

AUS DER KLINIK FÜR AUGENHEILKUNDE  
DER UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

DIREKTOR: PROF. DR. MED. GRISANTI

**Elektrophysiologische, histopathologische und  
immunhistochemische Untersuchungen  
der Effekte von LY-364947  
am Modell der isolierten und umströmten bovinen Netzhaut**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von

**Kristin Hösel**

aus Schwerin

Lübeck 2017

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. Lüke

2. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Samer Hakim

**Tag der mündlichen Prüfung: 8.11.2018**

**Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 8.11.2018**

**-Promotionskommission der Sektion Medizin-**

*„Alle Dinge sind Gift, und nichts ist ohne Gift;  
allein die Dosis machts, daß ein Ding kein Gift sei.“ - Paracelsus (Zeno).*

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	VII
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	VIII
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	IX
<b>1 Einleitung und Fragestellung</b> .....	1
1.1 Aufbau und Funktion der Retina.....	1
1.1.1 Aufbau der Retina.....	1
1.1.2 Photorezeptorzellen und Phototransduktion.....	2
1.2 Die proliferative Vitreoretinopathie.....	3
1.3 Pathophysiologie der PVR.....	5
1.4 Therapieansätze der PVR.....	7
1.5 LY-364947 zur Abwendung der PVR .....	8
1.5.1 In vivo Experimente .....	8
1.5.2 In vitro Experimente.....	9
1.5.3 Zusammenfassung .....	10
1.6 Das Elektroretinogramm (ERG) .....	10
1.6.1 Geschichte, Grundlage und Auswertung der Potentialschwankungen .....	11
1.6.2 Die b-Welle als Messparameter der Netzhautfunktion.....	12
1.7 Die Rolle der Caspasen im Prozess der Apoptose .....	13
1.8 Cleaved Caspase 3 als geeigneter Indikator für Apoptose.....	14
1.9 Fragestellung .....	15
<b>2 Material und Methodik</b> .....	16
2.1 Das Modell der isolierten und umströmten bovinen Netzhaut .....	16
2.1.1 Perfusionslösung.....	16
2.1.2 Präparation.....	17
2.1.3 Aufbau der Perfusionskammer .....	18
2.1.4 Reizquelle .....	18
2.2 Histopathologie und Indirekte Immunhistochemie.....	19

---

2.3 Durchführung.....	20
2.3.1 Versuchsanordnung .....	20
2.3.2 Versuchsprotokoll zur Wirkung von LY-364947 auf die b-Welle.....	23
2.3.3 Auswertung der ERGs und Darstellung der Versuchsergebnisse .....	23
2.3.4 Auswertung der histopathologischen und immunhistochemischen Untersuchungen .....	24
2.3.4.1 Auswertung der histopathologischen Untersuchung .....	24
2.3.4.2 Auswertung der immunhistochemischen Untersuchung .....	25
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>27</b>
3.1 Untersuchung der Wirkung von 20 $\mu$ M LY-364947 auf die b-Welle .....	27
3.2 Untersuchung der Wirkung von 50 $\mu$ M LY-364947 auf die b-Welle .....	27
3.3 Untersuchung der Wirkung von 100 $\mu$ M LY-364947 auf die b-Welle .....	28
3.4 Untersuchung der Wirkung der Perfusionslösung ohne Wirkstoffexposition auf die b-Welle.....	29
3.5 Ergebnisse der histopathologischen Auswertung .....	30
3.6 Ergebnisse der immunhistologischen Auswertung.....	30
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>34</b>
4.1 Zur Methodik der elektrophysiologischen Untersuchung am ERG Modell .....	34
4.2 Zur Methodik der histopathologischen und immunhistochemischen Untersuchung .....	36
4.3 Zum Wirkstoff LY-364947 und seiner Wirkungsweise .....	38
4.4 Interpretation der Versuchsergebnisse zur Wirkung von LY-364947 .....	39
<b>5 Zusammenfassung.....</b>	<b>42</b>
<b>Quellenverzeichnis .....</b>	<b>43</b>
<b>Anhang.....</b>	<b>49</b>
Anhang 1: Protokolle für die Herstellung der Lösungen und Proben.....	49
Protokoll für die Herstellung von 4 Liter Perfusionslösung .....	49
Protokoll für die Herstellung von 500 ml Fixierlösung nach Margo .....	49
Protokoll für die Einbettung in Paraffin.....	50
Protokoll für die Entparaffinierung.....	50

---

Protokoll für die HE-Färbung .....	50
Protokoll für die Vorbehandlung mit dem Natriumcitratpuffer .....	51
Protokoll für die phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) .....	51
Protokoll für 200 ml iFISH Blocking Buffer .....	51
Protokoll für die Eindeckung mit Mowiol .....	52
Anhang 2: Auflistung der verwendeten Materialien und Software .....	53
Anhang 3: Box-and-Whisker-Plots .....	57
<b>Danksagung</b> .....	<b>59</b>
<b>Lebenslauf</b> .....	<b>61</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ATP .....	Adenosintriphosphat
CAD .....	Caspase-activated DNase
CCaspase 3 .....	Cleaved Caspase 3
cGMP .....	cyclisches Guanosinmonophosphat
CNG .....	cyclic nucleotide-gated
coSMAD .....	common SMAD
DAPI .....	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DFF45 .....	DNA fragmentation factor 45
DMSO .....	Dimethylsulfoxid
EMT .....	Epitheliale Mesenchymale Transformation
ERG .....	Elektroretinogramm
GDP .....	Guanosindiphosphat
GTP .....	Guanosintriphosphat
HTF .....	Human Tenon`s Fibroblasts
IC50 .....	Mittlere Inhibitorische Konzentration
ICAD .....	Inhibitor of CAD
LAP .....	latency-associated peptide
LLC .....	large latent TGF- $\beta$ complex
LTBP .....	latent TGF- $\beta$ -binding-proteine
LY .....	LY-364947
PBS .....	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDE .....	Phosphodiesterase
PVR .....	Proliferative Vitreoretinopathie
ROS .....	reactive oxygen species
RPE .....	Retinales Pigmentepithel
RSMAD .....	receptor regulated SMAD
RT .....	Raumtemperatur
SD .....	Standardabweichung
TGF- $\beta$ .....	Transforming growth factor- $\beta$
TRD .....	Traktive Retinale Ablösung
$\alpha$ -SMA .....	Alpha Smooth Muscle Actin

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Schichten und Zellen der Retina.....	2
<b>Abbildung 2:</b> Fundusfoto einer PVR induzierten Netzhautablösung.....	4
<b>Abbildung 3:</b> TGF- $\beta$ in seiner Bedeutung für die PVR .....	6
<b>Abbildung 4:</b> Das ERG einer Katze nach einem Lichtreiz über 2 Sekunden. ....	11
<b>Abbildung 5:</b> Ragnar Granit.....	11
<b>Abbildung 6:</b> b-Welle.....	13
<b>Abbildung 7:</b> Funktionsweise der Caspasen. ....	14
<b>Abbildung 8:</b> Versuchsaufbau der ERG-Ableitung einer isolierten und umströmten Vertebratennetzhaut. ....	22
<b>Abbildung 9:</b> HE-Färbung eines Netzhautschnittes nach Exposition von 20 $\mu$ M LY-364947.....	25
<b>Abbildung 10:</b> Auswirkungen von 20 $\mu$ M LY-364947 auf die b-Wellenamplitude. ...	27
<b>Abbildung 11:</b> Auswirkungen von 50 $\mu$ M LY-364947 auf die b-Wellenamplitude ....	28
<b>Abbildung 12:</b> Auswirkungen von 100 $\mu$ M LY-364947 auf die b-Wellenamplitude. .	29
<b>Abbildung 13:</b> b-Wellenamplituden ohne Wirkstoffexposition.....	29
<b>Abbildung 14:</b> Beispielhafte Aufnahmen von Netzhäuten aus jeder Konzentrationsgruppe mit dem Fluoreszenzmikroskop. ....	31
<b>Abbildung 15:</b> Expression der CCaspase 3 in a.u. in drei Schichten der Retina. ....	32
<b>Abbildung 16:</b> Box-and-Whisker-Plots zur graphischen Darstellung der Messergebnisse aus der histopathologischen Analyse.....	57
<b>Abbildung 17:</b> Box-and-Whisker-Plots zur graphischen Darstellung der Messergebnisse aus der immunhistochemischen Analyse.....	57

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b>	Zusammengefasste Ergebnisse der statistischen Auswertung der histologischen Untersuchung.....	30
<b>Tabelle 2:</b>	Ergebnisse nach Analyse der Expression der CCaspase 3 in der Äußeren Körnerzellschicht.....	32
<b>Tabelle 3:</b>	Ergebnisse nach Analyse der Expression der CCaspase 3 in der Inneren Körnerzellschicht.....	32
<b>Tabelle 4:</b>	Ergebnisse nach Analyse der Expression der CCaspase 3 in den Zellkernen der Ganglienzellschicht.....	33

# 1 Einleitung und Fragestellung

## 1.1 Aufbau und Funktion der Retina

### 1.1.1 Aufbau der Retina

Die Retina (Netzhaut) ist ca. 200  $\mu\text{m}$  dick und kleidet den Augenhintergrund aller Wirbeltiere aus. Sie ist von grundlegender Bedeutung für das Aufnehmen und Verarbeiten von Lichtreizen.

Die Retina enthält die ersten drei Neurone der Sehbahn, welche nicht nur vertikal miteinander verbunden sind, sondern auch lateral über Interneurone (Horizontalzellen, amakrine Zellen). Außerdem kommen drei Arten von Gliazellen vor: die retinaspezifischen Müller-Zellen, Astrozyten und Mikroglia.

Mikroskopisch lassen sich die Schichten der Retina klar abgrenzen (Abbildung 1). Auf der lichtabgewandten Seite (auf der Choroidea) befindet sich das Stratum Pigmentosum, das Pigmentepithel, mit zahlreichen Melanosomen. Es ist unter anderem am Stoffaustausch mit den Photorezeptorzellen und an der Regeneration des Retinals beteiligt. Daran angrenzend liegen die Außensegmente der Photorezeptorzellen, also der Stäbchen und Zapfen. Sie stellen das erste Neuron der Sehbahn dar. Das Stratum Nucleare Externum (äußere Körnerschicht) wird von den Perikaryen der Photorezeptorzellen gebildet. In der nächsten Schicht, dem Stratum Plexiforme Externum, liegen die Synapsen zwischen dem ersten und zweiten Neuron (Bipolarzellen) und die Synapsen mit den Horizontalzellen. Daran schließt sich das Stratum Nucleare Internum an. Es enthält die Perikaryen der Bipolarzellen, Horizontalzellen, amakrine Zellen und der Müller-Zellen. Das Stratum Plexiforme Internum besteht aus den Synapsen zwischen dem zweiten und dritten Neuron und den Synapsen mit den Amakrinzellen. Daran gliedert sich die Ganglienzellschicht, welche die Perikaryen des dritten Neurons, also der Ganglienzellen, und der Müller-Zellen umfasst. Ihr folgt die Nervenfaserschicht aus den Axonen der Ganglienzellen. Diese Axone bilden den Nervus Opticus (II. Hirnnerv) und leiten Aktionspotentiale auf die weitere Sehbahn. Die lichtzugewandte Seite der Retina besteht aus den Endfüßchen der nach innen gerichteten Müller-Zellfortsätze und der Basallamina (Behrends et al., 2012; Lüllmann-Rauch and Paulsen, 2012).

