 |
| 1.5 | Altersbedingte Makuladegeneration..... | 17 |
| 1.5.1 | Bisherige Therapiemöglichkeiten..... | 19 |
| 1.6 | Transplantation retinaler Pigmentepithelzellen als Therapieansatz für degenerative Retinaerkrankungen | 21 |
| 1.6.1 | Ursprungszellen | 22 |
| 1.6.2 | Implantationstechniken..... | 23 |
| 1.7 | Ziel der Arbeit | 25 |
| 2 | MATERIAL UND METHODEN..... | 26 |
| 2.1 | Materialien..... | 26 |
| 2.1.1 | Chemikalien..... | 26 |
| 2.1.2 | Puffer und Medien | 26 |
| 2.1.3 | Färbelösungen..... | 27 |
| 2.1.4 | Verbrauchsmaterialien..... | 27 |
| 2.1.5 | Geräte..... | 28 |
| 2.1.6 | Primärantikörper | 29 |
| 2.1.6.1 | Nicht verwertbare Immunfärbungen | 30 |
| 2.1.7 | Sekundärantikörper..... | 32 |
| 2.1.8 | Software..... | 33 |
| 2.2 | Methoden..... | 33 |
| 2.2.1 | Allgemeiner Versuchsaufbau mit externen Vorarbeiten | 33 |
| 2.2.1.1 | Extern: Entwicklung der Trägermembran..... | 34 |
| 2.2.1.2 | Extern: Entwicklung der primären humanen RPE Zellen | 35 |
| 2.2.1.3 | Extern: Implantation und perioperatives Management | 36 |
| 2.2.2 | Aufbereitung der Schweineaugen..... | 39 |
| 2.2.3 | Anfertigung von Gefrierschnitten..... | 40 |
| 2.2.4 | Hämatoxylin-Eosin-Färbung als Übersichtsfärbung | 41 |
| 2.2.5 | Immunfärbung an Gefrierschnitten..... | 42 |
| 2.2.6 | Antigendemaskierung | 47 |
| 2.2.7 | TUNEL-Färbung..... | 48 |
| 2.2.8 | Mikroskopie | 49 |
| 2.2.8.1 | Mikroskopie der Hämatoxylin-Eosin-Färbung | 49 |
| 2.2.8.2 | Konfokale Laser Scanning Mikroskopie der Immunfärbungen und der TUNEL-Färbung..... | 49 |
| 2.2.9 | Bildbearbeitung..... | 51 |
| 3 | ERGEBNISSE..... | 52 |
| 3.1 | Morphologie der Retina und des Implantats in der Hämatoxylin-Eosin- und HNAA/DAPI-Übersichtsfärbung | 52 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 3.2 | Darstellung der Gliaproteine innerhalb der Retina und des Implantatbereichs..... | 55 |
| 3.2.1 | GFAP | 56 |
| 3.2.2 | Vimentin | 57 |
| 3.2.3 | Iba1 | 59 |
| 3.3 | Morphologie der Schweineretina im Vergleich zu den Kontrollaugen anhand der immunhistochemischen PNA- und PKC-alpha- Färbungen | 62 |
| 3.3.1 | PNA | 62 |
| 3.3.2 | PKC-alpha | 63 |
| 3.4 | Immunhistochemischer Nachweis der humanen Marker HNAA und STEM121 im Implantatbereich..... | 67 |
| 3.4.1 | HNAA..... | 67 |
| 3.4.2 | STEM121..... | 72 |
| 3.5 | Immunhistochemischer Nachweis der RPE-spezifischen Marker CRALBP und Bestrophin | 75 |
| 3.5.1 | CRALBP..... | 75 |
| 3.5.2 | Bestrophin..... | 77 |
| 3.6 | Gegenüberstellung der Versuchstiere sechs Wochen nach Implantation mit und ohne protokollgemäßer Immunsuppression anhand der Makrogliaproteine GFAP und Vimentin und der humanen Marker HNAA und STEM121 | 79 |
| 3.6.1 | Makrogliaproteine: GFAP und Vimentin | 79 |
| 3.6.2 | Humane Marker: HNAA und STEM121..... | 84 |
| 3.7 | Analyse der TUNEL-Färbung..... | 87 |
| 4 | DISKUSSION..... | 90 |
| 4.1 | Aktivierung von Gliazellen | 91 |
| 4.1.1 | Müller-Zell-Aktivierung..... | 91 |
| 4.1.2 | Aktivierung von Mikroglia..... | 93 |
| 4.2 | Morphologie der Retina und retinale Umbauprozesse (retinales Remodeling) ... | 94 |
| 4.3 | Beurteilung der Integration, Funktion und des Überlebens der implantierten hRPE-Zellen | 99 |
| 4.4 | Immunreaktion und Einfluss der Immunsuppression..... | 104 |
| 4.5 | Einfluss der chirurgischen Intervention | 106 |
| 5 | ZUSAMMENFASSUNG..... | 108 |
| 5.1 | Summary | 110 |
| 6 | ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | 112 |
| 7 | ABBILDUNGSVERZEICHNIS..... | 113 |
| 8 | TABELLENVERZEICHNIS | 115 |
| 9 | LITERATURVERZEICHNIS | 116 |
| 10 | EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG | 124 |
| 11 | DANKSAGUNG | 125 |
| 12 | PUBLIKATION | 126 |

1 Einleitung

1.1 Aufbau des menschlichen Auges

Als Retina bezeichnet man die innere Augenhaut, die den Bulbus innen auskleidet und embryonal dem neuroektodermalen Augenbecher entstammt. Die Retina ist das zentrale Organ zur Wahrnehmung und Verarbeitung von Lichtreizen sowie Weiterleitung der sensorischen Information an höhere Zentren des zentralen Nervensystems. Sie ist somit zentraler Bestandteil unserer Fähigkeit zu sehen. Die Retina lässt sich auf verschiedene Arten einteilen. Anatomisch unterscheidet man eine lichtempfindliche Pars optica retinae und eine lichtunempfindliche Pars caeca retinae, die an der Ora serrata ineinander übergehen. Die Pars optica retinae kleidet den hinteren Abschnitt des Bulbus aus und wird auch als Netzhaut bezeichnet. Sie besteht aus einem Stratum pigmentosum und einem Stratum nervosum. Das Stratum nervosum wird durch mehrere Schichten an Nervengewebe gebildet und dem zentralen Nervensystem zugeordnet. Das Stratum pigmentosum wird durch das einschichtige retinale Pigmentepithel gebildet (Lüllmann-Rauch & Asan, 2019). In dieser Arbeit wird nur Bezug auf die Pars optica retinae genommen. Analog zur englischsprachigen Literatur wird in den folgenden Texten für das Stratum nervosum der Pars optica retinae der Begriff „Retina“ verwendet.

Retina und retinales Pigmentepithel sind an der Ora Serrata und der Papille fest miteinander verwachsen. Die Ora serrata bildet dabei die anteriore Begrenzung der lichtsensiblen Retina, sodass diese beim Menschen einen Durchmesser von circa 30-40 mm aufweist. An den übrigen Stellen liegen Retina und retinales Pigmentepithel eng aneinander, sind aber nicht miteinander verwachsen, wodurch sich die Schichten bei der Präparation leicht voneinander trennen lassen (Vaughan D., 1983) oder es zum pathologischen Bild der Netzhautablösung kommen kann (Lüllmann-Rauch & Asan, 2019). Das retinale Pigmentepithel sitzt der daruntergelegenen Bruch-Membran fest auf. Die Bruch-Membran sowie die sich anschließende Choriokapillaris zählen nicht mehr zu den retinalen Schichten, sondern werden bereits der Choroidea zugeordnet. Ophthalmoskopisch lassen sich am menschlichen Auge mittig die Papille (Papilla nervi optici), als Austrittsstelle des Nervus Optikus, und eine circa 3,5 mm temporal davon gelegene rötlich-gelbliche Zone ausmachen (siehe Abbildung 1) (Vaughan D., 1983). Bei letzterer handelt es sich um die Makula lutea, die mittig eine trichterförmige, gefäßfreie Einziehung, die Fovea centralis, enthält. Die Fovea centralis misst in ihrem Durchmesser

circa 2 mm (Hageman et al., 2008). An der Papille treten zudem die an der Versorgung der inneren Schichten der Retina beteiligten GefäÙe in das Auge ein, die zum Teil radiär auf die Makula lutea zulaufen (Kolb, 2005). Charakteristisch lassen sich in der Funduskopie die superiore und inferiore temporale GefäÙarkade, die die gelbliche Makula umgeben, leicht erkennen (Hageman et al., 2008).

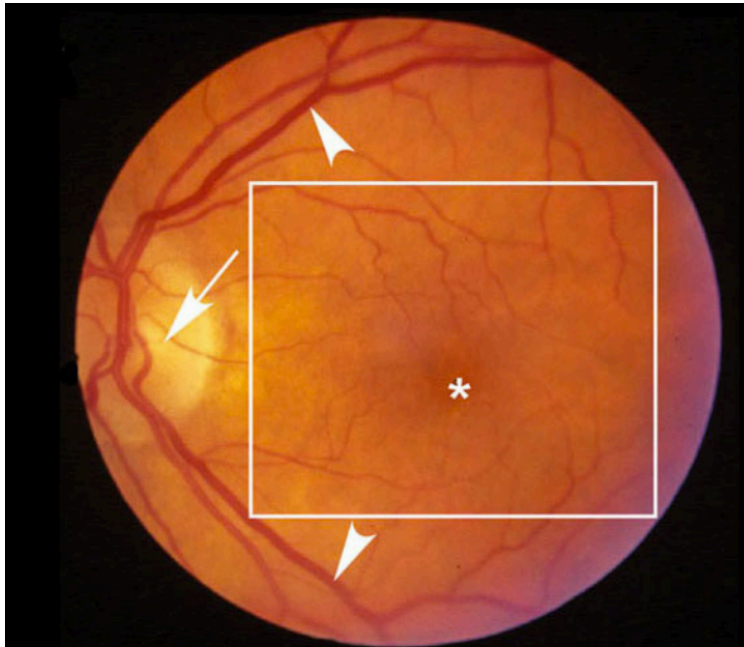


Abbildung 1: Ophthalmoskopische Ansicht der Retina. (Hageman et al., 2008)
Pfeil (runde helle Zone): Papilla nervi optici, Pfeilspitzen: superiore und inferiore temporale GefäÙarkade, weiÙe Box: Makula, Sternchen (*): Fovea centralis <http://webvision.med.utah.edu/>

1.1.1 Schichten und Nervenzellen der Retina

Die Retina enthäلت unter anderem die ersten drei Neurone der Sehbahn. Als erstes Neuron, welches einfallende Lichtreize in elektrochemische Signale umwandelt (Signaltransduktion) und somit photorezeptiv ist, fungieren die Photorezeptoren. Von hieraus erfolgt die vertikale Signalweiterleitung über die Bipolarzellen auf die Ganglienzellen mit zusätzlicher Modulation durch Interneurone, wie beispielsweise Horizontalzellen und Amakrinzellen. Diese Verschaltung ist eine stark vereinfachte Darstellung der Realität. In der Retina lassen sich circa 55 verschiedene Zelltypen voneinander unterscheiden (Masland & Howard, 2001). Aufgrund der Anordnung von Zellkörpern, Dendriten und Axonen erfolgt eine histologische Unterteilung der Retina in neun Schichten, beziehungsweise zehn Schichten, wenn man das retinale Pigmentepithel als eigene retinale Schicht mit aufzählt. Es lassen sich drei Zellkörperschichten und zwei Zellfortsatz-Schichten, in denen die Synapsen liegen, identifizieren. Zu den Zellkörperschichten gehören die äußere (ONL) sowie die innere (INL) Körnerschicht und

die Ganglienzellschicht (GCL) (Kolb, 2005). Die Einteilung der Schichten der Retina von außen nach innen einschließlich der lateinischen Fachbezeichnung und der gängigen Abkürzungen, wie sie in der englischsprachigen Literatur zu finden sind, lautet wie folgt:

- 1) Retinales Pigmentepithel (Stratum pigmentosum); *RPE*
 - 2) Außen (*OS*)- und Innensegmente (*IS*) der Photorezeptoren (Stratum segmentorum externorum und internorum)
 - 3) Äußere Grenzschiicht (Stratum limitans externum); *OLM*
 - 4) Äußere Körnerschicht (Stratum nucleare externum); *ONL*
 - 5) Äußere plexiforme Schicht (Stratum plexiforme externum); *OPL*
 - 6) Innere Körnerschicht (Stratum nucleare internum); *INL*
 - 7) Innere plexiforme Schicht (Stratum plexiforme internum); *IPL*
 - 8) Ganglienzellschicht (Stratum ganglioicum); *GCL*
 - 9) Nervenfaserschicht (Stratum neurofibrarum); *NFL*
 - 10) Innere Grenzschiicht (Stratum limitans internum); *ILM*
- (Lüllmann-Rauch & Asan, 2019)

In der ONL liegen die Zellkörper der Photorezeptoren, die in Zapfen- und Stäbchen-Photorezeptoren unterschieden werden können. Die INL enthält die Zellkörper der Bipolar-, Horizontal- und Amakrinzellen. In der GCL lassen sich die Zellkörper der Ganglienzellen finden, deren Axone in der NFL zur Papille ziehen und sich nach Austritt aus dem Auge zum Nervus Optikus zusammenlagern. Bei den Zellfortsatz-Schichten handelt es sich um die innere (IPL) und äußere (OPL) plexiforme Schicht. Die OPL befindet sich zwischen der ONL und der INL. In dieser Schicht liegen die Zell-Zellkontakte zwischen den Photorezeptoren, vertikal verlaufenden Bipolarzellen und horizontal ausgerichteten Horizontalzellen. In der IPL wird das durch die Bipolarzellen vertikal weitergeleitete Signal auf die Ganglienzellen übertragen. Zusätzlich bestehen in dieser Schicht weitere Verbindungen zu Amakrinzellen, die das Ganglienzellsignal beeinflussen. Zusätzlich zu den oben beschriebenen Schichten werden unter anderem durch die radiären Müllerzellen die äußere Grenzschiicht (OLM) und die innere Grenzschiicht (ILM) gebildet. Die OLM besteht aus Adhärenz-Verbindungen der Müllerzellen zu den inneren Segmenten der Photorezeptoren und stellt damit eine Barriere zwischen dem subretinalen Bereich und den neuronalen Schichten der Retina dar. Die inneren und äußeren Segmente der Photorezeptoren ragen somit in den subretinalen Bereich hinein und stehen in engen Kontakt mit dem retinalen

Pigmentepithel, welches den neuronalen Schichten der Retina unmittelbar anliegt. Die ILM entspricht der inneren Oberfläche der Retina, welche an den Glaskörper grenzt und als Diffusionsbarriere fungiert. Betrachtet man nun die Richtung des Licht- und des Signalwegs, lässt sich feststellen, dass das Licht zunächst alle Schichten der Retina passieren muss, bevor durch die außen gelegenen Photorezeptoren die Signaltransduktion initiiert werden kann. Die Signalweiterleitung erfolgt dann in die entgegengesetzte Richtung von den außen gelegenen Photorezeptoren über die Bipolarzellen zu den innen gelegenen Ganglienzellen (Kolb, 2005).

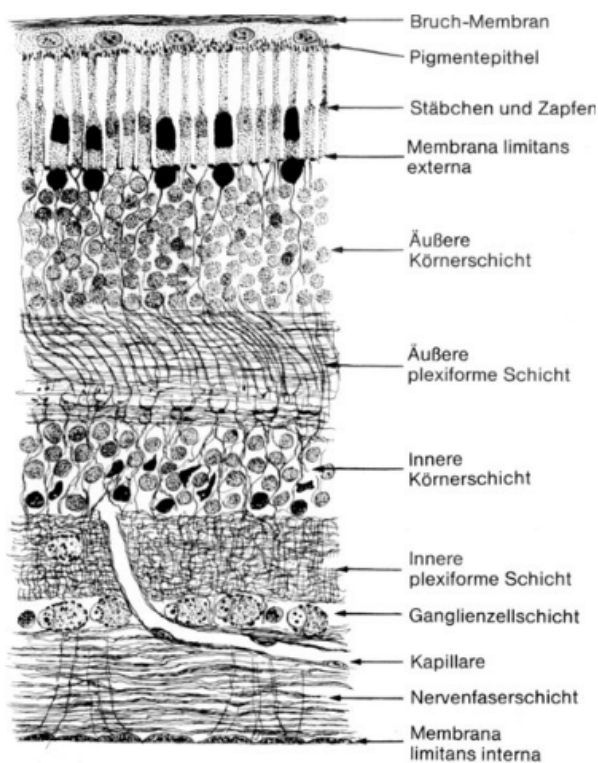


Abbildung 2: Die Schichten der Retina. (Vaughan D., 1983)

1.1.2 Gliazellen der Retina

Innerhalb der Retina kommen drei unterschiedliche Arten von Gliazellen vor. Diese lassen sich in Makroglia und Mikroglia unterteilen. Zu den Makrogliazellen gehören die Müller-Zellen und die Astrozyten. Die Mikroglia bilden die dritte Art der Gliazellen der Retina (Reichenbach & Bringmann, 2020). Gliazellen der Retina (Astrozyten, Müller-Zellen, Mikroglia) sind von den Nervenzellen der Retina (Photorezeptoren, Bipolarzellen, Horizontal- und Amakrinzellen, Ganglienzellen) abzugrenzen. Gliazellen besitzen im Gegensatz zum ruhenden Nervengewebe die Fähigkeit zur Proliferation und tragen daher nach Verletzung, Minderperfusion oder Degeneration von Nervengewebe zur Ausbildung einer Glianarbe bei (Lüllmann-Rauch & Asan, 2019).

Makroglia

Makroglia unterstützen die Funktion, den Metabolismus und die Homöostase der Photorezeptoren und weiterer Nervenzellen der Retina. Nährstoffe, Stoffwechselprodukte, Ionen und Wasser werden über die Makroglia zwischen Nervenzellen und Blutgefäßen transportiert (Reichenbach & Bringmann, 2020). Somit sind Makrogliazellen für eine intakte Funktion der retinalen Nervenzellen essentiell.

Die Zellkörper der Astrozyten befinden sich hauptsächlich in der GCL und ihre Fortsätze erstrecken sich parallel zur Glaskörperoberfläche bis in die NFL, da sie den Axonen der Ganglienzellen auf ihrem Weg zum Nervus Optikus folgen. Nach retinaler Verletzung werden Astrozyten aktiviert, wodurch es zu Proliferation und vermehrter Expression von Intermediärfilamenten wie GFAP (saures Gliafaserprotein) kommt. Diese entzündliche Astroglie ist ein zellulärer Mechanismus, um die Ganglienzellen vor weiterer Schädigung zu schützen (Reichenbach & Bringmann, 2020).

Die Müller-Zellen stellen die typischen radiären Gliazellen der Retina dar und können als eine Sonderform der Astrozyten verstanden werden. Radiäre Gliazellen kommen vor allem während der Embryonalentwicklung vor, während derer sie die Wanderung sich ausbildender Neurone unterstützen und selbst als neuronale Vorläuferzellen mit Differenzierungspotential zu Astrozyten und Neuronen auftreten. Postnatal kommen radiäre Gliazellen außer als Müller-Zellen nur noch als Bergmann-Glia und Pituizyten vor. Die Zellkörper der Müller-Zellen liegen in der INL und erstrecken sich mit ihren radiär verlaufenden Fortsätzen wie oben beschrieben von der ILM bis zu OLM und sind an der Bildung dieser Schichten mit ihrer Funktion als Diffusionsbarrieren maßgeblich beteiligt. Mithilfe ihres radiären Verlaufs durch die retinalen Schichten hindurch erfüllen sie vermutlich den Effekt einer Art Lichtleitung, wodurch das Licht die Photorezeptoren mit weniger Streuung erreichen kann. Zudem erfüllen sie reguläre Makroglia-Funktionen wie Stützfunktion, Aufrechterhaltung der Homöostase und Produktion von Extrazellulärmatrix (Lüllmann-Rauch & Asan, 2019), (Kolb, 2005). Ebenso wie bei den Astrozyten kommt es nach Verletzungen der Retina zu einer Aktivierung der Müller-Zellen mit einer vermehrten Expression von Intermediärfilamenten (Lewis & Fisher, 2003), (Reichenbach & Bringmann, 2020).

Mikroglia

Bei Mikroglia handelt es sich um ortsständige, mononukleäre Makrophagen des ZNS. Sie zählen zu den nicht-neuronalen Gliazellen des ZNS. Den Mikroglia-Zellen kommen

Aufgaben innerhalb der angeborenen und erworbenen Immunabwehr zu. Sie sind die ersten Zellen, die eine potentielle Infektion oder Gewebeschädigung des ZNS registrieren und auf diese reagieren (Ginhoux et al., 2013). Im Fall einer Gewebeschädigung gehen die verzweigten Mikrogliazellen schnell von einem Ruhezustand in einen aktivierten Zustand über, proliferieren, wandern, setzen Zytokine frei und werden phagozytisch (Ohsawa et al., 2004). Ein Marker für Mikroglia ist Iba1. Das Molekül Iba1 hat eine Aktinbindungsaktivität und ist an der Membranauffaltung („membrane ruffling“) in aktivierten Mikroglia beteiligt, was essentiell für Zellmigration und Phagozytose ist (Ohsawa et al., 2004). Mikrogliazellen können sich in der GCL, in den beiden plexiformen Schichten (IPL und OPL) und in der Umgebung von Blutgefäßen befinden (Reichenbach & Bringmann, 2020).

1.1.3 Fovea Centralis und Makula lutea

Der zuvor beschriebene allgemeine Aufbau der Retina variiert in gewissem Maße, je nachdem welche Areale der Retina man betrachtet. In der zentralen Makula lutea um die Fovea centralis herum überwiegt der Anteil an Zapfen, wohingegen in den peripheren Anteilen der Retina überwiegend Stäbchen zu finden sind. Die INL ist in den zentralen Retinaanteilen aufgrund der höheren Dichte an Zapfen-Bipolarzellen, Horizontal- und Amakrinzellen dicker. Dies führt über eine höhere Synapsenanzahl zu einer ebenfalls relativ verdickten IPL. Die GCL und NFL sind dementsprechend in zentralen Arealen ebenfalls dicker als in peripheren. Die ONL hingegen weist in allen Retinaanteilen eine ähnliche Dicke auf.

Fovea Centralis

Eine Sonderstellung der zentralen Retina-Anteile nimmt die Fovea Centralis ein. In diesem Bereich weist die Retina die geringste Dicke auf und verfügt über das höchste Auflösungsvermögen, weshalb sie als Ort des schärfsten Sehens bezeichnet wird. Die Photorezeptorendichte ist hier, ermöglicht durch die hexagonale Anordnung ihrer Zellkörper, sehr groß, wobei es sich ausschließlich um Zapfen-Photorezeptoren handelt. Stäbchen-Photorezeptoren lassen sich im Bereich der Fovea Centralis nicht finden. In diesem Bereich sind die ONL und die ILM verdünnt und alle anderen retinalen Schichten ringförmig nach peripher verlagert. Am deutlichsten ist dies in der Mitte der Fovea centralis, der Foveola, ausgeprägt, wo die Sinneszellen nur noch von Fortsätzen der Müllerzellen bedeckt sind. Durch die Verlagerung von Retinaanteilen von zentral nach

peripher verlaufen die Axone der Zapfen-Photorezeptoren im Bereich der Makula schräg von den Zellkörpern zu ihren Verschaltungsstellen („synaptic pedicles“) in der nach peripher verlagerten OPL und bilden dabei eine fibrös anmutende zusätzliche Schicht, die Henle-Faserschicht. Diese Schicht ist in den peripheren Arealen der Retina nicht zu finden (Vaughan D., 1983) (Kolb, 2005). Die Fovea enthält als Gliazellen ausschließlich Müller-Zellen und keine Astrozyten oder Mikroglia (Reichenbach & Bringmann, 2020).

Makula lutea

Die gelbliche Farbe der Makula lutea wird durch die Anreicherung der Carotinoide Zeaxanthin und Lutein in den Zapfenaxonen der Henle-Faserschicht verursacht. Es wird vermutet, dass die Makula dadurch wie ein Filter für kurzwelliges Licht fungiert, um die für die Sehfähigkeit essentielle zentrale Retina und insbesondere die Fovea vor UV-Schäden zu schützen (Kolb, 2005). Im Bereich der Makula ist der physiologischerweise leere Extrazellularraum am größten. Kommt es krankheitsbedingt zu einer vermehrten Bildung von extrazellulärer Matrix, akkumuliert diese besonders ausgeprägt im Extrazellularraum der Makula, was zu einer Verdickung und folglich zu einer Beeinträchtigung des Sehvermögens führt.

1.1.4 Das retinale Pigmentepithel

Aufbau des RPEs

Zwischen den lichtsensitiven Außensegmenten der Photorezeptoren und den Choriokapillaren zur Blutversorgung der Retina liegt das retinale Pigmentepithel, welches zur Aufrechterhaltung der Sehfähigkeit beiträgt (R. Sparrow et al., 2010). Im Speziellen handelt es sich beim retinalen Pigmentepithel um eine einschichtige, hexagonal angeordnete Zellschicht, deren Zellen durch „Tight Junctions“ verbunden sind. Diese Zellen enthalten Pigmentgranula mit einem hohen Melaningehalt und Zellorganellen zur Metabolisierung der verbrauchten und abgestoßenen Membrananteile der Außensegmente der Photorezeptoren. Dieser Vorgang ist essentiell zur Regeneration der Außensegmente, um die Sehfähigkeit und Integrität der Retina zu erhalten und ist zentraler Bestandteil der visuellen Signaltransduktionskaskade (R. Sparrow et al., 2010; Strauss, 2011). Die retinalen Pigmentepithelzellen weisen eine Polarität auf. An der apikalen Membran stehen sie in Kontakt mit den Photorezeptor-Außensegmenten und dem subretinalen Raum, dessen spezielle extrazelluläre Matrix die Interaktion mit den Außensegmenten der Photorezeptoren unterstützt. An der basolateralen Membran steht

das RPE in Kontakt mit der hochspezialisierten, mehrschichtigen Bruch-Membran, über die das RPE Anschluss an den Blutfluss in den fenestrierten Kapillaren der choroidealen Gefäßen erhält (Strauss, 2011).

Funktionen des RPEs

Neben der oben bereits erwähnten Regeneration der Photorezeptor-Außensegmente zählen Lichtabsorption, epithelialer Transport, Ionenpufferung, Phagozytose, Sekretion und Immunmodulation zu den Aufgaben des retinalen Pigmentepithels (R. Sparrow et al., 2010; Strauss, 2011). Im Rahmen der Regeneration der Photorezeptor-Außensegmente werden verbrauchte, abgestoßene Photorezeptor-Außensegmente durch die RPE-Zellen phagozytiert und verstoffwechselt. Nicht weiter abbaubare Bestandteile der phagozytierten Photorezeptor-Außensegmente persistieren innerhalb der RPE-Zellen als Lipofuszin und sind für die Autofluoreszenz des RPEs mitverantwortlich (Schraermeyer & Peters, 2001). Zudem ist das retinale Pigmentepithel bereits während der embryonalen Entwicklung an der Differenzierung der Photorezeptoren beteiligt. Ist die Verbindung des retinalen Pigmentepithels und der sich entwickelnden Retina gestört, ist das retinale Pigmentepithel in der Lage, eigenständig eine mehrschichtige Retina-ähnliche Struktur zu bilden (Strauss, 2011).

Da die RPE-Zellen untereinander über „Tight Junctions“ (Zonula occludens) in Verbindung stehen, bildet das RPE zudem einen Bestandteil der Blut-Retina-Schranke und trägt damit zum Immunprivileg des Auges bei (Näheres siehe Kapitel 1.2). Durch die dichten Verbindungen der „Tight Junctions“ der retinalen Pigmentepithelzellen untereinander findet der Austausch von Stoffen und Zellen über das RPE nur als selektiver epithelialer Transport statt. Immunzellen des Blutstroms können das RPE beziehungsweise die Blut-Retina-Schranke nicht ungehindert überwinden. Die Rolle des RPEs in Bezug auf das Immunprivileg des Auges ist allerdings nicht nur auf seine Beteiligung am Aufbau der Blut-Retina-Schranke beschränkt. Darüber hinaus kann das RPE immunmodulativ wirken. Im gesunden Auge werden Immunreaktionen unterdrückt, während im erkrankten Auge Immunreaktionen durch das RPE sogar initiiert werden können. Verschiedene Arten der retinalen Degeneration, unter anderem auch die altersbedingte Makuladegeneration, scheinen mit einer herabgesetzten Fähigkeit des RPEs, Immunreaktionen zu unterdrücken, verbunden zu sein (Strauss, 2011).

Auch bei der visuellen Signaltransduktion spielt das RPE eine wichtige Rolle. Bei der visuellen Signaltransduktion wird ein Lichtreiz in ein Rezeptorpotential umgewandelt, was die Voraussetzung für die Weiterleitung visueller Informationen entlang der Sehbahn ist. An der visuellen Signaltransduktion sind die Sehpigmente der Photorezeptoren beteiligt. Gut beschrieben sind die Vorgänge an den Stäbchen-Photorezeptoren mit ihrem Sehpigment Rhodopsin. Rhodopsin besteht aus dem Protein Opsin und Retinal, einer prosthetischen Gruppe. Im Rahmen der Signaltransduktion isomerisiert 11-cis-Retinal des Rhodopsins durch die Einwirkung der Photonenenergie zu all-trans-Retinal und initiiert damit die Signaltransduktionskaskade, nach dessen Ablauf Rhodopsin zunächst inaktiv ist. Bevor Rhodopsin erneut durch Photonenenergie aktiviert werden kann, muss all-trans-Retinal wieder durch 11-cis-Retinal ersetzt werden. Für den Ersatz des all-trans-Retinals durch neues 11-cis-Retinal wird das bereits konformationsgeänderte all-trans-Retinal des Rhodopsin zum RPE transportiert, dort zu 11-cis-Retinal reisomerisiert und zurück zu den Photorezeptoren transportiert. Diesen Zyklus bezeichnet man als den visuellen Zyklus des Retinals, in dem das RPE einen wichtigen Stellenwert hat. Der visuelle Zyklus der Zapfen-Photorezeptoren ist noch nicht gänzlich verstanden. Es wird vermutet, dass ein Teil des all-trans-Retinals der Zapfen ebenfalls durch das RPE reisomerisiert wird und ein anderer Teil durch die Müller-Zellen reisomerisiert wird (R. Sparrow et al., 2010; Strauss, 2011).

Des Weiteren weist das RPE die Fähigkeit zur Lichtabsorption auf, was neben der Absorption von Streulicht noch weiteren Effekten dient. Durch den auf die Makula gerichteten hohen Lichteinfall entsteht in diesem Bereich ein großes photooxidatives Potential, welches bei gleichzeitig hohem Sauerstoffangebot durch den hohen Blutfluss in den Choriokapillaren zu Photooxidation führt. Durch Photooxidation werden die Photorezeptor-Außensegmente geschädigt, sodass diese konstant regeneriert werden müssen. Teil dieses Erneuerungsprozesses ist unter anderem die Phagozytose der abgestoßenen Photorezeptor-Außensegmente durch das retinale Pigmentepithel, was wiederum zu einer erhöhten Last an freien Radikalen somit zu zusätzlichem photooxidativen Stress führt. Durch die Lichtabsorption, die durch die starke Pigmentierung aufgrund des hohen Melaningehalts des RPEs ermöglicht wird, können die photooxidativen Effekte reduziert werden. Die dabei entstehende Wärme kann durch den hohen Blutfluss in den Choriokapillaren abtransportiert werden. Zudem verfügt das RPE über weitere protektive Effekte. Es ist mit einer Vielzahl an enzymatischen und

nicht-enzymatischen Antioxidantien ausgestattet, wodurch der oxidative Stress, verursacht durch Photooxidation und freie Radikale, ebenfalls reduziert werden kann. Zu den antioxidativen Effekten tragen insbesondere die Melaningranula des RPEs bei, die die Bildung von Lipofuszin durch Lipidoxidation reduzieren (Schraermeyer & Peters, 2001). Zudem ist das RPE an der Reparatur von geschädigten Lipiden, Proteinen und DNA beteiligt (Strauss, 2011). Durch diese protektiven Effekte kann die Integrität des Retina/RPE/Choroidea-Komplexes lange gewahrt werden. Im Laufe des Lebens kommt es jedoch zu einer Abnahme des antioxidativen Potentials und somit zu einer zunehmenden Akkumulation von Lipofuszin, wodurch das RPE und mit ihm wiederum auch seine protektiven Effekte beeinträchtigt werden. Darin liegt nach heutigem Wissensstand ein wichtiger Manifestationsschritt der altersbedingten Makuladegeneration (Dithmar & Holz, 2008; Marmorstein et al., 2002; Schraermeyer & Peters, 2001; Strauss, 2011).

Zudem erhält das RPE die Ionen-Homöostase im subretinalen Raum durch den epithelialen Transport von Ionen aufrecht. Dies ist wichtig, da es durch die Reaktionen an den Photorezeptor-Membranen und der Bipolarzellen zu schnellen Änderungen der Ionenzusammensetzung kommt. Ohne eine schnelle Rekompensation der Ionenzusammensetzung durch das RPE wäre eine Signaltransduktion der visuellen Information nicht über eine längere Zeit möglich (Strauss, 2011).

Dysfunktion des RPEs

Photorezeptoren und retinales Pigmentepithel stehen in enger räumlicher und funktioneller Verbindung und weisen eine starke gegenseitige Abhängigkeit auf. Bei degenerativen Erkrankungen des RPEs wird ein Verlust an Photorezeptoren beobachtet, der zu einem zunehmenden Verlust der Sehfähigkeit führt. Als wichtige Erkrankung ist an dieser Stelle die altersbedingte Makuladegeneration (AMD) zu nennen, welche die häufigste Erblindungsursache in Industrienationen darstellt und in Kapitel 1.5 näher erläutert wird (Schwartz et al., 2015). Bei der häufigsten hereditären Form der Makuladystrophie, dem Morbus Stargardt, kommt es vorwiegend aufgrund von Mutationen im ABCA4-Gen (Morbus Stargardt Typ 1), welches für ein Transmembranprotein der Photorezeptor-Außensegmente kodiert, zu einem gestörten Abtransport und Akkumulation von Metaboliten des all-trans-Retinals aus beziehungsweise in den Photorezeptor-Außensegmenten und zu einer Akkumulation von

Lipofuszin innerhalb der RPE-Zellen. Als Folge kommt es auch hier zur einer Dysfunktion des RPEs, die wiederum mit einem weiteren Verlust an Photorezeptoren und Sehfähigkeit einhergeht (Tanna et al., 2017). Dies unterstreicht, dass auch Mutationen in Genen, die in Photorezeptoren exprimiert werden, Erkrankungen des retinalen Pigmentepithels verursachen, die dann wiederum sekundär zu einem Verlust an Photorezeptoren führen (Strauss, 2011).

1.1.5 Die Blutversorgung der Retina und Diffusionsbarrieren

Die Retina und das retinale Pigmentepithel werden über zwei Wege mit Blut und somit mit Nährstoffen versorgt, wobei letztendlich alle Gefäße der A. ophthalmica aus der A. carotis interna entspringen. Zum einen tritt an der Papilla Nervi optici die A. centralis retinae in den Augapfel ein (und die Vena centralis retinae aus). Zum anderen speisen vor allem die Aa. ciliares posteriores breves das Gefäßbett der Choriokapillaris und versorgen zudem die Papilla nervi optici. Hier bilden diese eine Anastomose zu der A. centralis retinae, den Haller-Zinn-Gefäßkranz. 70-85 % des das Auge erreichenden Blutflusses fließt durch die Choriokapillaris, welche hauptsächlich die Photorezeptoren und das retinale Pigmentepithel versorgt. Die A. centralis retinae, über die die restlichen 15-30% des Blutflusses das Auge erreichen, verzweigt sich nach ihrer Aufteilung in vier Hauptäste in viele weitere Endäste und versorgt die inneren Retinaschichten bis einschließlich zur inneren Körnerschicht. Die Versorgung der äußeren Schichten der Retina, insbesondere der Photorezeptoren, und des retinalen Pigmentepithels, wird durch die Kapillarbetten der Choriokapillaris gewährleistet. Diese werden zusätzlich zu den Aa. ciliares breves auch von den Aa. ciliares longes gespeist, welche die Sklera papillennah penetrieren und ebenfalls drei Kapillarschichten innerhalb der Choroidea bilden. Die Versorgung der äußeren Retinaschichten, einschließlich RPE und Bruch-Membran, durch die Choriokapillaris erfolgt über Diffusion. Die venöse Drainage des Auges erfolgt zum einen über die Vena centralis retinae zum anderen über die Vv. ciliares, sclerales und vorticosae. Alle drainieren über die V. ophthalmica superior und inferior anschließend in den Sinus cavernosus (Lüllmann-Rauch & Asan, 2019; Kirsch, 2020; Kolb, 2005).

An dem Aufbau der Blut-Retina-Schranke sind nicht nur die „Tight Junctions“ des retinalen Pigmentepithels gegenüber der Blutversorgung seitens der Choriokapillaris beteiligt. Die retinalen Blutgefäße, die der A. centralis retinae entspringen, verfügen über eine geschlossene Endothelschicht, deren Endothelzellen ebenfalls über „Tight

Junctions“ in Verbindung stehen. Somit manifestiert sich auch hier die Blut-Retina-Schranke. Da die Kapillaren innerhalb der Choriokapillaris über ein fenestriertes Endothel verfügen, sind diese nicht als Teil der Blut-Retina-Schranke zu werten. Die Blut-Retina-Schranke verhindert einen unregulierten Übertritt nicht-membrangängiger Substrate und Zellen aus dem Blutstrom ins Auge. Substrate, die für den Stoffwechsel der Retina essentiell sind und die Blut-Retina-Schranke nicht durch Diffusion überwinden können, werden mithilfe selektiven epithelialen Transports durch membranständige Transportmechanismen zur Verfügung gestellt. Neben der Blut-Retina-Schranke verfügt das Auge mit der Blut-Kammerwasser-Schranke über eine weitere Diffusionsbarriere. Die Blut-Kammerwasser-Schranke wird durch das nicht-pigmentierte Epithel des Ziliarkörpers, welches ebenfalls über „Tight Junctions“ verfügt, und das geschlossene Endothel der Irisgefäße gebildet (Lüllmann-Rauch & Asan, 2019).

1.2 Immunprivileg des Auges

Dem Immunsystem des Auges kommt im Vergleich zum restlichen Immunsystem eine Sonderstellung zu. Das Auge gilt als immunprivilegiert. Als immunprivilegierte Bereiche gelten Stellen in einem Organismus, an denen fremde Gewebetransplantate lange vital überdauern können ohne durch eine stattfindende Immunreaktion eine Abstoßung zu erfahren, wie es in nicht-immunprivilegierten Bereichen des Organismus normalerweise der Fall wäre (Streilein, 2003). Ein bekanntes Beispiel für das Immunprivileg des Auges ist die seit dem Beginn des 20. Jahrhunderts am Menschen mit gutem Erfolg durchführbare Kornea-Transplantation (Keratoplastik) (Niederhorn, 1990). Ein möglicher evolutionärer Grund für die Sonderstellung der Immunantwort des Auges ist, dass ein potentieller Verlust der Sehfähigkeit durch eine Immunreaktion mit Narbenbildung innerhalb des optischen Apparats und die entzündliche, immunreaktive Schädigung der Nervenzellen von Retina und Papille, die ein nur sehr begrenztes Regenerationspotential aufweisen, ein stark negativ-selektierender Faktor wäre. Dabei überwiegen die positiven Effekte eines immunprivilegierten Zustandes, der solche entzündlichen Immunreaktionen verhindert, die Risiken einer veränderten Immunsituation im Auge (Wenkel et al., 1999). Das Immunprivileg des Auges stützt sich auf das Zusammenspiel von Immunsystem und immunmodulierender intraokulärer Mikroumgebung (Jiang et al., 1993). Folgende fünf Hauptaspekte des Immunprivilegs sind bisher bekannt:

- 1) Blut-Retina-Schranke
- 2) Fehlen einer lymphatischen Drainage
- 3) Lösliche immunmodulierende Faktoren
- 4) Immunmodulierende Liganden auf der Oberfläche parenchymaler Zellen des Auges
- 5) Gewebeeigene Toleranz-vermittelnde Antigen-präsentierende Zellen (APCs)

Das Immunprivileg des Auges ist für die vordere Augenkammer bereits ausgiebig erforscht und gut belegt. Experimentell konnte gezeigt werden, dass allogene (von einem genetisch verschiedenen Individuum derselben Art stammende) Tumorzellen, die in die vordere Augenkammer eingebracht wurden, wachsen konnten, ohne durch eine Immunreaktion des Wirtes abgestoßen zu werden. Zusätzlich wurde durch die Tumorzellen eine abweichende systemische Immunantwort ausgelöst, die als Vorderkammer-assoziierte Immunabweichung (ACAID) beschrieben wird (Wenkel et al., 1999). Aufgrund des zeitlichen Zusammenhangs von ungehemmten Tumorwachstum und anhaltender ACAID geht man davon aus, dass abweichende Immunität und Immunprivileg eng miteinander verbunden sind (Wenkel et al., 1999). Das Immunprivileg des Auges kann demnach als dynamischer physiologischer Prozess verstanden werden, bei dem es unter anderem zur aktiven Herunterregulation systemischer zellvermittelter Immunität kommt (Jiang et al., 1993). Neben der Vorderkammer des Auges bietet auch der subretinale Raum das Potential eines immunprivilegierten Raums. Bereits 1993 konnte gezeigt werden, dass retinale Allografts auch im subretinalen Raum ohne entzündliche Reaktion überleben können, wohingegen es nach subkonjunktivaler Transplantation nach zwölf Tagen zu einer Abstoßung durch eine Hypersensitivitätsreaktion vom Spättyp kam. Nach Transplantation allogener Netzhaut in den subretinalen Raum blieb nicht nur die Hypersensitivitätsreaktion vom Spättyp aus, es fanden sich zudem regulatorische T-Zellen in der Milz der Empfängertiere, die die Hypersensitivitätsreaktion unterdrückten. Es zeigte sich somit auch hier sowohl ein Immunprivileg des subretinalen Raums als auch eine abweichende systemische Immunreaktion, die der ACAID ähnelt (Jiang et al., 1993). Ähnliche Ergebnisse konnten auch nach der subretinalen (wiederum im Vergleich zur subkonjunktivalen) Transplantation von allogenen RPE-Zellen gezeigt werden (Jiang et al., 1994). Hierbei muss allerdings mit in Betracht gezogen werden, dass es sich sowohl bei retinalen Pigmentepithelzellen als auch bei der Netzhaut an sich um

immunprivilegiertes Gewebe handelt und das Immunprivileg des subretinalen Raums somit nicht die einzige Erklärungsmöglichkeit darstellt. In anderen Studien konnten nach Injektion von Tumorzellen in den subretinalen Raum die Induktion einer Spender-spezifischen ACAID und ein progressives Tumorwachstum, was einem immunprivilegierten Zustand entspricht, nachgewiesen werden. In allogenen Empfängern zeigte sich allerdings nach zwei bis drei Wochen ein deutlicher Rückgang der Tumormasse. Die Spender-spezifische ACAID blieb hingegen bestehen, selbst wenn es zu einer kompletten Beseitigung der Tumormasse durch die Abstoßungsreaktion gekommen war. Die zugrundeliegenden Mechanismen, die zu einer Abstoßungsreaktion trotz des Immunprivilegs führen, werden noch diskutiert. Ein mitverursachender Faktor könnte das größere operative Trauma sein, welches bei der subretinalen Transplantation im Vergleich zur Vorderkammer-Transplantation nötig ist. Trotzdem lässt sich zusammenfassend sagen, dass der subretinale Raum die Fähigkeit zur Induktion einer abweichenden Immunantwort besitzt und zumindest temporär auch ein Immunprivileg bietet (Wenkel et al., 1999)

1.3 Retinale Degeneration und neuronaler Umbau (retinales Remodeling)

Retinale Degeneration, unabhängig von der auslösenden Ursache, führt häufig zu einem Verlust an Photorezeptoren. Durch den Verlust des photorezeptiven, ersten Neurons der Sehbahn verlieren die nachgeschalteten Neurone ihre Afferenzen. Der Verlust von Afferenzen ist im ZNS ein Reiz für neuronalen Umbau (geläufiger „Remodeling“). Durch Jones et al. werden diese Prozesse in drei Phasen unterteilt. Die erste Phase wird durch die frühe Reaktion auf Stress gebildet. In dieser Phase kommt es zu einer Verkürzung der Stäbchen-Photorezeptoren (v.a. der Außensegmente) und zu einem Umbau der synaptischen Endigungen der Photorezeptoren. Dabei können die Bipolar- und Horizontalzellen umgangen werden und die Photorezeptor-Fortsätze bis in die GCL reichen. Bei RPE-verursachten Netzhautdegenerationen kommt es als frühe Stressreaktion zu einer Veränderung der molekularen Marker und Aufhebung von Zellkontakten (Jones & Marc, 2005). In der zweiten Phase kommt es zu einem Absterben der Photorezeptoren und es werden die entstandenen Zelltrümmer durch Mikroglia phagozytiert. Zudem entsteht eine distale fibrotische Glianarbe, die durch distale Müllerzellfortsätze gebildet wird und die Netzhaut vom subretinalen Raum und vom RPE wie eine Versiegelung abtrennt (Jones & Marc, 2005). Durch das Absterben von Photorezeptoren nimmt die Dicke der ONL ab bis sie am Ende nicht mehr vorhanden ist.