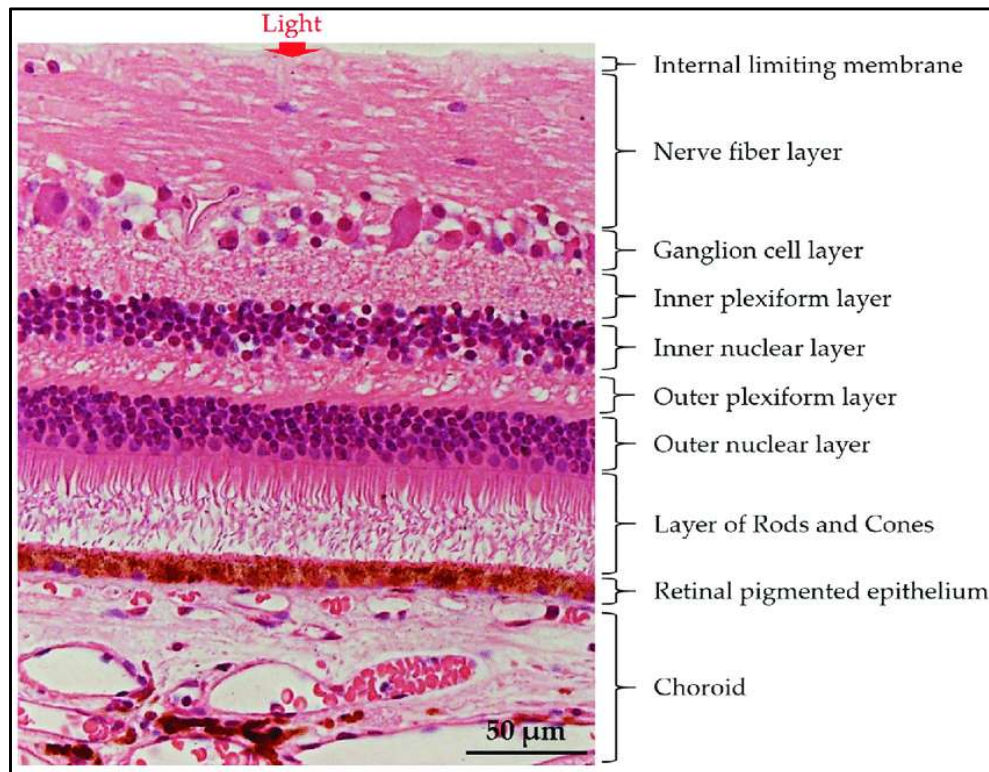


Abbildung 1: Schichten und Zellen der Retina (Lee Shirley Ding et al., 2017)

### 1.1.2 Photorezeptorzellen und Phototransduktion

Anhand der Duplizitätstheorie des Sehens kann man zwei Typen von Photorezeptoren bestimmen. Es gibt ca. sechs Mio. Zapfen, die für das photopische Sehen (Tagessehen) und das Farbsehen zuständig sind. Von den Zapfen unterscheidet man die ca. 120 Mio. Stäbchen, die für das skotopische Sehen (Dämmerungssehen und Nachtsehen) gebraucht werden. Die Photorezeptoren enthalten in ihren Außensegmenten Sehpigmente, die ihre chemischen Konfigurationen durch Lichteinfall verändern.

In der Scheibchenmembran der Stäbchen (sogenannte Disks) ist Rhodopsin eingelagert. Es ist aus dem Membranprotein Opsin und dem Aldehyd 11-cis-Retinal aufgebaut. Trifft ein Photon auf ein Rhodopsinmolekül, wird dieses aktiviert, in dem das 11-cis-Retinal in das all-trans-Retinal umgelagert wird. Über mehrere Zwischenstufen entsteht so das Metarhodopsin II, welches über den Austausch von GDP gegen GTP den Zerfall des Transducin in eine  $\alpha$ - und eine  $\beta$ - $\gamma$ -Untereinheit bewirkt. Die  $\alpha$ -Untereinheit bindet daraufhin an die cGMP-Phosphodiesterase (PDE) welche cGMP zu 5'GMP umwandelt. Im Dunkeln ist das cGMP an Kationen-Kanäle gebunden ist, welche den  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aufrechterhalten. Somit hat die Zelle, beruhend auf diesen konstanten „Dunkelstrom“, ein Ruhepotential von etwa -40 mV. Folglich bewirkt eine Konzentrationsminderung von cGMP eine Hyperpolarisation an der Zellmembran auf

ca. -70 mV. Dieses negative Photorezeptorpotential ist eine Besonderheit, da die meisten erregbaren Zellen mit einer Depolarisation auf einen adäquaten Reiz reagieren.

Auf die Hyperpolarisation reagiert die Zelle mit der Freisetzungshemmung des Transmitters Glutamat. Die erniedrigte Glutamatkonzentration bewirkt eine Potentialänderung im nachgeschalteten zweiten Neuron.

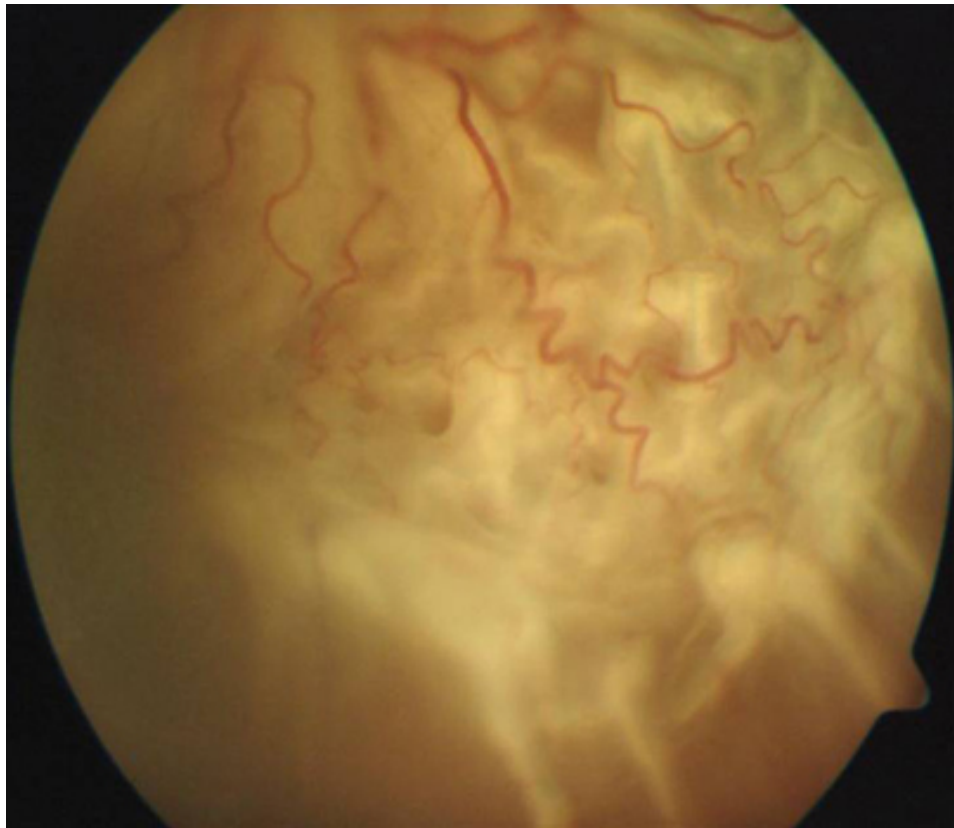
Zur Beendigung der Lichtreaktion gibt es mehrere Mechanismen: Zum einen wird Rhodopsin phosphoryliert. Damit steigt dessen Affinität für Arrestin, welches die Bindung von Transducin an Rhodopsin (MR II) unterbindet. Zum anderen wird das all-trans-Retinal ins Pigmentepithel transportiert und dort zu 11-cis-Retinal regeneriert, da es sonst nicht mehr aktiviert werden kann.

Desweiteren bewirkt die durch den Lichtreiz gesunkene  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration eine Aktivierung der Guanylatzyklase, also eine Synthese von cGMP. Dadurch wird die Offenwahrscheinlichkeit der cGMP-gesteuerten CNG-Kanäle erhöht und der Dunkelstrom wird wieder hergestellt (Behrends et al., 2012; Silbernagl, 2012).

## 1.2 Die proliferative Vitreoretinopathie

Die proliferative Vitreoretinopathie (PVR) ist eine Komplikation, bei der es durch gesteigerte Heilungsprozesse zur Ausbildung epi- und subretinaler Stränge und Membranen kommt. Dies führt schließlich zu Kontraktionen, Lochbildung und Netzhautablösung. Die PVR kann idiopathisch vorkommen, aber auch im Zusammenhang mit Risikoerkrankungen, wie Diabetes mellitus (diabetische PVR), Traumen, Netzhautrisse/-löcher, Amotio retinae, Retinopathia praematurorum, Venenverschlüsse, etc. stehen (Burk and Burk, 2014; Grehn, 2011).

Sie tritt in 5 bis 10 % als Komplikation der primären operativen Therapie rhegmatogener Netzhautablösungen auf und ist damit der häufigste Grund für den Misserfolg der Therapie (Asaria and Charteris, 2006).



**Abbildung 2:** Fundusfoto einer PVR induzierten Netzhautablösung (Gamulescu et al., 2009).

Metaplasiierte RPE-Zellen formen epiretinale Membranen mit traktiver Netzhautablösung (Gamulescu et al., 2009).

Die PVR kann sich an verschiedenen Lokalisationen des hinteren Augenabschnittes befinden und unterschiedlich ausgeprägt sein. Der Prozess wird dabei in Grad A bis C eingeteilt, wobei Grad A Pigmentkonglomerate in der Glaskörpermatrix oder auf der inferioren Netzhautoberfläche beschreibt. Grad A ist das erste Anzeichen einer intraokulären Proliferation. In Grad B zeigen sich Fältelungen der inneren Netzhautoberfläche, Netzhautrisse mit eingedellten Rändern, Tortuositas der retinalen Gefäße und verminderte Glaskörpermobilität. Grad C beschreibt die deutliche Manifestation einer fortgeschrittenen PVR mit rigiden Netzhautfalten, kondensiertem Glaskörper und Strangbildung.

Die Proliferationen können sich zwischen Netzhaut und Glaskörperbasis, also vor dem Äquator (anteriore PVR), oder hinter dem Äquator befinden (posteriore PVR). Die anteriore PVR tritt eher selten isoliert ohne posteriore PVR auf.

Ein Übergang von Grad A in Grad B und schließlich Grad C ist ohne Therapie häufig, aber nicht zwingend. Im Endstadium der Erkrankung kann es zum Verlust des Sehvermögens, Rubeosis iridis und Neovaskularisationsglaukom, persistierende Hypotonie und Phthisis bulbi kommen (Burk and Burk, 2014).

### 1.3 Pathophysiologie der PVR

Ursächlich für die Ausbildung einer PVR ist ein Defekt der Netzhaut, durch welchen Zellen des retinalen Pigmentepithels (RPE) in den Glaskörperraum verschleppt werden. Dadurch werden Müller-Gliazellen aktiviert, welche proliferieren, Metalloproteasen freisetzen und in den Glaskörperraum wandern. Der durch den Netzhautdefekt implizierte Schaden der Blut-Retina-Schranke führt zur Freisetzung von Wachstumsfaktoren, Blutbestandteilen und Zytokinen in den Glaskörper (Tamiya et al., 2010).

Daraufhin wandern wiederum RPE-, Glia- und Entzündungszellen ein. Hier erfolgt die sogenannte epitheliale mesenchymale Transformation (EMT). Das heißt, dass RPE- und Müller-Zellen sich in myofibroblastenähnliche Zellen umformen, welche proliferieren, wandern und in Wechselwirkung mit der extrazellulären Matrix Membrane bilden können (Burk and Burk, 2014). Vielfach wurde die Parallelen zwischen der PVR und den allgemeinen Wundheilungsprozessen unterstrichen. Die PVR entwickelt sich in einer Abfolge von drei Phasen: Inflammation, zelluläre Proliferation und Umwandlung der Extrazellulärmatrix.