In der dritten Phase kommt es zum Zelltod weiterer Nervenzellen der Retina. Müller-Zellen hypertrophieren, migrieren und dienen überlebenden Nervenzellen als Migrationspfade. Entlang dieser wandern Amakrinzellen in Richtung GCL und beteiligen sich an der Ausbildung von Mikroneuromen. Zudem wandern über Lücken in der glialen Versiegelung RPE-Zellen mit begleitenden Aderhautgefäßen in die Netzhaut ein und verdrängen die Zellen der inneren Kernschicht (Jones & Marc, 2005).

Auch nach einer Netzhautablösung („retinal detachment“) können eine Degeneration von Photorezeptoraußensegmenten, Verlust an Photorezeptoren, Müller-Zell-Hypertrophie, Veränderungen des RPEs sowie neuronales und gliales Remodeling beobachtet werden. Dabei ist die am frühesten auftretende Veränderung, die Degeneration der Außensegmente, durch ein Wiederanlegen der Retina („reattachment“) reversibel (Fisher et al., 2005). Nach der Netzhautablösung migrieren Müller-Zellkerne in äußere Retinaschichten, werden mitotisch und bilden schließlich eine subretinale Glianarbe (Lewis et al., 2010). Als Reaktion auf Stress ist zudem eine Hochregulation von Intermediärfilamenten, insbesondere von saurem Gliafaserprotein (GFAP), in radiären Müller-Gliazellen vorbeschrieben (Lewis et al., 2010; Lewis & Fisher, 2003).

1.4 Das Schweineauge als Tiermodell - Unterschiede zum menschlichen Auge

Das Schweineauge ähnelt in seinem Aufbau dem menschlichen Auge mehr als das von anderen Säugetieren, wie zum Beispiel Hund, Ziege und Rind, weshalb das Schweineauge als Tiermodell für human-ophthalmologische Erkrankungen attraktiv ist. Zudem können gängige ophthalmologische Untersuchungen, wie in etwa die optische Kohärenztomographie, auch am Schwein angewandt werden. Ein weiteres sehr gut geeignetes Tiermodell stellt der Affe dar. Hier steht allerdings aufgrund ethischer und ökonomischer Gründe ein nur begrenztes Angebot an Versuchstieren zur Verfügung. Schweineaugen sind auch in ihrer Verfügbarkeit anderen nicht-menschlichen Primatenaugen wesentlich überlegen (Ruiz-Ederra et al., 2005). Zudem eignet sich das Schweineauge als Tiermodell im Rahmen von RPE-Transplantationsprojekten mit Verwendung einer Trägermembran besonders gut, da im Gegensatz zu anderen gängigen Tiermodellen (Maus, Ratte) fast kein Größenunterschied zum menschlichen Auge besteht.

Die Besonderheit des Schweineauges als Tiermodell für menschliche Netzhauterkrankungen ist, dass das Schwein im Gegensatz zum Menschen zwar keine Makula lutea und Fovea centralis besitzt, es aber den Bereich einer sogenannten Area centralis gibt, die der humanen Makula in ihrem Aufbau ähnelt. Dabei handelt es sich um einen schmalen horizontalen Netzhautbereich, der wie die humane Makula ebenfalls eine starke Zapfenanreicherung und eine besonders hohe Ganglienzelldichte aufweist (Hebel, 1976; Monés et al., 2016). Diese Erkenntnis löste die vorbestehende Auffassung ab, dass beim Schwein eine gleichmäßige Verteilung von Zapfen-Photorezeptoren mit einem konstanten Zapfen-zu-Stäbchen-Verhältnis für alle Retinaanteile vorliegen würde (Beauchemin, 1974). Zudem ähneln sich das menschliche und das porcine Auge im strukturellen Aufbau des Retina/RPE/Choroidea-Komplexes, wobei die feste Interaktion zwischen RPE und der Bruch'schen Membran ebenfalls durch Integrine vermittelt wird und die Retinae beider Spezies ein ähnliches Zapfen-Stäbchen-Verhältnis aufweisen (Monés et al., 2016). Die einzelnen Schichten der Retina beider Spezies sind vergleichsweise gleich dick, bis auf die Nervenfaserschicht, die sich beim Schwein etwas dicker darstellt (siehe Abbildung 3) (Beauchemin, 1974).

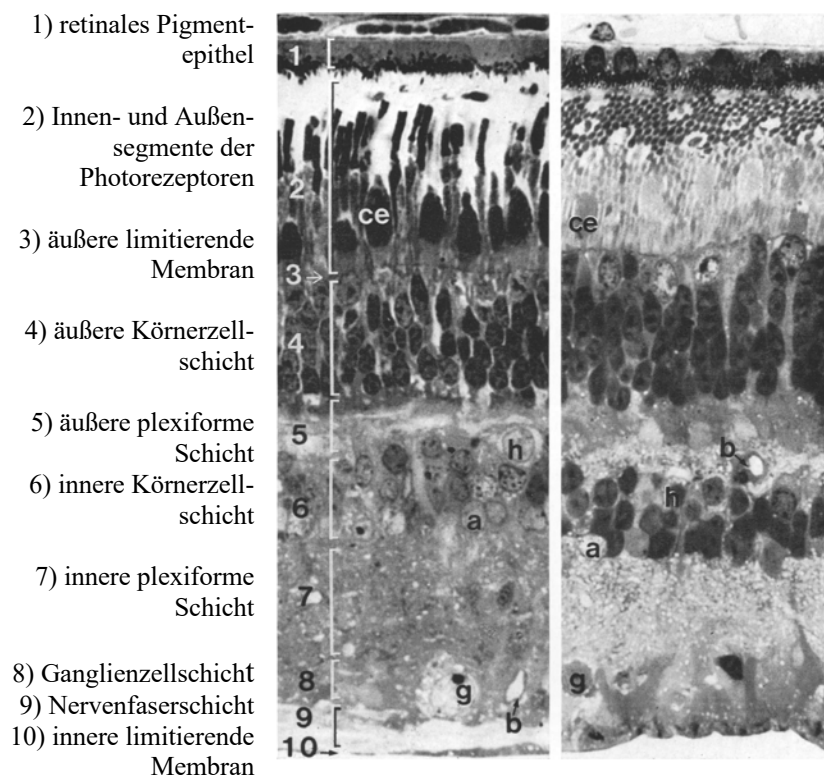


Abbildung 3: Semi-Dünnschnitte der porcinen (links) und der humanen (rechts) Retina im Vergleich. Modifiziert nach (Beauchemin, 1974).

1.5 Altersbedingte Makuladegeneration

Bei der altersbedingten Makuladegeneration (AMD) handelt es sich um eine degenerative Erkrankung der äußeren Netzhautschichten und des retinalen Pigmentepithels, welcher eine komplexe und multifaktorielle Ätiologie zugrunde liegt (Bertram et al., 2015). In Industrienationen führt diese Erkrankung die Liste der häufigsten Erblindungsursachen bei Personen über 65 Jahren an, gefolgt vom Glaukom und der diabetischen Retinopathie. Die degenerativen Prozesse treten beidseits im Bereich der Makula auf. Die AMD ist eine Erkrankung des höheren Lebensalters und manifestiert sich in der Regel nicht vor einem Alter von 55 Jahren. Obwohl die Makula nur vier Prozent der Retina ausmacht, deckt sie zehn Prozent des gesamten Gesichtsfeldes ab und ist für das zentrale und scharfe Sehen und somit für den Großteil unserer nützlichen Sehfähigkeit verantwortlich. In fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung kommt es zu einer erheblichen Einschränkung der zentralen Sehfähigkeit, was mit einer Behinderung im Alltag, wie zum Beispiel beim Lesen und Auto fahren, einhergeht und die Lebensqualität der Patienten einschränkt (Hageman et al., 2008). Neben dem Lebensalter gelten auch Rauchen, eine ungesunde Ernährungsweise sowie eine genetische Prädisposition als Risikofaktoren für die Entwicklung einer AMD. Für die genetische Prädisposition ist unter anderem eine Variation des Faktor H-Gens beschrieben, welche bei Heterozygoten mit einem zwei- bis dreifach und bei Homozygoten mit einem fünf- bis sechsfach erhöhten AMD-Risiko einhergeht (Binder et al., 2007). In frühen Stadien manifestiert sich die Erkrankung durch extrazelluläre Ablagerungen von Stoffwechselprodukten zwischen der Basallamina des RPEs und der Bruch-Membran, welche Drusen genannt werden. Diese können in harte Drusen mit einem Durchmesser kleiner als 0,63 mm und scharfer Begrenzung und weiche Drusen mit einem Durchmesser größer als 0,63 mm und unscharfer Begrenzung unterteilt werden. Eine Dysfunktionalität des RPEs, welche eine wichtige Rolle in der Entwicklung einer AMD einnimmt, führt zu sichtbaren Hyper- und Depigmentierungen (Binder et al., 2007). In späteren Erkrankungsstadien lassen sich klinisch eine „trockene“ und „feuchte“ Verlaufsform unterscheiden.

Bei der „trockenen“ Form der AMD kommt es zu einem Untergang der retinalen Pigmentepithelzellen, der Choriokapillaris und der äußeren Retinaschichten. Die „feuchte“ Verlaufsform der AMD ist durch chorioidale Neovaskularisationen, Abhebung und Risse des RPEs sowie im Endstadium durch eine disziforme Vernarbung gekennzeichnet (Bertram et al., 2015). Vereinfacht lässt sich sagen, dass es sich um die

„trockene“ Form der AMD handelt, solange die Bruch-Membran intakt ist, und man von der „feuchten“ Form der AMD spricht, sobald chorioidale Neovaskularisationen die Bruch-Membran penetrieren und im Blutstrom zirkulierende Zellen die geschädigten Retinaareale erreichen können (Szatmári-Tóth et al., 2016). Die AMD wird als chronisch voranschreitender Prozess verstanden, bei dem sich häufig zunächst die „trockene“ beziehungsweise atrophe Form der AMD manifestiert. Mit 85-90% macht die „trockene“ Form der AMD den Großteil der AMD-Erkrankungsfälle aus. Im Vergleich zur „feuchten“ AMD sind die Seheinschränkungen bei der „trockenen“ AMD vor allem initial deutlich geringer ausgeprägt. Allerdings kommt es bei 30-35% der „trockenen“ AMD-Verläufe im Spätstadium zum Auftreten einer geographischen Atrophie mit hochgradigen Einschränkungen der Sehfähigkeit (Schmitz-Valckenberg & Holz, 2010). Bei 10-15% aller AMD-Patienten kommt es entweder zur initialen Manifestation einer „feuchten“ AMD oder zu einem Progress zur „feuchten“ AMD aus der „trockenen“ Verlaufsform. Die „feuchte“ Form der AMD ist mit einem schnelleren klinischen Progress sowie einer höhergradigen Einschränkung der Sehfähigkeit verbunden und führt demnach häufiger zur Erblindung. Eine wichtige Komplikation der „feuchten“ AMD ist die subretinale Blutung aus den chorioidalen Neovaskularisationen, was ebenfalls zu einer plötzlichen, starken klinischen Verschlechterung führen kann. Das Risiko für das Auftreten einer subretinalen Blutung ist bei Patienten, die aufgrund ihrer Komorbiditäten eine Antikoagulation erhalten, erhöht. Obwohl die „trockene“ Form der AMD im Vergleich zur „feuchten“ AMD seltener zur Erblindung führt, ist die „trockene“ Form der AMD aufgrund ihrer Häufigkeit (85-90% der Fälle), für circa 20% der Erblindungen aufgrund einer altersbedingten Makuladegeneration verantwortlich (Hageman et al., 2008). Insbesondere im Hinblick auf eine alternde Bevölkerung ist mit einer weiteren Zunahme an Erblindungen durch die „trockene“ Form der AMD in Spätstadien mit geographischer Atrophie zu rechnen (Schmitz-Valckenberg & Holz, 2010).

Photorezeptoren, retinales Pigmentepithel, Bruch-Membran und Choriokapillaris stehen physiologischerweise in einer engen symbiotischen Beziehung. In der Pathophysiologie der AMD ist das harmonische Zusammenspiel dieser Komponenten gestört und insbesondere die Dysfunktionalität des RPEs ist bei der Krankheitsentwicklung von großer Bedeutung. Bei der „trockenen“ beziehungsweise atropen Form der AMD kommt es initial zu einer großen konfluierenden Drusenbildung und Hyperpigmentierung durch eine Dysfunktion des retinalen Pigmentepithels. Resorption dieser Drusen und

Verlust an vitalem RPE (Hypopigmentierung) stellen eine Progression zur geographischen Atrophie dar. Dadurch kann das RPE seinen physiologischen Aufgaben, wie unter anderem Phagozytose und Regeneration der abgestoßenen Photorezeptor-Außensegmente, nicht mehr ausreichend nachkommen. Dysfunktion und Absterben von Photorezeptoren und Choriokapillaris werden als sekundäre Folgen des Verlusts an vitalem RPE verstanden. Das retinale Pigmentepithel spielt daher eine zentrale Rolle in der Entwicklung der AMD (Bhutto & Luty, 2012). Bei der „feuchten“ Form der AMD könnte neben der Progression aus einer „trockenen“ AMD auch der Verlust chorioidaler Gefäße ein initialer ätiologischer Faktor sein. Es wird eine Abnahme der Choriokapillaris mit intakter RPE-Schicht beobachtet, was auf eine mögliche Minderversorgung mit Blut zurückzuführen ist. Zudem stellt sich ein proinflammatorisches Milieu ein, was zusätzlich zum Absterben oder zur Dysfunktion der Choriokapillaris führt. Als Folge dessen wird das RPE minderversorgt und dadurch hypoxisch, was das RPE zur Ausschüttung angiogenetischer Substanzen wie VEGF anregt. Dies führt zur Neubildung von chorioidalen Gefäßen, den chorioidalen Neovaskularisationen. Auch hier kommt es somit zu einer Dysfunktion des RPEs und die Photorezeptoren sterben aufgrund der Nährstoffminderversorgung, Austritt der Blutkomponenten aus den Neovaskularisationen und Narbenbildung ab (Bhutto & Luty, 2012). Bei beiden Formen der AMD ist somit das harmonische Zusammenspiel von Photorezeptoren, RPE, Bruch-Membran und Choriokapillaris gestört, was letztendlich zu einer Dysfunktion und Absterben aller Komponenten führen kann (Bhutto & Luty, 2012).

1.5.1 Bisherige Therapiemöglichkeiten

Die therapeutischen Optionen in Bezug auf die AMD sind bisher sehr limitiert. Eine kausale Therapie gibt es derzeit nicht und alle therapeutischen Ansätze konzentrieren sich darauf, den Progress der Erkrankung zu verlangsamen und somit die Erblindung zu verzögern oder zu verhindern. Daher nehmen sekundärpräventive Untersuchungen ab dem 55. Lebensjahr zur Früherkennung behandlungsbedürftiger Stadien eine wichtige Rolle ein. Bei beiden Formen der AMD wird zudem strikt von einer Fortführung eines gegebenenfalls bestehenden Nikotinkonsums abgeraten. Zudem kommen unterstützend vergrößernde Sehhilfen, Vorlesegeräte und Computer mit Sprachausgabe zum Einsatz. Etablierte invasive Behandlungsmöglichkeiten bestehen bisher nur bei der „feuchten“ Form der AMD. Hier steht die intravitreale Applikation von VEGF-Inhibitoren (Ranibizumab, Bevacizumab (off-label)) als therapeutische Maßnahme zur Verfügung

(intravitreale operative Medikamenteneingabe) (Bertram et al., 2015). Der Einsatz der anti-VEGF-Therapie gilt als medizinischer Durchbruch für die Therapie der „feuchten“ AMD. Anhand von Datenerhebungen in den USA und mathematischen Berechnungen wird der monatlichen intravitrealen Applikation von Ranibizumab bei „feuchter“ AMD eine Reduktion der Erblindungsinzidenz um 72% innerhalb von 2 Jahren zugeschrieben (Bressler et al., 2011). Zudem können Neovaskularisationen bei der „feuchten“ AMD mittels Laser oder photodynamischer Therapie (PDT) verödet werden (Hageman et al., 2008). In Einzelfällen können bei subretinalen Blutungen makulachirurgische Verfahren zum Einsatz kommen. Bei bestimmten Stadien wird die tägliche Supplementation mit Antioxidantien, Zink- und Kupferoxid empfohlen (Bertram et al., 2015). Andere operative Ansätze, wie Makulatransloktion und Netzhautrotation, haben bisher eher einen experimentellen Charakter inne und finden sich nicht in den Leitlinien der Therapie der AMD wieder (Hageman et al., 2008). In Bezug auf die „trockene“ Form der AMD werden derzeit verschiedene Angriffspunkte als mögliche Therapieoptionen untersucht. Gegenstand der Forschung sind diesbezüglich die Bereiche Komplementinhibition, Neuroprotektion, Modulation des visuellen Zyklus, Zell-basierte Therapien und antiinflammatorische Therapie (Ammar et al., 2020). Insgesamt lässt sich sagen, dass es trotz des erfreulichen Durchbruchs in der Therapie der „feuchten“ AMD, noch keine etablierten therapeutischen Optionen für die „trockene“ Form der AMD gibt. Da diese aber bereits jetzt schon einen Großteil der Fälle an Altersbedingter Makuladegeneration ausmacht und in Hinblick auf die alternde Bevölkerung zudem für einen stetig zunehmenden Anteil der Erblindungsursachen ursächlich sein wird, ist die Entwicklung therapeutischer Ansätze auch für diese Form der AMD von enormer Wichtigkeit.

1.6 Transplantation retinaler Pigmentepithelzellen als Therapieansatz für degenerative Retinaerkrankungen

Unter den in Kapitel 1.5.1 genannten möglichen Angriffspunkten in der Therapieentwicklung für die „trockene“ AMD fällt die Transplantation retinaler Pigmentepithelzellen in den Bereich der Zell-basierten Therapien. Wie bereits in den vorangegangenen Kapiteln erläutert wird davon ausgegangen, dass die Dysfunktionalität des RPEs eine Schlüsselrolle in der Entwicklung der AMD und anderer degenerativer Retinaerkrankungen spielt. Ziel der Forschung an RPE-Transplantationen ist der Ersatz der protektiven Funktionen des RPEs, welche durch die degenerativen Veränderungen der RPE-Zellen verloren gegangen sind, durch die Einbringung „frischer“ funktionstüchtiger RPE-Zellen (Ammar et al., 2020), wodurch ein Krankheitsprogress verhindert werden soll. Da, wie in Kapitel 1.2 beschrieben, der subretinale Raum, in dem sich beziehungsweise an dem sich angrenzend das RPE befindet, eine immunprivilegierte Mikroumgebung aufweist, bieten sich hier Transplantationsversuche an. Erste Hinweise auf das therapeutische Potential von RPE-Transplantationen konnten bereits 1988 von Li und Kollegen am „Royal College of Surgeons“ (RCS) – Rattenmodell erbracht werden. Bei den RCS-Ratten liegt aufgrund eines genetischen Defekts eine Dysfunktionalität des RPEs vor. Infolge der gestörten RPE-Funktion kommt es bei den RCS-Ratten zwei bis drei Monate nach der Geburt zu einer hochgradigen Reduktion der Photorezeptorenanzahl und somit auch zu einer Schrumpfung der ONL. Das RCS-Rattenmodell eignet sich daher unter bestimmten Voraussetzungen als Tiermodell für Erkrankungen mit retinaler Dystrophie. Li und Kollegen zeigten in ihren Experimenten erstmalig, dass die Injektion gesunder retinaler Pigmentepithelzellen in den subretinalen Raum der RCS-Ratten die Photorezeptoren vor Degeneration schützt (Li & Turner, 1988). Das RCS-Rattenmodell muss allerdings auch kritisch hinterfragt werden, da in neueren Studien zum Teil auch positive Auswirkungen auf die Photorezeptorengesundheit durch Placebo-Operationen gezeigt werden konnten und die zugrundeliegenden Mechanismen weiter diskutiert werden müssen (Pardue et al., 2005). Seitdem wurde weiter an Transplantationsmöglichkeiten von RPE-Zellen geforscht und es haben sich unterschiedliche Forschungsansätze herausgebildet. Diese lassen sich zum einen durch die Art der Einbringung der Zellen in den subretinalen Raum als auch nach Zellursprung unterteilen.

1.6.1 Ursprungszellen

Bezüglich des Zellursprungs finden sich Stammzell-basierte und nicht Stammzell-basierte Konzepte. Im Bereich der Stammzell-basierten Konzepte lassen sich Forschungsansätze mit dem Einsatz von induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSCs) und Forschungsansätze mit dem Einsatz humaner embryonaler Stammzellen (hESCs) unterscheiden. Induzierte pluripotente Stammzellen (iPSCs) werden in Reprogrammierungsverfahren durch Dedifferenzierung bereits differenzierter Zellen hergestellt. Anschließend können die iPSCs zur Differenzierung in eine Vielzahl anderer Zelltypen angeregt werden, unter anderem auch zur Differenzierung in RPE-Zellen. Das Potential dieses Forschungsfeldes ist groß. Potentielle Risiken könnten aufgrund des breiten Differenzierungspotentials in der potentiellen Differenzierung der iPSCs in kanzerogene Zelltypen oder inkorrekte Zelltypen liegen. Zudem handelt es sich bei diesen Zellen häufig um patienteneigene, autologe Zellen. Dies bietet das Risiko, dass genetische Veränderungen, die eventuell der Entwicklung einer AMD zugrunde lagen, auch in den transplantierten Zellen zu finden sind (Ammar et al., 2020). Auf der anderen Seite liegt gerade in der Möglichkeit zur Transplantation autologer Zellen der Vorteil eines geringeren Abstoßungsrisikos. Die Forschung an RPE-Transplantationen basierend auf iPSCs wurde in den letzten Jahren stark vorangetrieben. Aktuell wird eine Phase-1-Studie entworfen, die noch vor der FDA (Food and Drug Administration)-Zulassung steht (Ammar et al., 2020). hESCs werden aus menschlichen in-vitro gezüchteten Embryonen gewonnen, wozu sich das Verfahren der in-vitro-Fertilisation zu Nutze gemacht wird. Daher handelt es sich bei der Transplantation von RPE-Zellen, die aus hESCs abgeleitet wurden, um allogene Transplantationen, die ein Risiko für Abstoßungsreaktionen mit sich bringen. Zudem kommt hier die Diskussion der ethischen Frage auf. In Phase 1/2-Studien konnte ein gutes, klinisches Sicherheitsprofil für die Transplantation einer ersten hESC-RPE-Zellreihe (MA09-hRPE) in Suspension an Patienten mit Makuladegeneration aufgrund einer AMD oder Morbus Stargardt gezeigt werden (Schwartz et al., 2015; Qiu, 2019). Immunologische Abstoßungsreaktionen konnten zudem durch Immunsuppressiva und Steroide gut kontrolliert werden. Als bisheriges Hauptproblem wurden biologische und metabolische Defizite der transplantierten Zellen im Vergleich zu gesunden, ursprünglichen RPE-Zellen beschrieben. Die Fähigkeit zur Übernahme der RPE-Funktionen durch die transplantierten Zellen ist aber essentiell für das Transplantatüberleben, Verlangsamung des Krankheitsprozesses und Verbesserung der Sehfähigkeit. Die Forschung an hESC-RPE-Zellen zielt derzeit unter anderem auf die

Entwicklung von Kultivierungsmethoden ab, mit denen eine hESC-RPE-Zelllinie mit umfassender biologischer Kompetenz gezüchtet werden kann (Qiu, 2019). Der Differenzierungsprozess der Stammzellen (iPSCs und hESCs) zu RPE-Zellen unterliegt einer gewissen Spontanität, wodurch eine Konstanz des Gens- und Funktionsniveaus schwer und nur durch großen Aufwand zu erreichen ist. Dies gestaltet den Entwicklungsprozess der RPE-Zellen bei Stammzell-basierten Verfahren zeit- und kostaufwendig (Lytvynchuk, Ebbert et al., 2022).

Bei der Verwendung primärer RPE-Zellen handelt es sich bereits um differenzierte RPE-Zellen, wodurch sich der Entwicklungsprozess im Vergleich zu Stammzell-basierten Verfahren schneller und kosteneffektiver gestaltet und zudem das karzinogene Risiko geringer ist. Obwohl in mehreren Studien die angezüchteten iPSC- und hESC-RPE-Zelllinien hinsichtlich ihrer Funktionalität in den Bereichen Phagozytose, Polarität, Aufrechterhaltung eines Zellverbandes und immunologisches Potential mit kultivierten primären RPE-Zellen als Referenzwert verglichen werden (Sugita et al., 2021; Liao et al., 2010), fehlt es bislang an Studien zur Erforschung von Transplantationen primärer RPE-Zellen. In einer aktuellen Übersichtsarbeit bezüglich des Forschungsstandes auf dem Gebiet therapeutischer RPE-Zell-Transplantationen lassen sich bisher nur stammzellbasierte Verfahren finden (Sharma et al., 2020). In den letzten Jahren wurden mehrere Protokolle zur Kultivierung primärer humaner RPE-Zellen entwickelt, für die sich nach Abschluss der Kultivierung hohe morphologische Ähnlichkeiten und eine erhaltene Marker-Expression im Vergleich zum nativen humanen RPE nachweisen ließen (Hu & Bok, 2010; Maminishkis et al., 2006; Mazzoni et al., 2014). Daraus ergeben sich die methodischen Möglichkeiten und der wissenschaftliche Forschungsbedarf auf dem Gebiet der therapeutischen Transplantation primärer RPE-Zellen.

1.6.2 Implantationstechniken

Um retinale Pigmentepithelzellen in den subretinalen Raum einzubringen, stehen unterschiedliche Möglichkeiten zur Verfügung. Zum einen können die Zellen als Zellsuspension gespritzt oder zum anderen auf einer biologischen Trägermembran oder als selbsttragende Zellschicht implantiert werden (Popelka et al., 2015). Wie bereits erläutert gehören zu den Funktionen des RPEs nicht nur zelluläre Prozesse wie Phagozytose und Erneuerung der Photorezeptor-Außensegmente, Absorption von Streulicht durch die Pigmentierung und metabolische Funktionen, sondern auch der

Aufbau der Blut-Retina-Schranke und somit auch die Aufrechterhaltung einer immunprivilegierten Mikroumgebung des Auges. Für letztere Aspekte ist die polarisierte Organisation des RPEs als einschichtige Zellschicht mit engen Zell-Zell-Kontakten in Form von „Tight Junctions“ essentiell (Diniz et al., 2013).

In bisherigen Studien mit Transplantation der RPE-Zellen in Form von Zellsuspensionen konnte keine Ausbildung einer zusammenhängenden, einschichtigen Zellschicht nachgewiesen werden. Ohne Ausbildung einer zusammenhängenden Zellschicht kann die Barrierefunktion des RPEs nicht erfüllt werden, was das langfristige Überleben der transplantierten Zellen negativ beeinflusst (R. Sharma et al., 2019). Dies stellt einen erheblichen Nachteil der Transplantationen als Zellsuspension dar und relativiert die Vorteile der schnellen, einfachen und wenig-invasiven Art der Transplantation. Daher wurden Konzepte entwickelt, RPE-Zellen bereits als polarisierte Zellschicht zu transplantieren. Hierzu werden die RPE-Zellen entweder als selbsttragende Zellschicht oder auf einer Trägermembran, die die Bruch-Membran imitieren soll, angezchtet. Ein weiterer Vorteil dieser Verfahren ist, neben dem Erhalt der Polarität des RPEs, dass die Zellen bereits in einem hochdifferenzierten Zustand transplantiert werden und daher ihre metabolische Aktivität direkt nach der Transplantation ausüben und leichter ihren epithelialen Phänotyp zurückerlangen können (Popelka et al., 2015). Diniz et al. konnten in einem vergleichenden Studiendesign ein verbessertes Zellüberleben und das Vorhandensein einer polarisierten Zellschicht nach Transplantation von hESC-RPE-Zellen auf einer Trägermembran im Vergleich zur Transplantation als Zellsuspension im Tiermodell zeigen (Diniz et al., 2013). Passend zu diesen Ergebnissen konnte in Studien an menschlichen Patienten in einigen Fällen beobachtet werden, dass die hESC-RPE-Zellen nach Transplantation als Zellsuspension beeinträchtigt waren (R. Sharma et al., 2019). Sharma et al. konnten an zwei Tiermodellen zudem eine Integration von RPE-Zellen, welche auf einer abbaubaren Trägermembran in den subretinalen Raum eingebracht worden waren, in das RPE beziehungsweise auf die Bruch-Membran nachweisen, während dies für als Zellsuspension transplantierte RPE-Zellen nicht nachgewiesen werden konnte (R. Sharma et al., 2019). Im Gegensatz zu Zellsuspensionen konnten für polarisierte, einschichtige RPE-Zellschichten auf der Trägermembran eine Vielzahl an RPE-Funktionen nachgewiesen werden (Sharma et al., 2019).

Im Vergleich zu den Transplantationen von selbsttragenden RPE-Zellschichten weist die Transplantation von RPE-Zellen, die sich auf einer unterstützenden Trägermembran befinden, noch weitere Vorteile auf. Die Trägermembran verhindert durch die zusätzliche Stabilität Faltenbildung und erlaubt eine exakte Positionierung des Implantats während des Eingriffs. Die Transplantation von RPE-Zellen auf einer Trägermembran könnte somit zu einem verbesserten Zellüberleben und zu einer effizienteren Integration und somit auch Funktion der RPE-Zellen im Vergleich zu den anderen Transplantationstechniken beitragen. Ein Nachteil dieses Verfahrens liegt in dem aufwendigeren und invasiveren operativen Eingriff, bei dem unter anderem eine Sklerotomie und Retinotomie nötig sind. Dies birgt das Risiko von Narbenbildung, Fibrosierung und Schädigung der retinalen Schichten während des Eingriffs. Zudem beeinträchtigt jede zusätzliche Trennung von RPE und Choriokapillaris die Versorgung der transplantierten Zellen und äußeren Retinaschichten. Daher müssen die Trägermembranen eine hohe Porosität, große Porengröße und geringe Dicke aufweisen, um die Versorgung durch Diffusion so wenig wie möglich zu beeinträchtigen (Popelka et al., 2015).

1.7 Ziel der Arbeit

Eingebettet in den Kontext der Forschung an RPE-Transplantationen zur Entwicklung von Therapieansätzen für degenerative Netzhauterkrankungen erfolgte im Rahmen des übergeordneten Projekts die Transplantation primärer, humaner RPE-Zellen auf einer ultradünnen Trägermembran in den subretinalen Raum jeweils eines Auges von fünf immunsupprimierten Versuchsschweinen. Zu den Zeitpunkten ein, zwei, sechs und acht Wochen nach Implantation wurden die Versuchstiere euthanasiert und es erfolgte die E nukleation der Augen. Ziel dieser Arbeit war es, die Schweineretinae sowie die Implantatbereiche hinsichtlich morphologischer Veränderungen zu den unterschiedlichen Beobachtungszeitpunkten immunhistochemisch zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Chemikalien in alphabetischer Reihenfolge.

| Chemikalie | Hersteller, Ort |
|--|--|
| Bovines Serum Albumin (BSA) Fraktion V | <i>Serva</i> , Heidelberg, Deutschland |
| Di-Natriumhydrogenphosphat Heptahydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) | <i>Carl Roth</i> , Karlsruhe, Deutschland |
| Ethanol absolut | <i>Carl Roth</i> , Karlsruhe, Deutschland |
| Essigsäure (Eisessig) | |
| Natriumchlorid (NaCl) | <i>Carl Roth</i> , Karlsruhe, Deutschland |
| Natrumcitrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) | <i>Merck</i> , Darmstadt, Deutschland |
| Natriumdihydrogenphosphat- Monohydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) | <i>Merck</i> , Darmstadt, Deutschland |
| Normal Donkey Serum (NDS) | <i>Sigma-Aldrich</i> , Steinheim, Deutschland |
| Salzsäure rauchend 37 % (HCl) | <i>Merck</i> , Darmstadt, Deutschland |
| Triton X-100 (rein) | <i>Carl Roth</i> , Karlsruhe, Deutschland |
| Tween 20 | <i>Carl Roth</i> , Karlsruhe, Deutschland |

2.1.2 Puffer und Medien

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Puffer und Medien in alphabetischer Reihenfolge.

| Puffer/Medium | Zusammensetzung |
|---|--|
| Antikörpermedium | 1,5 ml (3 %) NDS 0,5 g (1%) BSA 250 μl (0,5 %) Triton X-100 48 ml 0,1 M PBS |
| Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) 0,2 M | 4,14 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 11,68 g NaCl 45,57 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ |

| | |
|---|--|
| | Salz in ca. 800 ml Aqua dest. lösen und anschließend auf 1000 ml auffüllen. |
| Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) 0,1 M, pH 7,4 | 500 ml 0,2 M PBS + 500 ml Aqua dest., pH 7,4 einstellen |
| Sodiumcitrat-Puffer (Antigendemaskierungs-Puffer) | 2,94 g Natriumcitrat (Dihydrate) (10mM) 0.5 mL Tween 20 (0,05%) In 1000 mL Wasser lösen und auf pH 6,0 mit 37% HCL einstellen |

2.1.3 Färbelösungen

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Färbelösungen in alphabetischer Reihenfolge.

| Färbelösung | |
|--|---|
| 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) | DAPI Stammlösung 0,1 mg/ml 1:1000 in PBS |
| Eosin G-Lösung 0,5 % wässrig | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Hämatoxylinlösung nach Gill II | <i>Carl Roth</i> , Karlsruhe, Deutschland |
| In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein (11684795910) – TUNEL-Assay | <i>Roche</i> , Basel, Schweiz |

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien in alphabetischer Reihenfolge.

| Verbrauchsmaterial | Hersteller, Ort |
|---|---|
| Dako Fluorescence Mounting Medium Code S3023 | <i>Agilent Dako</i> , Santa Clara, United States |
| Deckgläser 24x50 mm Für Objektträger | <i>Carl Roth</i> , Karlsruhe, Deutschland |
| Färbekammer für Objektträger (StainTray™) | <i>Science Services GmbH</i> , München, GmbH |
| Färbeküvette 120 ml | <i>VWR International GmbH</i> , Darmstadt, Deutschland |
| GE Healthcare Amersham™ Hyperfilm ECL | <i>Fisher Scientific</i> , Leicestershire, Vereinigtes Königreich |

| | |
|--|--|
| Hellendahl-Küvette 80 ml | <i>VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland</i> |
| Olympus IMMOIL-F30CC Immersion Oil Type F | <i>Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland</i> |
| Objekträgerkasten mit 50 und 100 Stellplätzen | <i>Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland</i> |
| Pap Pen | <i>Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland</i> |
| Parafilm | <i>VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland</i> |
| Pipettenspitzen | <i>Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland; Corning Inc., New York, USA</i> |
| Rasierklingen | <i>Gebr. Martin, Tuttlingen, Deutschland</i> |
| Roti ® - Histokitt II | <i>Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland</i> |
| Super Frost ® Plus Objekträger | <i>Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland</i> |
| Tissue-Tek® O.C.T.™ COMPOUND | <i>Sakura Finetik, Alphen aan den Rijn, Niederlande</i> |
| Tissue Tek® Cryomold® | <i>Sakura Finetik, Alphen aan den Rijn, Niederlande</i> |

2.1.5 Geräte

Tabelle 5: Auflistung der benutzten Geräte in alphabetischer Reihenfolge.

| Gerät | Hersteller, Ort |
|---|---|
| Biomtra WT 17 Wippschüttler | <i>Analytik Jena, Jena, Deutschland</i> |
| Fluoreszenz-Mikroskop Biozero | <i>Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland</i> |
| Konfokales Laser Scanning Mikroskop Fluoview FV10i | <i>Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland</i> |
| <i>Kryostat MEV</i> | <i>SLEE medical GmbH, Mainz, Deutschland</i> |

| | |
|---|---|
| <i>Lichtmikroskop, Motic Zoom-Stereomikroskop SMZ-168-BLED, binokular, 7,5x-50x</i> | <i>MoticEurope, Barcelona, Spanien</i> |
| <i>Magnetrührer</i> | <i>IKA, Staufen, Deutschland</i> |
| <i>Mikrowelle</i> | <i>Siemens, München, Deutschland</i> |
| <i>pH Messgerät</i> | <i>Mettler Toledo GmbH, Gießen, Deutschland</i> |
| <i>Vortex Mischer</i> | <i>VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland</i> |
| <i>Waage</i> | <i>Ohaus, Zürich, Österreich</i> |
| <i>Zentrifuge 1-15 PK</i> | <i>Sigma, Osterode am Harz, Deutschland</i> |
| <i>Zentrifuge, Mini Star</i> | <i>VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland</i> |

2.1.6 Primärantikörper

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Primärantikörper mit Angabe der Bestellnummer, des Wirtstiers, der Reaktivität, der verwendeten Verdünnungsstufe sowie des Herstellers in alphabetischer Reihenfolge.

| Antikörper mit Bestellnummer | Wirt & Reaktivität | Verd. | Hersteller, Ort |
|-------------------------------------|---|--------------|--|
| Bestrophin (E6-6): sc-32792 | Maus gegen Mensch | 1:100 | <i>Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA</i> |
| CRALBP (B2) NB100-74392 | Maus gegen Mensch, Maus, Ratte, Schwein, Primat | 1:100 | <i>Novus Biologicals, Abingdon, UK</i> |
| GFAP #AB5804 | Kaninchen gegen Mensch, Ratte, Schwein, Hund | 1:1.000 | <i>Merck, Darmstadt, DE</i> |

| | | | |
|--|--|--------------|--|
| HNAA (235-1) NBP2-34342- 0.1mg | Maus gegen Mensch | 1:300 | <i>Novus Biologicals, Abingdon, UK</i> |
| Iba1 (1022-5) ab15690 | Maus gegen Mensch | 1:200 | <i>Abcam, Cambridge, UK</i> |
| PKC-alpha P 4334 | Kaninchen gegen Maus, Ratte | 1: 10.000 | <i>Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA</i> |
| Lectin PNA Conjugate Alexa Fluor 488, L-21409 | | 1:300 | <i>Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA</i> |
| STEM121 Y40410 | Maus gegen Mensch | 1:1.000 | <i>Takara Bio Inc., Kusatsu, Japan</i> |
| Vimentin (V9) (ab8069) | Maus gegen Katze, Kuh, Hund, Pferd, Mensch, Schwein, Ratte | 1:250 | <i>Abcam, Cambridge, UK</i> |

2.1.6.1 Nicht verwertbare Immunfärbungen

Tabelle 7: Auflistung der Primärantikörper, mit denen eine Immunfärbung durchgeführt wurde aber deren Färbeargebnisse aufgrund fehlender Aussagekraft nicht in die Auswertung mit eingeflossen sind. Auflistung mit Angabe der Bestellnummer, des Wirtstiers, der Reaktivität, der verwendeten Verdünnungsstufe sowie des Herstellers in alphabetischer Reihenfolge.

| Antikörper mit Bestellnummer | Wirt & Reaktivität | Verd. | Hersteller, Ort |
|---|-----------------------------------|--------------|--|
| Bestrophin (C- 14): sc-22027 | Ziege gegen Mensch | 1:50 | <i>Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA</i> |

| | | | |
|--|------------------------------------|-------|--|
| CRALBP (H-100): sc-28193 | Kaninchen gegen Mensch | 1:100 | <i>Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA</i> |
| Collagen IV, A5 (PAB17513) | Kaninchen gegen Mensch, Maus | 1:100 | <i>Abnova, Tiapoh, Taiwan</i> |
| Collagen IV, A6 (PAB17514) | Kaninchen gegen Mensch. | 1:100 | <i>Abnova, Tiapoh, Taiwan</i> |
| L/M-Opsin: OPN1MW/MW2 /LW (K-19): sc- 22117 | Ziege gegen Mensch | 1:600 | <i>Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA</i> |
| Rhodopsin MAB5356 | Maus gegen Rind | 1:500 | <i>Millipore, Temecula (CA), USA</i> |
| RPE-65 <i>Datenblatt nicht vorhanden</i> | Kaninchen gegen.. | 1:100 | |
| S-Opsin: OPN1SW (N- 20): sc-14363 | Ziege gegen Mensch | 1:600 | <i>Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA</i> |

Die in Tabelle 7 aufgeführten Primärantikörper gegen Bestrophin und Cralbp zeigten schwache Färbesignale und wurden jeweils durch kräftiger und eindeutig spezifisch färbende, monoklonale Primärantikörper, die in Tabelle 6 aufgeführt sind, ersetzt. Die Antikörper gegen Collagen IV, A5 und IV, A6 sowie der RPE-65-Antikörper zeigten keine spezifischen Färbesignale im Vergleich zu den mitgeführten Negativkontrollen und wurden deshalb in der Auswertung der Ergebnisse nicht berücksichtigt. Für die unterschiedlichen Opsine zeigten sich in den kombinierten Immunfärbungen (L/M-Opsin mit GFAP oder Rhodopsin, S-Opsin mit GFAP) eine Überlagerung des Immunfluoreszenzsignal und somit uneindeutige und zum Teil unrealistische Färbeergebnisse, sodass die Opsin-Färbungen ebenfalls in der Auswertung der Ergebnisse nicht berücksichtigt wurden.

2.1.7 Sekundärantikörper

Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Sekundärantikörper mit Angabe der Bestellnummer, des Wirtstiers, der Reaktivität, der verwendeten Verdünnungsstufe sowie des Herstellers in alphabetischer Reihenfolge.

| Antikörper mit Bestellnummer | Wirt & Reaktivität | Verd. | Hersteller, Ort |
|-------------------------------------|-------------------------------|--------------|--|
| Alexa Fluor 488 | Esel gegen Maus | 1:500 | <i>Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, DE</i> |
| Alexa Fluor 488 (nur für RPE 65) | Esel gegen Kaninchen | 1:500 | <i>Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, DE</i> |
| Alexa Fluor 594 | Esel gegen Kaninchen | 1:500 | <i>Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, DE</i> |
| Alexa Fluor 594 | Esel gegen Maus | 1:500 | <i>Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, DE</i> |
| Alexa Fluor 647 ab150075 | Esel gegen Kaninchen | 1:500 | <i>Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, DE</i> |
| Alexa Fluor 647 | Esel gegen Maus | 1:500 | <i>Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, DE</i> |
| Cy3 (nur für S/M/L-Opsin) | Esel gegen Ziege | 1:500 | <i>Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, DE</i> |

2.1.8 Software

Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Software in alphabetischer Reihenfolge.

| Software | Entwickler, Ort |
|---|--|
| Adobe Photoshop CS 3 Extended | <i>Adobe Systems</i> , München, Deutschland |
| Fluoview FV10-ASW Version 4.1 | <i>Olympus Deutschland GmbH</i> , Hamburg, Deutschland |
| Mendeley Desktop Version 1.19 | <i>Mendeley Ltd., Elsevier</i> , Amsterdam, Niederlande |
| Microsoft Word für Mac Version 16.49 | <i>Microsoft Corporation</i> , Redmond, USA |

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeiner Versuchsaufbau mit externen Vorarbeiten

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die immunhistochemische Auswertung eines Versuches, bei dem primäre humane retinale Pigmentepithelzellen (im Folgenden als hRPE-Zellen abgekürzt) in Schweineaugen subretinal implantiert wurden. Diese Arbeit war in den Kontext eines übergeordneten Projekts eingebettet. An der Durchführung des Projekts waren die tschechische Akademie der Wissenschaften, das Universitätsklinikum Oslo und die experimentelle Ophthalmologie der Justus-Liebig-Universität Gießen beteiligt. Im Rahmen des Projekts erfolgte extern die subretinale Implantation primärer hRPE-Zellen in je ein Auge fünf immunsupprimierter Versuchsschweine („Minipigs“). Da die implantierten Zellen humanen Ursprungs waren, die Versuchstiere jedoch Schweine waren, lag somit eine xenogene Zelltransplantation vor. Die im Zentrum für ophthalmologische Forschung des Universitätsklinikums Oslo angezüchteten, primären hRPE-Zellen befanden sich hierbei auf einer Trägermembran, welche am Institut für Makromolekulare Chemie der tschechischen Akademie der Wissenschaften in Prag entwickelt wurde. Die Implantation, Betreuung und Euthanasie der Versuchstiere sowie die Enukleation der Augen erfolgte am Institut für Tierphysiologie und Genetik der tschechischen Akademie der Wissenschaften in Liběchov. Nach Übersendung der Augen der Versuchsschweine wurden diese in der experimentellen Ophthalmologie der Justus-Liebig-Universität Gießen aufbereitet, um Retinae und Implantate anhand immunhistochemischer Methoden morphologisch zu charakterisieren. Ziel war die

Erforschung der Auswirkungen der Implantation sowohl auf die implantierten Zellen als auch auf die Retina des Versuchsschweins. In Abbildung 4 wurde der Ablauf Versuchsabschnitte dargestellt.

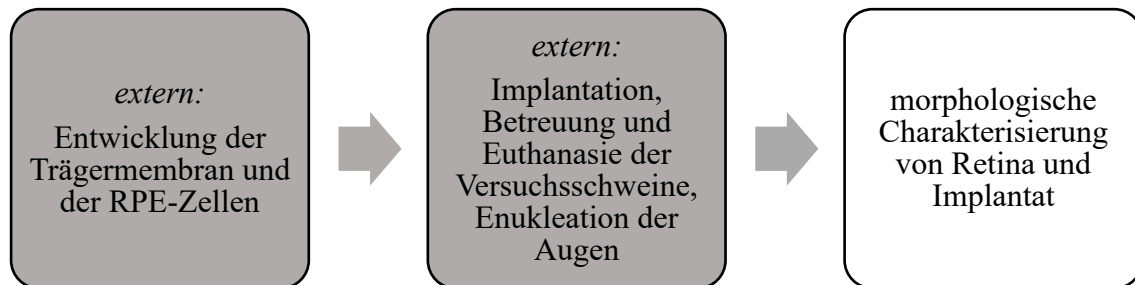


Abbildung 4: Reihenfolge der Versuchsabschnitte.

Die Studie erfolgte im Rahmen eines internationalen Projekts der Tschechischen Wissenschaftsstiftung (Projektnummer 18-04393S) und der Tschechischen Technik-Agentur (KAPPA Projekt TO01000107).

2.2.1.1 Extern: Entwicklung der Trägermembran

Die Trägermembran wurde aus Nanofasern aus Poly(L-Lactid-co-DL-Lactid) (LLA/DLLA 90/10, Mx 868 270 g/mol, PDI 2.3) hergestellt. Dazu wurde die Technik des Elektrosinnens angewandt, wobei ein randständiger, ovaler Stützrahmen in die Trägermembran eingebettet wurde (schematisch dargestellt in Abbildung 5). Das Herstellungsverfahren ist in der Veröffentlichung von Popelka et al. beschrieben (Popelka et al., 2015). Die Entwicklung dieser Trägermembran erfolgte speziell für die Transplantation retinaler Pigmentepithelzellen in Hinblick auf therapeutische Ansätze für degenerative Retinaerkrankungen. Das Herstellungsverfahren ermöglicht eine große Porengröße und somit hohe Porosität bei gleichzeitig sehr geringer Membrandicke, wodurch die Nährstoffversorgung der implantierten Zellen auf der Trägermembran gewährleistet wird (Popelka et al., 2015). Die Dicke der Trägermembran betrug 3,7 µm und die Porosität lag bei über 70% (Kozak et al., 2018).

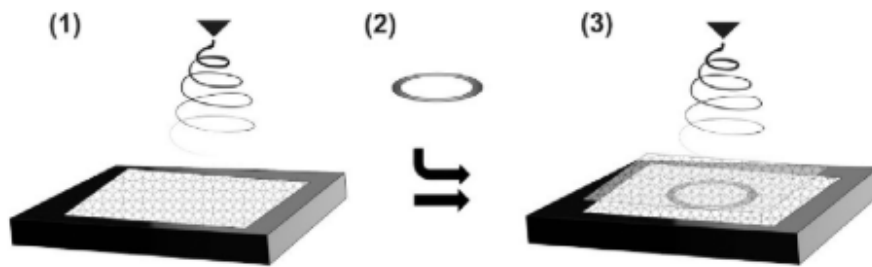


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Herstellung der Trägermembran im Elektrosprohverfahren. (1) Herstellung der unteren Trägermembranhälfte. (2) Einsetzen des Stützrahmens. (3) Komplettierung durch Herstellung der oberen Trägermembranhälfte (Popelka et al., 2015).

2.2.1.2 Extern: Entwicklung der primären humanen RPE Zellen

Primäre humane RPE-Zellen wurden humanen Spenderaugen entsprechend der Leitlinien der Deklaration von Helsinki nach Genehmigung durch das regionale Ethik-Komitee für Medizin- und Gesundheitsforschung des Zentrums für ophthalmologische Forschung des Universitätsklinikums Oslo (REK: 2017/418) entnommen. Zur Gewinnung der Zellen wurde ein durch Szatmári-Tóth et al. vorgeschriebenes Verfahren angewandt (Szatmári-Tóth et al., 2016). Abbildung 6 skizziert die einzelnen Schritte zur Kultivierung der primären humanen RPE-Zellen.

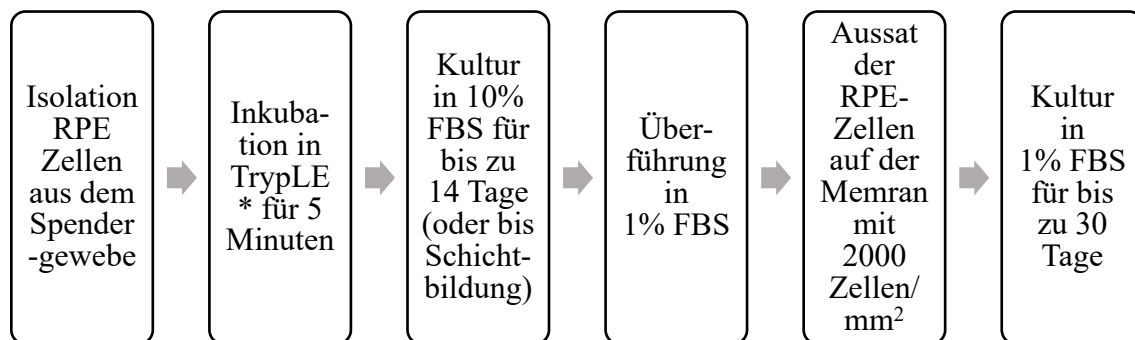


Abbildung 6: Skizzierung der Kultivierung und Aussat der RPE-Zellen. FBS= Fötales Kälberserum *TrypLE, Gibco®, Thermo Fisher Scientific, MA, USA

Während der Expansionsphase wurde ein zunehmender Verlust der Pigmentierung beobachtet. Spezifische, mit der Funktion des RPEs assoziierte Gene wurden jedoch weiterhin und in erhöhtem Ausmaß exprimiert, wohingegen andere RPE-Marker (unter anderem CRALBP und RPE-65) eine herabgesetzte Expression zeigten (siehe Abbildung 7). Des Weiteren wurde eine hohe Autofluoreszenz der kultivierten, primären humanen RPE-Zellen beobachtet. Die freundliche Bereitstellung dieser Informationen erfolgte durch das Zentrum für ophthalmologische Forschung des Universitätsklinikums Oslo.

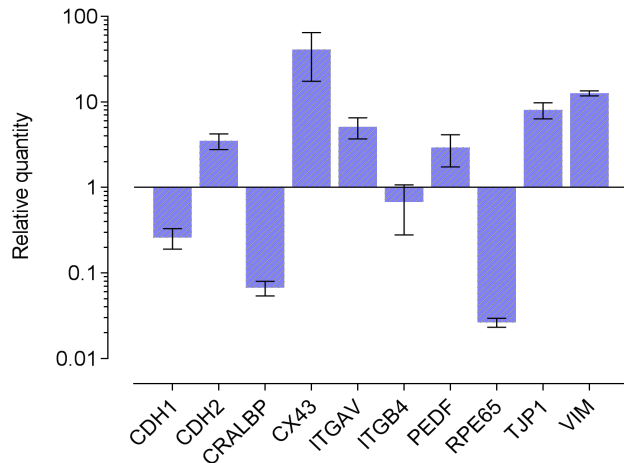


Abbildung 7: Relative Expression von RPE-Markern der kultivierten, primären humanen RPE-Zellen im Vergleich zu nativen RPE-Zellen.

Die Erhebung und Bereitstellung dieser Daten erfolgte durch das Zentrum für ophthalmologische Forschung des Universitätsklinikums Oslo (Goran Petrovski, Richard Nagymihaly, Morten C. Moe).

2.2.1.3 Extern: Implantation und perioperatives Management

Der experimentelle Tierversuch, bestehend aus Implantation, Betreuung der Versuchstiere, Euthanasie und Enukleation der Augen fand in Liběchov (Tschechien) statt. Das Studienprotokoll des Tierversuchs wurde durch das Ethik-Komitee des Instituts für Tierphysiologie und Genetik der tschechischen Akademie der Wissenschaften in Liběchov (Nummer 60/2016) genehmigt. Bei den Versuchsschweinen handelte es sich um „Liběchov Minipigs“ im Alter von 12-36 Monaten. Obwohl das Auge an sich, inklusive der Retina, aufgrund der Blut-Retina-Schranke als immunprivilegiertes Gewebe gilt (siehe Kapitel 1.2), konnte man aufgrund des chirurgischen Eingriffs im Rahmen der Implantation von einer Beeinträchtigung der Blut-Retina-Schranke zum Eingriffszeitpunkt mit möglicher konsekutiver Immunreaktion ausgehen. Deshalb wurde bereits bei der Planung des Versuchsaufbaus eine Immunsuppression der Versuchstiere für nötig erachtet. Die Immunsuppression erfolgte durch die einmalige gewichtsadaptierte Applikation von Tacrolimus freisetzenden Polymermikrokügelchen (0,25 mg/kg KG, s.c.) eine Woche vor Implantation. Aufgrund des vorzeitigen Versterben eines Versuchstiers (Schwein Nummer 2), musste dieses durch ein anderes Versuchstier (Schwein Nummer 6) ersetzt werden, welches die Tacrolimus-Applikation erst am Tag der Implantation erhielt. Die Operationen fanden in den Operationssälen des Instituts für Tierphysiologie und Genetik der tschechischen Akademie der Wissenschaften in Liběchov (Tschechien) in mikrochirurgischer Technik und unter Vollnarkose der Versuchsschweine statt. Nach Pars-Plana-Vitrektomie, iatrogenen Ablösung der Retina

durch subretinale Injektion von „Balanced Salt Solution“ (BSS®) und Retinotomie wurde das Implantat mithilfe eines Injektors subretinal platziert. Der Glaskörper wurde durch Silikonöl ersetzt und abschließend erfolgte die subkonjunktivale Gabe von 20 mg Gentamicin und 2 mg Dexamethason. Während der Operation erhielten die Versuchsschweine eine antibiotische Abdeckung mit Eficur® (1 ml/16 kg, i.m.) und die Gabe eines Glucocorticoids (Depo-Medrol® 120 mg, i.m.). Die antibiotische Abschirmung mit Eficur® wurde 24 und 48 Stunden nach der Operation wiederholt. Als zusätzliches Antibiotikum erhielten die Versuchsschweine 72 Stunden nach der Operation Draxxin®. Des Weiteren erfolgte postoperativ die konjunktivale Applikation von antimikrobiellen und antientzündlichen Augentropfen (Ophthalmo-Framykoin) fünfmal täglich für eine Woche. Die Versuchstiere wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Zeitraum zwischen ein bis acht Wochen euthanasiert, um die morphologische Charakterisierung an unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Implantation erheben zu können. Tabelle 10 erlaubt einen Überblick über die einzelnen Versuchsschweine und die unterschiedlichen Zeitabstände zwischen Immunsuppression, Implantation und Euthanasie. Die Euthanasie erfolgte durch Exsanguination in Vollnarkose. Nach Enukleation der Augen wurden diese in 4% Paraformaldehyd für 24 Stunden fixiert, in 1 M PBS bei 4 °C gelagert und anschließend an die experimentelle Ophthalmologie der Justus-Liebig-Universität Gießen verschickt. Die freundliche Bereitstellung dieser Informationen erfolgte durch das Institut für Tierphysiologie und Genetik der tschechischen Akademie der Wissenschaften in Liběchov (Tschechien).

Tabelle 10: Überblick über die einzelnen Versuchsschweine. In Anlehnung an Lytvynchuk, Ebbert et al., 2022.

| Nummer des Versuchsschweins | Beginn der Immunsuppression | Implantation (23./24.01.2019) | Zeitpunkt der Euthanasie |
|------------------------------------|---|--|---------------------------------|
| 1 | 1 Woche vor Implantation (16.01.2019) | ins linke Auge <i>(subretinale Blutung beim Implantationsversuch ins rechte Auge)</i> | 2 Wochen nach Implantation |
| 3 | 1 Woche vor Implantation (16.01.2019) | ins rechte Auge (linkes Auge = Kontrollauge) | 6 Wochen nach Implantation |
| 4 | 1 Woche vor Implantation (16.01.2019) | ins rechte Auge (linkes Auge = Kontrollauge) | 1 Woche nach Implantation |
| 5 | 1 Woche vor Implantation (16.01.2019) | ins rechte Auge (linkes Auge = Kontrollauge) | 8 Wochen nach Implantation |
| 6 | <i>Am Tag der Implantation (24.01.2019)</i> | ins rechte Auge (linkes Auge = Kontrollauge) | 6 Wochen nach Implantation |

Da die Nummerierung der einzelnen Schweine lediglich für die Zuordnung zu den zugrundeliegenden Daten von Nöten ist, für die weitere Auswertung jedoch die Zeitabstände zwischen Implantation und Euthanasie relevanter waren, erfolgte die Benennung der Schweine anhand letzterer. Aufgrund der insuffizienten Immunsuppression des Schweins Nummer sechs wurde die Auswertung der Ergebnisse in zwei Teile unterteilt. Im ersten Teil der Auswertung wurden alle Versuchsschweine mit einer protokollgemäßen Immunsuppression (Schwein Nummer eins, drei, vier und fünf) verglichen. Im zweiten Teil wurden die beiden Schweine, die das Implantat sechs Wochen lang trugen, gegenübergestellt, wobei ein Schwein die protokollgemäße Immunsuppression erhielt (Schwein Nummer drei) und das andere Schwein (Schwein Nummer sechs) nicht.

2.2.2 Aufbereitung der Schweineaugen

Die bereits in Paraformaldehyd fixierten und in 1 M PBS bei 4°C gewaschenen und aufbewahrten Schweineaugen wurden der Experimentellen Ophthalmologie der Justus-Liebig-Universität Gießen übersandt. Nach Erhalt der Schweineaugen wurde der anteriore Teil des Augenbechers durch eine zirkumferentielle limbusnahe Inzision entfernt. Nach der Eröffnung des Auges wurde der Augenbecher entsprechend der großen Blutgefäße anatomisch ausgerichtet (siehe Abbildung 8). Das Implantat war bei den behandelten Augen makroskopisch bereits gut zu erkennen. Es befand sich nasal der Papille im zentralen Retinabereich. Die Retina zeigte sich anliegend. Aus den behandelten Augen wurde ein je circa 1 cm x 1,5 cm messender rechteckiger Anteil, der das Implantat mittig enthielt, mittels Wiegeskalpell aus dem Augenbecher herausgeschnitten. Dabei wurden alle Schichten (Sklera, Choroidea, Retina) mit entnommen und darauf geachtet, die Retina beim Präparieren nicht abzulösen. Bei den nicht behandelten Kontrollaugen wurde ein entsprechender Anteil der nasalen zentralen Retina entnommen und mit diesem analog verfahren. Die Präparate wurden zur Kryoprotektion und Einbettung am ersten Tag in aufsteigende Saccharose-Lösungen (10%, 20% und 30% in PBS) überführt. Am Folgetag wurden die Präparate für zwei Stunden in eine 1:1 Lösung aus 30-prozentiger Saccharose-Lösung und Einbettmedium (Tissue-Tek® O.C.T.™ COMPOUND) und anschließend für weitere zwei Stunden in 100-prozentiges Einbettmedium überführt. Abschließend wurden die Präparate in mit Einbettmedium gefüllte Kryomolds eingebettet (siehe Abbildung 8). Die Präparate wurden daraufhin tiefgefroren und waren ab diesem Zeitpunkt für die Anfertigung von Kryostatschnitten bereit (Müller et al., 2017).

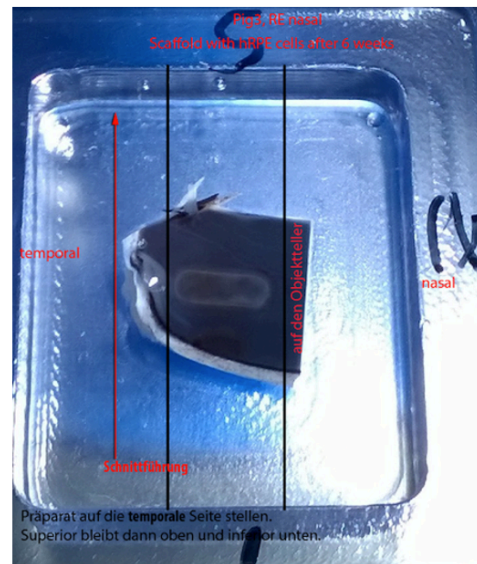
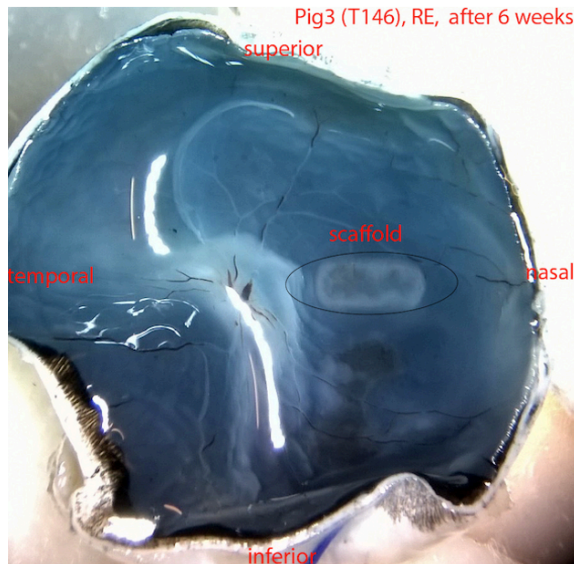


Abbildung 8: Bilder der Präparation. Links: Augenbecher eines behandelten Auges. Rechts: Präparat mit Implantat in Einbettmedium vor dem Einfrieren. Bilder der Präparation aufgenommen von Brigitte Müller. Die Bereitstellung dieser Daten erfolgte mit der freundlichen Genehmigung von Brigitte Müller und der experimentellen Ophthalmologie der JLU Gießen.

2.2.3 Anfertigung von Gefrierschnitten

Zur Anfertigung der Gefrierschnitte wurde zunächst aus den in Tissue Tek[®] Cryomold[®] eingebetteten Präparaten ein circa 1 cm x 0,5 cm messender Block mithilfe von Rasierklingen ausgeschnitten. Dabei wurden die Bilder der Präparation zu Hilfe genommen, damit der herausgetrennte Block den Implantatbereich möglichst mittig enthielt, beziehungsweise bei den Kontrollaugen den entsprechenden Retinabereich. Dann wurde dieser Block mittels Tissue-Tek auf dem Präparateteller des Gefriermikrotoms fixiert, sodass die Schnittlinie entlang der Breite des Implantats verlaufen würde (siehe Abbildung 9).

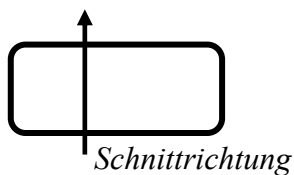


Abbildung 9: Skizze der Trägermembran mit Angabe der Schnitttrichtung beim Anfertigen der Gefrierschnitte.

Vor Beginn des Schneidevorgangs wurde die Kammer des Gefriermikrotoms auf -21 °C heruntergekühlt und die Objektkühlung aktiviert. Die Schnittdicke wurde auf 14 µm eingestellt. Zunächst erfolgte die Aufnahme auf einfache Objektträger. Die Schnitte wurden nach Aufnahme auf die Objektträger unter dem Lichtmikroskop auf eine ausreichende Qualität geprüft. Sobald Schnitte in guter Qualität und bei den Implantat

tragenden Augen mit Anschnitt des Implantats hergestellt worden waren, erfolgte die Aufnahme auf die Super Frost® Plus Objektträger mit je vier Schnitten pro Objektträger. Auch hier wurde eine Qualitätskontrolle der Schnitte unter dem Lichtmikroskop nach Aufnahme auf die Objektträger durchgeführt. Die Objektträger wurden mit der Nummerierung des Versuchstiers und Qualität der Schnitte beschriftet und bis zur Färbung im -20°C Gefrierschrank in Objektträgerkästen gelagert.

2.2.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung als Übersichtsfärbung

Bei der Hämatoxylin-Eosin-Färbung handelt es sich um eine Routinefärbemethode für histologische Schnitte. Hämatoxylin besitzt eine blau-lila Farbe und färbt saure beziehungsweise basophile Strukturen (z. B. DNA, Zellkernstrukturen) an, Eosin hingegen färbt basische beziehungsweise azidophile Strukturen (z. B. zytoplasmatische Proteine, Mitochondrien, Kollagen) pink-rot. Somit erscheinen in einem typischen Gewebe Zellkerne blau und zytoplasmatische Strukturen sowie die extrazelluläre Matrix in unterschiedlichen pink-rot Tönen (Fischer et al., 2008).

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung erfolgte an Gefrierschnitten. Für jedes Versuchsschwein wurde je ein Objektträger mit Schnitten guter Qualität eines Auges mit Implantat sowie des Kontrollauges ausgesucht, aufgetaut und 30 Minuten bei Raumluft antrocknen gelassen. Daraufhin erfolgte zweimalig ein Waschgang für je fünf bis zehn Minuten in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS, 0,1M). Anschließend erfolgte die Färbung mit einer 1:1 Mischung aus Hämatoxylinlösung nach Gill II und doppeltdestilliertem Wasser in einer Färbeküvette für 25-30 Sekunden. Für die Bläuung wurden die Schnitte in der Färbeküvette für zehn Minuten unter laufendes handwarmes Leitungswasser (nicht destilliert) gestellt und danach in doppelt destilliertes Wasser überführt. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte in der Färbeküvette in 100 ml 0,5 prozentiger Eosinlösung, welche mit einem Tropfen Eisessig versetzt war, für 10-15 Sekunden gefärbt. Daraufhin wurden die Schnitte erneut in doppelt destilliertes Wasser überführt. In einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Schnitte anschließend entwässert. Dazu erfolgte das Befüllen der Färbeküvette in aufsteigender Reihenfolge zunächst zweimalig mit 70 prozentigem Ethanol, einmalig mit 80 prozentigem Ethanol, einmalig mit 90 prozentigem Ethanol, einmalig mit 96 prozentigem Ethanol sowie abschließend zweimalig mit absolutem Ethanol für je zwei bis drei Minuten. Daraufhin

wurden die Schnitte mit Xylol geklärt. Dazu wurde die Färbeküvette zweimalig für je fünf Minuten mit Xylol befüllt. Abschließend erfolgte das Eindecken mit Roti-Histokit II und Deckgläsern sowie das Aushärten für mehrere Tage, bevor die Schnitte mikroskopiert wurden.

2.2.5 Immunfärbung an Gefrierschnitten

Es wurde hauptsächlich das Verfahren der indirekten Immunfluoreszenz verwendet. Die DAPI-Kernfärbung wurde zur Identifikation der Zellkerne und retinalen Schichten bei allen Immunfärbungen im zweiten Färbeschritt mitgefärbt.

Prinzip der Immunfluoreszenz

Bei der Immunfluoreszenz handelt es sich um eine immunhistochemische Arbeitsmethode, bei der fluoreszierende Antikörper zum Nachweis zellulärer Antigene verwendet werden. Die Methode der Immunfluoreszenz geht auf eine Veröffentlichung von Coons et al im Jahre 1941 zurück und begründet damit auch den Beginn der Immunhistochemie (Coons et al., 1941), (Ramos-Vara, 2005). Bei immunhistochemischen Färbungen wird sich das Prinzip einer Antigen-Antikörper-Bindung zu Nutze gemacht (Lefèvre & Lange, 2011). Diese Antigen-Antikörper-Bindung wird durch Markierung der Antikörper mit einem Reportermolekül mikroskopisch sichtbar gemacht (Ramos-Vara, 2005). Beim Verfahren der Immunfluoreszenz dienen Fluorochrome als Reportermoleküle. Die an die Antikörper gebundenen Fluorochrome können durch UV-Licht angeregt und durch die daraufhin erfolgende Lichtemission einer bestimmten Wellenlänge unter einem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden. Bei der Immunfluoreszenz lassen sich die direkte und die indirekte Immunfluoreszenz unterscheiden. Bei der direkten Immunfluoreszenz richtet sich ein fluoreszierender Primärantikörper direkt gegen das gesuchte Antigen (siehe Abbildung 10). Bei der zweischrittigen indirekten Immunfluoreszenz erfolgt zunächst die Inkubation des Gewebes mit einem das Zielantigen bindenden unmarkierten Primärantikörper eines definierten Wirtstiers. Überstände des nicht gebundenen Primärantikörpers werden abgewaschen. Im zweiten Schritt erfolgt die Inkubation mit dem fluoreszierenden Sekundärantikörper. Dieser wird so ausgewählt, dass er gegen das Wirtstier des Primärantikörpers gerichtet ist. Somit dient der Primärantikörper dem Sekundärantikörper als Antigen und es kann über das Fluoreszenzsignal des Sekundärantikörpers die Antikörper-Antikörper-Bindung, beziehungsweise das gesuchte

Antigen, indirekt unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden (siehe Abbildung 11).

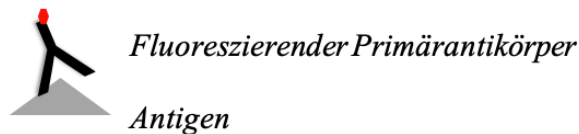


Abbildung 10: Prinzip der direkten Immunfluoreszenz.

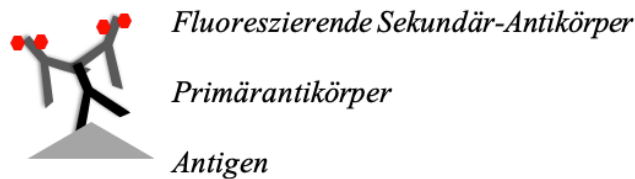


Abbildung 11: Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz.

Die indirekte Immunfluoreszenz ist der direkten hinsichtlich der Sensitivität überlegen. Zu einer Erhöhung der Sensitivität trägt zum einen der Einsatz des unmarkierten Primärantikörpers, der dadurch seine Bindungsaktivität behält, bei. Zum anderen ist durch Mehrfachbindung der fluoreszierenden Sekundärantikörper an den Primärantikörper die resultierende Leuchtintensität höher (Ramos-Vara, 2005). Für Mehrfach-Fluoreszenz-Markierungen benötigt man Primärantikörper aus unterschiedlichen Wirtstieren, sodass die Sekundärantikörper gegen diese unterschiedlichen Wirtstiere der Primärantikörper gerichtet sein können. Die Sekundärantikörper lassen sich durch unterschiedliche Anregungsquellen im Fluoreszenzmikroskop unterscheiden. Möchte man beispielsweise Antigen „A“ und Antigen „B“ durch indirekte Immunfluoreszenz unterscheiden, könnte man einen Primärantikörper für das Antigen „A“ aus einem Wirtstier (z.B. Ziege) und für das Antigen „B“ einen Primärantikörper eines anderen Wirtstieres (z.B. Kaninchen) auswählen. Für den zweiten Färbeschritt benötigt man sowohl einen Sekundärantikörper, der gegen das eine Wirtstier (hier Ziege) als auch einen Sekundärantikörper, der gegen das andere Wirtstier (hier Kaninchen) gerichtet ist. Für eine gute Unterscheidbarkeit beim Mikroskopieren sollten sich die Sekundärantikörper hinsichtlich ihres optimalen Anregungsspektrums möglichst stark unterscheiden. Die Auswertung erfolgt unter einem Fluoreszenzmikroskop. Hierbei werden die Fluorochrome der Sekundärantikörper durch unterschiedliche Laser angeregt und emittieren in der Folge Licht unterschiedlicher

definierter Wellenlängen, welche durch Emissionsfilter des Fluoreszenzmikroskop getrennt wahrgenommen und sichtbar gemacht werden können.

Prinzip der DAPI-Kernfärbung

DAPI (4'-6-Diamidin-2-Phenylindol-Dichlorid) ist eine spezifische fluoreszierende Farbesubstanz für DNA. Sie bildet einen fluoreszierenden Komplex mit den kleinen Furchen an A-T-reichen Regionen der DNA und eignet sich daher als ergänzende Färbung zur Detektion der Zellkerne bei Immunfluoreszenz-Färbungen (Kapuscinski, 1995). Wenn eine Bindung an Doppelstrang-DNA und Anregung mit ultraviolettem Licht erfolgte, emittiert DAPI Licht der Wellenlänge 448-460 nm im blauen Bereich (Kapuscinski, 1995). Die DAPI-Kernfärbung kann somit in Kombination mit Fluoreszenzfarbstoffen, die im langwelligeren Spektrum emittieren, bei Immunfluoreszenzfärbungen eingesetzt werden. Abbildung 12 stellt die Strukturformel von DAPI dar.

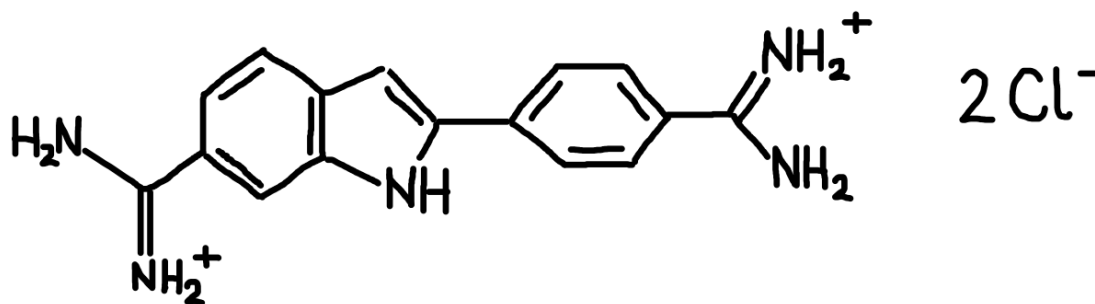


Abbildung 12: Strukturformel von DAPI (4'-6-Diamidin-2-Phenylindol-Dichlorid) in Anlehnung an (Kapuscinski, 1995).

Durchführung der Immunfärbung

Vor Beginn der eigentlichen Färbung wurde diese sorgfältig geplant mit Erstellung eines Färbeprotokolls sowie der Auswahl der benötigten Primär- und Sekundärantikörper. Die benötigten Volumina der Antikörperlösungen wurden berechnet und in das Protokoll eingetragen, wobei die geforderten Verdünnungsverhältnisse berücksichtigt und pro Objektträger und Färbeschritt von einem benötigten Volumen der Färbelösung von je circa 200-300 ml ausgegangen wurde. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte in Antikörpermedium.

In einem ersten Schritt wurden die Lösungen der Primärantikörper protokollgemäß hergestellt. Dazu wurde zunächst die benötigte Menge an Antikörpermedium in die Eppendorf-Gefäße pipettiert und danach die entsprechenden Primärantikörper in absteigender Reihenfolge der benötigten Volumina hinzugefügt. Vor Entnahme der Primärantikörper aus ihrer Stammlösung wurden die Eppendorf-Gefäße gevortext und zentrifugiert. Nach Hinzugabe aller Komponenten der Primärantikörperlösung wurden die Eppendorf-Gefäße verschlossen, beschriftet und mithilfe des Vortex-Mischers vermischt. Beim Färben wurde nur der Überstand abpipettiert und auf die zu färbenden Präparate aufgetragen, damit keine Antikörper-Präzipitate auf die Präparate gelangen konnten.

Zur Anfertigung der Immunfärbungen wurden vor Beginn die benötigte Anzahl an Objektträgern mit Gefrierschnitten in guter Qualität für die geplanten Färbungen sowie für die Negativkontrollen ausgesucht, bei Raumluft 30 Minuten antrocknen gelassen und mit dem zu färbenden Antigen des Primärantikörpers und Datum beschriftet. Hiernach wurden die drei bis vier Gefrierschnitte, die sich auf einem Objektträger befanden, mit dem PAP-Pen umrandet, um eine ausreichende Benetzung der Schnitte mit den Färbelösungen in den Färbeschritten zu gewährleisten. Es erfolgte zunächst das dreimalige Waschen der Schnitte in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS, 0,1M) für je 15 Minuten, gefolgt von der 60-minütigen Permeabilisierung in einer Lösung aus 0,1M PBS und 0,5% Tween. Sowohl das Waschen als auch die Permeabilisierung erfolgten in einer Färbeküvette auf einem Wippschüttler. Nach der Permeabilisierung wurden die Schnitte kurzzeitig zurück in PBS überführt und danach vorsichtig außerhalb der Pap-Pen-Umrandung trocken getupft und in die angefeuchtete Färbekammer gelegt. Die Primärantikörperlösung wurde vorsichtig auf die Objektträger pipettiert und anschließend wurde der entsprechende Bereich mit Parafilmstreifen abgedeckt, um ein Verdunsten der Antikörperlösung während der Inkubation zu verhindern. Die Inkubation erfolgte über Nacht. Am Folgetag wurden zunächst die Parafilmstreifen sorgfältig entfernt. Daraufhin erfolgte das dreimalige Waschen für je 15 Minuten der Schnitte in 0,1M PBS, um ungebundene Primärantikörper von den Gewebeschnitten zu entfernen. In dieser Zeit konnte die Färbelösung der Sekundärantikörper für den zweiten Färbeschritt protokollgemäß erstellt werden. Die Erstellung erfolgte weitgehend analog zur Erstellung der Primärantikörperlösung (s.o.). Allerdings wurde die Sekundärantikörperlösung anschließend bei 13.000 G für fünf Minuten zentrifugiert, damit sich möglicherweise

entstandene, stark fluoreszierende Präzipitate absetzen konnten. Während der Herstellung der Sekundärantikörperlösung wurde zudem insbesondere auf einen konsequenten Lichtschutz geachtet, um die Leuchtintensität der an die Sekundärantikörper gebundenen Fluorochrome nicht zu beeinträchtigen. Die Färbelösung der Sekundärantikörper enthielt zudem DAPI in einer Verdünnung von 1:1.000, um die Zellkerne mitanzufärben. Nach Ende des dritten Waschgangs wurden die Objektträger erneut vorsichtig trocken getupft und in die Färbekammer gelegt. Daraufhin wurde die Sekundärantikörperlösung (inklusive DAPI-Kernfärbung) aufgetragen und die lichtundurchlässige Färbekammer zügig verschlossen. Die Inkubationsdauer betrug zwei Stunden. Anschließend wurden die Schnitte in 0,1M PBS unter Lichtschutz dreimal für je 15 Minuten gewaschen. Zuletzt wurden die Schnitte in Dako Fluorescent Mounting Medium eingedeckt und unter Lichtschutz mindestens 24 Stunden vor dem ersten Mikroskopieren trocknen gelassen. In Tabelle 11 sind die wichtigsten Schritte der immunhistochemischen Färbungen zusammengefasst.

In jeder Färbung wurde für jedes Versuchsschwein und Auge (Auge mit Implantat und Kontrollauge) eine Negativkontrolle mitangefertigt. Hierbei wurde im ersten Färbeschritt der Primärantikörper weggelassen und nur das reine Antikörpermedium aufgetragen. Alle weiteren Schritte (Inkubationszeiten, Herstellung der Sekundärantikörperlösung mit DAPI-Kernfärbung) entsprachen denen der eigentlichen Färbung. Hierüber ließ sich eine spezifische Färbung durch die Primärantikörper von einer unspezifischen Hintergrundfärbung durch Bindung der Sekundärantikörper an Gewebestrukturen unterscheiden. Beim Mikroskopieren der Negativkontrollen wurde darauf geachtet, möglichst ähnliche Lasereinstellungen zu verwenden, um hierdurch entstehende Intensitätsunterschiede als Fehlerquelle zu vermeiden.

Tabelle 11: Zusammenfassung der wichtigsten Färbeschritte der Immunhistochemie.

| | Färbeschritt | Reagenz | Zeit |
|----------|---|--|------------------|
| 1 | Waschen | PBS 0,1M | 3 mal 15 Minuten |
| 2 | Permeabilisierung | 0,1M PBS + 0,5% Tween | 60 Minuten |
| 3 | Inkubation (Primär-antikörper) | Primärantikörper in Antikörpermedium | Über Nacht |
| 4 | Waschen | PBS 0,1M | 3 mal 15 Minuten |
| 5 | Inkubation (Sekundär-antikörper) unter Lichtschutz, Kernfärbung | Sekundärantikörper, DAPI, Antikörpermedium | 2 Stunden |
| 6 | Waschen unter Lichtschutz | PBS 0,1M | 3 mal 15 Minuten |
| 7 | Eindecken | Dako Fluorescent Mounting Medium | |

2.2.6 Antigendemaskierung

Allgemeines Prinzip der Antigendemaskierung

Bei der Antigendemaskierung, im Laboralltag und in der englischsprachigen Literatur bekannt als Antigen-Retrieval, handelt es sich um ein nicht-enzymatisches Verfahren zur Vorbehandlung von formalinfixierten Präparaten vor immunhistochemischen Färbungen. Im Rahmen der Formalinfixierung kann es zur Ausbildung von Verbindungen („Cross-Links“) zwischen Proteinen beziehungsweise Antigenen und Formalin kommen. Dies beeinflusst die Affinität der Antigene zu den Antikörpern, die bei der Immunfärbung eingesetzt werden, und somit das Ergebnis der Immunfärbung an sich negativ. Durch die Hitzeeinwirkung während der Antigendemaskierung werden diese Verbindungen aufgebrochen, wodurch die Affinität der Antigene zu den Antikörpern wiederhergestellt wird und bessere Färbeergebnisse erzielt werden können (Shi et al., 1997).

Durchführung der Antigendemaskierung

Die Antigendemaskierung wurde bei einer Immunfärbereihe als Zwischenschritt nach dem ersten Waschen mit PBS eingefügt. Die Präparate wurden dazu zweimalig für fünf Minuten in einem Natriumcitrat-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Präparate in vier Durchgängen bei 700 Watt in der Mikrowelle für je zehn Sekunden erhitzt mit je einer Pause von 50 Sekunden vor dem nächsten Durchgang. Zwischen den

Mikrowellenbehandlungen wurde die Temperatur innerhalb der Küvette gemessen, um eine Entwicklung zu hoher Temperaturen zu vermeiden. Nachdem die Küvette zwanzig bis dreißig Minuten abkühlen konnte, erfolgte ein fünfminütiger Waschgang in PBS. Anschließend konnte mit dem Protokoll der Immunfärbung fortgefahren werden.

Die Antigendemaskierung wurde nur bei einer Färbereihe durchgeführt, da diese die Färbung der Kollagene IV, 5. und 6. Kette enthielt und mit dieser Färbung vor Ort bisher wenig Erfahrungen gesammelt wurden. Mit der Antigendemaskierung sollte eine freie Zugänglichkeit der antigenen Strukturen sicher gestellt werden und die Wahrscheinlichkeit eines aussagekräftigen Ergebnisses erhöht werden. Da sich dieses trotzdem nicht zeigte, wurde in allen weiteren Färbungen erneut auf die Antigendemaskierung verzichtet, da die übrigen Primärantikörper auch ohne vorherige Antigendemaskierung bei bisherigen Projekten gute Färbeergebnisse gezeigt hatten, und die Integrität der Präparate nicht durch zusätzlichen Hitzestress im Rahmen der Antigendemaskierung gefährdet werden sollte. In der Färbereihe mit Antigendemaskierung waren unter anderem die Färbungen mit den Primärantikörpern Iba1, Bestrophin, PKC-alpha, Vimentin und CRALBP der behandelten Augen enthalten (exklusive des Versuchstieres, welches zwei Wochen nach Implantation euthanasiert wurde). Alle anderen Färbungen erfolgten ohne Antigendemaskierung.

2.2.7 TUNEL-Färbung

Allgemeines Prinzip der TUNEL-Methode

Mithilfe der TUNEL-Methode können apoptotische Zellen sichtbar gemacht werden. TUNEL steht hierbei für „Terminal Deoxynucleotidyl-Transferase (TdT) dUTP Nick-End Labeling“. Essentielle Bestandteile der TUNEL-Färbung sind das Enzym „Terminale Desoxynukleotid-Transferase“ und modifizierte, fluoreszierende Nukleotide. Treten Zellen in den Prozess der Apoptose ein, kommt es im Verlauf zu Doppel- und Einzelstrangbrüchen der DNA. An diesen DNA-Strangbrüchen liegen 3`OH-Enden frei. Das Enzym „Terminale Desoxynukleotid-Transferase“ ist auch ohne das Vorliegen eines „Templates“ in der Lage, in einer Polymerisationsreaktion modifizierte, fluoreszierende Nukleotide an diese freien 3`OH-Enden anzuhängen. Somit werden DNA-Doppel- und Einzelstrangbrüche, wie sie während der Apoptose auftreten, fluoreszenzmarkiert und die apoptotischen Zellkerne können mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden (Kyrylkova et al., 2012, Roche Diagnostics & Sigma-aldrich.com,

2016). Zur Qualitätskontrolle werden bei jeder Färbung eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgefärbt. Bei der Positivkontrolle wird das Präparat mit einer DNase-Lösung vorbehandelt, wodurch DNA-Strangbrüche erzeugt werden. In der Positivkontrolle sollten sich daher unter dem Fluoreszenzmikroskop alle Zellkerne angefärbt darstellen. In der Negativkontrolle befindet sich kein TdT in den Lösungen, wodurch die enzymatische Reaktion nicht stattfinden kann und sich kein Färbeargebnis zeigen sollte (Müller et al., 2017).

Durchführung der TUNEL-Methode

Für die Durchführung der TUNEL-Methode wurde der fertige Färbeausatz „In situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein“ des Herstellers „Roche“ (Produktnummer 11684795910) verwendet. Darin sind zwei Lösungen enthalten. Die Enzym-Lösung enthält die „Terminale Desoxynukleotid-Transferase“. Die Färbe-Lösung enthält die modifizierten, fluoreszierenden Nukleotide. Bei der Anwendung wurde dem Färbeprotokoll des Herstellers gefolgt (Roche Diagnostics & Sigma-aldrich.com, 2016). Das Protokoll ist unter folgendem Link abrufbar: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/417/021/11684795910bul.pdf>

2.2.8 Mikroskopie

2.2.8.1 Mikroskopie der Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Das Mikroskopieren der mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitte erfolgte durch Hellfeldmikroskopie am Fluoreszenz-Mikroskop Biozero der Marke Keyence mit 4x und 20x Objektiven. Es wurden jeweils Stapelaufnahmen angefertigt mit einer Stapeldicke von acht bis zwölf Bildern.