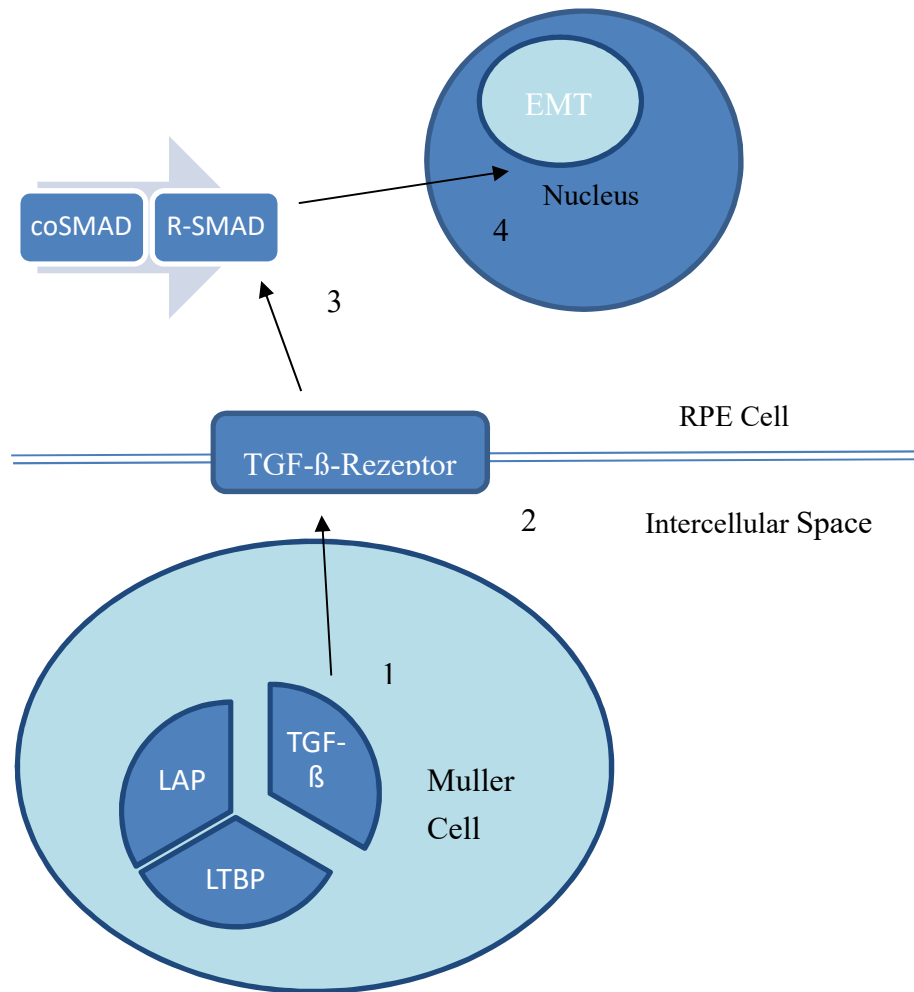
Die RPE- und Müller-Zellen spielen eine zentrale Rolle bei der Entstehung der PVR. Die pathogenetischen Kaskade der RPE-Zellen im Rahmen der PVR-Reaktion besteht aus der epithelialen mesenchymalen Transformation zu einem Fibrozyten-ähnlichen Phänotyp, der Proliferation und der gerichteten Migration der transformierten RPE-Zellen. Der Prozess der EMT wird durch verschiedene Zytokine, modifizierte Wachstumsfaktoren, den Verlust der normalen Matrixadhäsivität und einem veränderten Zell-Zell-Adhäsionsverhalten gesteuert. Die wichtigsten regulativ wirksamen Faktoren während der EMT sind neben verschiedenen Blutkomponenten wie Thrombin, Fibronectin, Plasmin, die durch den Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke Zutritt in den Glaskörper erlangen, verschiedene Wachstumsfaktoren wie Transforming Growth Faktor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), Platelet Derived Growth Faktor (PDGF), Monozyten Chemotactic Protein-1 (MCP-1), Basic Fibroblast Faktor (bFGF), Hepatocyte Growth Faktor (HGF), Connective Tissue Growth Faktor (CTGF), Epidermal Growth Faktor (EGF), Vascular Endothelial Growth Faktor (VEGF) und verschiedene Zytokine wie Il-6, Il-1beta, TNF-alpha und Interferon Gamma (INF-gamma).

Einer der wichtigsten Faktoren im Prozess der Ausbildung einer PVR ist der Transforming Growth Faktor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ). TGF- $\beta$  spielt bei Gewebskontraktionen im

Rahmen verschiedener fibröser Erkrankungen, inklusive der proliferativen Augenerkrankungen wie der proliferativen diabetischen Retinopathie und der PVR eine entscheidende Rolle (Spranger et al., 1999). Es wurde festgestellt, dass in den Glaskörpern der Augen von Patienten mit proliferativer diabetischer Retinopathie oder mit PVR vermehrt TGF- $\beta$  Rezeptoren exprimiert sind (Kita et al., 2008). Man kann davon ausgehen, dass TGF- $\beta$  Rezeptoren bei der Bildung subretinaler Stränge und Membranen eine wesentliche Bedeutung einnehmen (Winkler and Hoerauf, 2011). Dabei sind die Müller-Zellen und die RPE-Zellen Quelle des TGF- $\beta$ s in der humanen Retina (Jerdan et al., 1989).

TGF- $\beta$  liegt intrazellulär gebunden an das TGF- $\beta$  Propetid (latency associated peptide, (LAP)) und an ein TGF- $\beta$ -binding proteine (LTBP1-4) vor. Sie bilden den großen latenten TGF- $\beta$ -Komplex (large latent TGF- $\beta$  complex (LLC)) (Rifkin, 2005). Die Sekretion aus der Zelle erfolgt als LLC. Extrazellulär bildet LLC eine kovalente Bindung an die extrazelluläre Matrix (Annes, 2003). Bestimmte Proteasen, Integrine, pH-Werte oder Sauerstoffradikale (reactive oxygen species, ROS) können unter anderem zu einer Aktivierung des LLC führen (Barcellos-Hoff and Dix, 1996; Lyons, 1988; Munger et al., 1997; Wipff and Hinz, 2008). Im Rahmen der Aktivierung löst sich TGF- $\beta$  von seinem Propeptid (LAP) und kann an den TGF- $\beta$ -II Rezeptor binden (Rifkin, 2005). Der aktivierte TGF- $\beta$ -II Rezeptor phosphoryliert und aktiviert den TGF- $\beta$ -I Rezeptor, welcher wiederum receptor-regulated-SMADs (R-SMADs) phosphoryliert (Wrana et al., 1992). Phosphorylierte R-SMADs können im Komplex mit coSMADs (common-SMADs) in den Zellkern aufgenommen werden. Sie wirken als Transkriptionsfaktoren und verstärken Zell-Proliferation, Chemotaxis und Aktivierung von Immunzellen im Rahmen der EMT (Abbildung 3) (Massagué, 1998; Miyazono et al., 2000).

Mit TGF- $\beta$  behandelte RPE-Zellen differenzieren sich entlang des myofibroblastären Signalweges (Cleary et al., 1989). Zudem scheint der Transfer eines löslichen TGF- $\beta$ -II Rezeptors, der TGF- $\beta$  bindet, die Progression der experimentellen PVR zu unterdrücken (Oshima et al., 2002). Diese klinischen und experimentellen Studien weisen darauf hin, dass die Inhibition der TGF- $\beta$  Signalkaskade ein Ansatzpunkt bei der Prävention der Progression der PVR darstellen könnte.



**Abbildung 3:** TGF- $\beta$  in seiner Bedeutung für die PVR.

1 Die Müller-Zelle als Quelle des humanen TGF- $\beta$  in der humanen Retina. TGF- $\beta$  liegt zunächst im latenten Komplex gebunden an LTBP und LAP vor. Bestimmte Reize (Proteasen, Integrine, pH, ROS) lösen eine Aktivierung des Komplexes aus. TGF- $\beta$  löst sich aus dem Komplex.

2 TGF- $\beta$  bindet an den TGF- $\beta$  Rezeptor einer RPE-Zelle. Wirkort des TGF- $\beta$  Rezeptor-Blockers, LY-364947.

3 Der aktivierte Rezeptor mobilisiert einen receptor regulated-SMAD (R-SMAD), welcher wiederum im Komplex mit einem common-SMAD (coSMAD) in den Zellkern aufgenommen werden kann.

4 Einschaltung von Zell-Proliferation, Chemotaxis und Aktivierung von Immunzellen im Rahmen der EMT.

## 1.4 Therapieansätze der PVR

Ohne Therapie sind eine Progression der PVR und ein Übergang in eine Grad C PVR-Reaktion kaum aufzuhalten. Bei der momentanen Therapie der Wahl handelt es sich um einen vitreoretinalen Eingriff, ist aber nicht selten wenig erfolgreich (Burk and Burk, 2014).

Bei fortgeschrittenem PVR-Stadium sollte eine Vitrektomie erfolgen (Iandiev et al., 2010). Bei absehbarer PVR-Reaktion wird auch in früheren Stadien zur Vitrektomie

geraten. Meist erfolgt die Vitrektomie in Kombination mit zum Beispiel Retinotomie, Retinektomie, Endodrainage, Diathermie, Endolaser-Behandlung, Lensektomie, intraoperativem Einsatz von schweren Flüssigkeiten und intraokularer Tamponade mit Silikonöl.

Das Behandlungsziel stellt die Entfernung der aktivierten Zellen und Membranen und die komplette Ausräumung des Glaskörpers dar. Während der Operation wird auf die Aufhebung der periretinalen Traktion, die Wiederanlage der Netzhaut unter Aufrechterhaltung bestmöglicher Netzhaut- und Ziliarkörperfunktion bei geringstmöglicher iatrogener Komplikation gezielt (Burk and Burk<sup>1</sup>, 2014).

In bis zu 55 % der Fälle kommt es nach Erstoperation zu Reproliferationen, sodass Folgeoperationen nötig sind (Williams et al., 1996). Damit handelt es sich bei der PVR um eine in vielen Fällen operativ nur schwer kontrollierbare Erkrankung, weswegen neuere Studien auf eine Kombination mit verschiedenen anti-proliferativen Substanzen zielen.

In klinischen Studien wurden bereits einige Wirkstoffe mit einer Vitrektomie kombiniert. Jedoch hat man bisher keine zufrieden stellenden Erfolge verzeichnen können. Nach wie vor würde eine medikamentöse Therapie zur Prophylaxe einer PVR-Reaktion einen bedeutenden Schritt in der Behandlung der komplizierten Netzhautablösung darstellen (Nassar et al., 2014).

## **1.5 LY-364947 zur Abwendung der PVR**

LY-364947 (LY) ist ein selektiver Blocker des TGF- $\beta$ -I Rezeptors, welcher zentrale biologische Zellprozesse steuert. Dazu zählen beispielsweise Differenzierung, Apoptose, Migration, immunologische Vorgänge und die Bildung extrazellulärer Matrix (Massagué, 1998).

Im Rahmen der Studie von Nassar et al. konnte mithilfe von in vivo und in vitro Experimenten erstmals der antiproliferative Effekt von LY-364947 auf RPE-Zellen aufgezeigt werden (Nassar et al., 2014).

### **1.5.1 In vivo Experimente**

In einer in vivo Studie wurde in 30 Hasenaugen eine traumatische PVR-Reaktion ausgelöst. Die Augen bekamen verschiedenen Konzentrationen von LY-364947

intravitreal verabreicht, zum Teil mit zusätzlicher Vitrektomie. Es zeigte sich in der Kontrollgruppe (traumatische PVR-Reaktion ohne LY und ohne Vitrektomie) in 80 % eine ausgeprägte PVR mit traktiver retinaler Ablösung (TRD). Auch die isolierte Behandlung durch Vitrektomie bzw. durch die Trägersubstanz hatte keine positiven Auswirkungen. Die besten Resultate wurden mit der Behandlung von LY-364947 erzielt, wobei sowohl die PVR-Rate, als auch die Fibrosierung an sich signifikant reduziert werden konnte ( $p < 0,05$ ). Auch in Kombination mit einer Vitrektomie zeigte sich die Behandlung mit LY-364947 deutlich wirksam. TRD konnte in 93,3 % (14 von 15) unterbunden werden, wenn LY-364947 angewandt wurde.

Auch die histopathologische Untersuchung der Kontrollgruppe wies deutliche Proliferationsreaktionen im Sinne einer PVR mit traktiver Netzhautablösung auf. Dagegen konnte in allen LY-364947 Behandlungsgruppen eine signifikante PVR-Abwendung gezeigt werden. Es konnten mikroskopisch keine toxischen Auswirkungen der Substanz nachgewiesen werden (Nassar et al., 2014).

### 1.5.2 In vitro Experimente

Für die in vitro Experimente wurden menschliche Fibroblasten aus der Tenonkapsel (Human Tenon's Fibroblasts, HTF) isoliert und angezchtet.

In 96 Mikrotiterplatten wurden HTF zu  $5 \times 10^3$  Zellen/well ( $n=6$ ) angesetzt. Nach einer Wachstumszeit von 36 Stunden wurden die Zellen mit 0, 5, 20, 50 oder 100  $\mu\text{M}$  LY-364947 für 30 Minuten inkubiert. Ein 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) Test wurde durchgeführt und die mittlere inhibitorische Konzentration  $\text{IC}_{50}$  bestimmt. Die  $\text{IC}_{50}$  beträgt 20  $\mu\text{M}$  für LY-364947.

Desweiteren wurde ein 5-Brom-2-desoxyuridin (BrdU) Test durchgeführt und die Ergebnisse unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Es gab eine signifikante Reduktion an BrdU-positiven Zellen in mit LY-364947 inkubierten Kulturen. Eine lineare Tendenz war auszumachen.

Auch von nicht polarisierten Pigmentepithelzellen von isolierten Rinderaugen wurden Zellkulturen in einer Konzentration von  $1 \times 10^4$  Zellen/well angelegt. Die Kulturen wurden mit 0, 1, 5, 20 oder 50  $\mu\text{M}$  LY-364947 inkubiert (Nassar et al., 2014).

Nach vier Wochen konnten die Kulturen für die immunzytochemische Analyse am Fluoreszenzmikroskop mit  $\beta$ -Catenin- oder mit alpha smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA)-Antikörpern behandelt und angefärbt werden (Tura et al., 2007).

Es waren eine signifikante Reduktion an  $\alpha$ -SMA exprimierenden Zellen und eine merkliche Zunahme von  $\beta$ -Catenin Expression an den Zell-zu-Zell Kontakten nachweisbar. LY-364947 inhibierte signifikant die RPE-Transdifferenzierung zu Myofibroblasten (Nassar et al., 2014).

### 1.5.3 Zusammenfassung

In den in vitro Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass LY-364947 die Zellproliferation von Fibroblasten und die Transdifferenzierung der RPE- und Müller-Zellen verhindert. Diese Ergebnisse stimmen mit der in vivo Studie überein, welche zeigte, dass die Injektion von LY-364947 die Entstehung einer PVR und einer traktiven retinalen Ablösung verhindern kann.

Die Studie zeigt, dass LY-364947 als TGF- $\beta$  Rezeptor-Blocker zukünftig in der Prävention der PVR zum Einsatz kommen könnte. Sollten toxische Nebenwirkungen ausbleiben, stellt LY-364947 ein vielversprechendes Konzept in der Behandlung fibrosierender Pathologien dar (Nassar et al., 2014).

## 1.6 Das Elektroretinogramm (ERG)

Das Elektroretinogramm (ERG) wird heute vielfach als diagnostisches Hilfsmittel zur Erkennung von Netzhautdegenerationserkrankungen oder -dystrophien eingesetzt. Eine klassische Indikation zur Elektroretinographie stellt der Verdacht auf eine hereditäre degenerative Netzhauterkrankung, wie die Retinopathia pigmentosa dar, bei der schon frühzeitig skotopische und photopische Potentiale untergehen (Burk and Burk, 2014). Zusätzlich können auch die medikamentösen Nebenwirkungen der Netzhaut oder des Sehnervens kontrolliert und früh erkannt werden, wie beispielsweise bei einer Behandlung mit Chloroquin(-derivaten) oder Ethambutol (Behbehani et al., 2005; Karkanová et al., 2010).

Außerhalb des klinischen Einsatzes erhält das ERG auch in der Forschung Verwendung. Als Messinstrument der Netzhautfunktion eignet es sich vor allem für Untersuchungen degenerativer Prozesse, zur Analyse visueller Signalverarbeitung und zum Follow-up bei therapeutischen Eingriffen (Tanimoto et al., 2013).

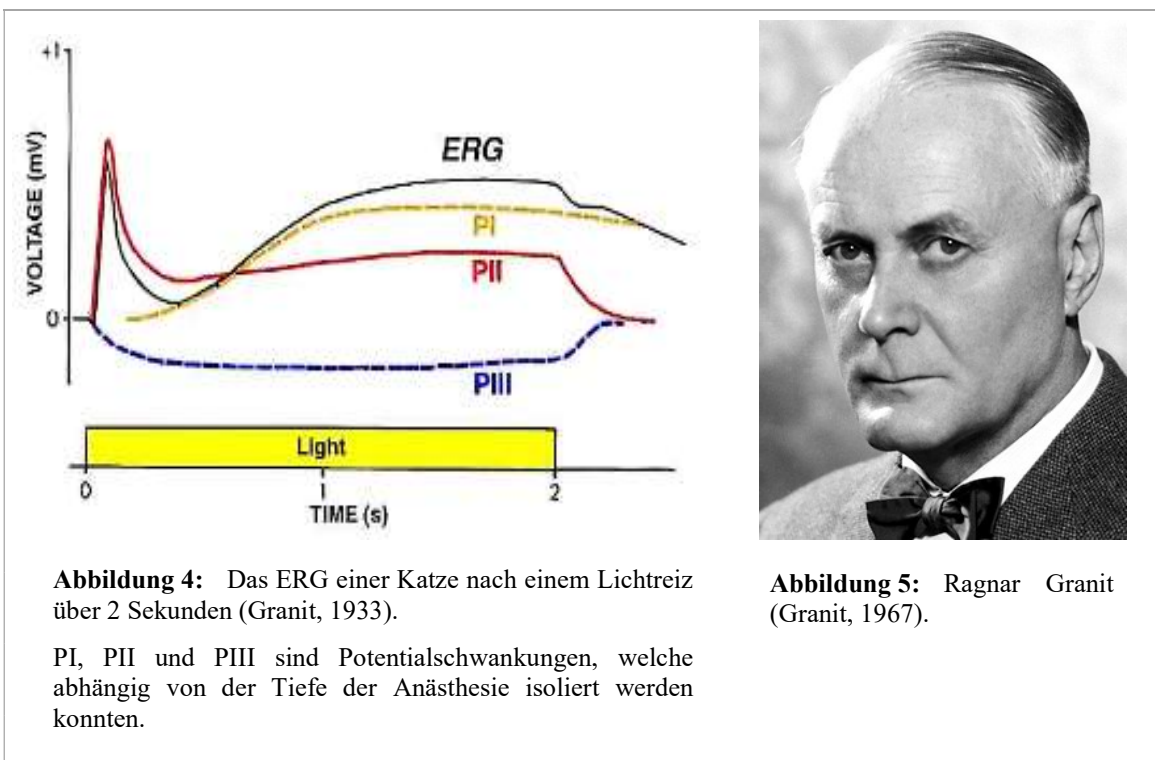
Elektroretinographische Untersuchungen am Modell der isolierten, umströmten bovinen Retina kommen insbesondere zur Untersuchung der potentiellen retinalen Toxizität von Substanzen zum Einsatz (Lüke et al., 2005).

### 1.6.1 Geschichte, Grundlage und Auswertung der Potentialschwankungen

Das erste Elektroretinogramm wurde 1865 von Holmgren abgeleitet. Er fand heraus, dass durch Lichtreizungen am enukleierten Froschauge Änderungen des Bestandpotentials auftraten (Holmgren, 1879).

Die Basis für wissenschaftliche Untersuchungen am ERG legte Ragnar Granit (Abbildung 5). Er fand über Studien an Frosch- und Katzenetzhäuten heraus, dass sich durch Suppression mit Äther oder durch Sauerstoffmangel drei verschiedene Potentialschwankungen ausmachen lassen (Granit, 1933). Er benannte sie nach ihrem zeitlichen Auftreten PI, PII und PIII (Abbildung 4).

Für seine Studien am ERG gewann Granit 1967 den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin.



**Abbildung 5:** Ragnar Granit (Granit, 1967).

Heute kann man bei einem Elektroretinogramm drei Wellenkomponente unterscheiden: die a-, b- und c-Welle.

Trifft ein Lichtreiz auf die Netzhaut, hyperpolarisieren die Photorezeptoren. Diese Summenpotentialschwankung ist als erster negativer Ausschlag im ERG zu

verzeichnen. Sie wird a-Welle genannt (Jamison et al., 2001; Kang Derwent and Linsenmeier, 2001).

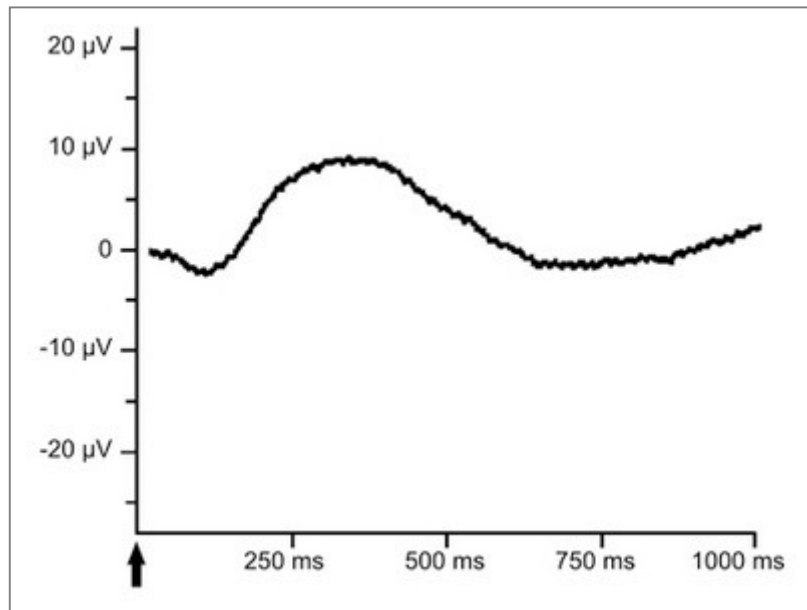
Die b-Welle wird durch die höheren neuronalen Verschaltungen der inneren retinalen Schichten ausgelöst (Hood and Birch, 1992). Daran haben laut gängiger Theorie sowohl die Müller- als auch die Bipolarzellen ihren Anteil (Xu and Karwoski, 1994).

Auf die b-Welle folgt mit zeitlicher Verzögerung eine erneute positive Potentialschwankung. Das Zustandekommen dieser c-Welle wird noch kontrovers diskutiert. Einer Theorie zufolge liegt der Ursprung der c-Welle in retinalen Stoffwechselprozessen (Sickel, 1966), wobei auch das retinale Pigmentepithel an sich ihren Teil an der Generierung der c-Welle beiträgt (Steinberg et al., 1983).

### **1.6.2 Die b-Welle als Messparameter der Netzhautfunktion**

Die b-Welle hat ihren Ursprung in der Potentialantwort des höheren neuronalen Netzwerkes der inneren Netzhautschichten (Hood and Birch, 1992). Vor allem die Müllerzellen und die On-Bipolarzellen haben einen großen Anteil an der Generierung der b-Welle (Tanimoto et al., 2015; Tian and Slaughter, 1995; Xu and Karwoski, 1994).

Sie tritt als positive Potentialschwankung mit leichter Latenz nach der a-Welle auf und wird vom ersten lokalen Minimum (a-Welle) bis zum ersten lokalen Maximum gemessen (Abbildung 6). Die b-Welle demaskiert sich im ERG am besten unter skotopischen Bedingungen und durch einen eher schwachen Lichtreiz. Unter dieser Voraussetzung werden nur wenige Photorezeptoren bei Lichtreiz aktiviert und es folgt eine umso intensivere Aktivierung des höheren neuronalen Netzwerkes. Somit ist die Größe der b-Wellenamplitude unter diesen optimalen Bedingungen am höchsten (Januschowski et al., 2014).