2.2.8.2 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie der Immunfärbungen und der TUNEL-Färbung

Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie

Das Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie beruht im Wesentlichen auf den physikalischen Mechanismen der Absorption und Emission elektromagnetischer Strahlung. Die an die Sekundärantikörper gebundenen Fluorochrome werden durch elektromagnetische Strahlung eines Lasers (monochromatisches Licht) angeregt und emittieren daraufhin elektromagnetische Strahlung. Die unterschiedlichen Fluorochrome unterscheiden sich

sowohl hinsichtlich der Wellenlängen, mit denen sie optimal angeregt werden können, als auch bezüglich des Spektrums an elektromagnetischer Strahlung, die sie daraufhin emittieren. So werden die Fluorochrome des Sekundärantikörpers Alexa 488® beispielsweise optimal durch einen Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und emittieren daraufhin grünes Licht (Wellenlängenbereich ~ 500-560 nm). Alexa 594® wird hingegen optimal durch einen Laser mit einer Wellenlänge von 561 nm oder 594 nm angeregt und emittiert daraufhin rot-oranges Licht (Wellenlängenbereich ~ 590-670 nm). Beim Mikroskopieren wird Licht der Wellenlänge des anregenden Lasers mittels eines dichroitischen Spiegels herausgefiltert, ohne dabei das durch die Fluoreszenz entstehende emittierte Licht anderer Wellenlängen zu beeinträchtigen. Somit werden selektiv die Signale der angeregten Fluorochrome detektiert (Lichtman & Conchello, 2005). Durch den Einsatz unterschiedlicher Sekundärantikörper mit unterschiedlichen Fluorochromen, der Anregung durch Laser unterschiedlicher Wellenlängen und der Verwendung spezieller Emissionsfilter können Mehrfachfärbungen an einem Präparat durchgeführt werden, da sich die Signale der einzelnen Sekundärantikörper deutlich unterscheiden lassen.

Prinzip der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie

Die Immunfärbungen wurden mit dem Verfahren der konfokalen Laser-Scanning Mikroskopie mikroskopiert. Durch die konfokale Laser Scanning Mikroskopie können die Ergebnisse einer Immunfluoreszenz-Färbung bildhaft festgehalten werden. Die technische Herausforderung der Bildgebung bei Immunfärbungen liegt im Umgang mit den starken Hintergrundsignalen, die entweder durch Färbung weiterer Strukturen oder durch Autofluoreszenz des Gewebes entstehen. Die konfokale Lasermikroskopie bietet eine Lösung für dieses Problem. Bei der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie wird das gefärbte Präparat Stück für Stück gescannt und somit in optische Sektionen unterteilt. Beim Scannen der einzelnen optischen Sektionen erfolgt die Detektion des entstehenden Lichtsignals durch spezielle Filter, um ungewollte Fluoreszenzsignale außerhalb der Brennpunktebene auszuschalten. Dadurch erreichen den Photodetektor hinter der Lochblende ausschließlich Signale aus der eingestellten Brennpunktebene und es werden Hintergrundsignale reduziert. Der auf die Probe gerichtete Laserstrahl ist dabei konfokal zu dem auf die Lochblende einfallenden Lichtsignal ausgerichtet. Die Bildinformationen der einzelnen optischen Sektionen werden durch Software-basiert zusammengesetzt (Paddock, 1999). Dies geschieht in allen drei Dimensionen und es ergeben sich optische

Schnitte durch das Präparat hindurch. Die Dicke und Anzahl der optischen Schnitte (Z-Ebenen) können durch den Untersucher bestimmt werden. Anschließend kann ein Bereich aus optischen Schnitten, die die gesuchten Informationen am deutlichsten zeigen, ausgewählt werden. Die ausgewählten optischen Schnitte werden dann durch die Software übereinandergelegt, sodass die dreidimensionalen Informationen auf ein zweidimensionales Bild reduziert beziehungsweise projiziert werden.

Zum Mikroskopieren der Immunfärbungen wurde im Rahmen dieser Arbeit das Konfokale Laser Scanning Mikroskop Fluoview FV10i der Marke Olympus verwendet. Dabei handelt es sich um ein in sich geschlossenes, motorisiertes und softwarebetriebenes Modell. Nach Einlegen des Präparats wurden zunächst Übersichtsaufnahmen aufgenommen, aus denen dann wiederum die Regionen für die Nahaufnahmen ausgewählt wurden. Verwendet wurden 10x und 60x Phasenobjektive, wodurch in Kombination mit der konfokalen Zoomtechnik 10- bis 600-fache Vergrößerungen erreicht werden konnten (<https://mikro-news.de/news/all-in-one-mikroskop-familie-von-olympus/>). Vor dem Verwenden des 60x Objektivs wurde auf dieses Immersionsöl aufgetragen. Bei der Einstellung der Laser wurde darauf geachtet, diese nicht stärker als nötig einzustellen, um eine Überbelichtung zu vermeiden. Der Abstand zwischen den Z-Schnitten betrug $0,7\ \mu\text{m}$ und für die Erstellung der zweidimensionalen Projektionsbilder wurden sechs bis zwölf Z-Ebenen (Stapeldicke) übereinander gelegt.

2.2.9 Bildbearbeitung

Die Bearbeitung der aufgenommenen Bilder erfolgte mit Photoshop® (Adobe Photoshop CS 3 Extended). Alle Dateien wurden nach dem gleichen Schema bearbeitet. Es erfolgten eine Tonwertkorrektur zur Kontrastverstärkung und eine automatische Reduktion der Unschärfe in allen Farbkanälen (RGB). Bei Mehrfachfärbungen wurden die Immunfärbungen einzeln in Kombination mit der DAPI-Färbung dargestellt. Für eine gute Unterscheidbarkeit wurden folgende zwei Farbkombinationen benutzt: 1) Eine Darstellung der Immunfärbung im grünen Kanal wurde mit der Darstellung der DAPI-Färbung in Magenta (blauer und roter Kanal) kombiniert. 2) Eine Darstellung der Immunfärbung im roten Kanal wurde mit der Darstellung der DAPI-Färbung in Türkis (blauer und grüner Kanal) kombiniert. In einigen Fällen wurden zwei überlappende Bilddateien zu einem größeren Bildformat vereinigt, um die Zielstruktur zusammenhängend darstellen zu können („Photomerge“).

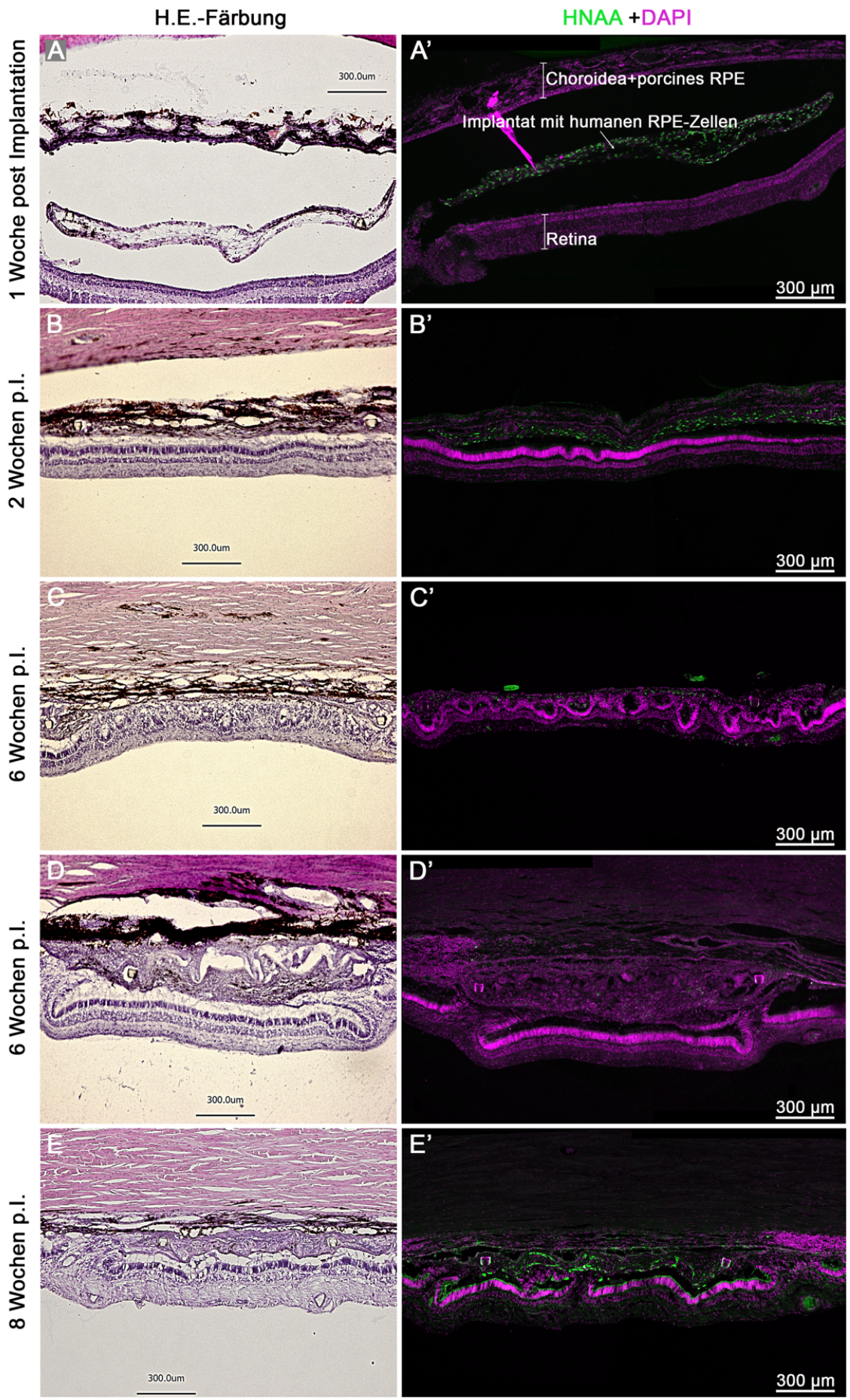
3 Ergebnisse

3.1 Morphologie der Retina und des Implantats in der Hämatoxylin-Eosin- und HNAA/DAPI-Übersichtsfärbung

Zur Übersicht über die morphologischen Zustände und Veränderungen von Retina und Implantat zu den unterschiedlichen Beobachtungszeitpunkten (ein, zwei, zweimal sechs und acht Wochen nach Implantation) im Unterschied zu dem jeweils unbehandelten Kontrollauge wurden im Folgenden die Hämatoxylin-Eosin-Färbung und die HNAA/DAPI-Übersichtsfärbung in zehnfacher Vergrößerung gegenübergestellt. HNAA (Humanes Nukleäres Antigen Antikörper) wurde als Marker zur Identifikation der implantierten humanen RPE-Zellen eingesetzt. Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) wurde zur Darstellung der Morphologie der Retinaschichten sowie des Implantats eingesetzt. Abbildung 13 zeigt die Ergebnisse der HE-Färbung (A-E) in Gegenüberstellung mit der HNAA-Färbung und DAPI-Kernfärbung (A'-E') des Implantatbereichs sowie der angrenzenden Strukturen (Retina unter dem Implantat, Choroidea, Sklera) zu den unterschiedlichen Beobachtungszeitpunkten bis zu acht Wochen nach Implantation sowie die Ergebnisse der entsprechenden Färbungen exemplarisch an einem unbehandelten Kontrollauge (F, F'). In der HE-Färbung lassen sich die neun Schichten der Retina, die pigmentierte Choroidea und die kollagenreiche Sklera gut voneinander abgrenzen. Das Implantat befindet sich bei allen Versuchstieren zwischen porcinem RPE und Retina und somit subretinal. In den Randbereichen des Implantats lässt sich die Ringstruktur der Trägermembran identifizieren, was das Auffinden des Implantats erleichtert. In der DAPI-Kernfärbung stachen in dieser Vergrößerung die Zellkörperschichten ONL und INL besonders hervor. Eine Woche nach Implantation (A, A') konnte keine Integration des Implantats in das porcine Gewebe beobachtet werden, wodurch sich das Implantat besonders leicht identifizieren ließ. Zu allen anderen Zeitpunkten nach Implantation (A-E, A'-E') zeigte sich eine Integration des Implantats in das Wirtsgewebe. Aufgrund der fehlenden Integration des Implantats war die Retina eine Woche nach Implantation (A, A') sowohl vom implantierten humanen als auch vom porcinen RPE persistierend abgelöst. Die ursprüngliche Schichtung der Retina blieb dabei weitgehend erhalten. Es zeigte sich jedoch eine Verschmälerung der ONL und ein Verlust an Photorezeptorinnen- und -außensegmenten. In der HNAA-Färbung (A') zeigten die implantierten, humanen RPE-Zellen eine deutliche HNA-Expression. Zwei Wochen nach Implantation (B, B') zeigte sich eine

flache langstreckige Integration des Implantats ins porcine Gewebe. Die neun Schichten der Retina ließen sich in der HE-Färbung (B) gut voneinander abgrenzen und auch Photorezeptorinnen- und -außensegmente waren erkennbar. In der HNAA-Färbung (B') ließ sich ebenfalls eine deutliche HNA-Expression im Implantatbereich nachweisen. Sechs und acht Wochen nach Implantation war im Implantatbereich keine HNA-Expression mehr nachweisbar. Das starke grüne Fluoreszenzsignal in der HNAA-Färbung acht Wochen nach Implantation (E') war auf die Autofluoreszenz der Melaningranula zurückzuführen und zeigte im Vergleich zur mitgeführten Negativkontrolle keine spezifische Färbung. Detailaufnahmen der HNAA-Färbungen im Vergleich zu den Negativkontrollen zur Demonstration des Verlusts der HNA-Expression über den Beobachtungszeitraum hinweg wurden in Kapitel 3.4.1 (Abbildung 17 (S. 69/70) und Abbildung 18 (S. 71)) dargestellt. Sechs Wochen nach Implantation zeigte sich zudem in dem Versuchstier mit protokollgemäßer Immunsuppression eine Rosettenbildung innerhalb der Retina (C, C'). Sechs Wochen nach Implantation mit nicht-protokollgemäßer Immunsuppression zeigte sich eine zellreiche Hypertrophie innerhalb des Implantatbereichs (D, D') ohne Rosettenbildung der Retina. Eine geringgradige Hypertrophie innerhalb des Implantatbereichs zeigte sich acht Wochen nach Implantation (E, E'). Das Kontrollauge (F, F') zeigte eine physiologische Schichtung der Retina.

Insgesamt ließ sich in den Übersichtsdarstellungen die angestrebte Einbringung des Implantats in den subretinalen Raum in allen Versuchstieren nachweisen. Zwei, sechs und acht Wochen nach Implantation zeigte sich zudem eine Integration des Implantats in das porcine Gewebe. Eine Woche nach Implantation ließ sich keine Integration feststellen und die Retina war sowohl vom porcinen als auch vom humanen RPE abgelöst. Sechs Wochen nach Implantation zeigte sich bei dem Versuchstier ohne protokollgemäße Immunsuppression eine zellreiche Hypertrophie innerhalb des Implantatbereichs. Diese war bei dem Versuchstier mit protokollgemäßer Immunsuppression nicht festzustellen, hier zeigte sich jedoch eine Rosettenbildung innerhalb der Retina unterhalb des Implantats. Ein und zwei Wochen nach Implantation wiesen die Zellkerne der implantierten, humanen RPE-Zellen eine HNA-Expression in der HNAA-Färbung auf. Diese war zu den späteren Beobachtungszeitpunkten nicht mehr festzustellen.



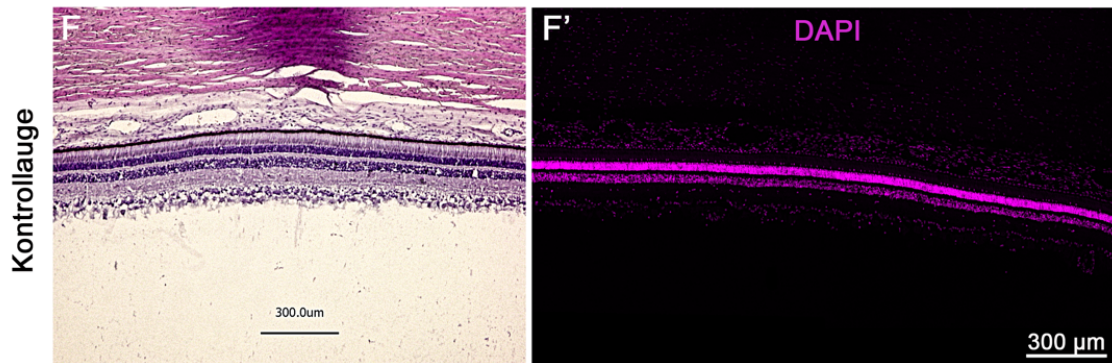


Abbildung 13: Hämatoxylin-Eosin-Färbung (links) mit Gegenüberstellung der HNAA-Expression und DAPI-Kernfärbung (rechts) des Implantatbereichs sowie der angrenzenden Strukturen (Retina unter Implantat, Choroidea, Sklera) im zeitlichen Verlauf.

Dargestellt sind die Ergebnisse 1 Woche (A, A'), 2 Wochen (B, B'), 6 Wochen (C, C', D, D') und 8 Wochen (E, E') nach Implantation sowie ein unbehandeltes Kontrollauge (F, F'). D und D' zeigen die Ergebnisse 6 Wochen nach Implantation am Schwein, welches die Immunsuppression erst am Tag der Operation erhielt. Bei allen anderen Versuchstieren wurde die Immunsuppression protokollgemäß bereits eine Woche vor der Operation begonnen. (Lytvynchuk, Ebbert et al., 2022)

Da sich bereits in den Übersichtsfärbungen ein deutlicher Unterschied zwischen den Versuchstieren mit und ohne protokollgemäßer Immunsuppression zeigte, erfolgte die Ergebnisauswertung des Versuchstieres mit nicht protokollgemäßer Immunsuppression gesondert. In den folgenden Kapiteln wurden zunächst die Ergebnisse der Versuchstiere mit protokollgemäßer Immunsuppression zu den unterschiedlichen Beobachtungszeiten ein, zwei, sechs und acht Wochen nach Implantation nebeneinander gestellt. Anschließend erfolgte eine Gegenüberstellung der Ergebnisse für die Versuchstiere mit und ohne protokollgemäßer Immunsuppression sechs Wochen nach Implantation separat in Kapitel 3.6.

3.2 Darstellung der Gliaproteine innerhalb der Retina und des Implantatbereichs

Zur Beurteilung der Reaktion von Gliazellen auf die Implantation von humanen RPE-Zellen auf einer Trägermembran ins Schweineauge wurden unterschiedliche Gliafärbungen durchgeführt. Es wurde die Expression der Makrogliamarker GFAP und Vimentin sowie des Mikrogliamarkers Iba1 untersucht. Zur Gegenüberstellung wurden zudem die Kontrollaugen ohne Implantat in der gleichen Art und Weise gefärbt. Für eine bessere Anschaulichkeit der Veränderungen wurden zuerst die Gliafärbungen der Kontrollaugen in Abbildung 14 (S. 59/61) und als Nächstes die Gliafärbungen der behandelten, implantattragenden Augen in Abbildung 15 (S. 62/62) dargestellt.

3.2.1 GFAP

GFAP (saures Gliafaserprotein) ist ein Protein, welches zu den Intermediärfilamenten gehört und hauptsächlich in Astrozyten des zentralen Nervensystems vorkommt (Eisenfeld et al., 1984; Lewis & Fisher, 2003). Die Zellkörper der Astrozyten befinden sich hauptsächlich in der Ganglienzellschicht und ihre Fortsätze erstrecken sich parallel zur Glaskörperoberfläche bis in die NFL, da sie den Axonen der Ganglienzellen auf ihrem Weg zum Nervus Optikus folgen. Auch die radiär verlaufenden Müller-Zellen exprimieren in geringerem Ausmaß GFAP, wobei eine Hochregulation der GFAP-Expression als Stressreaktion bekannt ist (Lewis & Fisher, 2003).

In Abbildung 14 (S. 59/59) zeigte sich für die unbehandelten Kontrollaugen eine (E), sechs (G) und acht (H) Wochen nach Implantation das Immunfluoreszenzsignal der GFAP-Färbung wie erwartet vor allem in der GCL und in der NFL mit vorwiegend quer verlaufenden Fasern, was der Lokalisation der Astrozyten mit dem Verlauf der Astrozytenfortsätze parallel zur Glaskörperoberfläche entspricht. Eine Expression von GFAP in den radiären Fasern der Müller-Zellen lag nur in geringem Ausmaß vor.

In Abbildung 15 (S. 61/62) zeigte sich für die behandelten Augen zu allen Zeitpunkten (L, M, J, K) eine deutliche Hochregulation von GFAP mit Nachweis des GFAP-Signals nicht nur in quer verlaufenden Fasern der Astrozyten in der GCL und NFL, sondern vor allem in den radiär verlaufenden Fasern der Müller-Zellen von der OLM bis zur ILM. Besonders gut ließen sich die quer verlaufenden Fasern der Astrozyten von den radiär verlaufenden Fasern der Müller-Zellen zwei Wochen nach Implantation abgrenzen (Abbildung 15, M). Auch in dem Kontrollauge ohne Implantat (Abbildung 14, F missglückte Operation), bei dem ein Implantationsversuch mit iatrogenen Retinaablösung erfolgt war, zeigte sich eine Hochregulation des GFAP-Signals in den Müller-Zellen im Vergleich zu den restlichen Kontrollaugen, bei denen kein Eingriff erfolgt war.

Eine Woche nach Implantation ließ sich innerhalb des Implantatbereichs keine GFAP Expression nachweisen (H). Abbildung 15, I zeigt den Randbereich des Implantats zwei Wochen nach Implantation. Hier ließ sich im Implantat selbst kein GFAP-Signal feststellen, in der dem Implantat angrenzenden Umgebung, insbesondere zur Seite des porcinen RPEs, zeigte sich allerdings reichlich Gewebe, welches GFAP positiv war (I). Auch sechs (J) und acht (K) Wochen nach Implantation zeigten sich GFAP-positive

Gewebevermehrungen im Implantatbereich. Sechs Wochen nach Implantation (J) war diese GFAP-positive Gewebevermehrung innerhalb des gesamten, hier sehr schmalen Implantatbereich auszumachen und bildete eine Art Grenzschicht in Richtung porcinem RPE aus, wohingegen sich acht Wochen nach Implantation (K) einzelne GFAP positive Gewebevermehrungen im Implantatbereich zeigten. Insgesamt ließ sich eine gliöse Reaktion in Implantatumgebung in allen Versuchstieren, bei denen eine Integration des Implantats stattgefunden hatte, beobachten (Abbildung 15, Bild I, J, K).

Zusammenfassend bestand im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollaugen eine Hochregulation der GFAP-Expression in den Müller-Zellen innerhalb der Retinae unterhalb der Implantate bei den behandelten, implantattragenden Augen und in der Retina des Versuchstieres mit persistierender Netzhautablösung. Zudem ließ sich eine gliöse Gewebereaktion innerhalb oder in unmittelbarer Umgebung des Implantats bei allen Versuchstieren, bei denen eine Integration des Implantats stattgefunden hatte, feststellen.

3.2.2 Vimentin

Bei Vimentin handelt es sich wie bei GFAP um ein Intermediärfilament, welches unter anderem in Müller-Gliazellen und Astrozyten vorkommt. Die Ergebnisse der Vimentinfärbung der Kontrollaugen wurden in Abbildung 14 (S. 59/59) und die Ergebnisse der Vimentinfärbung der behandelten Augen in Abbildung 15 (S. 61/62) dargestellt.

In Abbildung 14 (S. 59/59) zeigte sich für die Vimentin-Färbung der Kontrollaugen (A-D) eine Anfärbung der radiären Müller-Gliazellen mit ihrem Verlauf von der inneren (ILM) bis zur äußeren (OLM) Grenzschicht, wodurch sich diese Schichten gut abgrenzen ließen. Zudem zeigte sich auch hier der quere Faserverlauf der Astrozytenfortsätze innerhalb der GCL und NFL analog zu den Beobachtungen der GFAP-Färbung.

In Abbildung 15 (S. 61/62) zeigten sich für die Vimentin-Färbung der behandelten Augen folgende Ergebnisse. Eine Woche nach Implantation zeigte sich innerhalb der Retina (E) ein deutliches, dickfaseriges Vimentinsignal in allen Retinaschichten und somit eine im Vergleich zu den Kontrollaugen verstärkte Vimentin-Expression. Die Retina unter dem Implantat zwei Wochen nach Implantation (F) stellte sich ähnlich zu den Retinae der

Kontrollaugen dar und wies einen weitgehend physiologischen Zustand auf. Die quer verlaufenden Fasern in der NFL und GCL der Astrozyten waren hier sehr gut vom radiären Verlauf der Müller-Zellen abzugrenzen (F). Sowohl eine (A) als auch zwei (B) Wochen nach Implantation zeigte sich zudem ein deutliches Vimentinsignal innerhalb des Implantatbereichs selbst. Sechs Wochen nach der Implantation (C) zeigte sich ein deutliches, feinfaseriges Vimentinsignal in allen Retinaschichten. Es zeigte sich ein besonders starkes Signal im Implantatbereich. Allerdings ließen sich hier die Retinaschichten, beziehungsweise insbesondere die OLM schlecht vom Implantatbereich abgrenzen. Wie in der GFAP-Färbung ließ sich auch anhand der Vimentin-Expression die Formation einer Grenzschrift feststellen. Somit war von der Bildung einer gliösen Grenzschrift mit GFAP- und Vimentin-Expression auszugehen. Acht Wochen nach Implantation zeigte sich in der Retina (G) ein feinfaseriges Vimentinsignal mit einer abgrenzbaren OLM. Die NFL und GCL erschienen hier verdickt, was vermutlich auf einen schrägen Anschnitt zurückzuführen und somit als Artefakt zu werten war. Im Implantatbereich selbst zeigte sich acht Wochen nach Implantation (D) keine gleichmäßige Vimentin-Expression, sondern vereinzelte, regionale Vimentin-positive Gewebevermehrungen. Zudem ließen sich eine (E), sechs (C) und acht (G) Wochen nach Implantation einige von Vimentinfasern umschlossene Zellkerne innerhalb der ONL erkennen, was in den Kontrollaugen nicht festzustellen war.

Insgesamt zeigte sich ein, zwei und sechs Wochen nach Implantation eine gleichmäßige Expression von Vimentin innerhalb des Implantatbereichs, die acht Wochen nach Implantation abnahm und zu diesem Zeitpunkt eher auf regional begrenzte Gewebeansammlungen innerhalb des Implantatbereichs konzentriert war. Die Retinae unterhalb der Implantate wiesen zwei, sechs und acht Wochen eine im Vergleich zu den Kontrollaugen ähnliche Vimentin-Expression auf. Eine Woche nach Implantation zeigte sich eine verstärkte Vimentin-Expression. Hierbei handelte es sich um das Versuchstier mit fehlender Integration des Implantats und persistierender Retinaablösung. Die bereits in der GFAP-Färbung beobachtete Formation einer gliösen Grenzschrift sechs Wochen nach Implantation wies zudem auch eine Vimentin-Expression auf.

3.2.3 Iba1

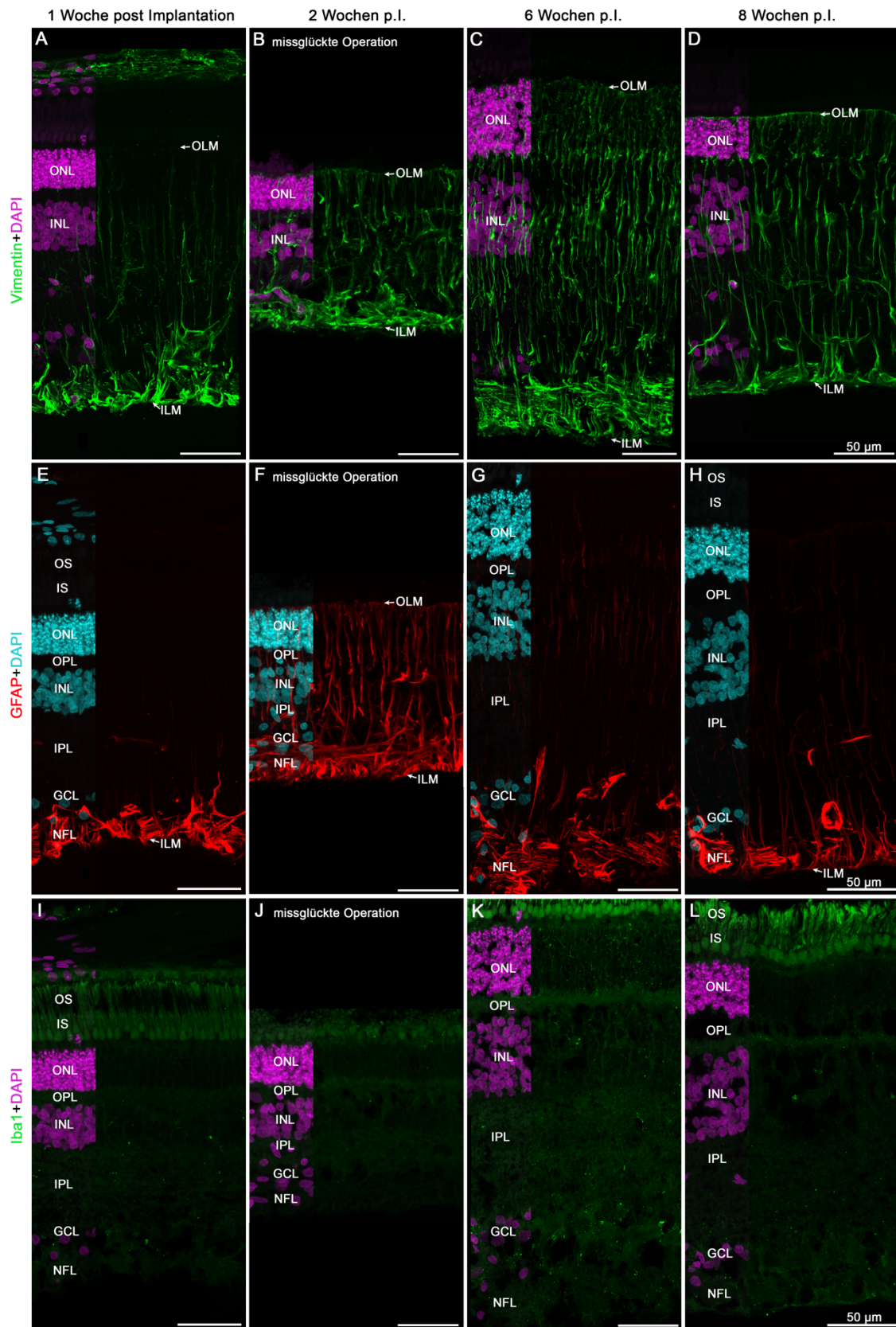
Als Marker für Mikroglia wurde Iba1 (ionisiertes Kalzium-bindendes Adaptormolekül 1) verwendet. Die Ergebnisse der Iba1-Färbung der Kontrollaugen wurden in Abbildung 14 (S. 59/59) und die Ergebnisse der Iba1-Färbung der behandelten Augen in Abbildung 15 (S. 61/62) dargestellt.

In den Kontrollaugen (Abbildung 14, I-L) war nur in geringem Ausmaß Iba1-spezifisches Färbesignal zu erkennen. In den behandelten Augen in Abbildung 15 (N-T) ließ sich deutlich mehr Iba1-spezifisches Färbesignal ausmachen. Besonders in der IPL fand sich eine erhöhte Signaldichte für die Iba-1-Färbung ein, zwei und sechs Wochen nach Implantation (R, S, P). Auch acht Wochen nach Implantation (T) zeigten sich im Vergleich zum Kontrollauge (Abbildung 14, Bild L) deutlichere Färbesignale, allerdings war hier das Färbesignal nicht auf die IPL beschränkt. Eine (N) und acht (Q) Wochen nach Implantation ließen sich einzelne mononukleäre Iba1-positive Zellen im Implantatbereich ausmachen (Markierung mit Pfeilen).

Insgesamt zeigte sich eine Aktivierung von Mikroglia in den Retinae aller behandelten Augen sowie im Implantatbereich eine und acht Wochen nach Implantation.

Abbildung 14: Expression der Makroglia marker Vimentin (A-D) und GFAP (E-H) sowie des Mikroglia markers Iba1 (I-L) in den Kontrollaugen zu den unterschiedlichen Beobachtungszeitpunkten bis 8 Wochen nach Implantation.

Das Immunfluoreszenzsignal ist für Vimentin und Iba1 in Grün dargestellt mit gleichzeitiger Darstellung der DAPI-Kernfärbung in Magenta. Das Immunfluoreszenzsignal der GFAP-Färbung ist in Rot dargestellt mit gleichzeitiger Darstellung der DAPI-Kernfärbung in Türkis. B, F und J (missglückte Operation) zeigen Retinaabschnitte des Kontrollauges, an dem ein erfolgloser Implantationsversuch mit iatrogner Retinaablösung durchgeführt worden war. OLM= äußere Grenzschicht, ONL=äußere Körnerschicht, OPL=äußere plexiforme Schicht, INL=innere Körnerschicht, IPL=innere plexiforme Schicht, GCL=Ganglienzellschicht, NFL=Nervenfaserschicht, ILM=innere Grenzschicht, OS=Außensegmente, IS= Innensegmente. (Lytvynchuk, Ebbert et al., 2022)



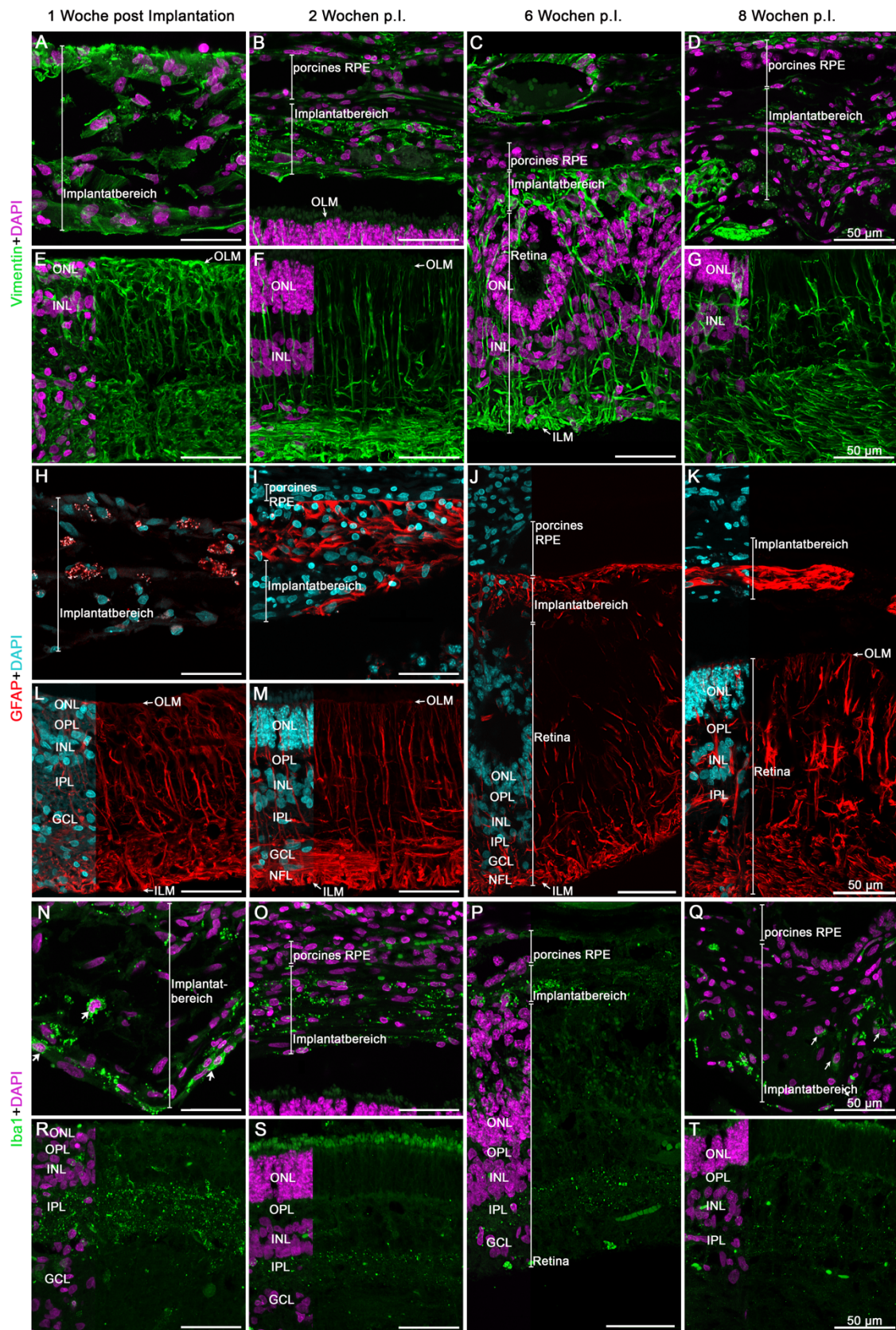


Abbildung 15: Expression der Makroglia marker Vimentin (A-G) und GFAP (H-M) sowie des Mikroglia markers Iba1 (N-T) in den behandelten Augen zu den unterschiedlichen Beobachtungszeitpunkten bis 8 Wochen nach Implantation.

Das Immunfluoreszenzsignal ist für Vimentin und Iba1 in Grün dargestellt mit gleichzeitiger Darstellung der DAPI-Kernfärbung in Magenta. Das Immunfluoreszenzsignal der GFAP-Färbung ist in Rot dargestellt mit gleichzeitiger Darstellung der DAPI-Kernfärbung in Türkis. OLM= äußere Grenzschicht, ONL=äußere Körnerschicht, OPL=äußere plexiforme Schicht, INL=innere Körnerschicht, IPL=innere plexiforme Schicht, GCL=Ganglienzellschicht, NFL=Nervenfaser-schicht. (Lytvynchuk, Ebbert et al., 2022)

3.3 Morphologie der Schweineretina im Vergleich zu den Kontrollaugen anhand der immunhistochemischen PNA- und PKC-alpha- Färbungen

3.3.1 PNA

PNA gilt als gut etablierter, immunhistochemischer Marker für die Zapfen-Photorezeptoren. Die Darstellung der Ergebnisse der PNA-Färbung erfolgte in Abbildung 16, A-H (S. 65/66). E-H zeigen die Ergebnisse der PNA-Färbung an den Kontrollaugen. In den unbehandelten Kontrollaugen (E, G, H) zeigte die Retina ein physiologisches Bild. Die Perikarien der Zapfen-Photorezeptoren befanden sich in äußeren Abschnitten der ONL, die Zapfenendfüßchen ließen sich in der OPL ausmachen und wurden exemplarisch mit Pfeilen und „cp“ (cone pedicles = Zapfenendfüßchen) markiert. Zudem ließen sich die Innen- und Außensegmente, die in den subretinalen Raum hineinragten, anhand ihrer Fluoreszenzintensitäten unterscheiden und zeigten sich gut erhalten. Unter F wurde das Ergebnis des Kontrollauges dargestellt, an dem ein erfolgloser Implantationsversuch mit iatrogener Retinaablösung stattgefunden hatte. Die Zellkörper und Zapfenendfüßchen waren hier nicht eindeutig abgrenzbar, da das Fluoreszenzsignal der Immunfärbung insgesamt flauer erschien und sich die ansonsten klar abgrenzbaren Perikarien und Zapfenendfüßchen ohne scharfe Umrandung darstellten (Abb. 16, F). Die Innen- und Außensegmente waren ebenfalls nicht eindeutig voneinander unterscheidbar und deutlich verkürzt.

In den Augen mit Implantat (A-D) ließen sich unterschiedliche Veränderungen der Retinae unterhalb der Implantate feststellen. Eine Woche nach Implantation (A) zeigte sich am behandelten Auge (nicht integriertes Implantat) eine Degeneration der Zapfen-Photorezeptoren. Die Zellkörper waren in der ONL nicht klar abgrenzbar, Zapfenendfüßchen, Photorezeptorinnen- und außensegmente waren ebenfalls nicht zu erkennen. Zudem zeigten sich neuronale Aussprossungen der Zapfen-Photorezeptoren in innere Retinaschichten bis an den Rand der GCL (A, Markierung mit Pfeilspitzen). Zwei Wochen nach Implantation (B) zeigte sich am behandelten Auge ein relativ physiologisches Bild der Retina. Zellkörper in der ONL und Zapfenendfüßchen in der

OPL waren eindeutig erkennbar. Allerdings waren die Photorezeptorinnen- und -außensegmente deutlich verkürzt und nicht eindeutig unterscheidbar. Ein dazu ähnliches Ergebnis zeigte sich acht (D) Wochen nach Implantation, wobei hier die Abgrenzbarkeit der Zapfenendfüßchen schlechter war. Sechs Wochen nach Implantation (C) erschien die Dichte der Zapfen-Photorezeptoren herabgesetzt, Zellkörper in der ONL und Zapfenendfüßchen in der OPL waren allerdings erkennbar. Auch hier wiesen die Photorezeptorinnen- und -außensegmente eine schlechte Unterscheidbarkeit auf und waren deutlich verkürzt.

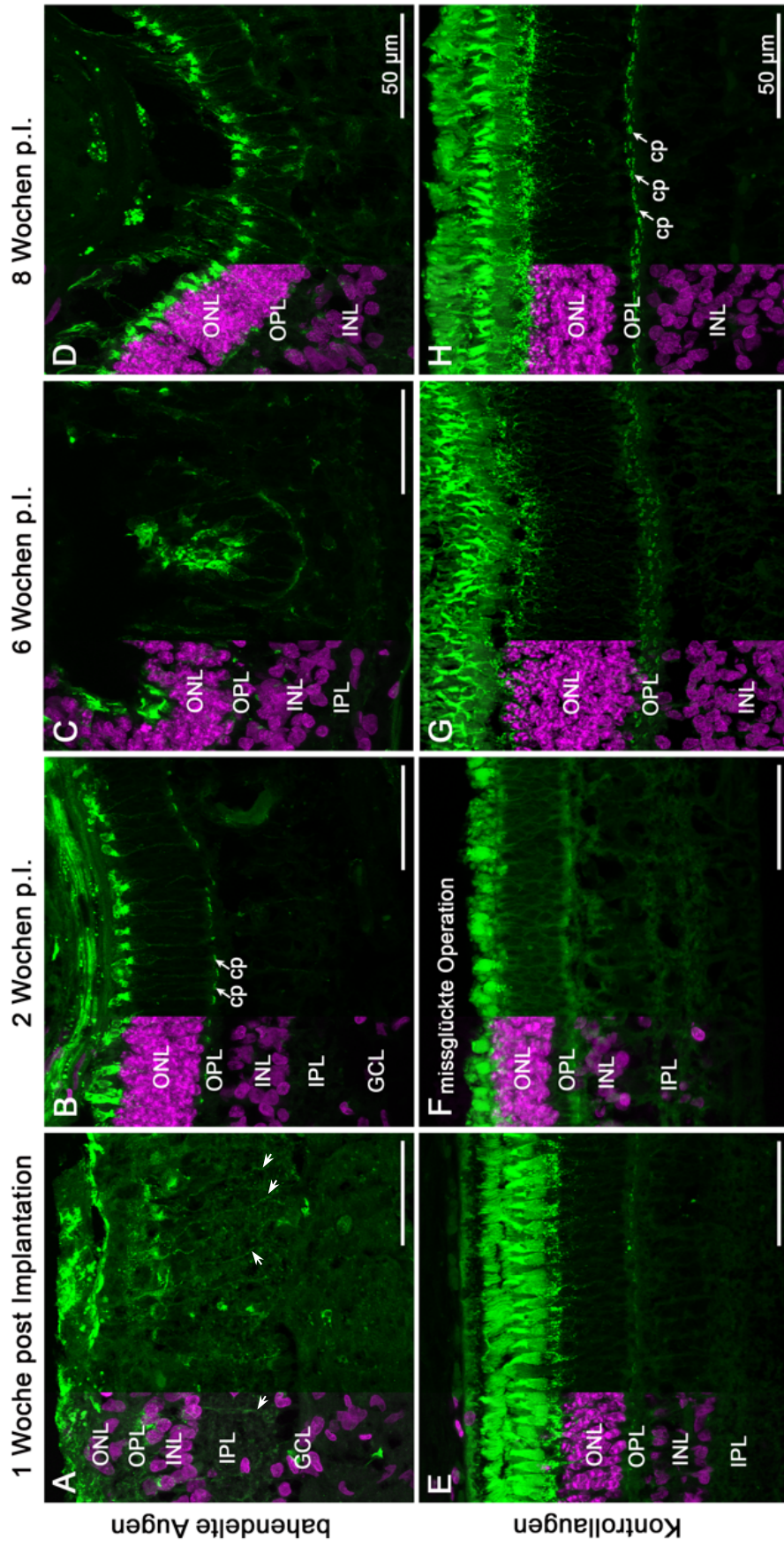
Insgesamt zeigten sich die Zapfen-Photorezeptoren zwei, sechs und acht Wochen nach Implantation erhalten mit unterschiedlich stark ausgeprägten morphologischen Veränderungen. Ein deutlicher Verlust an Photorezeptoren konnte nur eine Woche nach Implantation beobachtet werden. Bei diesem Versuchstier lag bei einer fehlenden Integration des Implantats und damit einhergehend eine persistierende Ablösung der Retina vor.

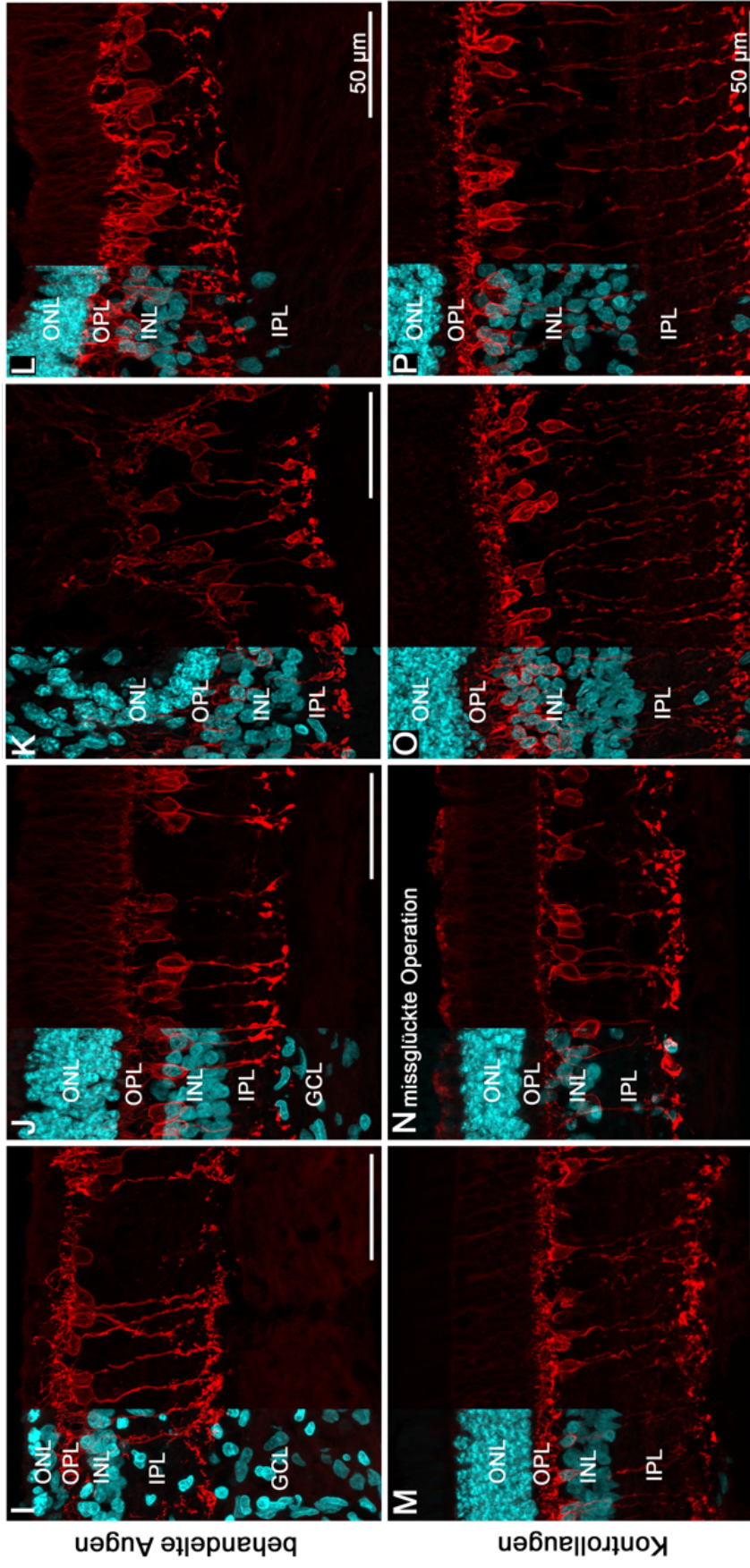
3.3.2 PKC-alpha

PKC-alpha gilt als gut etablierter, immunhistochemischer Marker für Stäbchen-Bipolarzellen in der Wirbeltierretina. Die Darstellung der Ergebnisse der PKC-alpha-Färbung der behandelten Augen sowie der Kontrollaugen zu den unterschiedlichen Beobachtungszeitpunkten erfolgte in Abbildung 16, I-P (S. 66). Die Ergebnisse der Kontrollaugen wurden in der unteren Zeile M-P dargestellt und zeigten eine weitgehend physiologische Morphologie der Stäbchen-Bipolarzellen. Die Perikarien der Stäbchen-Bipolarzellen lagen in den äußeren Abschnitten der INL. Von hier aus zogen synaptische Verzweigungen in die OPL und ein Axon mit endständigen, synaptischen Auftreibungen durch die IPL in Richtung GCL. Die Längenunterschiede der Axone, beziehungsweise die unterschiedlichen Schichtdicken der IPL, in den unterschiedlichen Versuchstieren waren vermutlich auf differierende Ansnittswinkel zurückzuführen und somit als Artefakte zu werten. In dem Kontrollauge (N), an dem ein missglückter Implantationsversuch erfolgt war, ließen sich keine besonderen morphologischen Unterschiede zu den unbehandelten Kontrollaugen feststellen. Auch in den behandelten Augen mit Implantat (I-L) zeigte sich die morphologische Struktur der Stäbchen-Bipolarzellen zu allen Beobachtungszeitpunkten weitgehend erhalten. Sechs Wochen

nach Implantation (K) zeigten sich Verformungen und Längenunterschiede der Stäbchen-Bipolarzellen, was auf die Rosettenbildung der Retina zurückzuführen war.

Zusammenfassend zeigten sich die inneren Schichten (INL, IPL) der Retina anhand der Beurteilung der Stäbchen-Bipolarzellen in der PKC-alpha-Färbung in ihrer Morphologie weitgehend unbeeinträchtigt durch Implantation humaner RPE-Zellen auf einer Trägermembran und waren somit insgesamt weniger beeinflusst durch die Implantation als die äußeren Schichten der Retina, beurteilt anhand der Morphologie der Zapfen-Photorezeptoren in der PNA-Färbung.





PKC-alpha+DAPI

Abbildung 16: Expression des Zapfen-Photorezeptoren-Markers PNA (Peanut Agglutinin) und des Stäbchen-Bipolarzellen-Markers PKC-alpha in der Retina unterhalb des Implantats und der unbehandelten Kontrollaugen zu den unterschiedlichen Beobachtungszeitpunkten bis zu 8 Wochen nach Implantation.

A-H zeigen die Ergebnisse der PNA-Färbung in Grün und der DAPI-Kernfärbung in Magenta. I-P zeigen die Ergebnisse der PKC-alpha-Färbung in Rot und der DAPI-Kernfärbung in Türkis. A-D und I-L zeigen die Retinaabschnitte unterhalb des Implantats der behandelten Augen. E-H und M-P zeigen Retinaabschnitte aus den entsprechenden Kontrollaugen. N und F (missglückte Operation) zeigen Retinaabschnitte des Kontrollauges, an dem ein erfolgloser Implantationsversuch mit iatrogen Retinaablösung durchgeführt worden war. CP=cone pedicles (Zapfenendfüßchen), ONL=äußere Körnerschicht, OPL=äußere plexiforme Schicht, INL=innere Körnerschicht, IPL=innere plexiforme Schicht, GCL=Ganglienzellschicht. Pfeilspitzen = neuronale Ausprossungen der Zapfen-Photorezeptoren in innere Retinaschichten. (Lytvynchuk, Ebbert et al., 2022)

3.4 Immunhistochemischer Nachweis der humanen Marker HNAA und STEM121 im Implantatbereich

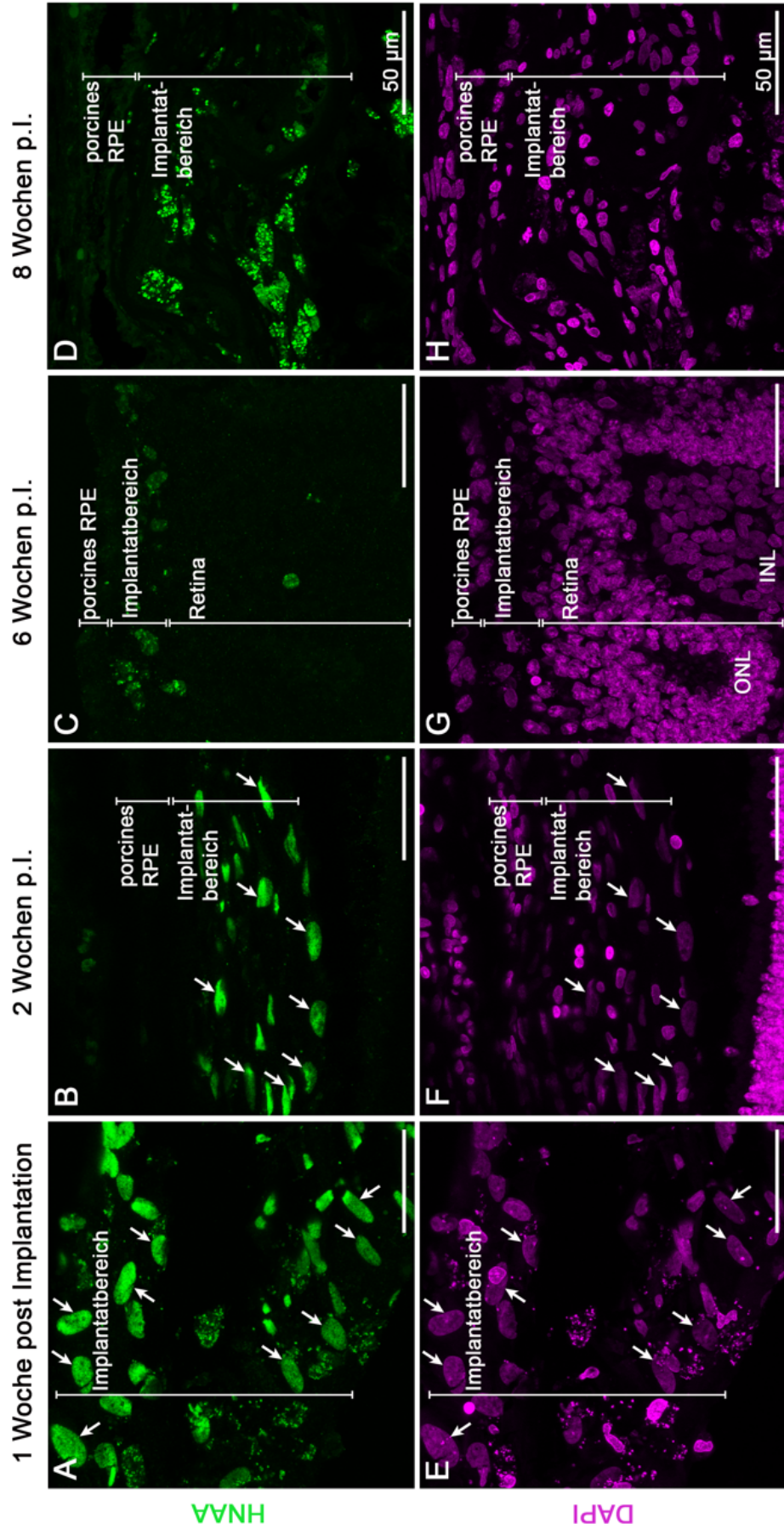
3.4.1 HNAA

HNAA (Humanes Nukleäres Antigen Antikörper) ist ein Marker, der sich für die immunhistochemische Anfärbung menschlicher Zellkerne eignet. Da es sich bei den implantierten primären RPE-Zellen um menschliche Zellen handelte, wurde diese Färbung zur Identifikation der implantierten RPE-Zellen eingesetzt. Das Ergebnis der HNAA-Färbung sowie der mitgeführten Negativkontrollen für die behandelten Augen wurde in Abbildung 17 (S. 69/70) dargestellt. Eine (A, I) und zwei Wochen (B, J) nach Implantation wiesen die implantierten Zellen eine homogene Expression von HNA (Humanes Nukleäres Antigen) im Zellkern auf. Die Lokalisation der HNA-Expression im Zellkern konnte durch die Co-Lokalisation mit der DAPI-Kernfärbung nachgewiesen werden (I, J). Zur Verdeutlichung wurden HNAA-positive Zellkerne mit Pfeilen markiert und die DAPI-Kernfärbung zusätzlich isoliert dargestellt (E-H), da das starke Färbesignal der HNAA-Färbung die Ergebnisse der DAPI-Kernfärbung in der kombinierten Darstellung teilweise verdeckte (I-L). Zudem ließen sich bereits zu diesen Stadien auch nicht HNAA-positive Zellkerne innerhalb des Implantatbereichs identifizieren. Auffallend war, dass die implantierten RPE-Zellen nicht als einschichtige Zellschicht orientiert waren, sondern mehrere Zellreihen innerhalb des Implantatbereichs aufwiesen. Im Vergleich zu den mitgeführten Negativkontrollen (M, N) ließ sich das Färbesignal der Zellkerne ein und zwei Wochen nach Implantation als spezifische Färbung klassifizieren.

Sechs (C, K) und acht (D, L) Wochen nach Implantation ließ sich keine spezifische Färbung durch die HNAA-Färbung im Vergleich zu den Negativkontrollen (O, P) mehr nachweisen. Acht Wochen nach Implantation zeigte sich ein starkes, granuläres Fluoreszenzsignal, welches sich aber hinsichtlich seiner Intensität und Lokalisation nicht von der mitgeführten Negativkontrolle unterschied. Es deckte sich zudem nicht mit dem Signal der DAPI-Kernfärbung, war somit nicht im Zellkern lokalisiert und insgesamt ebenfalls als nicht spezifisches Färbesignal zu werten. Die nicht spezifischen, granulären Immunfluoreszenzsignale waren dabei auf die Autofluoreszenz der Melaningranula zurückzuführen. Zur besseren Anschaulichkeit wurden die Zeitpunkte eine und acht Wochen nach Implantation in Gegenüberstellung mit den entsprechenden Negativkontrollen in Abbildung 18 (S. 71) noch einmal vergrößert dargestellt. Spezifisches HNAA-Färbesignal wurde mit Pfeilen markiert (Abbildung 18, A).

Unspezifisches Autofluoreszenzsignal der Melaningranula, welches sowohl in den Negativkontrollen (Abbildung 18, C und D) als auch acht Wochen nach Implantation (Abbildung 18, B) festzustellen war, wurde mit Pfeilspitzen markiert.

Zusammenfassend ließen sich zu den Zeitpunkten ein und zwei Wochen nach Implantation deutlich einzelne, humane Zellkerne im Implantatbereich durch die HNAA-Färbung wie erwartet nachweisen. Zu den späteren Zeitpunkten sechs und acht Wochen nach Implantation konnte jedoch keine spezifische HNA-Expression mehr nachgewiesen werden. Folglich war von einem Verlust der Expression des humanen Antigens der implantierten Zellen oder von einer Degeneration der humanen RPE-Zellen im zeitlichen Verlauf auszugehen.



HNAA

DAPI

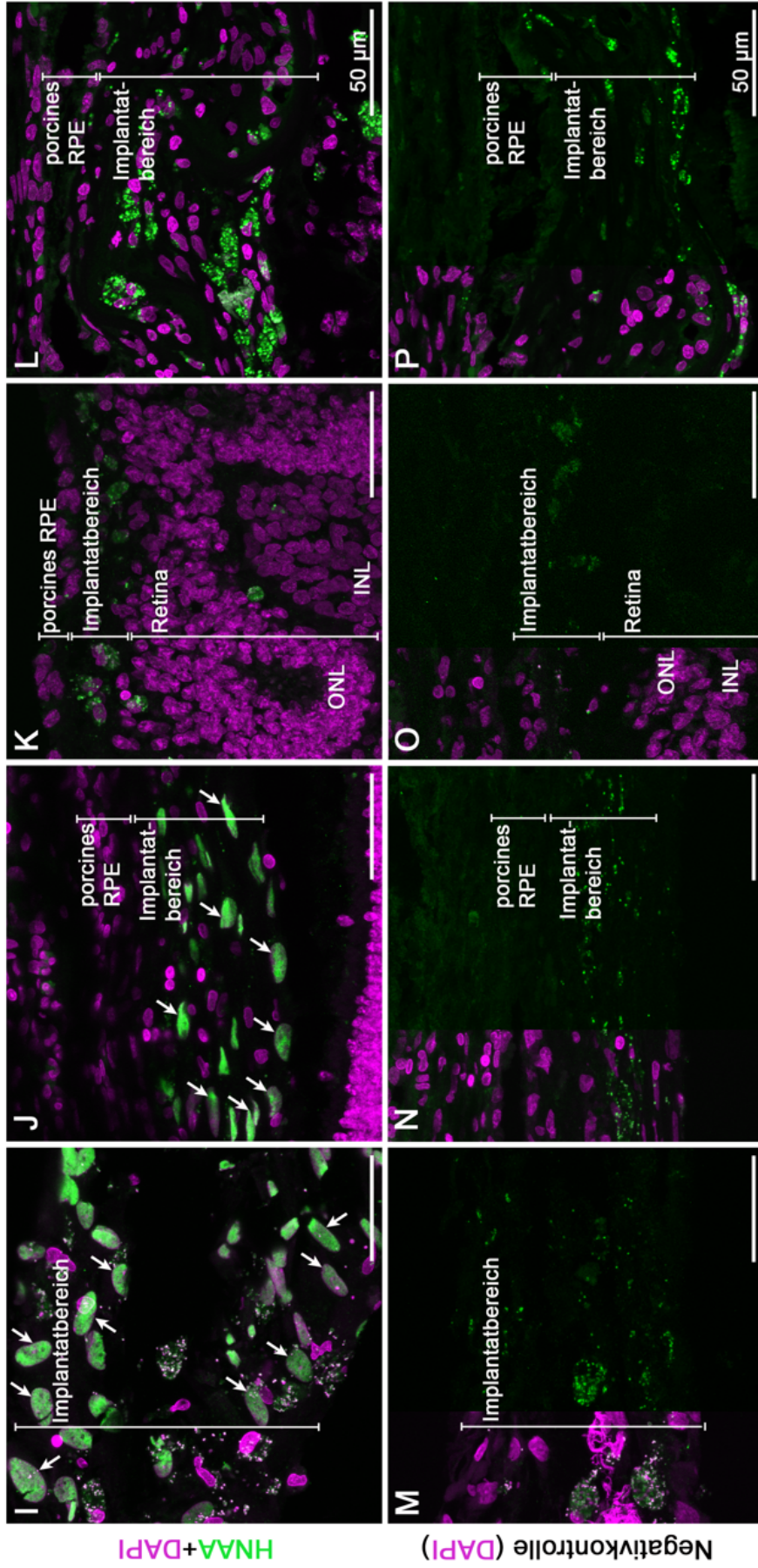


Abbildung 17: Nachweis des humanen Markers HNAA für die auf einer Trägermembran implantierten primären, humanen RPE-Zellen zu den unterschiedlichen Beobachtungszeitpunkten bis 8 Wochen nach Implantation.

Unter A-D sind die Immunfluoreszenzsignale der HNAA-Färbung in Grün zu den unterschiedlichen Beobachtungszeitpunkten alleine dargestellt. Unter E-H sind die Immunfluoreszenzsignale der DAPI-Kernfärbung in Magenta alleine dargestellt. Unter I-L sind die Ergebnisse der HNAA-Färbung (Grün) und der DAPI-Kernfärbung (Magenta) kombiniert dargestellt. M-P zeigt die Ergebnisse der mitgeführten Negativkontrollen mit DAPI-Kernfärbung in Magenta zur Unterscheidung von spezifischen Färbesignalen und Autofluoreszenzsignalen der Melaningranula. ONL=äußere Körnerschicht, INL=innere Körnerschicht. Pfeile = spezifisches HNAA-Färbesignal. (Lytvynchuk, Ebbert et al., 2022)

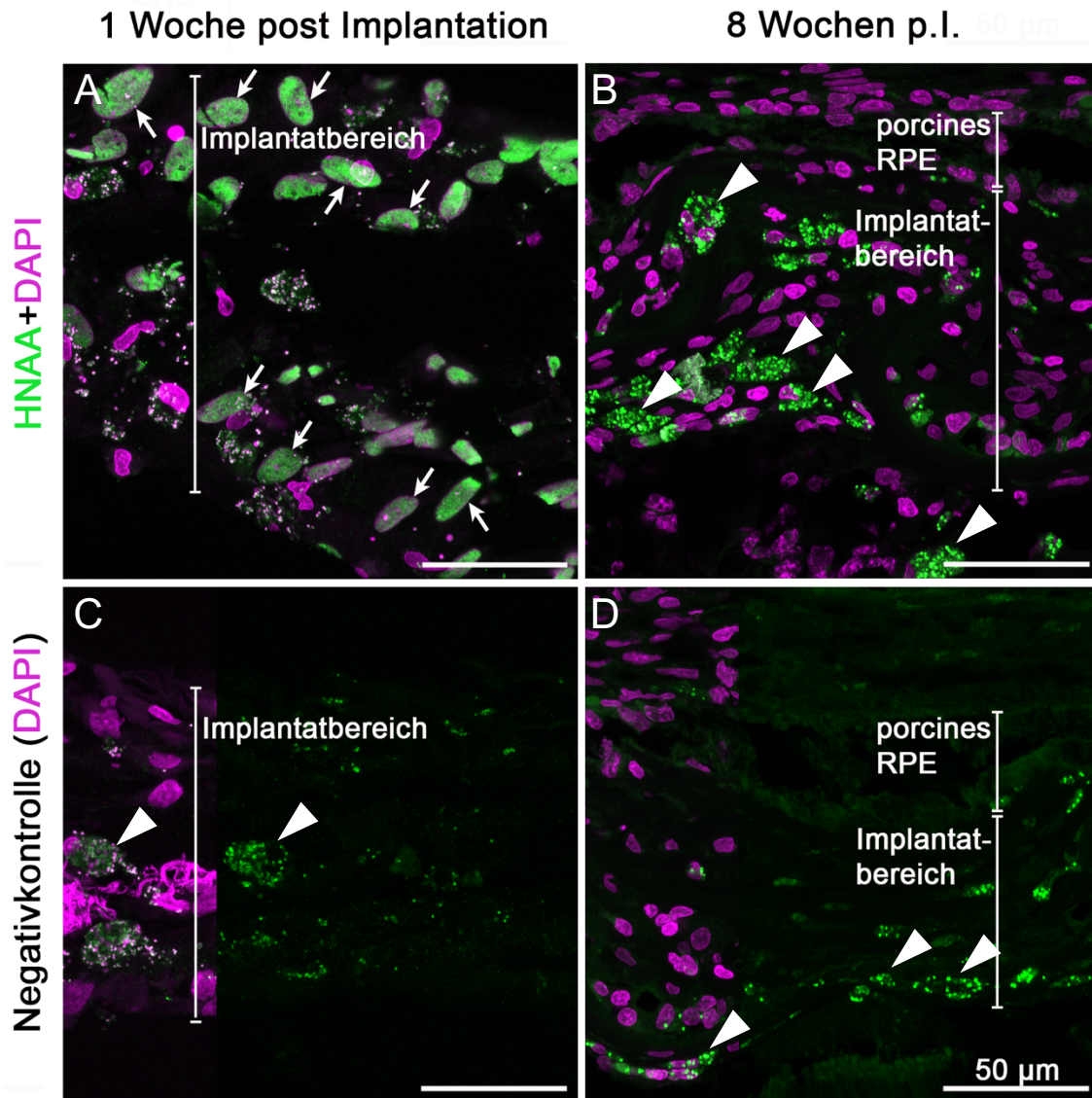


Abbildung 18: Nachweis des humanen Markers HNAA für die auf einer Trägermembran implantierten primären, humanen RPE-Zellen 1 und 8 Wochen nach Implantation in Gegenüberstellung zu den Negativkontrollen.

Unter A-B sind die Immunfluoreszenzsignale der HNAA-Färbung (Grün) und der DAPI-Kernfärbung (Magenta) kombiniert zu den unterschiedlichen Beobachtungszeitpunkten dargestellt. C-D zeigen die Ergebnisse der mitgeführten Negativkontrollen mit DAPI-Kernfärbung in Magenta. Pfeile = spezifisches HNAA-Färbesignal, Pfeilspitzen = unspezifische Autofluoreszenzsignale der Melaningranula.

3.4.2 STEM121

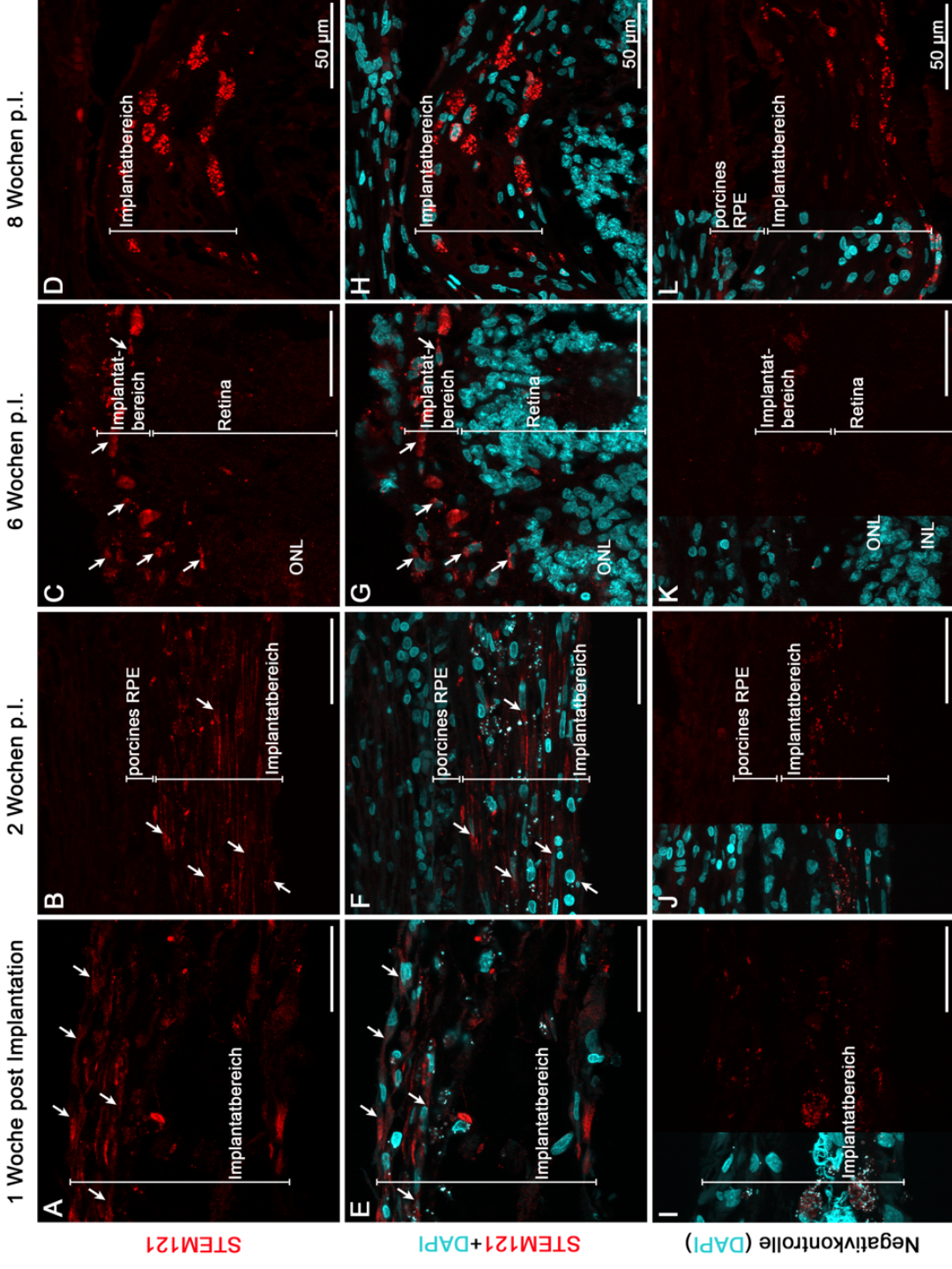
Bei STEM121 handelt es sich um einen spezifischen, immunhistochemischen Marker, mit dem das Zytoplasma humaner Zellen dargestellt werden kann. STEM121 wurde eingesetzt, um die zytoplasmatischen Strukturen der implantierten, humanen RPE-Zellen sichtbar zu machen und somit ergänzend zur HNAA-Färbung die Integration der menschlichen Zellen in das porcine Gewebe zu beurteilen.

In Abbildung 19 (S. 74) wurden die Ergebnisse der STEM121-Färbung der behandelten Augen sowie der mitgeführten Negativkontrollen dargestellt. A-D zeigt das Immunfluoreszenzsignal der STEM121-Färbung alleine, E-H die Kombination des STEM121-Signals (Rot) und der DAPI-Kernfärbung (Türkis). Um spezifische Färbesignale von der starken Autofluoreszenz der Melaningranula des RPEs abgrenzen zu können, wurden unter I-L die Ergebnisse der mitgeführten Negativkontrollen ebenfalls dargestellt. Eine (A, E) und zwei (B, F) Wochen nach Implantation zeigte sich eine feingranuläre, homogen verteilte Anfärbung des Zytoplasmas der Zellen im Implantatbereich. Exemplarisch wurden die Übergänge von Perikaryon zu Zytoplasma mit Pfeilen markiert. Somit wurden zu diesen Zeitpunkten, analog zu den Ergebnissen der HNAA-Färbung, die menschlichen Marker von den implantierten Zellen weiterhin exprimiert. Die Zellen wiesen eine flache, längliche Form auf und schienen untereinander, wenn auch nicht als einschichtiger Zellverband, konfluierend in Verbindung zu stehen. Zwei Wochen nach Implantation (B, F) ließen sich circa zehn dicht übereinander liegende Zellschichten erkennen. Eine Woche nach Implantation (A, E) wiesen die einzelnen Zellschichten größere Abstände untereinander auf. Bei diesem Präparat handelte es sich um das Versuchstier, bei dem es vermutlich aufgrund einer intraoperativen Verdrehung des Implantats zu keiner Integration des Implantats in das porcine Gewebe gekommen war. Sowohl eine (A, E) als auch zwei (B, F) Wochen nach Implantation ließ sich das Färbesignal im Vergleich zu den Negativkontrollen (I, J) eindeutig als spezifisch bewerten. Auch sechs Wochen nach Implantation (C, G) ließen sich im Vergleich zur Negativkontrolle (K) spezifische Färbesignale erkennen und wurden ebenfalls mit Pfeilen gekennzeichnet. Die humanen zytoplasmatischen Strukturen, die durch die STEM121-Färbung markiert wurden, wiesen hier jedoch im Vergleich zu den früheren Beobachtungszeitpunkten eine abweichende Form auf. Die zytoplasmatischen Ausläufer nahmen nicht mehr die zuvor beschriebene flache, längliche Form ein, sondern waren unregelmäßig geformt und standen nicht untereinander in

Verbindung. Auch die feingranuläre, homogene Anfärbung des Zytoplasmas fand sich sechs Wochen nach Implantation nicht mehr. Es zeigte sich vielmehr eine grobgranuläre, teils fleckige Anfärbung höherer Intensität mit überlagerter Autofluoreszenz (C, G). Acht Wochen nach Implantation (D, H) zeigte sich ein starkes, granuläres Fluoreszenzsignal, welches sich allerdings hinsichtlich seiner Intensität und Lokalisation nicht von der mitgeführten Negativkontrolle (L) unterschied und somit nicht als spezifisches Färbesignal, sondern als Autofluoreszenz der Melaningranula zu werten war. Analog zur HNAA-Färbung erschien auch hier die Autofluoreszenz acht Wochen nach Implantation im Vergleich zu den früheren Beobachtungszeitpunkten als besonders stark ausgeprägt.

Somit ließ sich auch hier, analog zu den Beobachtungen in der HNAA-Färbung, ein Verlust der Expression des humanen Markers STEM121 und zudem auch eine Auflockerung des Zellverbands im zeitlichen Verlauf beobachten.

Abbildung 19: Expression des humanen Markers STEM121 in primären, humanen RPE-Zellen zu den unterschiedlichen Beobachtungszeitpunkten 1, 2, 6 und 8 Wochen nach Implantation auf einer Trägermembran.



Unter A-D sind die Immunfluoreszenzsignale der STEM121-Färbung in Rot zu den unterschiedlichen Beobachtungszeitpunkten alleine dargestellt. Unter E-H sind die Immunfluoreszenzsignale der STEM121-Färbung in Rot zu den unterschiedlichen Beobachtungszeitpunkten in Kombination mit der DAPI-Kernfärbung in Türkis dargestellt. I-L zeigt die Ergebnisse der mitgeführten Negativkontrollen mit DAPI-Kernfärbung in Türkis zur Unterscheidung von spezifischen Färbesignalen und Autofluoreszenzsignalen der Melanin granula. ONL=äußere Körnerschicht, INL=innere Körnerschicht. Pfeilspitzen = Übergänge von Perikaryon zu Zytoplasma. (Lytyvynchuk, Ebbert et al., 2022)

3.5 Immunhistochemischer Nachweis der RPE-spezifischen Marker CRALBP und Bestrophin

3.5.1 CRALBP

CRALBP (zelluläres Retinaldehyd-bindendes Protein) ist ein Protein, welches im RPE unterschiedlicher Spezies zu finden und an der Rückführung von all-trans-Retinol zu 11-cis-Retinal maßgeblich beteiligt ist (Saari et al., 2001). Somit eignet sich CRALBP als RPE-Zellmarker und wurde zu diesem Zweck eingesetzt.

Abbildung 20 (S. 76) stellt die Ergebnisse der CRALBP-Färbung an den behandelten Augen unter A-H zu den unterschiedlichen Beobachtungszeitpunkten bis zu acht Wochen nach Implantation dar. Zur Demonstration der RPE-Spezifität des Markers und zur Darstellung der physiologischen Morphologie wurde unter I-L das Ergebnis der CRALBP-Färbung an den Kontrollaugen dargestellt. Das RPE präsentierte sich hier als einschichtige, zusammenhängende Zellschicht mit deutlicher und homogener CRALBP-Expression innerhalb des Zytoplasmas. Eine Woche nach Implantation zeigte das porcine RPE am behandelten Auge (A, E) ein ähnliche und somit physiologische Struktur. Innerhalb des Implantatbereichs (A', E') ließ sich keine CRALBP-Expression der humanen RPE-Zellen erkennen. Zwei Wochen nach Implantation (B, F) ließ sich eine CRALBP-Expression sowohl im Bereich des porcinen RPEs als auch am Rand des Implantatbereichs, vor allem an der dem porcinen RPE zugewandten Seite, feststellen. Innerhalb des Implantatbereichs exprimierten die implantierten humanen RPE-Zellen kein CRALBP. Sechs Wochen nach Implantation (C, G) zeigte sich neben der CRALBP-Expression des porcinen RPEs kein eindeutiges Färbesignal der CRALBP-Färbung innerhalb des Implantatbereichs. Acht Wochen nach Implantation (D, H) ließ sich die CRALBP-Expression ebenfalls nur innerhalb des porcinen RPEs und nicht innerhalb des Implantatbereichs feststellen.

Insgesamt zeigte sich im porcinen RPE die Expression von CRALBP weitgehend unbeeinflusst von der Implantation, wohingegen eine CRALBP-Expression der humanen, implantierten RPE-Zellen zusammenfassend nicht nachzuweisen war.

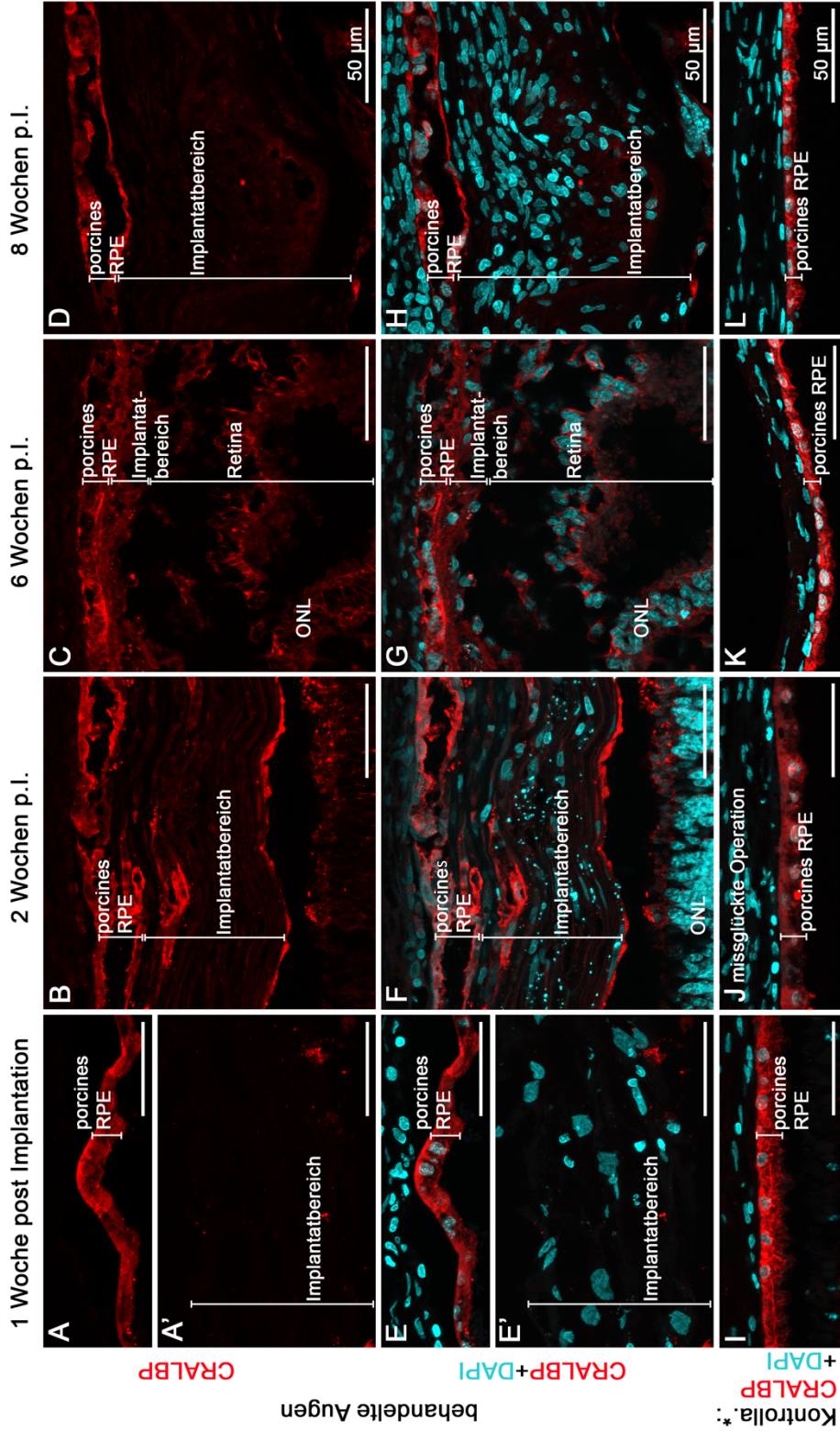


Abbildung 20: Expression des RPE-Markers CRALBP (zelluläres Retinaldehyd-bindendes Protein) im porcinen RPE und im Implantatbereich in den behandelten Augen (A-H) 1, 2, 6 und 8 Wochen nach Implantation.

Unter A-D sind die Immunfluoreszenzsignale der CRALBP-Färbung in Rot zu den unterschiedlichen Beobachtungszeitpunkten alleine dargestellt. Unter E-H sind die Immunfluoreszenzsignale der CRALBP-Färbung in Rot zu den unterschiedlichen Beobachtungszeitpunkten in Kombination mit der DAPI-Kernfärbung in Türkis dargestellt. I-L zeigen die Ergebnisse der Färbung an den Kontrollaugen zum Nachweis der Spezifität des Markers. *Kontrollä.=Kontrollaugen, ONL=äußere Körnerschicht. (Lytvynchuk, Ebbert et al., 2022)

3.5.2 Bestrophin

Bestrophin ist ein integrales Protein der Zellmembran, welches von RPE-Zellen exprimiert wird und als Kalzium-abhängiger Chlorid-Kanal vermutlich an der Regulation der Membranleitfähigkeit des RPEs und der elektrischen Interaktion des RPEs mit den Photorezeptoren beteiligt ist (Strauß & Rosenthal, 2005). Es eignet sich somit als immunhistochemischer RPE-Zellmarker und wurde als dieser eingesetzt.

Abbildung 21 (S.78) zeigt unter A-D die Ergebnisse der Bestrophin-Färbung an den behandelten Augen zu den unterschiedlichen Beobachtungszeitpunkten bis zu acht Wochen nach Implantation. Unter E-H wurden die Färbeergebnisse der Kontrollaugen zur Demonstration der RPE-Spezifität des Markers und zur Darstellung der physiologischen Morphologie dargestellt. Hier präsentierte sich das RPE als konfluierende, einschichtige Zellschicht mit gleichmäßiger Bestrophin-Expression. An dem Kontrollauge eine Woche nach Implantation (E) ließen sich zudem die Zell-Zell-Kontakte als Signalanhebungen erkennen. Die Photorezeptorinnen- und -außensegmente wiesen eine moderate Autofluoreszenz auf. Auch an den behandelten Augen (A-D) war das porcine RPE Bestrophin-positiv. Eine Woche nach Implantation ließ sich innerhalb des Implantatbereichs (A') ebenfalls eine homogene, zytoplasmatische Expression von Bestrophin erkennen, die im Vergleich zum Färbesignal des porcinen RPEs weniger intensiv erschien. Innerhalb des Implantatbereichs ließ sich zwei (B), sechs (C) und acht Wochen (D) nach Implantation kein spezifisches Färbesignal der Bestrophin-Färbung feststellen, da sich kein Unterschied zu den Färbeergebnissen der Negativkontrollen (nicht dargestellt) gezeigt hatte. Das intensive, granuläre Immunfluoreszenzsignal, welches insbesondere acht Wochen nach Implantation (D) auffiel, war auf die Autofluoreszenz der Melaningranula zurückzuführen und als nicht spezifisch zu werten.

Insgesamt zeigte sich eine weitgehend unbeeinflusste Expression von Bestrophin innerhalb des porcinen RPEs. Innerhalb des Implantatbereichs ließ sich eine im Vergleich zum porcinen RPE schwächere Bestrophin-Expression lediglich eine Woche nach Implantation (A') nachweisen. Zu allen weiteren Beobachtungszeitpunkten war keine Bestrophin-Expression innerhalb des Implantatbereichs nachweisbar.