**Abbildung 6:** b-Welle (Januschowski et al., 2014).

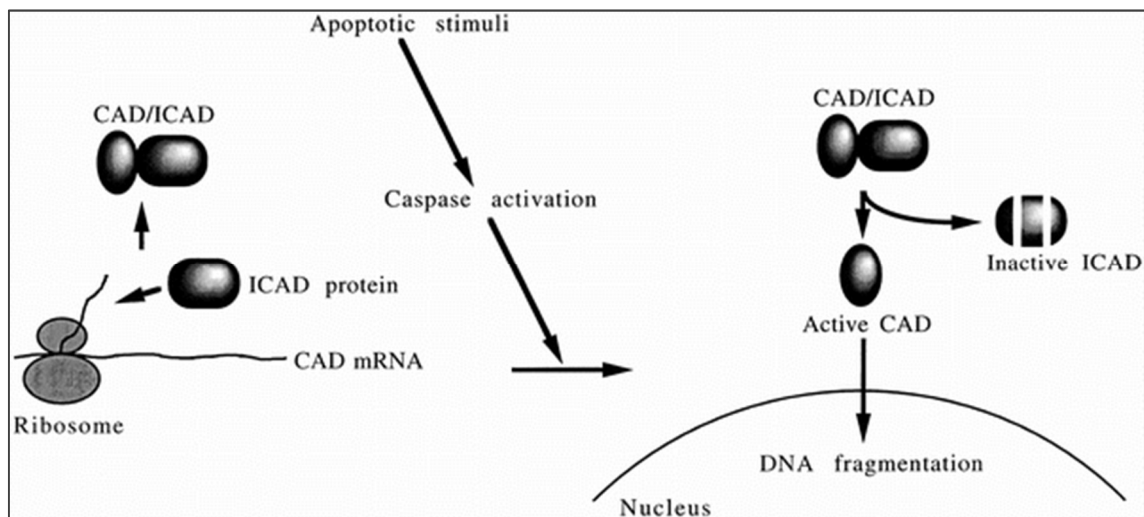
Der Pfeil kennzeichnet den Lichtreiz. Das Diagramm stellt die Summenantwort der Netzhautneurone im zeitlichen Verlauf dar. Das erste lokale Minimum entspricht der a-Welle, das lokale Maximum entspricht der b-Welle. Die skotopische Bedingungen sorgen für die Dominanz der b-Welle (Januschowski et al., 2014).

Die b-Welle im ERG eignet sich in Bezug auf das Beurteilen der zellulären oder funktionellen Eigenschaft der Netzhautschichten als aufschlussreicher und sensibler Indikator. Da sowohl eine Läsion der Photorezeptorzellen, als auch eine Schädigung des höheren neuronalen Netzwerkes Auswirkungen auf die b-Welle haben, ist sie als Funktionsparameter bei Wirkstoffexposition geeignet. Den genauen Wirkort der Substrate kann man mit einer separaten Analyse der a-Welle ermitteln (Januschowski, 2010).

## 1.7 Die Rolle der Caspasen im Prozess der Apoptose

Caspasen sind Cysteinproteasen, welche eine wichtige Rolle im Prozess des programmierten Zelltodes, der Apoptose, spielen. Sie besitzen einen reaktiven Cysteinrest, mit welchem spezifische Peptidbindungen von Aspartat gespalten werden können (cysteiny-l-aspartate specific protease) (Luttmann et al., 2008). Von den bisher identifizierten 14 menschlichen Caspasen unterscheidet man zwischen Initiatorcaspasen und Effektorcaspasen. Initiatorcaspasen haben eine lange Prodomäne und werden durch prä-apoptotische Stimuli aktiviert. Sie spalten die kürzere Prodomäne der Effektorcaspasen und rufen somit die Aktivierung zur Proteolyse verschiedener Zielproteine hervor (Kumar, 2007). Beispielsweise bauen sie das Kernprotein Lamin B

ab, welches eine wichtige Stützfunktion der Kernhülle besitzt (Murphy et al., 2008). Die Effektorcaspasen schneiden außerdem das Protein ICAD/DFF45 (inhibitor of caspase activated DNase oder DNA fragmentation factor 45). Dieses Protein hemmt CAD, eine Caspase-activated DNase. Eine Spaltung von ICAD durch Effektorcaspasen schaltet diese Inhibition aus, wodurch die Zell-DNA fragmentiert wird (Abbildung 7) (Danial and Korsmeyer, 2004).



**Abbildung 7:** Funktionsweise der Caspasen (Enari et al., 1998).

Eine Caspase-aktivierte-Desoxyribonuclease (CAD) bindet direkt nach seiner Synthese an seinen Inhibitor, ICAD. Durch prä-apoptische Stimuli (Apoptotic stimuli) werden Caspasen stimuliert, welche ICAD spalten (Inactive ICAD). Die somit aktivierte CAD (Active CAD) kann nun das Zytoplasma verlassen. In seiner aktivierten Form fungiert es als DNase und zerspaltert die Kern-DNA (DNA fragmentation) (Enari et al., 1998).

## 1.8 Cleaved Caspase 3 als geeigneter Indikator für Apoptose

Die Caspase 3 gehört zur Gruppe der Effektorcaspasen. Sie wird hauptsächlich durch die Initiatorcaspase 8 aktiviert. Unterliegt die Zelle prä-apoptischen Stimuli, welche durch verschiedene zelluläre Proteine, sogenannten death receptors (Fas-Rezeptoren, TRAIL-Rezeptoren, TNF-Rezeptoren), vermittelt werden, kommt es zu einer Aktivierung der Caspase 8 (Murphy et al., 2008). Über eine Spaltung der Prädomäne aktiviert sie die Caspase 3. Diese ist teilweise oder gänzlich für die proteolytische Spaltung vieler Zielproteine verantwortlich, wie beispielsweise die Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP). PARP ist ein DNA-Reparaturenzym. Seine Spaltung durch Caspase 3 bewirkt, dass Brüche in einzelsträngiger DNA nicht ohne homologe Rekombination behoben werden können (Tewari et al., 1995). Diese Kaskade ist ein wichtiger Schritt im Prozess des programmierten Zelltodes (Nicholson et al., 1995).

Der Active Caspase 3 Rabbit Monoclonal Antibody bindet nur an die aktive Form der Caspase 3. Aufgrund einer hohen Kreuzreaktivität mit den Caspasen 3 der meisten Säugetiere ist der Antikörper auch für bovines Gewebe gut einsetzbar. Der Nachweis von Caspase 3 über spezifische Antikörper, wie Anti-Cleaved Caspase 3 ist eine spezifische und sensitive Methode. Sie eignet sich vor allem für Gewebe in der Standardeinbettung mit Paraffin (Gown and Willingham, 2002).

## 1.9 Fragestellung

Eine vorausgegangene Studie konnte zeigen, dass mit dem TGF- $\beta$  Rezeptor-I-Blocker LY-364947 ein effektiver Wirkstoff in der Prophylaxe der Entstehung der proliferativen Vitreoretinopathie (PVR) gefunden wurde (Nassar et al., 2014). Der Einsatz von LY-364947 ist als intraoperative Injektion im Rahmen einer Vitrektomie denkbar um einer PVR-Reaktion vorzubeugen. Voraussetzung für die intraokulare Applikation ist ein Ausbleiben von toxischen Schäden auf die Netzhaut. Das Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, Toxizität von LY-364947 in einer therapeutischen Konzentration auszuschließen. Der Hintergrund der Arbeit ist die klinisch relevante Frage, ob und ab welcher Konzentration LY-364947 toxische Effekte auf die Netzhaut induziert. Die a priori formulierte Nullhypothese ( $H_0$ ) lautet „Es gibt in allen hier verwendeten Analysen keinen Unterschied zwischen den Retinas der Kontrollgruppe zu den mit verschiedenen Konzentrationen von LY-364947 umspülten Retinas.“

## **2 Material und Methodik**

Die Versuche fanden im Labor der Augenklinik der Universität zu Lübeck unter der Leitung von Prof. Dr. med. Matthias Lüke statt.

Detaillierte Beschreibungen der Protokolle für die Anfertigung der Lösungen und Präparate sowie die vollständige Auflistung der verwendeten Materialien mit den jeweiligen Herstellerangaben befinden sich im Anhang unter 7.1.1 bis 7.2.

Die statistische Auswertung erfolgte nach eingehender Beratung mit Herrn M. Sc. Markus Oliver Scheinhardt aus dem Institut für medizinische Biometrie und Statistik der Universität zu Lübeck.

### **2.1 Das Modell der isolierten und umströmten bovinen Netzhaut**

Als Grundlage für die Versuche an dem Modell der umströmten und isolierten Rindernetzhaut dienen die Arbeiten von Sickel und Lüke (Lüke et al., 2005; Sickel, 1961, 1966).

#### **2.1.1 Perfusionslösung**

Zur Lagerung und Umspülung der bovinen Netzhäute wurde eine Perfusionslösung hergestellt, welche 120 mM NaCl, 2 mM KCl, 0,1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,15 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 13,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 5 mM Glucose enthielt. Das detaillierte Protokoll für die Anfertigung der Perfusionslösung befindet sich im Anhang unter 7.1.1. Die einzelnen Konzentrationen beruhen auf den empirisch ermittelten Konzentrationen nach Sickel und Lüke und gewährleisteten eine möglichst lange Messbarkeit der retinalen Antworten im ERG (Lüke et al., 2005).

Der pH-Wert der Perfusionslösung war mit 7,8 etwas alkalischer als der Blut-pH-Wert. Auch die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration war niedriger als die Plasma-Ca<sup>2+</sup>-Konzentration. Um die sauren Metabolite, die durch den Stoffumsatz der Nervenzellen anfallen, abzupuffern, enthielt die Perfusionslösung ein Phosphatpuffersystem. Auch sollte eine konstante Umströmung der Netzhaut für eine schnelle Elimination der sauren Metabolite sorgen.

Für eine konstante Messbarkeit war es zudem erforderlich den Sauerstoffpartialdruck in der Perfusionslösung gegenüber der Raumluft sättigung zu erhöhen und konstant zu halten. Deshalb wurde die Perfusionslösung im Erlenmeyerkolben während des

gesamten Versuchs mit 100%igem Sauerstoff begast. Auch zur Lagerung der Netzhäute wurde die Lösung vorher 20 Minuten mit Sauerstoff gesättigt. Um eine bessere Verteilung des Sauerstoffes innerhalb der Lösung zu gewährleisten, war am Ende des Schlauches ein Aquarienstein befestigt.

### **2.1.2 Präparation**

Die Rinderaugen wurden freundlicherweise vom nächstgelegenen Schlachthof zur Verfügung gestellt. Die Rinder wurden per Bolzenschuss betäubt und durch einen Aderschnitt gestochen (getötet). Danach erfolgten unverzüglich die E nukleation und die Aufbewahrung der Augen in sauerstoffgesättigter Nährlösung in einem lichtundurchlässigen Gefäß.

Die Präparation konnte ca. 20-30 Minuten später im neurophysiologischen Labor der Augenklinik der Universität zu Lübeck erfolgen.

Das Labor war mit einer Rotlichtlampe ausgestattet, sodass die Präparation in abgedunkelten Verhältnissen und unter Rotlicht stattfinden konnte. Diese Bedingungen sind notwendig, da nur bei geringer Lichtintensität und bei eher langwelligem Licht das Sehpigment (Rhodopsin) nicht vollständig zerfällt.

Zuerst wurde das periorbitale Fettgewebe vom Augapfel abpräpariert. Dann wurde das Auge mit einem äquatorialen Schnitt ca. 5-10 mm vom limboskleralen Übergang eröffnet. Der vordere Augenabschnitt, die Linse und der Glaskörper konnten nun vorsichtig mit Pinzetten entfernt werden. Dabei war durch eine behutsame, rotierende Bewegung mit der Pinzette darauf zu achten, dass bei der Entnahme des Glaskörpers die Netzhaut unbeschädigt blieb. Der verbliebene hintere Augenabschnitt konnte in vier Quadranten geteilt werden. Mit einer Trepanationsstanze konnte aus jedem Quadranten eine kreisförmige Sklera-Choroidea-Retina-Stanze von 7 mm Durchmesser gewonnen werden. Am besten eigneten sich die Abschnitte, die noch keine Nervenfaseroedeme aufwiesen. Die Stanzen wurden in eine Laborschale mit oxidierter Perfusionslösung gelegt. Dort konnte durch behutsames Hin- und Herbewegen mithilfe einer Pinzette die Retina vom Pigmentepithel gelöst werden.

Da jeweils zwei Rinderaugen vorbereitet wurden, lagen am Ende der Präparation meist 4-8 Retinastanzen vor. Diese konnten in einem abgedichteten, lichtundurchlässigen Gefäß mit sauerstoffgesättigter Perfusionslösung bei 4-8 °C für ca. 24 Stunden aufbewahrt werden.