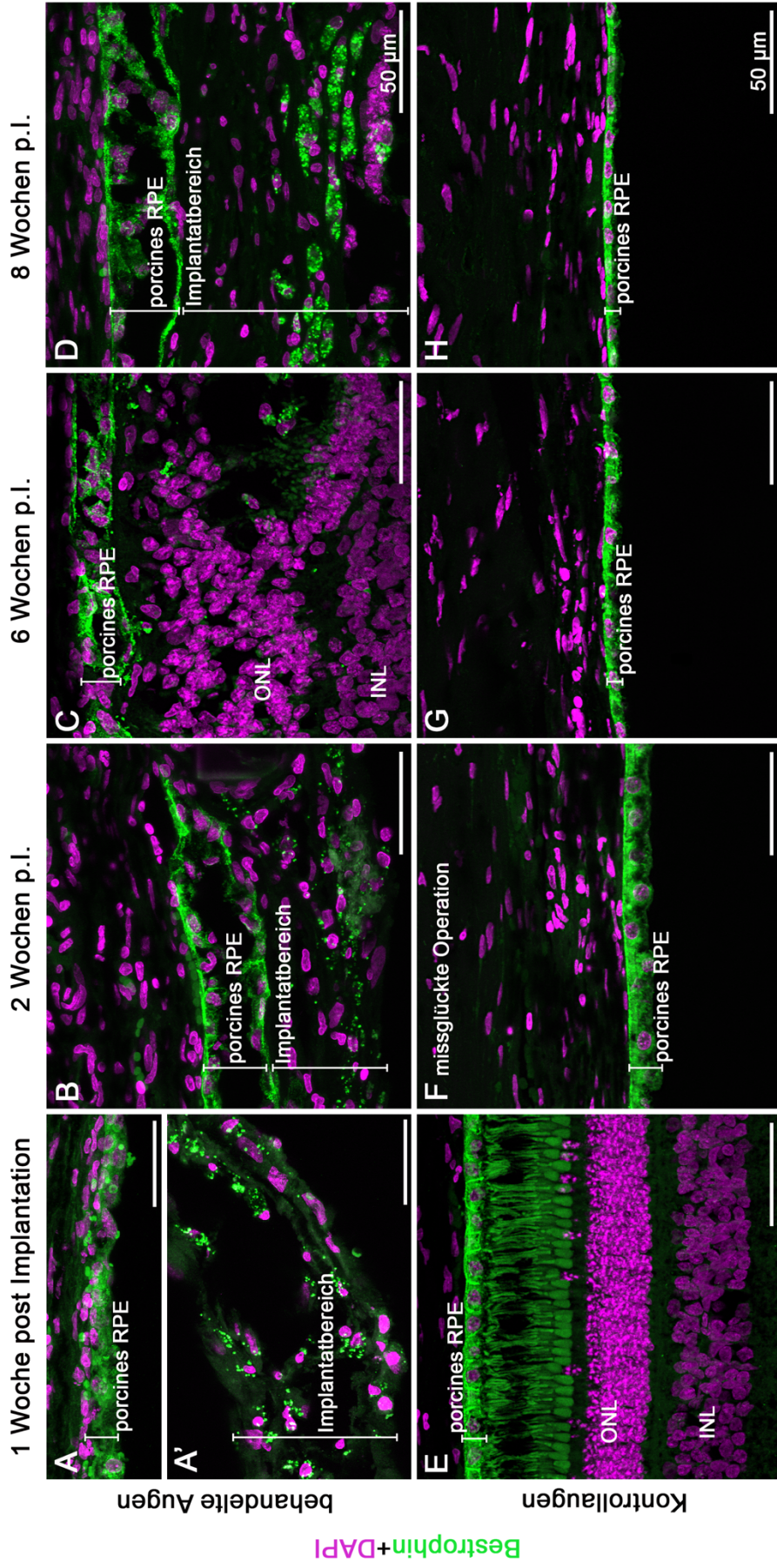


Abbildung 21: Expression des RPE-spezifischen Markers Bestrophin im porcinen RPE und im Implantatbereich in den behandelten Augen (A-D) zu den unterschiedlichen Beobachtungszeitpunkten bis zu 8 Wochen nach Implantation.

Unter A-D sind die Immunfluoreszenzsignale der Bestrophin-Färbung in Grün zu den unterschiedlichen Beobachtungszeitpunkten in Kombination mit der DAPI-Kernfärbung in Magenta dargestellt. E-H zeigen die Ergebnisse der Färbung an den Kontrollaugen zum Nachweis der Spezifität des Markers. ONL=äußere Körnerschicht, INL=innere Körnerschicht. (Lytvynchuk, Ebbert et al., 2022)

3.6 Gegenüberstellung der Versuchstiere sechs Wochen nach Implantation mit und ohne protokollgemäßer Immunsuppression anhand der Makrogliaproteine GFAP und Vimentin und der humanen Marker HNAA und STEM121

In den folgenden Abschnitten wurden die beiden Versuchstiere, die sechs Wochen nach Implantation euthanisiert wurden und sich nur hinsichtlich der erhaltenen immunsuppressiven Therapieregime unterschieden, gegenübergestellt. Ein Versuchstier erhielt die protokollgemäße Immunsuppression mit der Applikation von Tacrolimus sieben Tage vor Implantation. Die Färbeergebnisse dieses Versuchstieres sind größtenteils schon aus den vorherigen Ergebnisdarstellungen bekannt. Das Versuchstier, welches für ein verstorbenes Versuchstier kurzfristig als Ersatz zur Verfügung gestellt wurde und daher die immunsuppressive Therapie erst am Tag der Implantation erhielt (nicht protokollgemäße Immunsuppression), wurde diesem Versuchstier nun gegenübergestellt, um die Effekte der unterschiedlichen immunsuppressiven Therapieregime auf das Implantationsergebnis zu beurteilen.

3.6.1 Makrogliaproteine: GFAP und Vimentin

Die Färbeeigenschaften von GFAP und Vimentin wurden in Bezug auf die Auswertung der Gliafärbungen in Kapitel 3.2 als bekannt vorausgesetzt. Abbildung 22 (S. 81) zeigt die Expression der Makrogliaproteine GFAP und Vimentin der behandelten Augen sechs Wochen nach Implantation mit und ohne protokollgemäße Immunsuppression als Übersichtsaufnahmen. Die Detailaufnahmen wurden in Abbildung 23 (S. 82/83) dargestellt. Zum Vergleich der Ergebnisse mit den Ergebnissen der Kontrollaugen wurden diese in Abbildung 24 (S. 83) dargestellt.

In den Übersichtsaufnahmen in Abbildung 22 stach, wie in den Übersichtsdarstellungen der HE-Färbung in Kapitel 3.1 auch, die zellreiche Hypertrophie des Implantatbereichs (C, G) des Versuchstieres mit nicht protokollgemäßer Immunsuppression ins Auge, welche für das Versuchstier mit protokollgemäßer Immunsuppression (D, H) nicht festzustellen war. Hier zeigte sich hingegen eine Rosettenbildung innerhalb der Retina (D, H). Die GFAP-Expression war in den Müllergliazellen des behandelten Auges des Versuchstieres ohne protokollgemäße Immunsuppression, analog zu den Ergebnissen in Kapitel 3.2.1, ebenfalls hochreguliert. Der zellreiche, hypertrophierte Implantatbereich (A, C) wies hingegen weitgehend keine GFAP-Expression auf. Es zeigten sich jedoch

zum Teil von der Retina aus in den Implantatbereich hineinwachsende GFAP positive, regional begrenzte Gewebeerneuerungen an der der Retina zugewandten Seite des Implantatbereichs (A, C). Eine Vimentin-Expression ließ sich hingegen im gesamten Implantatbereich, beziehungsweise in der gesamten Hypertrophiezone, ausmachen (E, G). In dem Auge des Versuchstieres mit protokollgemäßer Immunsuppression zeigte sich innerhalb des hier sehr schmalen, nicht hypertrophierten Implantatbereichs die bereits in Kapitel 3.2 beschriebene gliöse Grenzschicht mit GFAP- und Vimentinexpression (B, D, F, H). Im Vergleich zu den Ergebnissen der anderen Versuchstiere (siehe Kapitel 3.2) präsentierte sich das Expressionsverhalten der Makrogliamarker (regionale GFAP-positive Gewebeerneuerungen bei weitgehend GFAP-negativem Implantatbereich, Vimentinexpression im gesamten Implantatbereich) in dem Versuchstier ohne protokollgemäße Immunsuppression insgesamt sehr ähnlich. Der deutlichste Unterschied bestand in der ausgeprägten zellreichen Hypertrophie innerhalb des Implantatbereichs.

In den Detailaufnahmen in Abbildung 23 bestätigten sich die oben genannten Beobachtungen. Auch hier zeigte sich der hypertrophierte Implantatbereich des Versuchstieres ohne protokollgemäße Immunsuppression bis auf regionale GFAP-positive Gewebeerneuerungen am Retina zugewandten Rand des Implantatbereichs GFAP-negativ (A), wohingegen eine Vimentinexpression in der gesamten Hypertrophiezone nachzuweisen war (C). Die gliöse Grenzschichtbildung innerhalb des Implantatbereichs in dem Versuchstier mit protokollgemäßer Immunsuppression, welche positiv für GFAP (B) und Vimentin (D) war, ließ sich in den Detailaufnahmen gut nachvollziehen. In den Retinae unterhalb des Implantatbereichs zeigte sich eine Hochregulation von GFAP (B, E) und Vimentin (D, F) in den Müller-Zellen.

Abbildung 24 zeigt die Ergebnisse der Makrogliafärbungen mit GFAP und Vimentin der Kontrollaugen der entsprechenden Versuchstiere als Übersichts- und Detailaufnahmen. Diese wiesen, wie die Kontrollaugen der meisten anderen Versuchstiere auch (siehe Kapitel 3.2), eine physiologische Expression der Makrogliamarker auf.

Zusammenfassend trat als wesentlicher Unterschied zwischen den Versuchstieren mit und ohne protokollgemäße Immunsuppression sechs Wochen nach Implantation eine zellreiche Hypertrophie innerhalb des Implantatbereichs des Versuchstieres ohne protokollgemäße Immunsuppression in den Vordergrund. Diese Hypertrophiezone wies

eine gleichförmige Vimentin-Expression auf, wohingegen sich eine GFAP-Expression nur regional begrenzt, in der der Retina zugewandten Randzone des hypertrophierten Implantatbereichs, feststellen ließ, was dem bei den anderen behandelten Versuchstieren festgestellten Expressionsverhalten ähnelte. Bei dem Versuchstier mit protokollgemäßer Immunsuppression kam es zu keiner Hypertrophie innerhalb des Implantatbereichs.

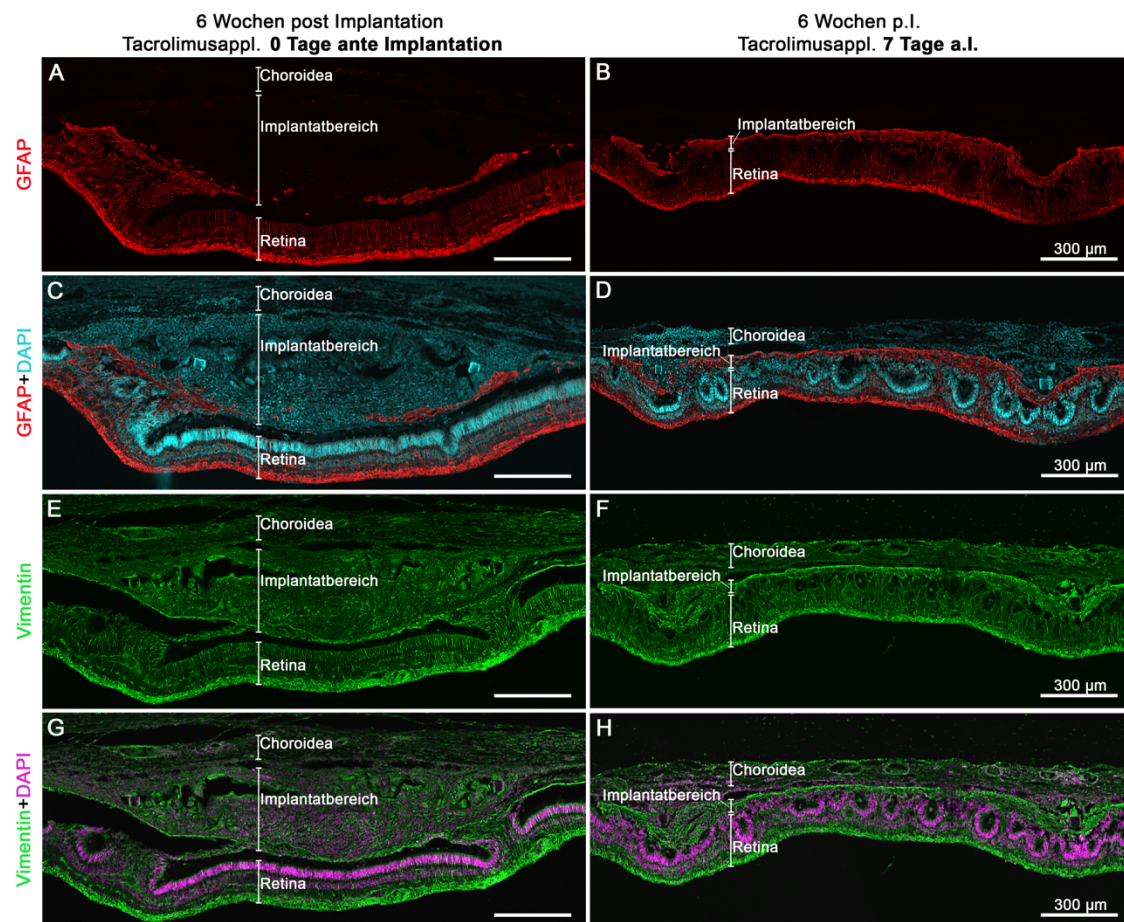
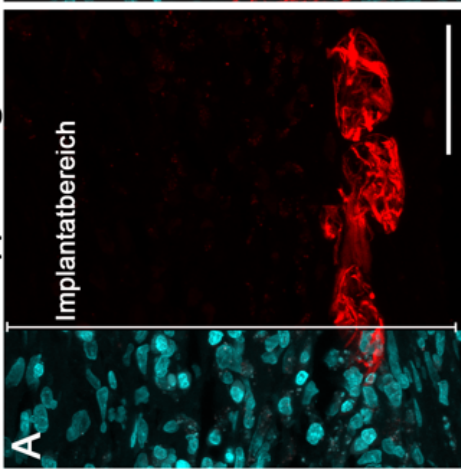


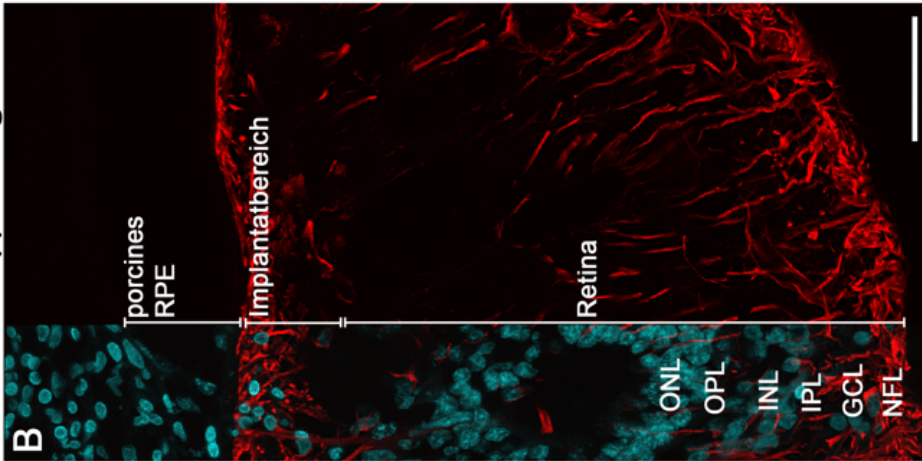
Abbildung 22: Expression der Makrogliamarker GFAP und Vimentin der behandelten Augen 6 Wochen nach Implantation ohne (links) und mit (rechts) protokollgemäßer Immunsuppression in den Übersichtsaufnahmen.

In der linken Spalte sind die Ergebnisse des Versuchstieres, welches die immunsuppressive Therapie mit Tacrolimus erst am Tag der Implantation erhielt, dargestellt. In der rechten Spalte sind die Ergebnisse des Versuchstieres, welches die immunsuppressive Therapie mit Tacrolimus protokollgemäß bereits 7 Tage vor der Implantation erhielt, dargestellt. A-D zeigen die Immunfluoreszenzsignale der GFAP-Färbung in Rot, unter C-D in Kombination mit der DAPI-Kernfärbung in Türkis. E-H zeigen die Immunfluoreszenzsignale der Vimentin-Färbung in Grün, unter G-H in Kombination mit der DAPI-Kernfärbung in Magenta. Tacrolimusappl.=Tacrolimusapplikation, p.I.=post Implantation, a.I.=ante Implantation. Die Maßstäbe entsprechen 300 µm.

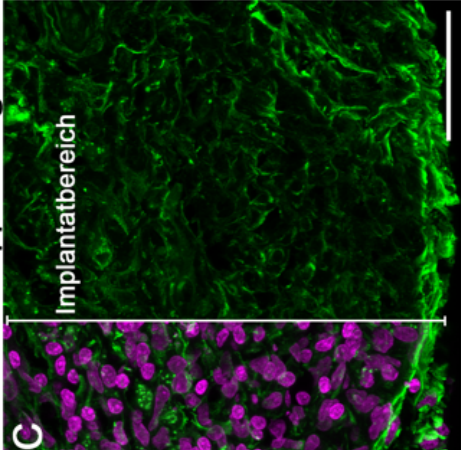
6 Wochen p.l.
Tacrolimusappl. 0 Tage a.l.



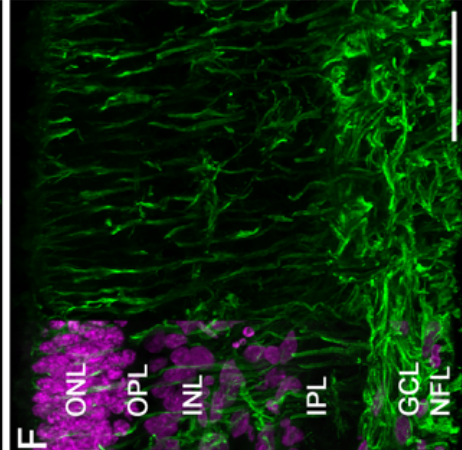
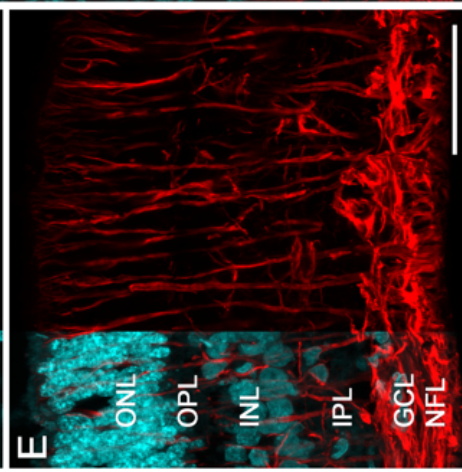
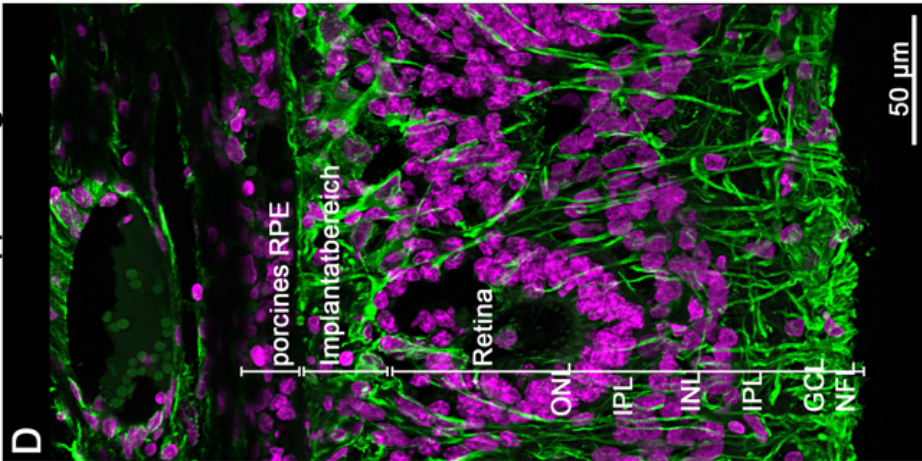
6 Wochen p.l.
Tacrolimusappl. 7 Tage a.l.



6 Wochen p.l.
Tacrolimusappl. 0 Tage a.l.



6 Wochen p.l.
Tacrolimusappl. 7 Tage a.l.



GFAP+DAPI

Vimentin+DAPI

Abbildung 23 (siehe Seite 83 oben)

Abbildung 23: Expression der Makroglia marker GFAP und Vimentin der behandelten Augen 6 Wochen nach Implantation mit und ohne protokollgemäßer Immunsuppression in den Detailaufnahmen.

In der jeweils linken Spalte (A, C, E, F) sind die Ergebnisse des Versuchstieres, welches die immunsuppressive Therapie mit Tacrolimus erst am Tag der Implantation erhielt, dargestellt. In der jeweils rechten Spalte (B, D) sind die Ergebnisse des Versuchstieres, welches die immunsuppressive Therapie mit Tacrolimus protokollgemäß bereits 7 Tage vor der Implantation erhielt, dargestellt. A, B, E zeigen die Immunfluoreszenzsignale der GFAP-Färbung in Rot in Kombination mit der DAPI-Kernfärbung in Türkis. C, D, F zeigen die Immunfluoreszenzsignale der Vimentin-Färbung in Grün in Kombination mit der DAPI-Kernfärbung in Magenta. p.I.=post Implantation, a.I.=ante Implantation, Tacrolimusappl.=Tacrolimusapplikation, ONL=äußere Körnerschicht, OPL=äußere plexiforme Schicht, INL=innere Körnerschicht, IPL=innere plexiforme Schicht, GCL=Ganglienzellschicht, NFL=Nervenfaserschicht. Die Maßstäbe entsprechen 50 µm.

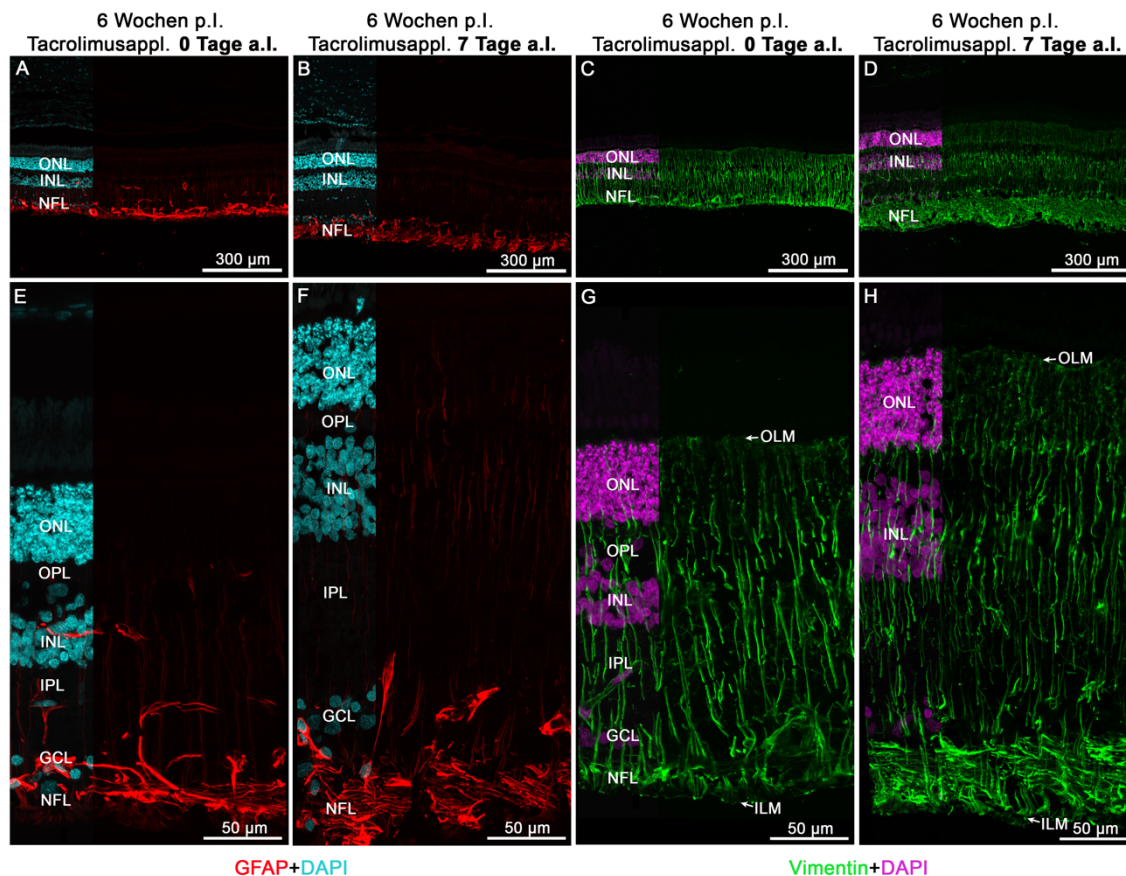


Abbildung 24: Expression der Makroglia marker GFAP und Vimentin der Kontrollaugen ohne Implantat 6 Wochen nach Implantation mit und ohne protokollgemäßer Immunsuppression in den Übersichts- und Detailaufnahmen.

In der jeweils linken Spalte (A, C, E, G) sind die Ergebnisse des Versuchstieres, welches die immunsuppressive Therapie mit Tacrolimus erst am Tag der Implantation erhielt, dargestellt. In der jeweils rechten Spalte (B, D, F, H) sind die Ergebnisse des Versuchstieres, welches die immunsuppressive Therapie mit Tacrolimus protokollgemäß bereits 7 Tage vor der Implantation erhielt, dargestellt. A, B, E, F zeigen die Immunfluoreszenzsignale der GFAP-Färbung in Rot in Kombination mit der DAPI-Kernfärbung in Türkis. C, D, G, H zeigen die Immunfluoreszenzsignale der Vimentin-Färbung in Grün in Kombination mit der DAPI-Kernfärbung in Magenta. p.I.=post Implantation, a.I.=ante Implantation, Tacrolimusappl.=Tacrolimusapplikation, OLM=äußere Grenzmembran, ONL=äußere Körnerschicht, OPL=äußere plexiforme Schicht, INL=innere Körnerschicht, IPL=innere plexiforme Schicht, GCL=Ganglienzellschicht, NFL=Nervenfaserschicht, ILM=innere Grenzmembran.

3.6.2 Humane Marker: HNAA und STEM121

Die Färbereigenschaften von HNAA und STEM121 wurden in Kapitel 3.4 erläutert. In Abbildung 25 (S. 86) wurden die Ergebnisse der HNAA und STEM121 Färbung sechs Wochen nach Implantation mit und ohne protokollgemäßer Immunsuppression dargestellt. Die Ergebnisse für das Versuchstier mit protokollgemäßer Immunsuppression wurden bereits in Kapitel 3.4 beschrieben und in diesem Kapitel mit den Ergebnissen des Versuchstiers ohne protokollgemäße Immunsuppression verglichen. Sechs Wochen nach Implantation mit protokollgemäßer Immunsuppression wurde keine spezifische nukleäre HNA-Expression (B, F) und eine im Vergleich zu den früheren Beobachtungszeitpunkten formveränderte, zytoplasmatische STEM121-Expression (D, H) der implantierten humanen Zellen mit Aufhebung der zellulären Verbindungen festgestellt. Für das Versuchstier ohne protokollgemäße Immunsuppression ließen sich im Vergleich dazu ähnliche Ergebnisse feststellen. In der HNAA-Färbung (A, E) zeigte sich kein spezifisches, nukleäres Immunfluoreszenzsignal. Das Immunfluoreszenzsignal war zwar im Vergleich zur Negativkontrolle auf den ersten Blick intensiver und in mehreren Bereichen des Implantats lokalisiert, war jedoch nicht innerhalb der Zellkerne lokalisiert, somit nicht als spezifische Färbung menschlicher Zellkerne zu werten und auf unterschiedliche Anschnitte mit einem unterschiedlichen Gehalt an Melaningranula zurückzuführen. (Für die Immunfärbung wurde ein Objektträger mit einem Anschnitt durch einen mittigen Anteil des Implantats und für die Negativkontrolle ein Anschnitt durch den Randbereich des Implantats gewählt. Der mittige Anschnitt war dicker und enthielt mehr autofluoreszierende Melaningranula, wohingegen der Randbereich des Implantats eine geringere Dicke aufwies und weniger autofluoreszierende Melaningranula enthielt.) Zudem zeigte das Fluoreszenzsignal in Abbildung 25 (A, E) keine Co-Lokalisation mit der DAPI-Kernfärbung (E) und befand sich somit nicht in den Zellkernen, in denen die HNA-Expression zu erwarten gewesen wäre. Folglich war das intensive Fluoreszenzsignal in A und E auf eine starke Autofluoreszenz und nicht auf eine spezifische HNAA-Färbung zurückzuführen. Bei der Auswertung der STEM121-Färbung des Versuchstieres ohne protokollgemäße Immunsuppression stellte die starke Autofluoreszenz ebenfalls eine Herausforderung dar. Von dem starken Fluoreszenzsignal in Abbildung 25 (C, F) war ebenfalls ein Großteil auf die Autofluoreszenz zurückzuführen. Dennoch ließen sich einzelne Zellen mit zytoplasmatischer STEM121-Expression innerhalb des hypertrophierten Implantatbereichs ausmachen und wurden in C und G mit Pfeilen markiert.

Insgesamt zeigten sich hinsichtlich der Expression der humanen Marker ähnliche Ergebnisse mit und ohne protokollgemäße Immunsuppression sechs Wochen nach Implantation. Eine spezifische, nukleäre HNA-Expression ließ sich bei beiden Versuchstieren nicht feststellen, sodass von einem Verlust der Expression des humanen Markers und/oder von einem Zelluntergang der humanen Zellen ausgegangen werden musste. Eine zytoplasmatische STEM121-Expression ließ sich bei beiden Versuchstieren nachweisen, allerdings zeigte sich eine Formveränderung und Aufhebung der zellulären Verbindungen im Vergleich zu den früheren Beobachtungszeitpunkten.

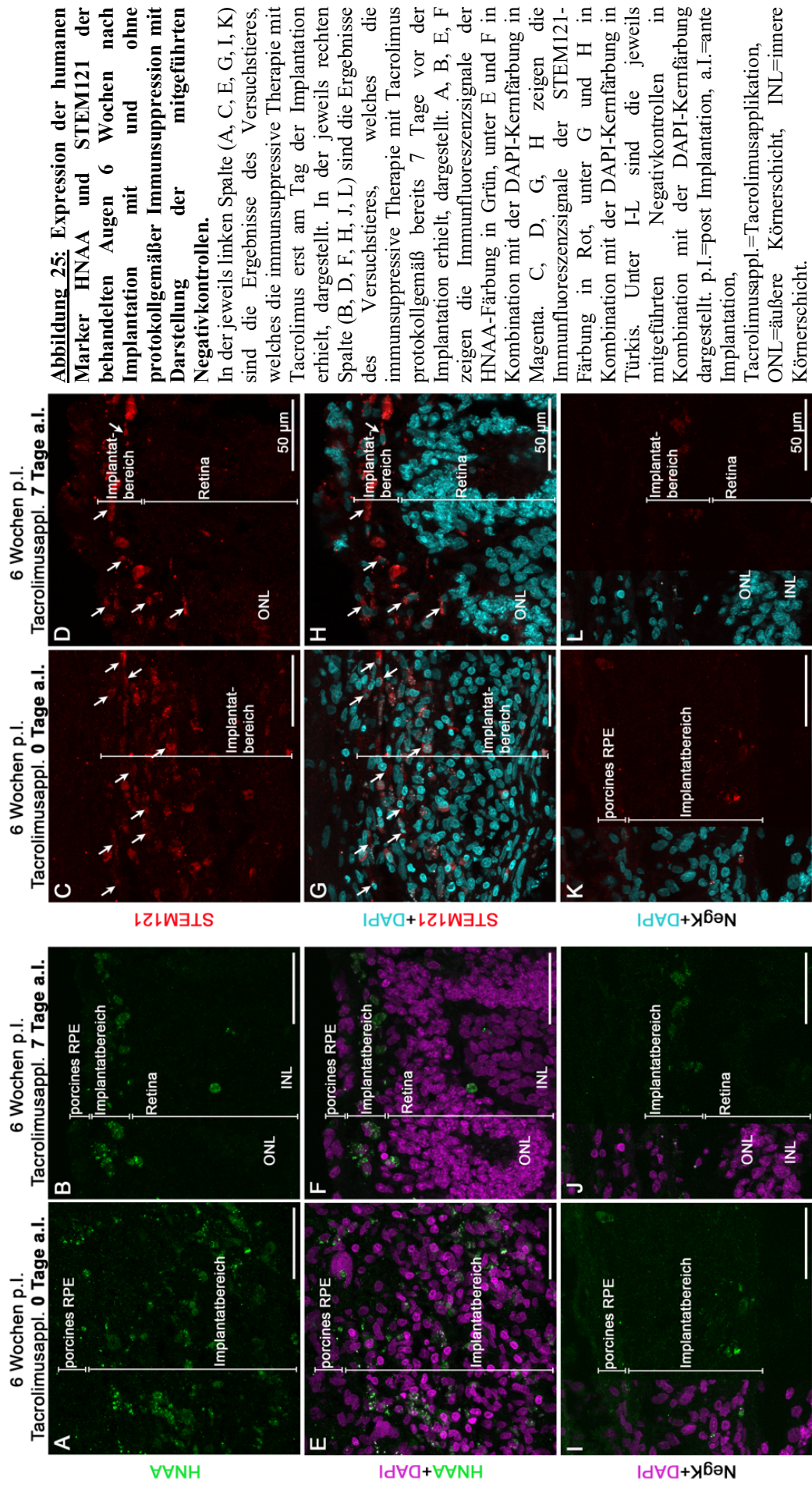


Abbildung 25: Expression der humanen Marker HNAA und STEM121 der behandelten Augen 6 Wochen nach Implantation mit und ohne protokollgemäßer Immunsuppression mit Darstellung der mitgeführten Negativkontrollen.

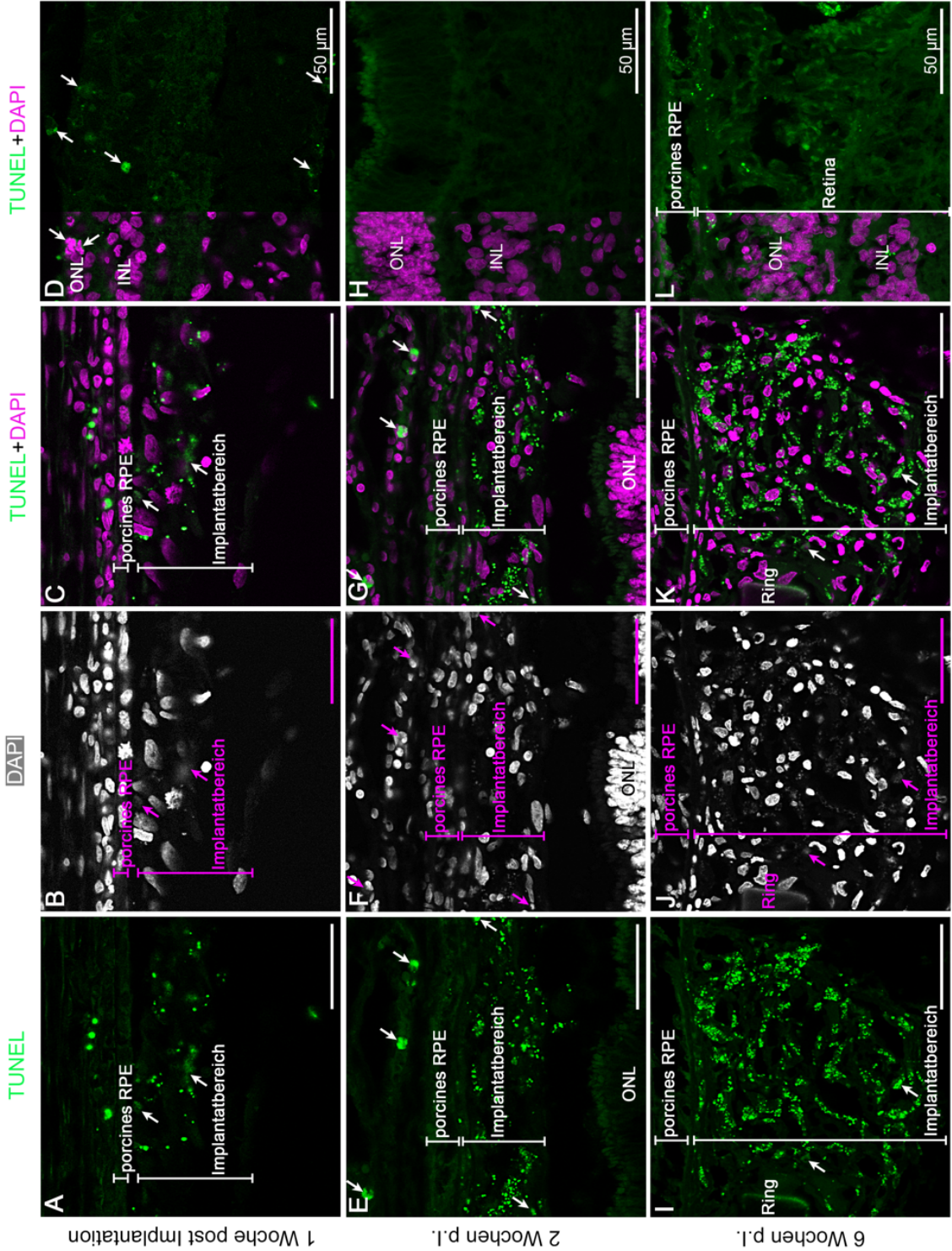
In der jeweils linken Spalte (A, C, E, G, I, K) sind die Ergebnisse des Versuchstieres, welches die immunsuppressive Therapie mit Tacrolimus erst am Tag der Implantation erhielt, dargestellt. In der jeweils rechten Spalte (B, D, F, H, J, L) sind die Ergebnisse des Versuchstieres, welches die immunsuppressive Therapie mit Tacrolimus protokollgemäß bereits 7 Tage vor der Implantation erhielt, dargestellt. A, B, E, F zeigen die Immunfluoreszenzsignale der HNAA-Färbung in Grün, unter E und F in Kombination mit der DAPI-Kernfärbung in Magenta. C, D, G, H zeigen die Immunfluoreszenzsignale der STEM121-Färbung in Rot, unter G und H in Kombination mit der DAPI-Kernfärbung in Türkis. Unter I-L sind die jeweils mitgeführten Negativkontrollen in Kombination mit der DAPI-Kernfärbung dargestellt. p.I.=post Implantation, a.I.=ante Implantation, Tacrolimusappl.=Tacrolimusapplikation, ONL=äußere Körnerschicht, INL=innere Körnerschicht.

3.7 Analyse der TUNEL-Färbung

Um der Frage nachzugehen, ob die implantierten Zellen und die Zellen der Retina unterhalb des Implantats im Rahmen der Implantation vermehrt durch Apoptose zu Grunde gegangen waren, wurde die TUNEL-Methode angewandt. Die Hintergründe und Funktionsweise der TUNEL-Methode wurden in Kapitel 2.2.7 beschrieben. Die Ergebnisse der TUNEL-Färbung wurden in Abbildung 26 (S. 88/89) für die unterschiedlichen Beobachtungszeitpunkte nach der Implantation dargestellt. I-L zeigen hierbei die Ergebnisse für den Zeitpunkt sechs Wochen nach Implantation mit protokollgemäßer Immunsuppression und M-P die Ergebnisse für den Zeitpunkt sechs Wochen nach Implantation ohne protokollgemäße Immunsuppression. Apoptotische beziehungsweise TUNEL-positive Zellkerne wurden mit Pfeilen markiert. Da das DAPI-Signal bereits apoptotischer Zellkerne teilweise schon abgeschwächt war, wurde unter B, F, J, N und R die DAPI-Zellkernfärbung zur Kontrastverstärkung in Schwarz-Weiß dargestellt, sodass auch flauere Signale besser erkannt werden konnten. In den drei linken Spalten wurden jeweils die Implantatbereiche mit dem TUNEL-Signal in Grün (A, E, I, M, Q), der DAPI-Kernfärbung in Schwarz-Weiß (B, F, J, N, R) und dem TUNEL-Signal (Grün) in Kombination mit der DAPI Kernfärbung in Magenta (C, G, K, O, S) dargestellt. Die Darstellung der kombinierten Ergebnisse der TUNEL und DAPI-Färbung der Retinae unterhalb der Implantate erfolgte in der rechten Spalte (D, H, L, P, T).

Eine Woche nach Implantation ließen sich wenige apoptotische Zellkerne innerhalb des Implantatbereichs nachweisen (Abbildung 26, A-C). In der Retina unterhalb des Implantats zeigten sich zu diesem Zeitpunkt jedoch mehrere apoptotische Zellkerne (D). Hierbei handelte es sich um das Versuchstier, bei dem es zu keiner Integration des Implantats und einer persistierenden Netzhautablösung gekommen war. Zwei und acht Wochen nach Implantation ließen sich innerhalb des Implantats und des porcinen RPEs ebenfalls einzelne apoptotische Zellkerne nachweisen (E-G, Q-S), in der darunterliegenden Retina jedoch nicht (H, T). Sechs Wochen nach Implantation mit protokollgemäßer Immunsuppression (I-L) fanden sich nur wenige apoptotische Zellen, ohne protokollgemäße Immunsuppression ließen sich jedoch sowohl im Implantatbereich (M-O) als auch in der darunter gelegenen Retina (P) im Vergleich dazu mehr apoptotische Zellkerne feststellen.

Zusammenfassend ließen sich zu allen Beobachtungszeitpunkten einzelne apoptotische Zellkerne in den Implantatbereichen ausmachen, vermehrt konnten diese jedoch beim Versuchstiere ohne protokollgemäße Immunsuppression festgestellt werden. Innerhalb der Retinae unterhalb der Implantate konnten apoptotische Zelluntergänge nur unterhalb des nicht integrierten Implantats eine Woche nach Implantation und in dem Versuchstier ohne protokollgemäße Immunsuppression nachgewiesen werden.



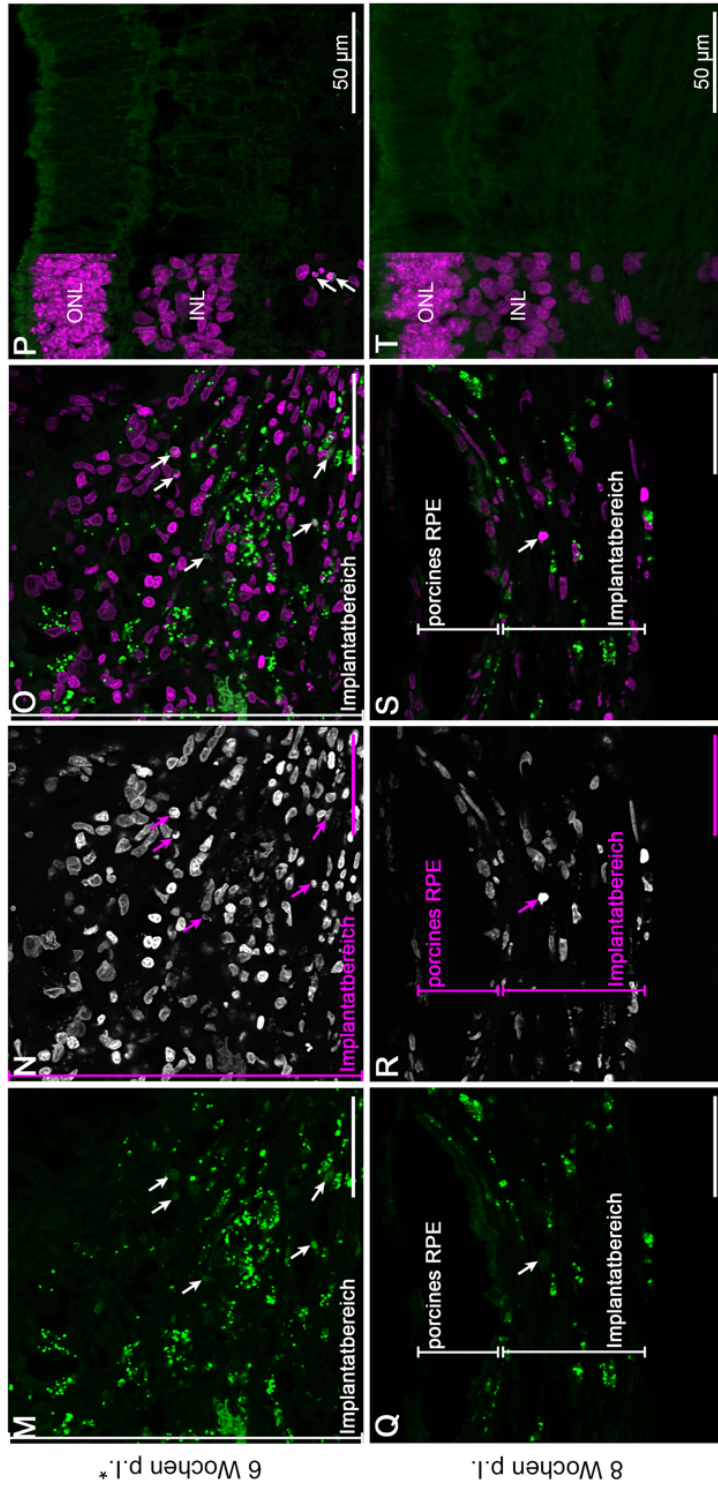


Abbildung 26: Darstellung der TUNEL-Färbung der behandelten Augen aller Versuchstiere.