Zur Versuchsdurchführung wurde eine einzelne Stanze in die Perfusionskammer gespannt. Dazu überführte man eine Retinastanze auf ein Trägernetz. Dieses Trägernetz wurde von einem Kunststoffträger eingeschlossen, welchen man in eine Perfusionskammer legte und an das Perfusionssystem anschloss.

### **2.1.3 Aufbau der Perfusionskammer**

Der Kunststoffträger wurde in eine Perfusionskammer eingelegt. Diese Kammer bestand aus einer Deck- und einer Bodenplatte, in welche dünne Plexiglasscheiben eingelegt wurden. Um den Kunststoffträger abzudichten, befand sich in der Mitte beider Platten jeweils ein dichter Gummiring. Durch Zuschrauben konnte die Perfusionskammer somit luftdicht verschlossen werden.

Der Kunststoffträger wurde über einen Zufluss und einen Abfluss an das Perfusionssystem angeschlossen. Der Durchfluss durch die Perfusionskammer erfolgte über einen Überlauf, wobei vor dem Einsetzen in den Faradayschen Käfig darauf geachtet werden musste, dass sich keine Luftblasen im System befanden.

Der über die Lampe gesetzte Lichtreiz konnte die Plexiglasscheiben ungehindert passieren und die Photorezeptorzellen stimulieren. In den Kunststoffträger waren Silberdrahtelektroden eingelassen, welche die Reizantwort als Potentialschwankungen wahrnehmen konnten. Die Ableitungen wurden verstärkt und über einen USB-Wandler digitalisiert, sowie nachfolgend mit der Software DASyLab Professional Version 10.0.0 dargestellt.

### **2.1.4 Reizquelle**

Um eine adäquate Reizantwort zu erhalten wurde eine Glühlampe eingesetzt. Diese stimulierte die Netzhaut mit einem einzelnen Lichtreiz. Über entsprechende Filter konnte die Reizintensität auf 6,3 mlx festgelegt werden. Die Reizintensität wurde zu Beginn des Versuches empirisch bestimmt und sollte möglichst große und langanhaltende Potentialableitung generieren.

Die Lampe war an einen Zeitschalter gekoppelt, sodass genau einmal pro fünf Minuten ein Reiz gesetzt wurde.

Dies ermöglichte gut messbare und gleichförmige Ableitungen, die durch eine fehlende Adaption langfristig konstant blieben.

## 2.2 Histopathologie und Indirekte Immunhistochemie

Detaillierte Beschreibungen der Protokolle für die Anfertigung der histopathologischen und immunochemischen Präparate und die jeweiligen Herstellerangaben befinden sich im Anhang unter 7.1.1 bis 7.2.

Unmittelbar im Anschluss an die Auswaschphase wurden die Stanzen aus der Perfusionskammer gelöst. Die Präparate wurden in einer Lösung nach Margo (1 % Formaldehyd/1,25 % Gluteraldehyd) fixiert.

Dann wurden die Gewebestanden in aufsteigenden Iso-Propylalkohol-Lösungen entwässert und im Anschluss in Paraffin eingebettet.

Für die histopathologische Untersuchung wurden 4 µm Schnitte mit dem Senkrechtmikrotom angefertigt. Die Schnitte wurden mit Xylol und einer absteigenden Reihe Ethanollösungen entparaffiniert. Danach erfolgte die 7-10minütige Einfärbung mit Hämatoxylin nach Meyer. Nach einer Spülung mit destilliertem Wasser wurden die Schnitte für 30-60 Sekunden in Eosin gefärbt. Nach erneuter Wässerung und Behandlung mit Ethanol und Xylol konnten die Schnitte mit Entellan eingedeckt werden.

Die Präparate wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Dabei wurde pro Präparat an zwei unterschiedlichen Stellen die Gesamtdicke der Retina ohne Schicht der Stäbchen und Zapfen und die Breite von Ganglienzellschicht mit der Inneren Plexiformen Schicht ausgemessen. Beide Strecken wurden jeweils ins Verhältnis gesetzt (Ganglienzellschicht und Innere Plexiforme Schicht zur Gesamtdicke der Retina). Die Werte wurden mithilfe von Microsoft Office Excel 2013 statistisch ausgewertet, wobei eine signifikante Verschmälerung der Ganglienzellschicht und Inneren Plexiformen Schicht als Zeichen für einen toxischen Gewebeschaden interpretiert werden müsste (Kim et al., 2013).

Für das immunhistochemische Verfahren wurden 6 µm Schnitte unter dem Senkrechtmikrotom angefertigt. Es folgte die Entwässerung der Schnitte mit Xylol und einer absteigenden Reihe an Ethanollösungen. Danach wurden die Schnitte mit einem Natriumcitratpuffer aufbereitet, wobei eine 30minütige Hitzebehandlung in 10 mM Natriumcitrat, pH 6, erfolgte. Dies diente der Epitop-Demaskierung.

Es folgte die Waschung mit Aqua tridest. für 5 Minuten und mit einer 10fach verdünnten phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) (137 mM Natriumchlorid, 2,7 mM

Kaliumchlorid und 12 mM  $\text{HPO}_4^{2-}$  und  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) für 3x10 Minuten. Um eine unspezifische Antikörperbindung zu verhindern, wurden die Gewebeschnitte mit einem iFISH Blocking Buffer inkubiert, welcher 3 % bovines Serumalbumin (6 g) enthielt. Nach dem Lösen erfolgte die sterile Filtrierung mit einem 0,22  $\mu\text{m}$  Syringe Filter. Die Schnitte konnten nun mit dem Erstantikörper, Anti Rabbit Caspase, für 12-24 Stunden bei 4-8° C inkubiert werden. Das Verdünnungsverhältnis von Antikörper zu iFISH Buffer entsprach hierbei 1:100. Nach erneuter Waschung mit PBS erfolgte eine Inkubation mit dem konjugierten Zweitantikörper, Anti Rabbit IgG Cy 3. Das Verdünnungsverhältnis entsprach hier 1:200. Danach wurden die Präparate mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-Phenylindol gefärbt. Diese Gegenfärbung diente als Kontrast des Hintergrundgewebes und eignete sich besonders gut um die konjugierten Strukturen hervorzuheben. Nach einer erneuten Waschung konnten die Präparate mit Mowiol eingedeckt werden. Die Schnitte wurden unter lichtgeschützten Bedingungen und bei 4-8 °C aufbewahrt.

Um die Vergleichbarkeit zu wahren und eine Auswertung zu ermöglichen wurden die je sechs Proben pro LY-Konzentration alle parallel und in einem Durchgang angefertigt. Zu den 24 Schnitten wurde gleichzeitig noch eine Negativkontrolle zu der LY-Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  hergestellt.

Die Betrachtung und Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop fand innerhalb einer Woche nach der immunhistochemischen Färbung statt. Unter Zuhilfenahme der Software Leica Application Suite LAS Software wurden die histologischen Proben untersucht. Digitale Fotografien wurden mit einer DFC 290 kompatiblen Kamera aufgenommen.

## **2.3 Durchführung**

### **2.3.1 Versuchsanordnung**

Alle Versuche wurden unter exakt den gleichen und konstanten Voraussetzungen durchgeführt. Dazu mussten die Umgebungsbedingungen der Netzhäute, wie Sauerstoffpartialdruck, Temperatur und osmotischer Druck, stets konstant gehalten werden.

Der Kunststoffträger wurde mit der Netzhautstanze in die Perfusionskammer eingeschlossen und an das Perfusionssystem angeschlossen. Die Kammer und das

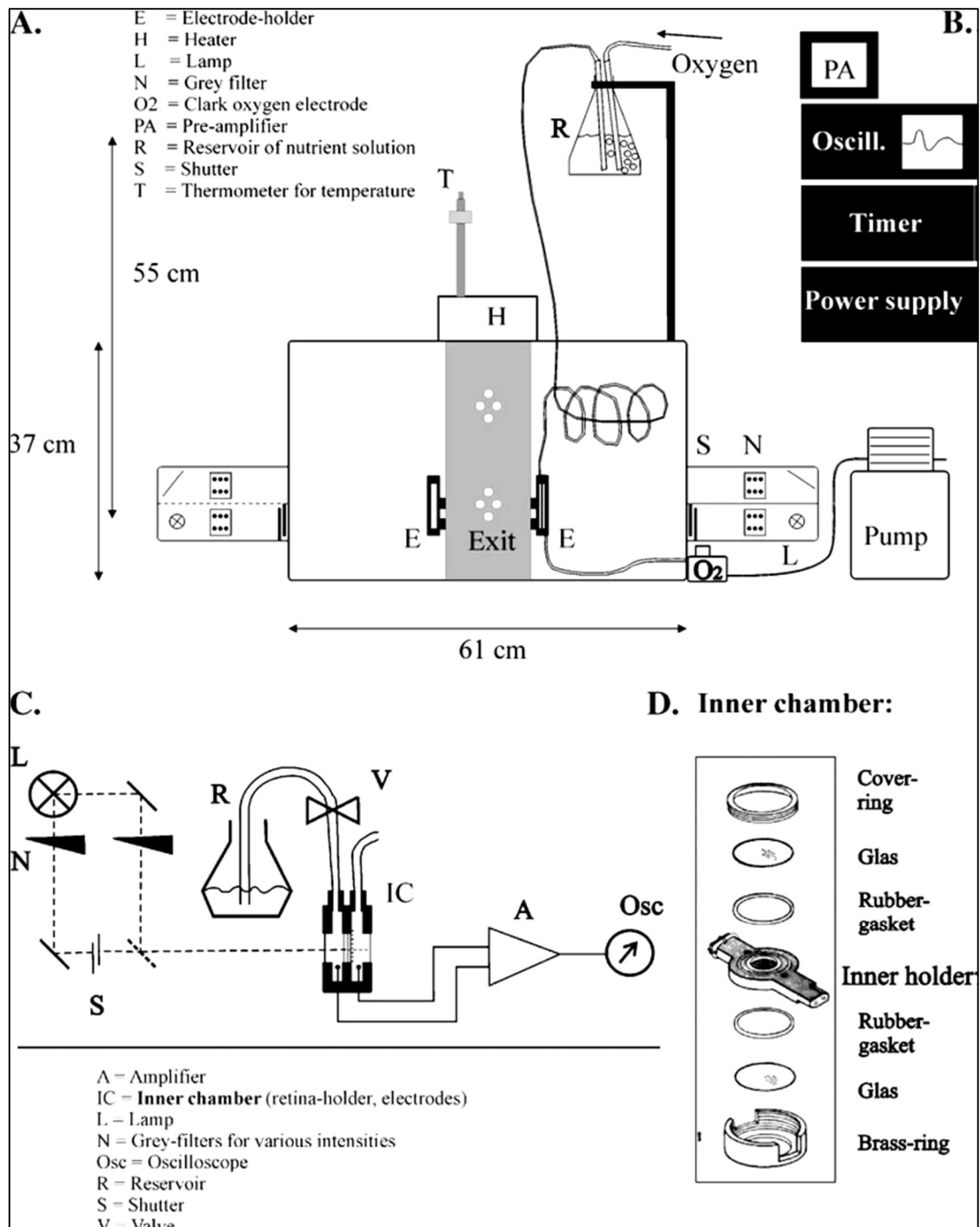
gesamte System wurden luftblasenfrei mit der Perfusionslösung gespült. Die Kammer wurde dann in einen von optischen und thermischen Reizen isolierten Messkasten eingesetzt. Der Abflussschlauch wurde zu Versuchsbeginn in eine Rollerpumpe gespannt. So konnte eine konstante Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min des Perfusionsystems gewährleistet werden. Diese Perfusionsgeschwindigkeit war nötig, um saure Metabolite abzuschwemmen, welche während des Stoffumsatzes entstanden. Eine Erhöhung der Perfusionsgeschwindigkeit wäre nicht angebracht gewesen, da dies mechanischen Stress für die Netzhaut bedeutet hätte. Die Perfusionslösung wurde nach dem Verlassen des Messkastens schließlich in ein Auffanggefäß geführt und konnte dann verworfen werden.

Durch Wärmeplatten, die in der Rückwand des Faradayschen Käfigs eingelassen waren, wurde die in dem Schlauchsystem befindliche Perfusionslösung auf 30 °C erwärmt. Diese Temperatureinstellung hat sich als optimal für einen konstanten und hohen Sauerstoffpartialdruck erwiesen und war geeignet um kontinuierliche ERG-Ableitungen zu erzeugen (Lüke et al., 2005).

Eine Zeituhr sorgte dafür, dass sich der Temperaturregler automatisch 4 Sekunden vor einem Lichtreiz ausschaltete um eine elektrische Störung der Ableitung durch das Heizen der Wärmeplatten zu vermeiden.

Im absolut lichtundurchlässigen Kasten befand sich eine Glühlampe, die an ein Regulationssystem angebunden war. So konnten die Netzhäute alle 5 Minuten mit einem Lichtreiz von 6,3 mlx und 500 ms Dauer gereizt werden.

Die elektrischen Reizantworten wurden mithilfe des Grass CP 511 Verstärker (100-Hz high-pass filter, 50-Hz notch filter, 100.000×amplification) in einem Frequenzbereich von 0,1 Hz und 300 Hz gefiltert und dann 50.000fach verstärkt. Danach wurden die Potentiale mit einem A/D Wandler prozessiert und konvertiert. Die Daten wurden auf einen Computer übertragen. Über die Software DASyLab Professional Version 10.0.0 konnten die gemessenen Werte aufgezeichnet, sichtbar gemacht und gespeichert werden. Die Abbildung 8 stellt die Versuchsanordnung schematisch dar.



**Abbildung 8:** Versuchsaufbau der ERG-Ableitung einer isolierten und umströmten Vertebratennetzhaut (Lüke et al., 2005).

Die vereinfachte Abbildung bezieht sich auf eine analoge Ableitungstechnik.

**A** schematische Darstellung des Versuchskastens bestehend aus dem Sammelbehälter für die Perfusionslösung (R) und der Heizvorrichtung (H) mit einer Temperaturregulierung (T). Die Elektrodenhalter (E) sind mit dem Verstärker und dem Oszilloskop verbunden, wie in **B** dargestellt. Der Kasten ist ein Faradayscher Käfig und elektrisch und optisch isoliert. Die Vorderwand lässt sich nach vorne aufklappen und öffnen. Die Lichtreize werden über eine Glühlampe (L) gegeben. Die Lichtintensität wird über Filter (N) bestimmt. Eine Blende (S) ist an den Zeitschalter angeschlossen und kontrolliert den Lichteinfall.

**B** Reiz- und Aufnahmeeinheit, bestehend aus dem Verstärker (PA), einer Software, welche das Oszilloskop (Oscill) substituiert, der Zeitschaltuhr und dem Thermostat. Desweiteren sorgt ein Netzanschluss (Power supply) für eine konstante Lichtintensität der Lampe während der gesamten

Versuche.

**C** Perfusionssystem mit ERG-Ableitung und ERG-Aufnahme.

**D** Aufbau der Perfusionskammer. Die küvettenartig aufgebaute Perfusionskammer ist über Gummi-Ringe (Rubber gasket) und Glasplättchen (Glas) abgedichtet. Im Inneren befindet sich der Kunststoffträger (Inner holder) mit einem feinen zentralen Gitter, auf welchem sich die Netzhautstanze befindet. Im Kunststoffträger befinden sich noch ein Zu- und ein Ablauf, sowie die Silberelektroden (Lüke et al., 2005).

Es wurde die Annahme vorausgesetzt, dass nach ca. einer Stunde unter Perfusion im Messkasten konstante ERGs abgeleitet werden konnten und, dass die Reizantworten der Netzhäute für mindestens zehn Stunden ohne wesentlichen Amplitudenverlust abgeleitet werden konnten (Lüke et al., 2005).

### **2.3.2 Versuchsprotokoll zur Wirkung von LY-364947 auf die b-Welle**

Die präparierte Netzhautstanze wurde in die Perfusionskammer gelegt und an das Perfusionssystem angeschlossen. Dann wurde die Kammer in den Messkasten gespannt.

Bei konstanter Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min und beständiger Temperatur von ca. 30 °C wurde alle 5 Minuten ein Lichtreiz von 6,3 mlx für 500 ms auf die Netzhaut appliziert.

Die Messung wurde erst begonnen, nachdem über mindestens 30 Minuten konstante b-Wellenamplituden aufgezeichnet wurden.

30 Minuten nach Beginn der Messung wurde die Netzhaut mit der jeweiligen LY-364947 Konzentration umspült. Nach einer Expositionsspanne von 45 Minuten wurde die Netzhaut über 75 Minuten mit Perfusionslösung ausgewaschen.

Direkt im Anschluss an die Versuche wurde die Netzhaut fixiert und gefärbt.

Es wurden für jede LY-364947 Konzentration (0 µM (Kontrolle), 20 µM, 50 µM, 100 µM) Versuche an 6 bovinen Netzhäuten durchgeführt.

### **2.3.3 Auswertung der ERGs und Darstellung der Versuchsergebnisse**

Die gemessenen Potentiale wurden zur Visualisierung auf die Einheit 1 mV verstärkt. Die Messung erfolgte vom tiefsten Punkt des ersten lokalen Minimums bis zum höchsten Punkt des ersten lokalen Maximums. Der erste Tiefpunkt entspricht der a-Welle, also der Reizantwort der Photorezeptorzellen. Das darauf folgende lokale Maximum stellt den höchsten Wert der b-Welle dar, also die Potentialänderung im Bereich des höheren neuronalen Netzwerkes der Netzhaut.

Die einzelnen Messwerte der jeweiligen Konzentrationen wurden gemittelt und gleichermaßen in einem Koordinatensystem gegen die Zeit (t in Minuten) festgehalten. Diese Mittelwertskurven erlaubten Rückschlüsse auf die Dosis-Wirkungs-Beziehung von LY-364947.

Zur Auswertung der Versuchsergebnisse während der Exposition wurden aus den Mittelwertskurven das lokale Minimum ( $E_{MIN}$ ) und das lokale Maximum ( $E_{MAX}$ ) bestimmt. Die prozentuale Minderung der Amplitudenhöhe unter Exposition wurde mit der Formel  $(1 - E_{MIN}/E_{MAX}) * 100$  errechnet.

Darüber hinaus wurde noch die prozentuale Minderung der Amplitudenhöhe der b-Welle am Ende der Auswaschphase bestimmt. Sie konnte mit der Formel  $(1 - A_{75}/N_0) * 100$  errechnet werden.  $N_0$  ist der letzte Messwert, der direkt vor Exposition aufgenommen wurde. Er stellt den Amplitudenwert dar, der als feststehende Größe unter Normalbedingungen zu betrachten ist.  $A_{75}$  ist der Messwert, der am Ende der Auswaschphase, das heißt 75 Minuten nach Exposition, festgestellt wurde.

Sowohl die Grafiken, als auch die Mittelwerte der Messwerte, die Signifikanzen und die Standardabweichungen konnten unter Zuhilfenahme der Datenverarbeitungssoftware Origin 6.0 berechnet werden.

Zur Bestimmung der Signifikanz wurde der gepaarte t-Test angewandt. Als Signifikanzniveau wurde  $\alpha \leq 0,05$  definiert.

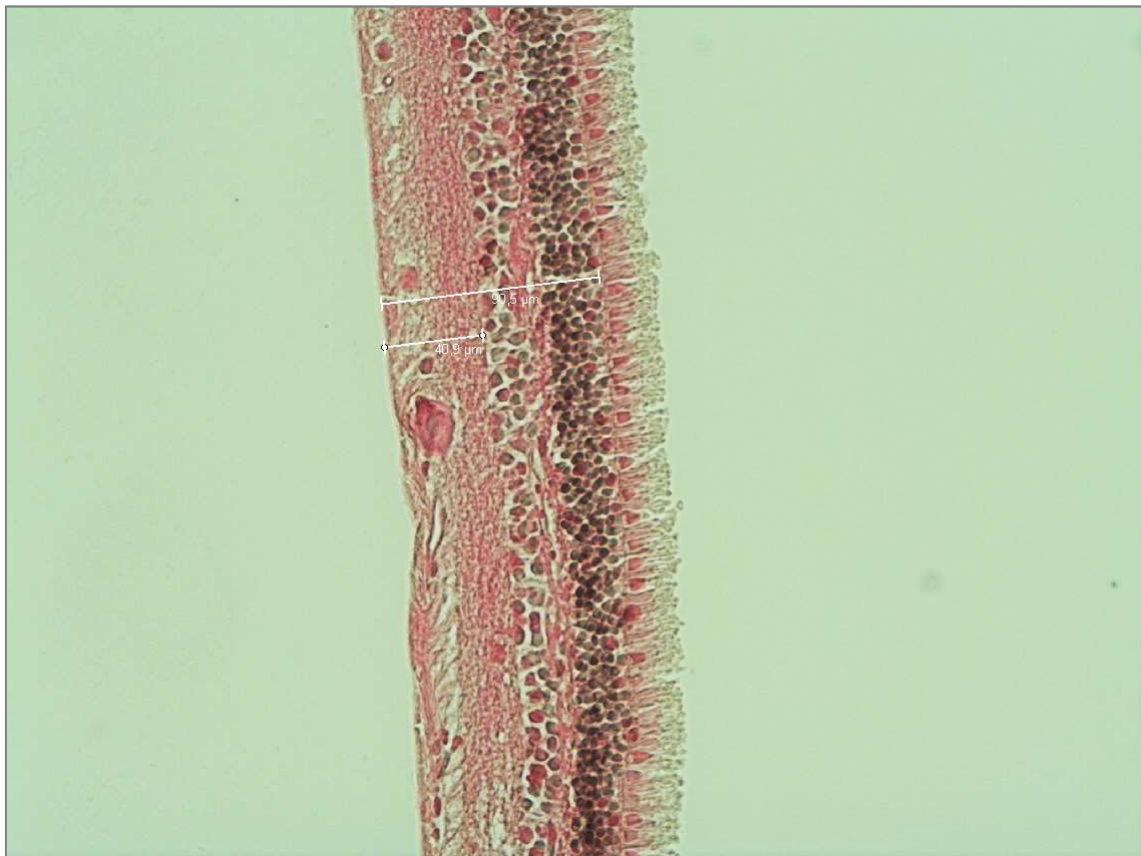
### **2.3.4 Auswertung der histopathologischen und immunhistochemischen Untersuchungen**

#### **2.3.4.1 Auswertung der histopathologischen Untersuchung**

Die gefärbten Netzhäute konnten nativ unter dem Fluoreszenzmikroskop Leica DMI 6000 B betrachtet werden. Dabei wurden die exponierten Netzhäute auf eine Verschmälerung der Ganglienzellschicht und der Inneren Plexiformen Schicht untersucht. Die Strecke von Membrana Limitans Interna bis zur Inneren Körnerzellschicht wurde ausgemessen und ins Verhältnis zur Gesamtdicke (ohne Schicht der Stäbchen und Zapfen, also bis zur Membrana Limitans Externa) gesetzt. Das Verhältnis dieser Strecken wird im Folgenden mit „Q“ abgekürzt. Ein beispielhaftes Bild eines Präparates findet sich unter Abbildung 9.

Es wurden bei jedem Präparat an zwei unterschiedlichen Stellen der Netzhaut die Verhältnisse (Q) ausgemessen, sodass bei einer Versuchszahl von  $n=6$  pro LY-Konzentration insgesamt 12 Werte pro LY-Konzentration vorlagen.

Die ausgemessenen Verhältnisse wurden mithilfe von Microsoft Office Excel 2013 statistisch ausgewertet. Zur Bestimmung der Signifikanz wurde der zweiseitige ungepaarte t-Test angewandt, wobei sich die Vergleichswerte der ersten Matrix auf die Kontrollgruppe bezogen. Die Normalverteilung der Daten wurde mithilfe Blockspots überprüft (Abbildung 16), sodass davon ausgegangen werden kann, dass der t-Test geeignet ist. Das Signifikanzniveau wurde gemäß dem globalen Signifikanzniveau bei  $\alpha \leq 0,05$  festgelegt.



**Abbildung 9:** HE-Färbung eines Netzhautschnittes nach Exposition von  $20 \mu\text{M}$  LY.

Ausgemessen wurden die Strecken Ganglienzellschicht und Innere Plexiforme Schicht ( $40,9 \mu\text{m}$ ) und Gesamtdicke ohne Stäbchen und Zapfen ( $90,5 \mu\text{m}$ ).