In den drei linken Spalten sind jeweils die Implantatbereiche mit dem TUNEL-Signal in Grün (A, E, I, M, Q), der DAPI-Kernfärbung in Schwarz-Weiß (B, F, J, N, R) und dem TUNEL-Signal (Grün) in Kombination mit der DAPI Kernfärbung in Magenta (C, G, K, O, S) dargestellt. Die rechte Spalte zeigt das TUNEL-Signal in Grün und die DAPI-Kernfärbung in Magenta für die Retinae unterhalb der Implantate (D, H, L, P, T). I-L zeigen die Ergebnisse für den Zeitpunkt sechs Wochen nach Implantation mit protokollgemäßer Immunsuppression und M-P die Ergebnisse für den Zeitpunkt sechs Wochen nach Implantation ohne protokollgemäße Immunsuppression. TUNEL-positive Zellkerne sind mit Pfeilen markiert. p.i.=post Implantation, ONL=äußere Körnerschicht, INL=innere Körnerschicht. *ohne protokollgemäße Immunsuppression.

4 Diskussion

Die Analyse der Ergebnisse zeigte, dass die angestrebte Einbringung des Implantats in den subretinalen Raum bei allen Versuchstieren erreicht werden konnte. Die verstärkte GFAP- und Vimentin-Expression nach der Implantation wurde auf eine reaktive Aktivierung der Müller-Zellen mit Ausbildung einer Gliazarbe zurückgeführt. Neben dieser Aktivierung von Makroglia zeigte sich zudem eine Aktivierung von Mikroglia, was auf eine neuroinflammatorische Reaktion trotz des Immunprivilegs des Auges hindeutete. Innerhalb der Retinae konnten Auswirkungen auf die vorwiegend äußeren Netzhautschichten mit leichter Beeinträchtigung der Photorezeptoren-Gesundheit festgestellt werden. Dennoch zeigten sich alle retinalen Schichten über die Zeit erhalten, was für eine suffiziente Nährstoffversorgung über das Implantat hinweg sprach. Auch wenn eine erfolgreiche Integration des Implantats in das Wirtsgewebe in vier von fünf Versuchstieren beobachtet werden konnte, stellte sich aufgrund des beobachteten Verlusts der humanen Marker HNAA und STEM121 im zeitlichen Verlauf sowie der fehlenden Expression der RPE-Zell-Marker CRALBP und Bestrophin die Frage nach der Funktionalität und dem Überleben der implantierten, primären hRPE-Zellen. Die beobachtete Hypertrophie und vermehrte Apoptose innerhalb des Versuchstieres ohne protokollgemäße Immunsuppression aber auch die vermutete neuroinflammatorische Reaktion in allen anderen Versuchstieren legten nahe, dass die Immunsuppression trotz Immunprivileg des Auges eine wichtige Rolle spielte. Zudem wurde anhand des missglückten Implantationsversuches mit Auswirkungen auf die retinale Gesundheit das chirurgische Risiko der Implantation deutlich.

Um die Aktivierung von Glia-Zellen, retinale Umbauprozesse und die Fragen hinsichtlich Funktion und Überleben der implantierten hRPE-Zellen sowie den Einfluss von Immunsuppression und chirurgischer Intervention weitergehend zu beurteilen, erfolgte im Folgenden eine nähere Diskussion der entsprechenden Ergebnisse.

4.1 Aktivierung von Gliazellen

4.1.1 Müller-Zell-Aktivierung

Im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollaugen wurde bei den behandelten Augen eine deutlich stärkere Expression des Intermediärfilaments GFAP beobachtet. Die Expression von GFAP zeigte sich nicht nur hauptsächlich in den inneren Retinaschichten (GCL, NFL) in den vorwiegend quer verlaufenden Fasern der Astrozyten, die regelhaft GFAP exprimieren, wie es bei den unbehandelten Kontrollaugen der Fall gewesen war. Zusätzlich war eine GFAP-Expression auch in allen weiteren Retinaschichten nachzuweisen (siehe Kapitel 3.2.1) mit vorwiegend radiären Faserverlauf. Da dies dem Verlauf von Müller-Zellen entspricht, liegt eine Hochregulation der GFAP-Expression in den Müller-Zellen im Rahmen einer reaktiven Aktivierung der Müller-Zellen nahe. Auch die Expression des Intermediärfilaments Vimentin war im Vergleich zu den Kontrollaugen in allen Retinaschichten verstärkt nachzuweisen (siehe Kapitel 3.2.2), was ebenfalls für eine Aktivierung der Müller-Zellen spricht.

Eine Hochregulation von GFAP in Müller-Zellen in RCS-Ratten wurde bereits 1984 von Eisenfelder et al. beschrieben, wobei die Expression von GFAP in Müller-Zellen mit dem Ausmaß der durch den genetischen Defekt verursachten Photorezeptor-Degeneration positiv korrelierte. Dieses Ergebnis wurde auch nach durch hochintensive Lichtexposition erzeugter Photorezeptor-Degeneration beobachtet, sodass daraus die vermehrte GFAP-Expression als Reaktion auf Photorezeptor-Degeneration abgeleitet wurde (Eisenfeld et al., 1984). Eine vermehrte Expression von GFAP in Müller-Zellen wurde zudem von Lewis und Fisher (2003) nach Verletzungen der Retina, wie zum Beispiel nach Netzhautablösungen, beschrieben. Die Hochregulation von GFAP in Astrozyten des ZNS ist allgemein eine bekannte Reaktion des ZNS auf Stress und findet innerhalb der Retina vor allem in den Müller-Zellen, der Sonderform von Astrozyten der Retina, statt (Lewis & Fisher, 2003). Auch Geller und Kollegen (2001) beschrieben eine vermehrte Expression der Intermediärfilamente GFAP und Vimentin in Müller-Zellen sowie eine Proliferation der Müller-Zellen nach Netzhautablösung. Lewis und Kollegen (2010) beobachteten zudem im Rahmen der Proliferation der Müller-Zellen nach Netzhautablösung eine Akkumulation von Vimentinfasern um mitotische, in äußere Retinaschichten gewanderte Müller-Zellkerne (Lewis et al., 2010). Von Vimentinfasern umschlossene Zellkerne in äußeren Retinaschichten ließen sich ebenfalls in einigen Augen behandelter Versuchstiere feststellen (siehe Kapitel 3.2.2).

Somit ist, gestützt auf mehrere Beobachtungen in den Augen der behandelten Versuchstiere, von einer Aktivierung von Müller-Zellen als Reaktion auf die Implantation auszugehen. Diese könnte durch eine persistierende Schädigung der Photorezeptoren, die durch die iatrogene, kurzzeitige und lokale Netzhautablösung im Rahmen der Operation verursacht wurde, bedingt sein. Die Netzhautablösung im Bereich, in dem das subretinale Implanat eingebracht werden soll und somit als Operationsschritt notwendig ist, führt in diesem Bereich zu einer Photorezeptor-Degeneration und auch zu einer Beeinträchtigung der Photorezeptor-Bipolar-Synapse (Zarbin, Sugino, & Townes-Anderson, 2019). Somit liegt nahe, dass die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete Müller-Zell-Aktivierung ebenfalls auf eine Beeinträchtigung der Photorezeptoren als Folge der Netzhautablösung im Rahmen der Implantation zurückzuführen ist.

Bildung einer Glianarbe

Neben der beobachteten, vermehrten Expression von GFAP und Vimentin in den Müller-Zellen im Rahmen einer Müller-Zell-Aktivierung, zeigte sich eine Vermehrung GFAP- und Vimentin-positiven Gewebes in unmittelbarer Implantatumgebung und zum Teil auch innerhalb des Implantats bei den Versuchstieren, bei denen eine Integration des Implantats in das Wirtsgewebe stattgefunden hatte (zwei, sechs und acht Wochen nach Implantation, siehe Kapitel 3.2). Besonders deutlich konnten diese Veränderungen sechs Wochen nach Implantation festgestellt werden, da hier die gliöse Gewebevermehrung eine Art Grenzschicht zum subretinalen Raum bildete (siehe Kapitel 3.2). Aufgrund der oben bereits genannten Expression von GFAP und Vimentin in aktivierten Müller-Zellen, können die beobachteten subretinalen Gewebevermehrungen innerhalb des Implantats und in Implantatumgebung als Glianarbe, gebildet durch Müller-Zell-Fortsätze, gewertet werden.

Die Ausbildung einer Glianarbe in Folge der Müller-Zell-Aktivierung ist bereits in mehreren Studien beschrieben worden (Jones & Marc, 2005; Lewis et al., 2010). Jones und Marc (2005) beschrieben diese Prozesse in der zweiten Phase des retinalen Remodelings im Rahmen einer retinalen Degeneration zunächst unabhängig von der auslösenden Ursache (siehe Kapitel 1.3). Die aktivierten Müller-Zellen hypertrophieren, proliferieren und wachsen in den subretinalen Raum hinein (Jones & Marc, 2005). Dabei entsteht eine fibrotische Glianarbe, geformt von den distalen Müllerzellfortsätzen, die die Netzhaut versiegelt und vom RPE und subretinalen Raum abgrenzt (Jones & Marc, 2005).

Lewis und Kollegen (2010) beobachteten ebenfalls die Aktivierung und Proliferation von Müller-Zellen mit Bildung subretinaler Glianarben und ordneten diese Prozesse dem klinischen Bild der Proliferativen Vitreoretinopathie (PVR) zu. Von einer PVR spricht man bei einer unkontrollierten Zellvermehrung innerhalb des Auges mit Bildung subretinaler (oder epiretinaler) Membranen, welche unter anderem nach krankheitsbedingter Netzhautablösung beobachtet werden (Lang, 2015). Diese subretinalen Membranen werden durch Gliazellen gebildet und entsprechen einer Glianarbe (Lang, 2015). Die Bildung von Glianarben ist somit die Folge eines Einwachsens aktivierter und proliferierender Müller-Zellen in den subretinalen Raum nach Netzhautablösung oder anderen Schädigungen der Retina.

Diese Beobachtungen lassen sich demnach gut mit den Ergebnissen dieser Arbeit in Verbindung setzen, da auch hier eine gliöse Narbenbildung in Implantat Umgebung im subretinalen Raum zwei, sechs und acht Wochen nach Implantation beobachtet wurde. Eine gliöse Formation, die der Beschreibungen einer gliösen Versiegelung analog zu Jones und Marc (2005) am nächsten kommt, zeigte sich sechs Wochen nach Implantation, da auch hier eine Glianarbe durch distale Müller-Zell-Fortsätze zur Seite des wirtseigenen RPEs gebildet wurde. In Anlehnung an Lewis und Kollegen (2010) und die Definition der PVR kann die beobachtete Bildung einer subretinalen Glianarbe bei allen Versuchstieren, bei denen eine Integration des Implantats stattgefunden hatte, zudem als Proliferative Vitreoretinopathie (PVR) interpretiert werden.

4.1.2 Aktivierung von Mikroglia

Innerhalb der Retinae der behandelten Augen sowie im Implantatbereich ein und acht Wochen nach Implantation konnte eine Aktivierung von Mikroglia anhand der Iba-1-Immunfärbung festgestellt werden (siehe Kapitel 3.2.3). Es wird eine neuroinflammatorische Immunantwort als Reaktion auf die Implantation artfremden Gewebes trotz bestehender Immunsuppression und Immunprivileg des Auges vermutet.

Die Aktivierung der Mikroglia zeigte sich vor allem an einem verstärkten Iba1-Signal innerhalb der IPL. Ein verstärktes Iba1-Signal innerhalb der IPL wurde ebenfalls in Rattenaugen nach der Transplantation von aus hESC abgeleiteten Retinatransplantaten beobachtet und auch dort auf eine vermehrte Aktivität von Mikroglia zurückgeführt (McLelland et al., 2018). Als Teil der Immunantwort des ZNS auf potentielle Infektionen

oder Gewebeschädigungen spricht eine vermehrte Aktivität von Mikroglia für eine neuroinflammatorische Immunantwort (Ginhoux et al., 2013). Dies steht in Konflikt mit dem immunprivilegierten Zustand, den der subretinale Raum normalerweise aufweist (siehe Kapitel 1.2). Ein wichtiger Faktor zur Aufrechterhaltung des Immunprivilegs ist die Blut-Retina-Schranke. Da es im Rahmen von subretinalen Implantationen zu einer Verletzung von Gefäßen kommt, war diese im Rahmen der Implantation allerdings zumindest zum Teil und zeitweise in ihrer Funktion beeinträchtigt, was die Initiierung von Immunprozessen ermöglicht haben könnte. Zum anderen kommen auch dem RPE immunmodulierende Aufgaben zu (siehe Kapitel 1.1.4). Somit könnte auch ein dysfunktionales, transplantiertes RPE oder eine Beeinträchtigung des wirtseigenen RPEs durch das subretinale Implantat eine gesteigerte Immunantwort begünstigt haben. Eine Aktivierung von Mikroglia im Rahmen des retinalen Remodelings wurde ebenfalls durch Jones und Marc in der zweiten Phase beschrieben (Jones & Marc, 2005) (siehe Kapitel 1.3). Hierbei kommt der Mikroglia die Aufgabe der Phagozytose von Zelltrümmern zu, die unter anderem durch das Absterben der Photorezeptoren entstehen. Zudem konnten ein und acht Wochen nach Implantation einige Iba1-positive Zellen innerhalb des Implantatbereichs detektiert werden (siehe Kapitel 3.2.3). Dies spricht für eine ablaufende Immunreaktion innerhalb des Implantatbereichs, sodass davon auszugehen ist, dass trotz immunsuppressiver Therapie und Immunprivileg des subretinalen Raums die implantierten hRPE-Zellen als fremd erkannt wurden und eine neuroinflammatorische Antwort ausgelöst wurde.

4.2 Morphologie der Retina und retinale Umbauprozesse (retinales Remodeling)

Zur Beurteilung der Morphologie sowie Integrität der Schweineretina nach subretinaler Implantation von primären humanen RPE-Zellen werden die Ergebnisse der PNA- und PKC-alpha-Immunfärbungen sowie der HE-Färbungen und der TUNEL-Methode herangezogen.

Zwei, sechs und acht Wochen nach Implantation zeigten sich die Zapfen-Photorezeptoren in der PNA-Färbung zwar erhalten, jedoch mit unterschiedlich stark ausgeprägten morphologischen Veränderungen. Die morphologischen Veränderungen umfassten eine Verkürzung und schlechtere Unterscheidbarkeit der Photorezeptorinnen- und -außen-segmente und zum Teil unschärfere Abgrenzbarkeit der Zapfenendfüßchen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollaugen. Eine Woche nach Implantation zeigte sich

hingegen ein deutlicher Verlust an gesunden Photorezeptoren mit Verschmälerung der ONL sowie neuronalen Aussprossungen der Zapfen-Photorezeptoren in innere Retinaschichten, vermutlich als Folge der fehlenden Integration des Implantats mit persistierender Retinaablösung.

Diese Ergebnisse weisen auf eine Stressreaktion der Photorezeptoren hin, wie es zum Teil in der ersten Phase des retinalen Remodelings von Jones und Marc (2005) beschrieben wurde (siehe Kapitel 1.3). Zu dieser Stressreaktion zählen ein Verkürzen insbesondere der Photorezeptoraußensegmente (Jones & Marc, 2005), wie es auch hier zu allen Zeitpunkten nach Implantation beobachtet wurde. Von Jones und Marc (2005) wurden jedoch noch weitere pathologische Prozesse im Rahmen der Stressreaktion der Photorezeptoren, wie eine Dekonstruktion der synaptischen Endigungen und neuronale Aussprossungen bis in die GCL, beschrieben (Jones & Marc, 2005). Die synaptischen Endigungen stellten sich hier zwei, sechs und acht Wochen nach Implantation (siehe Kapitel 3.3.1) jedoch relativ intakt dar, da die Zapfenendfüßchen deutlich zu erkennen waren. Neuronale Aussprossungen der Zapfen-Photorezeptoren in innere Retinaschichten bis an den Rand der GCL und eine Destruktion der Zapfenendfüßchen ließen sich hingegen nur eine Woche nach Implantation beobachten, sodass hier von einer stärkeren Schädigung der Retina und damit einhergehend von einem stärker ausgeprägten retinalen Remodeling auszugehen war. Zudem zeigte sich die Dicke der ONL eine Woche nach Implantation herabgesetzt, was für einen quantitativen Verlust an Photorezeptoren sprach. Da es sich hierbei um das Versuchstier handelte, bei dem die Integration des Implantats aufgrund einer vermutlichen Verdrehung der Trägermembran ausblieb, ließ sich die Ursache der deutlich ausgeprägteren retinalen Degeneration im Vergleich zu den anderen Versuchstieren auf eine persistierende Netzhautablösung zurückführen. Zu allen anderen Beobachtungszeitpunkten ließen sich die Photorezeptoren zwar aufgrund der verkürzten Außensegmente als gestresst bezeichnen, ein voll ausgeprägtes retinales Remodeling, wie es in Kapitel 1.3 beschrieben wurde, mit Destruktion der synaptischen Endigungen, Absterben der Photorezeptoren mit Verschmälerung der ONL und neuronalen Aussprossungen in innere Retinaschichten war hier allerdings nicht festzustellen. Daraus lässt sich schließen, dass trotz der Implantation, welche durch die Trägermembran und die proliferative Umgebungsreaktion zu einer Verlängerung der Diffusionsstrecke zwischen Choriokapillaris und äußeren Retinaschichten führt, die

Ernährung der äußeren Retinaschichten und hier insbesondere der Photorezeptoren, nicht maßgeblich durch das Implantat beeinträchtigt wird.

Zusammenfassend scheinen die Ansprüche an die Trägermembran hinsichtlich Membrandicke und Porosität zur Aufrechterhaltung der Nährstoffversorgung der äußeren Retinaschichten erfüllt zu sein. Das Wiederanlegen der Retina an das integrierte RPE-Implantat führte zudem zu einem besseren Erhalt an Photorezeptoren, wohingegen eine ausgeprägte Photorezeptor-Degeneration und retinale Umbauprozesse bei persistierender Netzhautablösung eine Woche nach Implantation beobachtet wurden. Dennoch wiesen die Photorezeptoren zu allen Beobachtungszeitpunkten nach Implantation leichte pathologische Veränderungen im Rahmen einer Stressreaktion auf. Auch in weiteren aktuellen Studien zu RPE-Transplantationen werden pathologische Veränderungen von Photorezeptoren und Photorezeptor-Degeneration beobachtet und als potentiell problematisch beurteilt. Hier wird der Einsatz von Rho-Kinase-Inhibitoren als vielversprechender Ansatz, die mit der Netzhautablösung im Rahmen der Implantation einhergehende Beeinträchtigung der Photorezeptoren zu reduzieren, diskutiert (Zarbin et al., 2019).

In der PKC-alpha Färbung wurden die Stäbchenbipolarzellen, deren Zellkerne sich in der INL befinden und deren Zellfortsätze sich in die OPL und IPL erstrecken, dargestellt (Negishi et al., 1988). Somit können anhand dieser Färbung Aussagen über die inneren Schichten der Retina getroffen werden. Im Vergleich zu den Kontrollaugen zeigte die PKC-alpha Färbung der behandelten Augen ein relativ ähnliches Ergebnis, sodass die inneren Schichten als weitgehend unbeeinträchtigt durch die Implantation beurteilt werden.

Gerade im Vergleich zu der PNA-Färbung, die die Zapfen-Photorezeptoren und damit eher die äußeren Retinaschichten darstellt, wird deutlich, dass die Implantation primärer hRPE-Zellen auf einer Trägermembran vorwiegend die äußeren und weniger die inneren Retinaschichten beeinflusst. Eine mögliche Erklärung hierfür liegt unter anderem in der Blut- und Nährstoffversorgung der Retinaschichten (siehe Kapitel 1.1.5). Während die inneren Retinaschichten durch Kapillarbetten versorgt werden, die aus mit dem Nervus Opticus eintretenden Blutgefäßen gespeist und somit durch das Einbringen eines Implantats in den subretinalen Raum nicht beeinflusst werden, werden die äußeren

Retinaschichten und insbesondere die Photorezeptoren via Diffusion aus den Gefäßen der Choriokapillaris versorgt. Diese Diffusionsstrecke wurde durch das Einbringen des Implantats und die gliöse Narbenbildung in Implantatumgebung verlängert. Da aber trotzdem bis zu acht Wochen nach Implantation vitale Photorezeptoren erhalten waren, scheint die Blut- und Nährstoffversorgung nicht kritisch eingeschränkt gewesen zu sein. Ein weiterer Grund für die Beeinträchtigung der vorwiegend äußeren Retinaschichten wird in der Trennung der Photorezeptoren vom wirtseigenen RPE gesehen. Wie in Kapitel 1.1.4 dargestellt, ist die Interaktion zwischen RPE und Photorezeptoren essentiell für die retinale Integrität und das Überleben der Photorezeptoren. Im Rahmen der subretinalen Implantation kam es zu einer Trennung von Photorezeptoraußensegmenten und wirtseigenem RPE, was zu einer in den vorangegangenen Abschnitten bereits beschriebenen Schädigung der Photorezeptoren führt. Die Frage inwieweit die transplantierten hRPE-Zellen ihren RPE-Funktionen nachkommen konnten und somit das Potential hatten, die Funktionen des wirtseigenen RPEs zu ersetzen, wird in den folgenden Abschnitten behandelt.

In den Übersichtsdarstellungen zeigte sich die Schichtung der Retina in der HE-Färbung zu allen Beobachtungszeitpunkten weitgehend erhalten. Bereits hier ließ sich eine Verschmälerung der ONL und die fehlende Integration des Implantats für den Zeitpunkt eine Woche nach Implantation erkennen. Als Besonderheit konnte in der HE-Färbung für den Zeitpunkt sechs Wochen nach Implantation (mit protokollgemäßer Immunsuppression) eine ausgeprägte Rosettenbildung festgestellt werden (siehe Kapitel 3.1). Die Rosettenbildung innerhalb der Retina ist ein bekanntes, aber nicht gänzlich verstandenes Phänomen und wird allgemein als unspezifische Reaktion auf Verletzungen der Retina verstanden (R. K. Sharma et al., 1997). Sie wurde mehrfach nach subretinalen Netzhauttransplantationen an unterschiedlichen Säugetieren beschrieben und war dabei nicht mit verstärkten degenerativen Prozessen assoziiert (Lin et al., 2018; McLelland et al., 2018; R. K. Sharma et al., 1997). Zum Teil wurde sogar innerhalb der Rosettenformation eine besonders hohe Konzentration an Photorezeptor-Außensegmenten beobachtet (Silverman & Hughes, 1989). Nach Transplantationen von Zell-Suspensionen wurde eine Rosettenbildung seltener beobachtet (R. K. Sharma et al., 1997). Obwohl die Rosettenbildung sechs Wochen nach Implantation mit einer herabgesetzten Photorezeptor-Dichte assoziiert war, ließen sich insbesondere innerhalb der Rosetten erhaltene Photorezeptoren feststellen (siehe Kapitel 3.3.1). Daher wird die

Rosettenbildung im Rahmen dieser Arbeit als unspezifische Reaktion auf die subretinale Implantation, welche mit zeitlicher Verzögerung auftreten kann, gewertet.

In der Analyse der TUNEL-Färbung (Kapitel 3.7) zeigten sich innerhalb der Retinae unterhalb der Implantate nach zwei, sechs und acht Wochen keine apoptotischen Zellen. Dies stützt die Konklusionen aus der PNA- und PKC-alpha-Färbungen, anhand derer die inneren und äußeren Retinaschichten zu diesen Zeitpunkten als vital beschrieben werden. Somit kam es zu diesen Zeitpunkten nicht zu einem vermehrten Zelltod innerhalb der Retina. Lediglich bei ausbleibender Integration und persistierend abgelöster Retina, wie es eine Woche nach Implantation der Fall war, ließ sich im TUNEL-Assay ein vermehrtes Absterben retinaler Zellen durch TUNEL-positive Zellkerne in ONL, INL und GCL feststellen. Auch dies ist mit den bisher festgestellten, stärker ausgeprägten Anzeichen des retinalen Remodelings und Photorezeptor-Degeneration zu diesem Zeitpunkt gut vereinbar.

Zusammenfassend ließen sich für die Versuchstiere, in denen eine Integration des Implantats und ein Wiederanlegen der Retina stattgefunden hatte (zwei, sechs und acht Wochen nach Implantation), gestresste Photorezeptoren und retinale Umbauprozesse mit Müller-Zell-Aktivierung und Bildung subretinaler Glianarben feststellen. Ein komplettes retinales Remodeling im Rahmen einer retinalen Degeneration wie es von Jones et al. beschrieben wurde (Kapitel 1.3) und Zelltod innerhalb der Retina ließ sich allerdings nicht ausmachen. Somit zeigte sich die Retina unterhalb der Implantate zu diesen Zeitpunkten zwar leicht gestresst aber insgesamt nicht vital bedroht. Im Gegensatz dazu konnten nach fehlender Integration und persistierend abgelöster Retina, wie es eine Woche nach Implantation der Fall war, vermehrt retinale Umbauprozesse und Zelltod innerhalb der Retina festgestellt werden. Insgesamt lässt sich ableiten, dass durch die Implantation der hRPE-Zellen auf einer ultradünnen Trägermembran, eine erfolgreiche Integration des Implantats ins Wirtsgewebe mit suffizienter Nährstoffversorgung der Retina und Erhalt der Photorezeptoren unterhalb des Implantats ermöglicht wird, aber auch, dass ein nicht unerhebliches Interventionsrisiko, welches den Erfolg der Implantation gefährden kann, besteht.

4.3 Beurteilung der Integration, Funktion und des Überlebens der implantierten hRPE-Zellen

In den Übersichtsdarstellungen der HE-Färbung (siehe Kapitel 3.1) zeigte sich eine erfolgreiche Einbringung des Implantats in den subretinalen Raum bei allen behandelten Versuchstieren. Das subretinale Implantat wurde in vier von fünf Fällen erfolgreich in das Wirtsgewebe integriert. Lediglich eine Woche nach Implantation ließ sich keine Integration und eine persistierend abgelöste Retina feststellen. Bei diesem Versuchstier kam es laut Operateur während der Implantation zu einer Verdrehung des Implantats, sodass dies und die damit verbundene räumliche Hinderung vermutlich die Integration des Implantats und ein Wiederanlegen der Retina verhinderten. Für den Zeitpunkt zwei Wochen nach Implantation konnte für das integrierte Implantat ein zusammenhängender Zellverband der implantierten Zellen in der STEM121-Färbung nachgewiesen werden (siehe Kapitel 3.4.2), was relevant ist, da viele der RPE-Funktionen grundlegend abhängig von der Formation einer zusammenhängenden Zellschicht sind (R. Sharma et al., 2020). Somit konnte der bereits zitierte, mögliche Vorteil einer erleichterten Integration als zusammenhängende Zellschicht bei der RPE-Transplantation auf einer Trägermembran im Vergleich zur Transplantation als Zellsuspension auch hier nachvollzogen werden (R. Sharma et al., 2019).

CRALBP und Bestrophin, zwei spezifische RPE-Zellmarker, sind für die RPE-Funktionen essentielle Proteine und wurden daher neben dem Nachweis von RPE-Zellen zur Beurteilung der Funktionalität der implantierten, primären hRPE-Zellen herangezogen. Auch in bisherigen RPE-Transplantationsstudien wurden CRALBP und Bestrophin regelmäßig zum Nachweis von RPE-Zellen und zur Validierung der RPE-Zellfunktion eingesetzt (Sharma et al., 2020). Die Ergebnisse der Immunfärbungen für CRALBP und Bestrophin wurden in den Kapiteln 3.5.1 und 3.5.2 beschrieben. Hier zeigte sich eine im Vergleich zu den Kontrollaugen unbeeinflusste Expression von CRALBP und Bestrophin innerhalb des porcinen RPEs. Für die implantierten primären hRPE-Zellen konnte eine Expression von CRALBP und Bestrophin so gut wie nicht nachgewiesen werden. Sowohl CRALBP als auch Bestrophin sind jedoch essentiell für bestimmte RPE-Funktionen. CRALBP ist beteiligt an der Regeneration von all-trans-Retinal zu 11-cis-Retinal (Saari et al., 2001) und Bestrophin ist als Ionenkanal an der elektrischen Interaktion des RPEs mit den Photorezeptoren beteiligt (Strauß & Rosenthal, 2005). Aufgrund der fehlenden Expression von CRALBP und Bestrophin liegt somit

nahe, dass die davon abhängigen chemischen und elektrischen Interaktionen mit den Photorezeptoren bei den implantierten, primären hRPE-Zellen deutlich beeinträchtigt waren und dass somit auch die Funktionalität der hRPE-Zellen insgesamt in Frage gestellt werden muss. Es ist möglich, dass der Ursprung dieses Problems bereits in der Kultivierung der Zellen oder im Zellalter (Leichenspende) liegt, da die RPE-spezifischen Marker CRALBP und RPE-65 (Bestrophin nicht untersucht) bereits *in vitro* vor Implantation eine verminderte Expression aufwiesen (siehe Abbildung 7, S. 36). Im veränderten Expressionsmuster der primären hRPE-Zellen in der Zellkultur lässt sich zudem eine mögliche Erklärung für die festgestellte, gleichmäßige Vimentin-Expression im Implantatbereich zwei, sechs und acht Wochen nach Implantation finden, da die Zellen bereits vor Implantation eine erhöhte Vimentinexpression aufwiesen.

Für den Nachweis der implantierten, primären hRPE-Zellen wurden die humanen Marker HNAA und STEM121 verwendet (siehe Kapitel 3.4), mit denen sich die Zellkerne (HNAA) und das Zytoplasma (STEM121) menschlicher Zellen markieren lassen. Auch Sharma und Kollegen (2019) verwendeten STEM121 erfolgreich zur Detektion menschlicher, von iPSCs-abgeleiteten RPE-Zellen nach Transplantation in Ratten- und Schweineaugen. Wie in Kapitel 3.4 dargestellt zeigte sich für die Färbungen mit HNAA und STEM121 ein dynamisches Ergebnis mit einem Verlust der spezifischen Marker-Expression im zeitlichen Verlauf. Auch die zu Beginn deutliche Vimentin-Expression, die bereits *in vitro* für die primären hRPE-Zellen nachgewiesen wurde, ließ sich acht Wochen nach Implantation nicht mehr feststellen und wies somit eine ähnliche Dynamik im Expressionsverhalten wie HNAA und STEM121 auf. Dass die untersuchten Proteine im zeitlichen Verlauf nicht mehr nachgewiesen werden konnten, könnte durch Zelluntergang beziehungsweise Apoptose, Migration der RPE-Zellen oder eine Transdifferenzierung der RPE-Zellen verursacht worden sein.

Um ein mögliches vermehrtes Auftreten von Apoptose zu detektieren, wurde eine TUNEL-Färbung durchgeführt (siehe Kapitel 3.7). Hierbei konnten zu allen Zeitpunkten einzelne TUNEL-positive Zellkerne im Implantatbereich nachgewiesen werden. Dies spricht, wenn auch in geringem Ausmaß, für einen apoptotischen Zelluntergang der implantierten hRPE-Zellen. Dies könnte auf die in Kapitel 4.1.2 beschriebene neuroinflammatorische Reaktion im Implantatbereich zurückzuführen sein und würde somit einer Abstoßungsreaktion gegenüber dem Implantat entsprechen.

Auch wenn ein Untergang der implantierten, primären hRPE-Zellen durch die TUNEL-Analyse nachgewiesen werden konnte, sind Transdifferenzierungsprozesse, die ebenfalls mit einer verminderten Expression der humanen und RPE-Marker einhergehen könnten, nicht als zusätzliche Ursache auszuschließen. Erklärbar wären hierbei Transdifferenzierungsprozesse im Rahmen einer epithelial-mesenchymalen Transformation (EMT), ausgelöst durch die nachgewiesene neuroinflammatorische Reaktion. Die Möglichkeit negativer Auswirkungen durch EMT im Rahmen von RPE-Transplantationen wurde bereits durch Sharma und Kollegen diskutiert. Im Rahmen der EMT kann es dabei zu einem Verlust des RPE-Phenotyps sowie zu einer fibrotischen und membranösen Narbenbildung kommen, welche die Sehfähigkeit gefährdet (R. Sharma et. Al, 2020). Im Rahmen der EMT wird zudem nicht nur ein Verlust des ursprünglichen epithelialen Phänotyps beobachtet, sondern auch eine vermehrte Expression mesenchymaler Marker wie Vimentin (Koen & Collier, 2010), wie sie auch hier festgestellt wurde. In Zusammenschau der Beobachtungen (Verlust der RPE-Zell- und humanen Marker, Ausbildung fibrotischer Glianarben, erhöhte Vimentinexpression und Neuroinflammation) wären diese Prozesse ebenfalls im Rahmen einer epithelial-mesenchymalen Transformation erklärbar. Um diese sicher nachzuweisen, erfordert es allerdings weitere Untersuchungen. Eine EMT würde zudem auch eine Migration der transplantierten Zellen ermöglichen (Koen & Collier, 2010).

In beiden Fällen, Zelluntergang und Transdifferenzierung, ist von einer beeinträchtigten Funktionalität der implantierten, primären hRPE-Zellen auszugehen. Eine Dysfunktionalität der implantierten, primären hRPE-Zellen und Separation der Retina vom wirtseigenen, voll funktionalen RPE stellt eine plausible Erklärung für den beobachteten Stress der Photorezeptoren (Verkürzung der Außensegmente, unschärfere Abgrenzbarkeit der Zapfenendfüßchen) dar. Ein kompletter Verlust aller RPE-Funktionen scheint hingegen unwahrscheinlich zu sein, da weitere degenerative Prozesse im Rahmen eines retinalen Remodelings, wie es nach kompletter Separation von Retina und RPE beobachtet werden kann, nicht festgestellt wurden. Vor diesen degenerativen Umbauprozessen konnte ein Wiederanlegen der Retina an das integrierte hRPE-Implantat schützen, was für den Erhalt einiger RPE-Funktionen und, wie bereits diskutiert, eine suffiziente Nährstoffversorgung über die Trägermembran spricht.

RPE-Pigmente und Autofluoreszenz

Innerhalb des Implantatbereichs konnte in den meisten Färbungen eine starke Autofluoreszenz detektiert werden. In allen Färbungen zeigte sich die Autofluoreszenz jedoch lediglich innerhalb des Implantatbereichs mit den implantierten primären hRPE-Zellen und nicht innerhalb des porcinen RPEs, obwohl beide Melanin und autofluoreszierendes Lipofuszin enthalten müssten. Zudem zeigte sich in den mit HNAA und STEM121 gefärbten Gefrierschnitten die Autofluoreszenz acht Wochen nach Implantation im Vergleich zu den früheren Beobachtungszeitpunkten besonders stark ausgeprägt (siehe Kapitel 3.4).

Dass das RPE aufgrund des Lipofuszin-Gehalts autofluoreszierende Eigenschaften besitzt, wurde bereits in Kapitel 1.1.4 erwähnt. Melanin und Lipofuszin gehören zu den endogenen Pigmenten. Endogene Pigmente sind Stoffe mit Eigenfarbe, die vom Organismus selbst gebildet werden (Kühnel, 2014). Die Pigmentgranula des humanen RPEs enthalten eine hohe Konzentration an Melanin. Melanin schützt als Radikalfänger vor der Entstehung toxischer Lipidoxidationen und reduziert die Entstehung von Lipofuszin. Lipofuszin ist ein autofluoreszierendes Pigment, welches in Lysosomen postmitotischer Zellen entsteht, insbesondere wenn diese oxidativem Stress ausgesetzt sind. Innerhalb von RPE-Zellen bestehen die autofluoreszierenden Lipofuszingranula aus nicht weiter abbaubaren, phagozytierten Photorezeptoraußensegmenten. Mit zunehmendem Alter oder im Rahmen degenerativer Netzhauterkrankungen (M. Stargardt, AMD) reduziert sich das antioxidative Potential des Melanins und somit auch die Fähigkeit vor der Lipofuszin-Entstehung zu schützen. Dadurch kommt es zu einer Bildung von Melanolipofuszin-Komplexen und insgesamt zu einer zunehmenden Akkumulation von Lipofuszin, welche aufgrund der autofluoreszierenden Eigenschaften des Lipofuszins klinisch mittels Fundusautofluoreszenz-Aufnahmen dargestellt werden kann (Dithmar & Holz, 2008; R. Sparrow et al., 2010; Schraermeyer & Peters, 2001).

Die starke Autofluoreszenz der implantierten hRPE-Zellen ist somit vermutlich auf einen hohen Gehalt an Lipofuszin zurückzuführen. Wie im vorangegangenen Abschnitt erläutert, akkumuliert Lipofuszin im Rahmen krankheitsbedingter Prozesse aber auch physiologisch mit steigendem Lebensalter. Da die primären hRPE-Zellen von Leichenspendern stammten, könnte ein Grund für den hohen Lipofuszin-Gehalt innerhalb des Implantatbereichs das höhere Lebensalter der Leichenspender sein. Dies könnte auch

den Unterschied der Autofluoreszenz zwischen hRPE-Zellen und porcinem RPE erklären, da die Versuchstiere kein hohes Lebensalter aufwiesen. Qiu (2019) beobachtete zudem ebenfalls bei der Transplantation von ESC-hRPE-Zellen eine auffallend hohe Pigmentierung, welche auf beschleunigte Alterungsprozesse aufgrund insuffizienter oder fehlender antioxidativer Komponenten des transplantierten RPEs zurückgeführt wurde. Die auffallend starke Autofluoreszenz acht Wochen nach Implantation könnte demnach ebenfalls auf fortgeschrittene Alterungsprozesse und somit auch auf eine Dysfunktionalität des RPEs in Bezug auf antioxidative Eigenschaften hinweisen, welche eine zunehmende Akkumulation von Lipofuszin bedingt haben könnte.

Alternativ wäre die ausgeprägte Autofluoreszenz acht Wochen nach Implantation durch die Verwendung eines anderen Sekundärantikörpers erklärbar und somit als Artefakt und nicht als Zunahme der Autofluoreszenz über die Zeit zu werten. Zum Verständnis dafür ist die Kenntnis über die Spektraleigenschaften der RPE-Autofluoreszenz, die sich in der Fundusautofluoreszenz zu Nutze gemacht werden, hilfreich. Im Rahmen der Fundusautofluoreszenz wird monochromatisches Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm bis 550 nm zur Anregung genutzt und ein Wellenlängenbereich über 500 nm detektiert (Dithmar & Holz, 2008; Sparrow et al., 2010). Die in der Fundusautofluoreszenz gemessenen Emissionen sind breit und zentrieren bei 610 nm. Die Absorptionsmaxima der Lipofuszin-verwandeten Pigmente des RPEs liegen im Wellenlängenbereich von 430-510 nm (Sparrow et al., 2010). In der HNAA- und STEM121-Immunfärbung wurde für die Zeitpunkte ein, zwei und sechs Wochen nach Implantation der Sekundärantikörper Alexa 647 verwendet. In der HNAA- und STEM121-Immunfärbung für den Zeitpunkt acht Wochen nach Implantation, die aufgrund des späteren Eintreffens des Auges zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt wurde, wurde jedoch der Sekundärantikörper Alexa 488 verwendet. Somit wurden die HNAA- und STEM121-Immunfärbung für den Zeitpunkt acht Wochen nach Implantation mit Lasereinstellungen mikroskopiert, die auch Lipofuszin-Granula optimal zur Fluoreszenz anregen. Daher könnte die scheinbar stärkere Autofluoreszenz acht Wochen nach Implantation auf die unterschiedliche Lasereinstellung beim Mikroskopieren zurückzuführen sein.

Die auffallend hohe Autofluoreszenz der hRPE-Zellen hatte sich allerdings bereits *in vitro* im Rahmen der Kultivierung (siehe Kapitel 2.2.1.2) gezeigt. Dies legt nahe, dass die starke Autofluoreszenz eine vorbestehende Eigenschaft der primären hRPE-Zellen aufgrund des Lebensalters der Spender war. Eine möglicherweise zusätzlich während der

Implantationszeit zunehmende Lipofuszin-Akkumulation wurde noch nicht weiter untersucht.

4.4 Immunreaktion und Einfluss der Immunsuppression

Obwohl der subretinale Raum einen immunprivilegierten Zustand aufweist (siehe Kapitel 1.2), wurden eine neuroinflammatorische Reaktion in der Iba1-Färbung (Kapitel 3.2.3) und apoptotische Prozesse innerhalb des Implantatbereichs in der TUNEL-Färbung (Kapitel 3.7) für alle Versuchstiere nachgewiesen. Wie bereits diskutiert, deuten die Neuroinflammation, apoptotischen Prozesse und Verlust der Expression der humanen Marker auf eine mögliche Abstoßungsreaktion hin. Dies lässt sich mit den Ergebnissen von Wenkel und Kollegen (1999) in Verbindung setzen. Wie bereits in Kapitel 1.2 erläutert, konnte hier nach allogener Implantation in den subretinalen Raum zunächst ein Immunprivileg durch ungehemmtes Tumorstadium nachgewiesen werden, wobei es zwei bis drei Wochen nach Implantation zu einer Reduktion der Tumormasse durch eine Abstoßungsreaktion und somit zu einer Aufhebung des immunprivilegierten Zustandes kam (Wenkel et al., 1999). Zu dem zeitlichen Verlauf mit initialem Immunprivileg in den ersten Wochen und anschließender Abstoßungsreaktion lassen sich Parallelen zu den Ergebnissen dieser Arbeit ziehen, da auch hier vitale, implantierte Zellen durch die humanen Marker in den ersten Wochen nachgewiesen werden konnten, gefolgt von einem möglichen Zelluntergang in den nächsten Wochen durch eine vermutete Abstoßungsreaktion. Von Wenkel und Kollegen (1999) wurde unter anderem das größere operative Trauma im Vergleich zu Transplantation im Bereich der Vorderkammer als mögliche Ursache für die Aufhebung des immunprivilegierten Zustandes diskutiert. Auf eine trotz des aufgehobenen immunprivilegierten Zustandes persistierende abweichende Immunantwort ähnlich einer ACAID, wie sie von Wenkel und Kollegen (1999) beobachtet wurde, wurden die Versuchstiere nicht untersucht.

Zudem wurden in Kapitel 3.6 die Darstellungen der Makroglia-Marker und der Expression der humanen Marker für die Versuchstiere mit und ohne protokollgemäße Immunsuppression zum Beobachtungszeitpunkt sechs Wochen nach Implantation gegenübergestellt. Die Darstellung der TUNEL-Analyse in Kapitel 3.7 erlaubte zudem den Vergleich des Ausmaßes apoptotischen Zelluntergangs zwischen den beiden Versuchstieren. Aufgrund des verspäteten Beginns der immunsupprimierenden Therapie war von einer insuffizienten Immunsuppression bei dem Versuchstier ohne

protokollgemäße Immunsuppression zum Zeitpunkt der Implantation auszugehen. Als hervorstechende Unterschiede ließen sich eine deutliche zellreiche Hypertrophie innerhalb des Implantatbereichs sowie der vermehrte Nachweis apoptotischer Zellkerne für das Versuchstier ohne protokollgemäße Immunsuppression festhalten. Es lässt sich daraus ableiten, dass die überschießende Hypertrophie und der vermehrte Zelluntergang auf eine insuffiziente Immunsuppression und somit auf immunreaktive Prozesse zurückzuführen sind. Dies bestärkt die Annahme, dass das Immunprivileg des Auges durch den Eingriff beeinträchtigt wird. Ein naheliegender Grund hierfür ist die Verletzung von Blutgefäßen im Rahmen der subretinalen Implantation, wodurch die Blut-Retina-Schranke gestört wird. Zudem besteht das Risiko, dass es im Rahmen der Implantation zu einer Verletzung des Wirts-RPEs kommt, welches ebenfalls an der Aufrechterhaltung der immunsuppressiven Mikroumgebung des Auges beteiligt ist. Beide Aspekte wurden bereits von unter anderem Qiu (2019) als mögliche Auslöser einer lokalen Immunantwort diskutiert.

Die beobachteten immunreaktiven Prozesse unterstreichen die Wichtigkeit einer immunsuppressiven Therapie bei der Implantation primärer hRPE-Zellen, da es sich hierbei um nicht-autologe Implantate handelt. Eine ablaufende Immunreaktion beziehungsweise Abstoßungsreaktion gefährdet das Überleben der implantierten RPE-Zellen und somit den Erfolg der Behandlung. Da prospektiv die RPE-Zelltherapie für AMD-Patienten geplant ist, die durchschnittlich ein höheres Lebensalter aufweisen, ist die Notwendigkeit einer Immunsuppression allerdings ein mögliches Komplikationsrisiko, da durch die zusätzliche Immunsuppression die bereits aufgrund des Alters erhöhte Morbidität der Patienten weiter erhöht werden könnte. In Bezug auf immunreaktive Prozesse und Notwendigkeit einer immunsuppressiven Therapie könnten sich autologe, aus iPSCs abgeleitete RPE-Zellen als vorteilhaft erweisen, da durch die autologen, patienten-spezifischen Zellen keine Immunantwort ausgelöst werden und somit auch keine immunsuppressive Therapie notwendig sein sollte (Zarbin et al., 2019).

4.5 Einfluss der chirurgischen Intervention

Aufgrund eines missglückten Implantationsversuches, der bei dem Versuchstier, welches zwei Wochen nach Implantation euthanasiert wurde, aufgetreten war, bietet sich an dieser Stelle die Möglichkeit kurz auf die Auswirkungen und möglichen Operationsrisiken im Rahmen der Implantation einzugehen. Die Ergebnisse der missglückten Implantation wurden unter den Kontrollaugen für den Zeitpunkt zwei Wochen nach Implantation dargestellt und zusätzlich mit „missglückte Operation“ beschriftet. Bei diesem Implantationsversuch kam es zu einer subretinalen Blutung während der Operation, sodass die Implantation abgebrochen und das Implantat in das kontralaterale Auge des gleichen Versuchstieres eingebracht wurde. Für das Auge mit missglückter Operation und subretinaler Blutung ließen sich mehrere pathologische Veränderungen feststellen. Es zeigten sich eine Aktivierung der Müller-Zellen mit vermehrter GFAP- und Vimentin-Expression, vergleichbar mit den Veränderungen an den behandelten Augen. Zudem waren die Photorezeptoraußensegmente verkürzt und die Zapfen-Endfüßchen konnten nicht mehr abgegrenzt werden. Somit war der Zustand der Retina nach missglückter Operation mit subretinaler Blutung sogar stärker beeinträchtigt und das retinale Remodeling deutlicher ausgeprägt als bei den erfolgreich behandelten Augen ohne Blutungsereignisse. Im Gegensatz zu den erfolgreich behandelten Augen (mit Implantat) konnte am Auge der missglückten Operation keine verstärkte Iba1-Expression in der IPL und somit keine Mikroglia-Aktivierung nachgewiesen werden. Dies entspricht der Erwartungshaltung, da kein Fremdmaterial, welches eine neuroinflammatorische Reaktion hätte auslösen können, in dieses Auge implantiert wurde und stützt zudem die Hypothese, dass die Mikroglia-Aktivierung bei den Implantat-tragenden Augen auf die Einbringung von Fremdmaterial mit konsekutiver neuroinflammatorischer Reaktion zurückzuführen ist.

Die Folgen des missglückten Implantationsversuches unterstreichen die Operationsrisiken, die mit der Transplantation von RPE-Zellen auf einer Trägermembran einhergehen können. Im Vergleich zur Transplantation als Zellsuspension ist die RPE-Zellimplantation auf einer Trägermembran mit einer höheren Invasivität verbunden und erfordert eine größere Retinotomie. Dadurch sind nicht nur allgemeine Operationsrisiken erhöht, sondern die notwendige größere Retinotomie geht zudem mit einem erhöhten Risiko für Netzhautablösung und Narbenbildung einher (Zarbin et al., 2019). Zwar bietet der Einsatz einer Trägermembran gegenüber der Transplantation als Zellsuspension viele

Vorteile, wie unter anderem die Möglichkeit zur Transplantation der RPE-Zellen als zusammenhängende Zellschicht mit besserem Erhalt der Photorezeptoren-Gesundheit bei gleichzeitig erhaltener Nährstoffversorgung, und Sharma und Kollegen konnten die Überlegenheit gegenüber der Transplantation als Zellsuspension in Bezug auf Verhinderung retinaler Degenerationsprozesse und Protektion der Photorezeptoren nach Laser-induzierten Retinaschäden im Tiermodell bereits nachweisen (R. Sharma et al., 2019). Dennoch steht zu diesem Zeitpunkt nicht fest, ob die Vorteile der Trägermembran die Inkaufnahme des höheren Komplikationsrisikos rechtfertigen (R. Sharma et al., 2020; Zarbin et al., 2019). Zur Beantwortung dieser Frage bedarf es weiterer klinischer Studien. Zudem wird auch an therapeutischen Optionen zur Kontrolle möglicher Komplikationen weiter geforscht. Hier zeigte sich zuletzt der Einsatz von Rho-Kinase-Inhibitoren als geeignet, die Beeinträchtigung der synaptischen Verbindungen und den Zelluntergang der Photorezeptoren, die mit der Netzhautablösung im Rahmen der Implantation auftreten können, signifikant zu reduzieren (Zarbin et al., 2019).

5 Zusammenfassung

Die Forschung an RPE-Zelltransplantationen dient der Suche nach Therapiemöglichkeiten für die Altersbezogene Makuladegeneration (AMD). Die AMD ist die führende Erblindungsursache bei Personen über 55 Jahren in Industrienationen und geht mit einer starken Einschränkung der Lebensqualität einher. Pathophysiologisch spielt ein erkranktes und dysfunktionales RPE eine wichtige Rolle in der Manifestation einer AMD. Bisher mangelt es insbesondere für die häufigere, „trockene“ Form der AMD an therapeutischen Möglichkeiten. Es wurden bereits erste klinische Studien mit Transplantationen von RPE-Zellen bei AMD-Patienten zur Erforschung weiterer therapeutischer Möglichkeiten durchgeführt mit zum Teil vielversprechenden Ergebnissen. Zur Transplantation von RPE-Zellen existieren bezüglich Zellursprung und Implantationstechnik unterschiedliche Forschungsansätze. RPE-Zellen lassen sich entweder als Zellsuspension oder als zusammenhängende Zellschicht auf einer Trägermembran transplantieren. Der Einsatz einer Trägermembran bietet bezüglich Funktion und Überleben der RPE-Zellen sowie der Integration einige Vorteile gegenüber der Zellsuspension, ist jedoch mit einem invasiveren Eingriff verbunden. In bisherigen Studien wurden zur Kultivierung von RPE-Zellen vor allem induzierte pluripotente Stammzellen oder embryonische Stammzellen verwendet. Als alternativer Ansatz zu stammzellbasierten Verfahren kamen im Rahmen dieses Projekts primäre hRPE-Zellen, die aus Leichenspendern gewonnen wurden, zum Einsatz. Da es sich bei diesen Zellen um bereits differenzierte RPE-Zellen handelt, bietet dieser Ansatz das Potential einer kosteneffektiveren Alternative zu stammzellbasierten Verfahren mit geringerem onkogenen Risiko.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten durch die Implantation primärer hRPE-Zellen in Schweineaugen erste Erfahrungen auf diesem Gebiet gesammelt werden und der Einsatz einer neu entwickelten Trägermembran geprüft werden. Hierzu wurden in externen Vorarbeiten primäre hRPE-Zellen aus Leichenspendern gewonnen, auf einer Trägermembran angezüchtet und in je ein Auge fünf immunsupprimierter Versuchsschweine subretinal implantiert. Ein, zwei, sechs und acht Wochen nach Implantation wurden die Versuchstiere euthanasiert und die Augen an die experimentelle Ophthalmologie der JLU Gießen übersandt, um die Auswirkungen der Implantation auf Retina und Implantat mittels immunhistochemischer Methoden morphologisch zu

charakterisieren. Dabei konnte eine Integration des Implantats bei vier von fünf Versuchstieren festgestellt werden. Auch wenn für die Retinae unterhalb der Implantate bei allen Versuchstieren eine Aktivierung von Müller-Zellen und die Ausbildung von Gliazellen festgestellt wurden und die Photorezeptoren Anzeichen von Stress zeigten, ließen sich zu allen Beobachtungszeitpunkten vitale Photorezeptoren nachweisen und stark ausgeprägte retinale Umbauprozesse ausschließen. Somit konnte der Einsatz der Trägermembran in Bezug auf Integration und Nährstoffversorgung als erfolgreich gewertet werden. Für die implantierten hRPE-Zellen hingegen wurden ein Verlust der Expression von humanen Markern im zeitlichen Verlauf und Anzeichen von Dysfunktionalität nachgewiesen, die vermutlich im Rahmen von Transdifferenzierungsprozessen, Zelluntergang und Zellafter auftraten. Trotz immunprivilegierter Eigenschaften des subretinalen Raums und der immunsuppressiven Therapie ließ sich eine neuroinflammatorische Reaktion und ein Zelluntergang der implantierten hRPE-Zellen feststellen. Diese waren besonders stark in einem Versuchstier, welches zum Zeitpunkt der Implantation insuffizient immunsupprimiert war, ausgeprägt. Dies unterstrich die Notwendigkeit einer immunsuppressiven Therapie bei der Verwendung primärer hRPE-Zellen, da es sich dabei um nicht-autologe Zellen handelte. Bei einem weiteren Versuchstier kam es im Rahmen der Implantation zu einer subretinalen Blutung mit deutlichen retinalen Umbauprozessen als Folge, was zudem das höhere Komplikationsrisiko der invasiveren Implantationstechnik beim Einsatz einer Trägermembran im Vergleich zur Zellsuspension verdeutlichte.

Insgesamt zeigte sich der Einsatz der Trägermembran im Rahmen dieses Projekts bezüglich Integration und Nährstoffversorgung als erfolgreich. Die implantierten, primären hRPE-Zellen wiesen jedoch Anzeichen für Dysfunktionalität und Zelluntergang auf. Zudem wurde eine neuroinflammatorische Reaktion durch die artfremden Zellen ausgelöst, was den beobachteten Zelluntergang und den Verlust der Expression humaner Marker der hRPE-Zellen auf eine mögliche Abstoßungsreaktion zurückführen ließ. Ein Folgeprojekt mit Verwendung von induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSCs) wurde bereits begonnen. Da es sich hierbei um junge Zelllinien handelt und iPSCs autolog gewonnen werden können, könnte hierdurch eine verbesserte Funktionalität der implantierten RPE-Zellen und geringere Immunantwort ohne Notwendigkeit einer immunsuppressiven Therapie erreicht werden.

5.1 Summary

The purpose of RPE cell transplantation studies is finding therapeutic options for age-related macular degeneration (AMD). AMD is the leading cause of blindness in individuals over 55 years in industrialized nations and is associated with a severe reduction in quality of life. A diseased and dysfunctional RPE plays an important role in the pathogenesis of AMD. To date, there is a lack of therapeutic options especially for the more common "dry" form of AMD. First clinical studies with transplantation of RPE cells in AMD patients have been performed with partly promising results. There are different research approaches regarding cell origin and implantation technique for transplantation of RPE cells. RPE cells can be transplanted either as a cell suspension or as a continuous cell layer on a scaffold. The use of scaffolds offers some advantages over cell suspension in terms of RPE cell function and survival as well as integration, but is associated with a more invasive procedure. In previous studies, induced pluripotent stem cells or embryonic stem cells were mainly used as source of RPE cells. Alternatively to stem cell-based approaches, primary hRPE cells derived from cadaveric donors were used in this project. Since these cells are already differentiated RPE cells, this approach offers the potential of a more cost-effective alternative with lower oncogenic risk compared to stem cell-based approaches.

The purpose of this work was to gain initial experience with transplantation of primary hRPE cells and to test a new developed scaffold. Primary hRPE cells were obtained from cadaveric donors in external preliminary work, grown on a scaffold and implanted subretinally in one eye of each of five immunosuppressed minipigs. At one, two, six and eight weeks after implantation, the minipigs were euthanized. The eyes were sent to the Department of Experimental Ophthalmology, Justus-Liebig-University Giessen, Germany for morphologic characterization of the effects on retina and implant due to the implantation of hRPE cells using immunohistochemical methods. Integration of the implant was observed in four of five minipigs. Although activation of Müller cells and formation of glial scars were observed in the retinae underneath the implants in all minipigs and the photoreceptors showed signs of stress, vital photoreceptors could be detected at all observation times and severe retinal remodeling processes could be excluded. Thus, the use of the scaffold could be considered successful in terms of integration and nutrient supply. In contrast, for the implanted hRPE cells, a loss of

expression of human markers over time and signs of dysfunctionality were detected, which presumably occurred in the context of transdifferentiation processes, cell death and cell aging. Despite the immune-privileged environment of the subretinal space and immunosuppressive therapy, a neuroinflammatory response and cell death of implanted hRPE cells could be detected. These were particularly found in one experimental animal that was insufficiently immunosuppressed at the time of implantation. This highlights the need for immunosuppressive therapy when using primary hRPE cells, as these are non-autologous cells. In another minipig, subretinal hemorrhage occurred during implantation with significant retinal remodeling processes as a consequence, which also highlighted the higher risk of complications associated with the more invasive implantation technique when using a scaffold compared to cell suspension.

Overall, the use of the scaffold in this project was shown to be successful in terms of integration and nutrient supply. However, the implanted primary hRPE cells showed signs of dysfunctionality and cell death. In addition, a neuroinflammatory response was induced by the non-autologous hRPE cells, which attributed the observed cell death and loss of human marker expression to a possible graft rejection. A follow-up project using induced pluripotent stem cells (iPSCs) has already been initiated. Since these cells have a lower cell age and iPSCs can be autologously derived, this could provide improved functionality of the implanted RPE cells and reduced immune response without the need for immunosuppressive therapy.

6 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------|--|
| A..... | Arteria |
| ACAID | Vorderkammer-assoziierte Immunabweichung |
| AMD..... | Altersbedingte Makuladegeneration |
| DAPI..... | 4'-6-Diamidin-2-Phenylindol-Dichlorid |
| EMT..... | epithelial-mesenchymale Transformation |
| FBS..... | Fötale Kälberserum |
| GCL..... | Ganglienzellschicht |
| hRPE..... | humanes Retinales Pigmentepithel |
| ILM..... | Innere Grenzschrift |
| INL | Innere Körnerschicht (Inner Nuclear Layer) |
| IPL..... | Innere Plexiforme Schicht |
| iPSC..... | induzierte pluripotene Stammzellen |
| IS | Innensegmente (Photorezeptoren) |
| NFL | Nervenfaserschicht |
| OLM | Äußere Grenzschrift |
| ONL..... | Äußere Körnerschicht (Outer Nuclear Layer) |
| OPL | Äußere Plexiforme Schicht |
| OS..... | Außensegmente (Photorezeptoren) |
| PBS, 0,1M | Phosphat-gepufferte Salzlösung |
| RPE..... | Retinales Pigmentepithel |
| S..... | Seite |
| s.o. | siehe oben |
| z.B. | zum Beispiel |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |

7 **Abbildungsverzeichnis**

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Ophthalmoskopische Ansicht der Retina. (Hageman et al., 2008) | 2 |
| Abbildung 2: Die Schichten der Retina. (Vaughan D., 1983)..... | 4 |
| Abbildung 3: Semi-Dünnschnitte der porcinen (links) und der humanen (rechts) Retina im Vergleich. Modifiziert nach (Beauchemin, 1974)..... | 16 |
| Abbildung 4: Reihenfolge der Versuchsabschnitte. | 34 |
| Abbildung 5: Schematische Darstellung der Herstellung der Trägermembran im Elektrosplintverfahren. (1) Herstellung der unteren Trägermembranhälfte. (2) Einsetzen des Stützrahmens. (3) Komplettierung durch Herstellung der oberen Trägermembranhälfte (Popelka et al., 2015)..... | 35 |
| Abbildung 6: Skizzierung der Kultivierung und Aussat der RPE-Zellen. FBS= Fötales Kälberserum *TrypLE, Gibco®, Thermo Fisher Scientific, MA, USA | 35 |
| Abbildung 7: Relative Expression von RPE-Markern der kultivierten, primären humanen RPE-Zellen im Vergleich zu nativen RPE-Zellen. | 36 |
| Abbildung 8: Bilder der Präparation. Links: Augenbecher eines behandelten Auges. Rechts: Präparat mit Implantat in Einbettmedium vor dem Einfrieren..... | 40 |
| Abbildung 9: Skizze der Trägermembran mit Angabe der Schnittrichtung beim Anfertigen der Gefrierschnitte..... | 40 |
| Abbildung 10: Prinzip der direkten Immunfluoreszenz. | 43 |
| Abbildung 11: Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz. | 43 |
| Abbildung 12: Strukturformel von DAPI (4'-6-Diamidin-2-Phenylindol-Dichlorid) in Anlehnung an (Kapuscinski, 1995). | 44 |
| Abbildung 13: Hämatoxylin-Eosin-Färbung (links) mit Gegenüberstellung der HNAA-Expression und DAPI-Kernfärbung (rechts) des Implantatbereichs sowie der angrenzenden Strukturen (Retina unter Implantat, Choroidea, Sklera) im zeitlichen Verlauf..... | 55 |
| Abbildung 14: Expression der Makrogliamarker Vimentin (A-D) und GFAP (E-H) sowie des Mikroglia markers Iba1 (I-L) in den Kontrollaugen zu den unterschiedlichen Beobachtungszeitpunkten bis 8 Wochen nach Implantation..... | 59 |
| Abbildung 15: Expression der Makrogliamarker Vimentin (A-G) und GFAP (H-M) sowie des Mikroglia markers Iba1 (N-T) in den behandelten Augen zu den unterschiedlichen Beobachtungszeitpunkten bis 8 Wochen nach Implantation. | 62 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 16: Expression des Zapfen-Photorezeptoren-Markers PNA (Peanut Agglutinin) und des Stäbchen-Bipolarzellen-Markers PKC-alpha in der Retina unterhalb des Implantats und der unbehandelten Kontrollaugen zu den unterschiedlichen Beobachtungszeitpunkten bis zu 8 Wochen nach Implantation..... | 66 |
| Abbildung 17: Expression des humanen Markers HNAA der auf einer Trägermembran implantierten primären, humanen RPE-Zellen zu den unterschiedlichen Beobachtungszeitpunkten bis 8 Wochen nach Implantation..... | 70 |
| Abbildung 18: Expression des humanen Markers HNAA der auf einer Trägermembran implantierten primären, humanen RPE-Zellen 1 und 8 Wochen nach Implantation in Gegenüberstellung zu den Negativkontrollen. | 71 |
| Abbildung 19: Expression des humanen Markers STEM121 in primären, humanen RPE-Zellen zu den unterschiedlichen Beobachtungszeitpunkten 1, 2, 6 und 8 Wochen nach Implantation auf einer Trägermembran. | 74 |
| Abbildung 20: Expression des RPE-Markers CRALBP (zelluläres Retinaldehyd-bindendes Protein) im porcinen RPE und im Implantatbereich in den behandelten Augen (A-H) 1, 2, 6 und 8 Wochen nach Implantation. | 76 |
| Abbildung 21: Expression des RPE-spezifischen Markers Bestrophin im porcinen RPE und im Implantatbereich in den behandelten Augen (A-D) zu den unterschiedlichen Beobachtungszeitpunkten bis zu 8 Wochen nach Implantation. | 78 |
| Abbildung 22: Expression der Makroglia marker GFAP und Vimentin der behandelten Augen 6 Wochen nach Implantation ohne (links) und mit (rechts) protokollgemäßer Immunsuppression in den Übersichtsaufnahmen..... | 81 |
| Abbildung 23: Expression der Makroglia marker GFAP und Vimentin der behandelten Augen 6 Wochen nach Implantation mit und ohne protokollgemäßer Immunsuppression in den Detailaufnahmen..... | 83 |
| Abbildung 24: Expression der Makroglia marker GFAP und Vimentin der Kontrollaugen ohne Implantat 6 Wochen nach Implantation mit und ohne protokollgemäßer Immunsuppression in den Übersichts- und Detailaufnahmen. | 83 |
| Abbildung 25: Expression der humanen Marker HNAA und STEM121 der behandelten Augen 6 Wochen nach Implantation mit und ohne protokollgemäßer Immunsuppression mit Darstellung der mitgeführten Negativkontrollen. | 86 |
| Abbildung 26: Darstellung der TUNEL-Färbung der behandelten Augen aller Versuchstiere. | 89 |

8 Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Chemikalien in alphabetischer Reihenfolge. | 26 |
| Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Puffer und Medien in alphabetischer Reihenfolge. | 26 |
| Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Puffer und Medien in alphabetischer Reihenfolge. | 27 |
| Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien in alphabetischer Reihenfolge. | 27 |
| Tabelle 5: Auflistung der benutzten Geräte in alphabetischer Reihenfolge..... | 28 |
| Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Primärantikörper mit Angabe der Bestellnummer, des Wirtstiers, der Reaktivität, der verwendeten Verdünnungsstufe sowie des Herstellers in alphabetischer Reihenfolge. | 29 |
| Tabelle 7: Auflistung der Primärantikörper, mit denen eine Immunfärbung durchgeführt wurde aber deren Färbeergebnisse aufgrund fehlender Aussagekraft nicht in die Auswertung mit eingeflossen sind. Auflistung mit Angabe der Bestellnummer, des Wirtstiers, der Reaktivität, der verwendeten Verdünnungsstufe sowie des Herstellers in alphabetischer Reihenfolge. | 30 |
| Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Sekundärantikörper mit Angabe der Bestellnummer, des Wirtstiers, der Reaktivität, der verwendeten Verdünnungsstufe sowie des Herstellers in alphabetischer Reihenfolge. | 32 |
| Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Software in alphabetischer Reihenfolge..... | 33 |
| Tabelle 10: Überblick über die einzelnen Versuchsschweine..... | 38 |
| Tabelle 11: Tabellarische Zusammenfassung der wichtigsten Färbeschritte der Immunhistochemie. | 47 |

9 Literaturverzeichnis

- Ammar, M. J., Hsu, J., Chiang, A., Ho, A. C., & Regillo, C. D. (2020). Age-related macular degeneration therapy: A review. *Current Opinion in Ophthalmology*, 31(3), 215–221. <https://doi.org/10.1097/ICU.0000000000000657>
- Beauchemin, M. L. (1974). The fine structure of the pig's retina. *Albrecht von Graefes Archiv Für Klinische Und Experimentelle Ophthalmologie*, 190(1), 27–45. <https://doi.org/10.1007/BF00414333>
- Bertram, B., Holz, F., Kellner, U., & Reinhard, T. (2015). Leitlinie Nr.21 der BVA und DOG: Altersabhängige Makuladegeneration, (21), 1–9. Retrieved from <https://www.dog.org/?cat=32>
- Bhutto, I., & Luty, G. (2012). Understanding age-related macular degeneration (AMD): Relationships between the photoreceptor/retinal pigment epithelium/Bruch's membrane/choriocapillaris complex. *Molecular Aspects of Medicine*, 33(4), 295–317. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.04.005>
- Binder, S., Stanzel, B. V., Krebs, I., & Glittenberg, C. (2007). Transplantation of the RPE in AMD. *Progress in Retinal and Eye Research*, 26(5), 516–554. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2007.02.002>
- Bressler, N. M., Doan, Q. V, Varma, R., Lee, P. P., Suñer, I. J., Dolan, C., ... Colman, S. (2011). Estimated cases of legal blindness and visual impairment avoided using ranibizumab for choroidal neovascularization: non-Hispanic white population in the United States with age-related macular degeneration. *Archives of Ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, 129(6), 709–717. <https://doi.org/10.1001/archophthalmol.2011.140>
- Coons, A. H., Creech, H. J., & Jones, R. N. (1941). Immunological Properties of an Antibody Containing a Fluorescent Group. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 47(2), 200–202. <https://doi.org/10.3181/00379727-47-13084P>
- Diniz, B., Thomas, P., Thomas, B., Ribeiro, R., Hu, Y., Brant, R., ... Humayun, M. S. (2013). Subretinal Implantation of Retinal Pigment Epithelial Cells Derived From Human Embryonic Stem Cells: Improved Survival When Implanted as a Monolayer. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 54(7), 5087–5096. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-11239>
- Dithmar, S., & Holz, F. G. (2008). Fundusautofluoreszenz. In *Fluoreszenzangiographie*

- in der Augenheilkunde* (pp. 31–55). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
https://doi.org/10.1007/978-3-540-35224-2_4
- Eisenfeld, A. J., Bunt-Milam, A. H., & Sarthy, P. V. (1984). Muller cell expression of glial fibrillary acidic protein after genetic and experimental photoreceptor degeneration in the rat retina. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 25(11), 1321–1328.
- Fischer, A. H., Jacobson, K. A., Rose, J., & Zeller, R. (2008). Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *Cold Spring Harbor Protocols*, 3(5), 4986–4988.
<https://doi.org/10.1101/pdb.prot4986>
- Fisher, S. K., Lewis, G. P., Linberg, K. A., & Verardo, M. R. (2005). Cellular remodeling in mammalian retina: Results from studies of experimental retinal detachment. *Progress in Retinal and Eye Research*, 24(3), 395–431.
<https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2004.10.004>
- Geller, S. F., Lewis, G. P., & Fisher, S. K. (2001). FGFR1, Signaling, and AP-1 Expression after Retinal Detachment: Reactive Müller and RPE Cells. *Investigative Ophthalmology*, 1363–1369.
- Ginhoux, F., Lim, S., Hoeffel, G., Low, D., & Huber, T. (2013). Origin and differentiation of microglia. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7(MAR), 1–14.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00045>
- Hageman, G. S., Gehrs, K., Johnson, L. V., & Anderson, D. (2008). Age-Related Macular Degeneration (AMD). In H. Kolb, E. Fernandez, & R. Nelson (Eds.), *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System [Internet]*. Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center; 1995-. Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center; 1995-. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27323/>
- Hebel, R. (1976). Distribution of retinal ganglion cells in five mammalian species (pig, sheep, ox, horse, dog). *Anatomy and Embryology*, 150(1), 45–51.
<https://doi.org/10.1007/BF00346285>
- Hu, J., & Bok, D. (2010). Culture of highly differentiated human retinal pigment epithelium for analysis of the polarized uptake, processing, and secretion of retinoids. *Methods in Molecular Biology*, 652, 55–73. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-325-1_2
- Jiang, L. Q., Jorquera, M., & Streilein, J. W. (1994). Immunologic Consequences of Intraocular Implantation of Retinal Pigment Epithelial Allografts. *Experimental Eye*

Research. <https://doi.org/10.1006/exer.1994.1069>

- Jiang, L., Q., Jorquera, M., & Streilein, J. W. (1993). Subretinal space and vitreous cavity as immunologically privileged sites for retinal allografts. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 34(12), 3347–3354.
- Jones, B. W., & Marc, R. E. (2005). Retinal remodeling during retinal degeneration. *Experimental Eye Research*, 81(2), 123–137. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2005.03.006>
- Kapuscinski, J. (1995). DAPI: A DMA-Specific fluorescent probe. *Biotechnic and Histochemistry*, 70(5), 220–233. <https://doi.org/10.3109/10520299509108199>
- Kirsch, J. (2020). Auge - Sehorgan. In G. Aumüller, G. Aust, A. Conrad, J. Engele, J. Kirsch, G. Maio, ... E. Al. (Eds.), *Duale Reihe Anatomie*. <https://doi.org/10.1055/b-0034-100992>
- Koen, E. J., & Collier, A. B. (2010). Particle-in-cell simulations of a beam driven plasma. *Physics of Plasmas*, To be subm(May), 1420–1428. <https://doi.org/10.1172/JCI39104.1420>
- Kolb, H. (2005). Simple Anatomy of the Retina [Updated 2012]. In H. Kolb, E. Fernandez, & R. Nelson (Eds.), *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System [Internet]*. Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center; 1995-. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11533/>
- Kozak, I., Stranak, Z., Popelka, S., Ardan, T., Rais, D., Cizkova, J., ... Motlik, J. (2018). Safety and feasibility of new nanofiber subretinal delivery system with injector for RPE cell transplantation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 59(9), 5670.
- Kühnel, W., Taschenatlas Histologie (2014). 13 Auflage, Thieme Verlag.
ISBN: 9783133486132
- Kyrylkova, K., Kyryachenko, S., Leid, M., & Kioussi, C. (2012). Detection of Apoptosis by TUNEL Assay. In C. Kioussi (Ed.), *Odontogenesis: Methods and Protocols* (pp. 41–47). Totowa, NJ: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-860-3_5
- Lang, G. (2015). Proliferative Vitreoretinopathie (PVR). In *Augenheilkunde essentials*. Lang G, Lang G, Hrsg. 1. Auflage. Stuttgart: Thieme; 2015. <https://doi.org/10.1055/b-003-117805>
- Lefèvre, S., & Lange, U. (2011). Immunfluoreszenz. *Zeitschrift Fur Rheumatologie*, 70(3), 228–231. <https://doi.org/10.1007/s00393-010-0745-7>
- Lewis, G. P., Chapin, E. A., Luna, G., Linberg, K. A., & Fisher, S. K. (2010). The fate of

- müller's glia following experimental retinal detachment: Nuclear migration, cell division, and subretinal glial scar formation. *Molecular Vision*, 16(July), 1361–1372.
- Lewis, G. P., & Fisher, S. K. (2003). Up-Regulation of Glial Fibrillary Acidic Protein in Response to Retinal Injury: Its Potential Role in Glial Remodeling and a Comparison to Vimentin Expression. *International Review of Cytology*, 230, 263–290. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(03\)30005-1](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(03)30005-1)
- Li, L., & Turner, J. E. (1988). Inherited retinal dystrophy in the RCS rat: Prevention of photoreceptor degeneration by pigment epithelial cell transplantation. *Experimental Eye Research*, 47(6), 911–917. [https://doi.org/10.1016/0014-4835\(88\)90073-5](https://doi.org/10.1016/0014-4835(88)90073-5)
- Liao, J. L., Yu, J., Huang, K., Hu, J., Diemer, T., Ma, Z., ... Fan, G. (2010). Molecular signature of primary retinal pigment epithelium and stem-cell-derived RPE cells. *Human Molecular Genetics*, 19(21), 4229–4238. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq341>
- Lichtman, J. W., & Conchello, J. A. (2005). Fluorescence microscopy. *Nature Methods*, 2(12), 910–919. <https://doi.org/10.1038/nmeth817>
- Lin, B., McLelland, B. T., Mathur, A., Aramant, R. B., & Seiler, M. J. (2018). Sheets of human retinal progenitor transplants improve vision in rats with severe retinal degeneration. *Experimental Eye Research*, 174(February), 13–28. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2018.05.017>
- Liu, Z., Li, Y., Cui, Y., Roberts, C., Lu, M., Wilhelmsson, U., ... Chopp, M. (2014). Beneficial effects of gfap/vimentin reactive astrocytes for axonal remodeling and motor behavioral recovery in mice after stroke. *Glia*, 62(12), 2022–2033. <https://doi.org/10.1002/glia.22723>
- Lüllmann-Rauch, R., & Asan, E. (2019). Auge. In R. Lüllmann-Rauch & E. Asan (Eds.) (6., vollst). Georg Thieme Verlag. <https://doi.org/10.1055/b-006-163361>
- Lytvynchuk, L., Ebbert, A., Studenovska, H., Josifovska, N., Rais, D., Tichotov, L., ... Erceg, S. (2022). Subretinal Implantation of Human Primary RPE Cells Cultured on Nanofibrous Membranes in Minipigs.
- Maminishkis, A., Chen, S., Jalickee, S., Banzon, T., Shi, G., Wang, F. E., ... Miller, S. S. (2006). Confluent monolayers of cultured human fetal retinal pigment epithelium exhibit morphology and physiology of native tissue. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 47(8), 3612–3624. <https://doi.org/10.1167/iovs.05-1622>
- Marmorstein, A. D., Marmorstein, L. Y., Sakaguchi, H., & Hollyfield, J. G. (2002).

- Spectral profiling of autofluorescence associated with lipofuscin, Bruch's membrane, and sub-RPE deposits in normal and AMD eyes. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 43(7), 2435–2441.
- Masland, R. H., & Howard. (2001). The fundamental plan of the retina Richard. *Nature Publishing Group*, 4(9), 877–886.
- Mazzoni, F., Safa, H., & Finnemann, S. C. (2014). Understanding photoreceptor outer segment phagocytosis: Use and utility of RPE cells in culture. *Experimental Eye Research*, 126, 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2014.01.010>
- McLelland, B. T., Lin, B., Mathur, A., Aramant, R. B., Thomas, B. B., Nistor, G., ... Seiler, M. J. (2018). Transplanted hESC-derived retina organoid sheets differentiate, integrate, and improve visual function in retinal degenerate rats. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 59(6), 2586–2603. <https://doi.org/10.1167/iovs.17-23646>
- Monés, J., Leiva, M., Peña, T., Martínez, G., Biarnés, M., Garcia, M., ... Fernandez, E. (2016). A swine model of selective geographic atrophy of outer retinal layers mimicking atrophic AMD: A phase I escalating dose of subretinal sodium iodate. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 57(10), 3974–3983. <https://doi.org/10.1167/iovs.16-19355>
- Müller, B., Wagner, F., Lorenz, B., & Stieger, K. (2017). Organotypic cultures of adult mouse retina: Morphologic changes and gene expression. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 58(4), 1930–1940. <https://doi.org/10.1167/iovs.16-20718>
- Naskar, R., Wissing, M., & Thanos, S. (2002). Detection of early neuron degeneration and accompanying microglial responses in the retina of a rat model of glaucoma. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 43(9), 2962–2968.
- Negishi, K., Kato, S., & Teranishi, T. (1988). Dopamine cells and rod bipolar cells contain protein kinase C-like immunoreactivity in some vertebrate retinas. *Neuroscience Letters*, 94(3), 247–252. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(88\)90025-0](https://doi.org/10.1016/0304-3940(88)90025-0)
- Niederhorn, J. Y. (1990). Immune privilege and immune regulation in the eye. *Advances in Immunology*, 48, 191–226. [https://doi.org/10.1016/s0065-2776\(08\)60755-5](https://doi.org/10.1016/s0065-2776(08)60755-5)
- Ohsawa, K., Imai, Y., Sasaki, Y., & Kohsaka, S. (2004). Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. *Journal of Neurochemistry*, 88(4), 844–856. <https://doi.org/10.1046/j.1471->

4159.2003.02213.x

- Paddock, S. W. (1999). Confocal laser scanning microscopy. *BioTechniques*, 27(5), 992–1004. <https://doi.org/10.2144/99275ov01>
- Pardue, M. T., Phillips, M. J., Yin, H., Sippy, B. D., Webb-Wood, S., Chow, A. Y., & Ball, S. L. (2005). Neuroprotective effect of subretinal implants in the RCS rat. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 46(2), 674–682. <https://doi.org/10.1167/iovs.04-0515>
- Popelka, Š., Studenovská, H., Abelová, L., Ardan, T., Studený, P., Straňák, Z., ... Rypáček, F. (2015). A frame-supported ultrathin electrospun polymer membrane for transplantation of retinal pigment epithelial cells. *Biomedical Materials (Bristol)*, 10(4). <https://doi.org/10.1088/1748-6041/10/4/045022>
- Qiu, T. G. (2019). Transplantation of human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelial cells (MA09-hRPE) in macular degeneration. *Npj Regenerative Medicine*, 4(1). <https://doi.org/10.1038/s41536-019-0081-8>
- R. Sparrow, J., Hicks, D., & P. Hamel, C. (2010). The Retinal Pigment Epithelium in Health and Disease. *Current Molecular Medicine*, 10(9), 802–823. <https://doi.org/10.2174/156652410793937813>
- Ramos-Vara, J. A. (2005). Technical aspects of immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*, 42(4), 405–426. <https://doi.org/10.1354/vp.42-4-405>
- Reichenbach, A., & Bringmann, A. (2020). Glia of the human retina. *Glia*, 68(4), 768–796. <https://doi.org/10.1002/glia.23727>
- Roche Diagnostics, & Sigma-aldrich.com. (2016). In Situ Cell Death Detection Kit , Fluorescein, Version 18, 1–25. Retrieved from <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/417/021/11684795910bul.pdf>
- Rojas, B., Gallego, B. I., Ramírez, A. I., Salazar, J. J., de Hoz, R., Valiente-Soriano, F. J., ... Ramírez, J. M. (2014). Microglia in mouse retina contralateral to experimental glaucoma exhibit multiple signs of activation in all retinal layers. *Journal of Neuroinflammation*, 11(1), 1–24. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-133>
- Ruiz-Ederra, J., García, M., Hernández, M., Urcola, H., Hernández-Barbáchano, E., Araiz, J., & Vecino, E. (2005). The pig eye as a novel model of glaucoma. *Experimental Eye Research*, 81(5), 561–569. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2005.03.014>
- Saari, J. C., Nawrot, M., Kennedy, B. N., Garwin, G. G., Hurley, J. B., Huang, J., ...

- Crabb, J. W. (2001). Visual cycle impairment in cellular retinaldehyde binding protein (CRALBP) knockout mice results in delayed dark adaptation. *Neuron*, 29(3), 739–748. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00248-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00248-3)
- Schmitz-Valckenberg, S., & Holz, F. G. (2010). Geographic atrophy in AMD. *Ophthalmologie*, 107(11), 997–998. <https://doi.org/10.1007/s00347-010-2157-0>
- Schraermeyer, U., & Peters, S. (2001). Charakteristika und Funktionen des Melanins im retinalen Pigmentepithel. *Der Ophthalmologe*, 98(12), 1181–1185. <https://doi.org/10.1007/s003470170011>
- Schwartz, S. D., Regillo, C. D., Lam, B. L., Elliott, D., Rosenfeld, P. J., Gregori, N. Z., ... Lanza, R. (2015). Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: Follow-up of two open-label phase 1/2 studies. *The Lancet*, 385(9967), 509–516. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61376-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61376-3)
- Sharma, R., Bose, D., Maminishkis, A., & Bharti, K. (2020). Retinal pigment epithelium replacement therapy for age-related macular degeneration: Are we there yet? *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 60, 553–572. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010919-023245>
- Sharma, R. K., Bergström, A., & Ehinger, B. (1997). Influence of technique and transplantation site on rosette formation in rabbit retinal transplants. *Acta Ophthalmologica Scandinavica*, 75(1), 3–10. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0420.1997.tb00240.x>
- Sharma, R., Khristov, V., Rising, A., Jha, B. S., Dejene, R., Hotaling, N., ... Bharti, K. (2019). Clinical-grade stem cell-derived retinal pigment epithelium patch rescues retinal degeneration in rodents and pigs. *Science Translational Medicine*, 11(475). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aat5580>
- Shi, S. R., Cote, R. J., & Taylor, C. R. (1997). Antigen retrieval immunohistochemistry: Past, Present, and Future. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 45(3), 327–343. <https://doi.org/10.1177/002215549704500301>
- Silverman, M. S., & Hughes, S. E. (1989). Transplantation of photoreceptors to light-damaged retina. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 30(8), 1684–1690.
- Sparrow, J. R., Wu, Y., Nagasaki, T., Yoon, K. D., Yamamotoa, K., & Zhoua, J. (2010). Fundus autofluorescence and the bisretinoids of retina. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 9(11), 1480–1489. <https://doi.org/10.1039/c0pp00207k>

- Strauss, O. (2011). The Retinal Pigment Epithelium. In H. Kolb, E. Fernandez, & R. Nelson (Eds.), *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System [Internet]*. Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center; 1995-. Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center; 1995-. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54392/>
- Strauß, O., & Rosenthal, R. (2005). Funktion des bestrophins. *Ophthalmologe*, *102*(2), 122–126. <https://doi.org/10.1007/s00347-004-1157-3>
- Streilein, J. W. (2003). Ocular immune privilege: the eye takes a dim but practical view of immunity and inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, *74*(2), 179–185. <https://doi.org/10.1189/jlb.1102574>
- Sugita, S., Mandai, M., Kamao, H., & Takahashi, M. (2021). Immunological aspects of RPE cell transplantation. *Progress in Retinal and Eye Research*, *84*, 100950. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2021.100950>
- Szatmári-Tóth, M., Kristóf, E., Veréb, Z., Akhtar, S., Facskó, A., Fésüs, L., ... Petrovski, G. (2016). Clearance of autophagy-associated dying retinal pigment epithelial cells – a possible source for inflammation in age-related macular degeneration. *Cell Death and Disease*, *7*(9), 1–13. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.133>
- Tanna, P., Strauss, R. W., Fujinami, K., & Michaelides, M. (2017). Stargardt disease: Clinical features, molecular genetics, animal models and therapeutic options. *British Journal of Ophthalmology*, *101*(1), 25–30. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2016-308823>
- Vaughan D., A. T. (1983). Retina. In *Ophthalmologie* (pp. 152–153). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-642-69329-8_13
- Wenkel, H., Chen, P. W., Ksander, B. R., & Streilein, J. W. (1999). Immune privilege is extended, then withdrawn, from allogeneic tumor cell grafts placed in the subretinal space. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *40*(13), 3202–3208.
- Zarbin, M., Sugino, I., & Townes-Anderson, E. (2019). Concise Review: Update on Retinal Pigment Epithelium Transplantation for Age-Related Macular Degeneration. *Stem Cells Translational Medicine*, *8*(5), 466–477. <https://doi.org/10.1002/sctm.18-0282>

10 Ehrenwörtliche Erklärung

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

Gießen, 10.07.2023

Unterschrift

11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen danken, die mich bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit unterstützt und begleitet haben.

Mein besonderer Dank gilt meinen Doktorvater Prof. Dr. Dr. Knut Stieger und meiner Betreuerin Dr. Brigitte Müller für die hervorragende und überaus freundliche Betreuung sowohl während der Forschungszeit und als auch während des Schreibprozesses.

Des weiteren danke ich allen Beteiligten, die im Rahmen dieses Forschungsprojektes am Zentrum für ophthalmologische Forschung des Universitätsklinikums Oslo, Norwegen und am Institut für Tierphysiologie und Genetik der tschechischen Akademie der Wissenschaften in Liběchov, Tschechien mitgewirkt haben und somit die dieser Dissertation zugrundeliegende Forschungsarbeit erst ermöglicht haben. Mein besonderer Dank gilt an dieser Stelle Prof. Dr. Goran Petrovski, PhD, Taras Ardan MD, PhD und Lyubomyr Lytvynchuk MD, PhD.

Außerdem möchte ich meinen Eltern und Großeltern, meiner kleinen Schwester und Freunden danken, die mich nicht nur während meiner Doktorarbeit sondern während des gesamten Studiums und sowieso schon immer mit ihren lieben Worten, offenen Ohren und immerwährender Unterstützung begleitet haben. Ich danke euch von Herzen.

12 Publikation

Lytvynchuk L, Ebbert A, Studenovska H, et al. Subretinal Implantation of Human Primary RPE Cells Cultured on Nanofibrous Membranes in Minipigs. 2022. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10030669>