#### 2.3.4.2 Auswertung der immunhistochemischen Untersuchung

Die Betrachtung und Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop Leica DMI 6000 B mit einer Fluoreszenzkamera Leica DFC 350 FX erfolgte in einem abgedunkelten Raum. Die Mikroskopie und Auswertung konnten innerhalb einer Woche nach der IHC-Färbung erfolgen. Unter Zuhilfenahme der Leica Application Suit LAS Software

wurden die Proben analysiert und die Daten auf einen dafür eingerichteten Computer übertragen.

Pro Probe wurde ein Foto aufgenommen, in welchem alle Netzhautschichten über eine möglichst große Strecke gut erkennbar waren. Beispielhafte Aufnahmen der Netzhäute mit dem Fluoreszenzmikroskop werden in Abbildung 14 gezeigt. Über die Software konnten die Filter festgelegt werden, welche die optimale Bildqualität und möglichst geringes Bildrauschen darstellten. Über die Filter A4 und Y3 wurde die Expression der Cleaved Caspase 3 in der Äußeren Körnerzellschicht, Inneren Körnerzellschicht und in den Ganglienzellkernen der Ganglienzellschicht gemessen. Dafür wurde die Äußere und Innere Körnerzellschicht jeweils über eine möglichst große Fläche markiert und die jeweilige durchschnittliche Farbintensität in Graustufen pro  $\mu\text{m}^2$  aufgenommen. Für die Intensitätsmessung der Ganglienzellkerne wurden pro Probe fünf einzelne Zellkerne markiert und lokal die durchschnittliche Farbintensität aufgenommen. Die Werte der fünf Zellkerne der Ganglienzellen wurden für jedes Präparat gemittelt.

Es konnte für jeden Versuch aus dem ERG-Experiment ein Schnitt eingefärbt und untersucht werden, sodass pro LY-Konzentration (0  $\mu\text{M}$  (Kontrolle), 20  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ ) sechs verwertbare Netzhautproben zur Verfügung standen ( $n=6$ ).

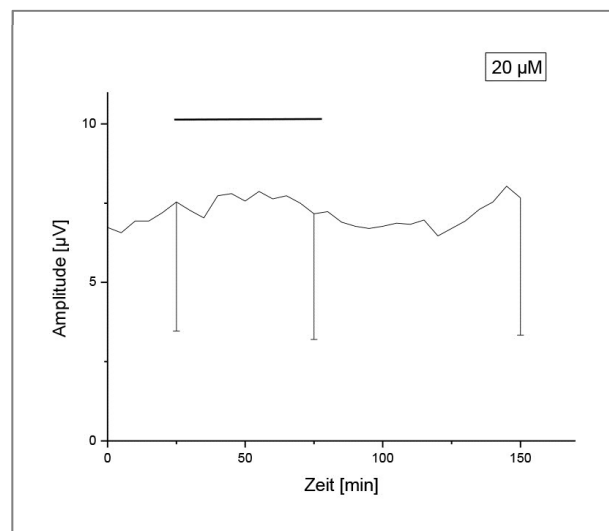
Die Werte mit der beliebigen Einheit arbitrary unit (a.u.) wurden in eine Exceltabelle übertragen und statistisch ausgewertet. Die Einheit arbitrary unit (a.u.) wurde als Standardeinheit festgelegt und gilt für das oben genannte Fluoreszenzmikroskop mit der Software Leica Application Suit LAS. Sie entspricht im Versuch der durchschnittlichen Farbintensität (Graustufen) pro  $\mu\text{m}^2$  Fläche.

Zur Bestimmung der Signifikanz wurde der zweiseitige ungepaarte t-Test angewandt. Die Normalverteilung der Daten wurde mithilfe Blockspots überprüft (Abbildung 17), sodass davon ausgegangen werden kann, dass der t-Test geeignet ist. Das lokale Signifikanzniveau wurde nach der Bonferroni-Methode adjustiert ( $\alpha=0,05/3$ ) und bei  $\alpha \leq 0,0167$  festgelegt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Untersuchung der Wirkung von 20 $\mu\text{M}$ LY-364947 auf die b-Welle

Sechs bovinen Netzhäuten wurden während der Expositionszeit einer Perfusionslösung mit 20  $\mu\text{M}$  LY-364947 ausgesetzt ( $n=6$ ). Das entspricht einer Konzentration von 20  $\mu\text{g/ml}$ . Während der gesamten Versuchszeit war keine signifikante Reduktion der b-Wellenamplitude feststellbar. Der Wert am Ende der Auswaschzeit war im Vergleich zum Ausgangswert nicht signifikant erniedrigt ( $p=0,345$ ). Das lokale Minimum fand sich nach 120 Minuten und war ebenfalls nicht bedeutend unterschiedlich zum lokalen Maximum ( $p=0,547$ ).

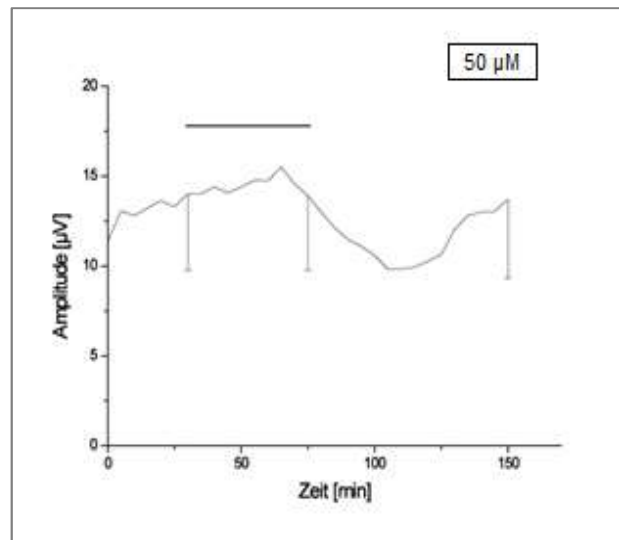


**Abbildung 10:** Auswirkungen von 20  $\mu\text{M}$  LY-364947 auf die b-Wellenamplitude.

Der Graph beschreibt die Mittelwerte der Versuchsreihen ( $n=6$ ). Die horizontale Markierung zeigt den Expositionszeitraum an. Eine einseitige Standardabweichung ist eingezeichnet.

#### 3.2 Untersuchung der Wirkung von 50 $\mu\text{M}$ LY-364947 auf die b-Welle

Die Abbildung 11 stellt die Mittelwertskurve aus den Versuchen unter Exposition von 50  $\mu\text{M}$  LY-364947 dar ( $n=6$ ). Das lokale Minimum der Mittelwerte der b-Welle fand sich nach 105 Minuten und war im Vergleich zum lokalen Maximum signifikant reduziert (36,77 %,  $p=0,007$ ). Am Ende der Auswaschzeit war die b-Welle jedoch nicht mehr bedeutend unterschiedlich zu den Ausgangswerten (5,7 %,  $p=0,880$ ).

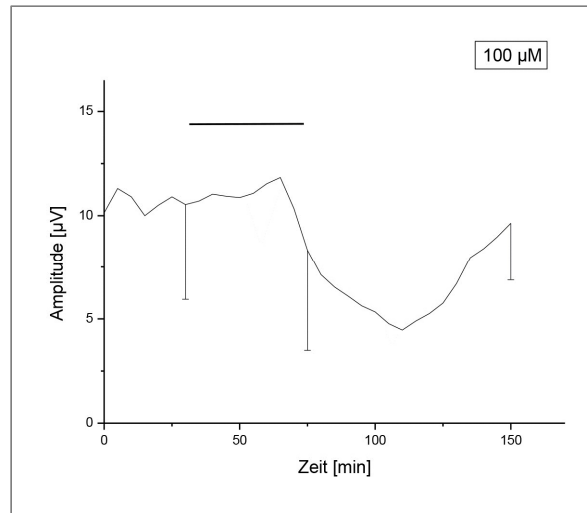


**Abbildung 11:** Auswirkungen von 50 µM LY-364947 auf die b-Wellenamplitude.

Der Graph beschreibt die Mittelwerte der Versuchsreihen (n=6). Die horizontale Markierung zeigt den Expositionszeitraum an. Eine einseitige Standardabweichung ist eingezeichnet.

### 3.3 Untersuchung der Wirkung von 100 µM LY-364947 auf die b-Welle

Bei der Testung der Wirkung von 100 µM LY-364947 auf die Netzhäute wurde eine signifikante Reduktion der b-Welle festgestellt (n=6). Das lokale Minimum der Mittelwerte befand sich bei 110 Minuten. Die b-Wellen waren hier signifikant erniedrigt im Vergleich zum lokalen Maximum (62,3 %, p=0,002). Jedoch konnte nach der Auswaschzeit das Anfangsniveau wieder erreicht werden, sodass sich die b-Wellen nach der Auswaschphase nicht mehr bedeutend von den Ausgangswerten unterschieden. (p=0,613). Die Abbildung 12 zeigt die Versuchsergebnisse für 100 µM LY-364947.

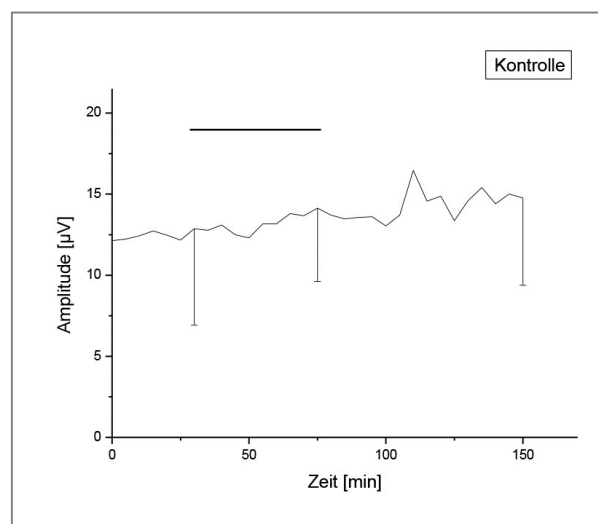


**Abbildung 12:** Auswirkungen von 100 µM LY-364947 auf die b-Wellenamplitude.

Der Graph beschreibt die Mittelwerte der Versuchsreihen (n=6). Die horizontale Markierung zeigt den Expositionszeitraum an. Eine einseitige Standardabweichung ist eingezeichnet.

### 3.4 Untersuchung der Wirkung der Perfusionslösung ohne Wirkstoffexposition auf die b-Welle

Zur Beurteilung der Perfusionslösung wurden an sechs Netzhäuten über 150 Minuten ERGs ohne Wirkstoffexposition abgeleitet (n=6). Es wurden während der gesamten Zeit keine signifikanten Auswirkungen auf die b-Welle festgestellt.



**Abbildung 13:** b-Wellenamplituden ohne Wirkstoffexposition.

Der Graph beschreibt die Mittelwerte der Versuchsreihen (n=6). Die horizontale Markierung würde den Expositionszeitraum anzeigen. Eine einseitige Standardabweichung ist eingezeichnet.

### 3.5 Ergebnisse der histopathologischen Auswertung

Die Verhältnisse von Ganglienzellschicht und Innerer Plexiformen Schicht zur Gesamtdicke der Retina (Q) wurden in den einzelnen Konzentrationsgruppen von LY-364947 mit den Verhältnissen der Kontrollgruppen verglichen. In den Konzentrationsgruppen 20  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  und Kontrollgruppe wurden jeweils sechs Netzhautpräparate untersucht (n=6). Da ein Netzhautpräparat aus der Gruppe der 100  $\mu\text{M}$  Konzentration bei der Färbung beschädigt wurde, lagen für diese Gruppe nur fünf Präparate, also 10 Messwerte vor (n=5).

Es konnte im Rahmen der histopathologischen Auswertung keine signifikanten Minderungen der Ganglienzellschicht und Inneren Plexiformen Schicht festgestellt werden. Die einzelnen Mittelwerte des Verhältnisses Q, die Standardabweichungen (SD), die p-Werte aus dem zweiseitigen ungepaarten t-Test, sowie die 95 % Konfidenzintervalle können für jede Konzentrationsgruppe der Tabelle 1 entnommen werden.

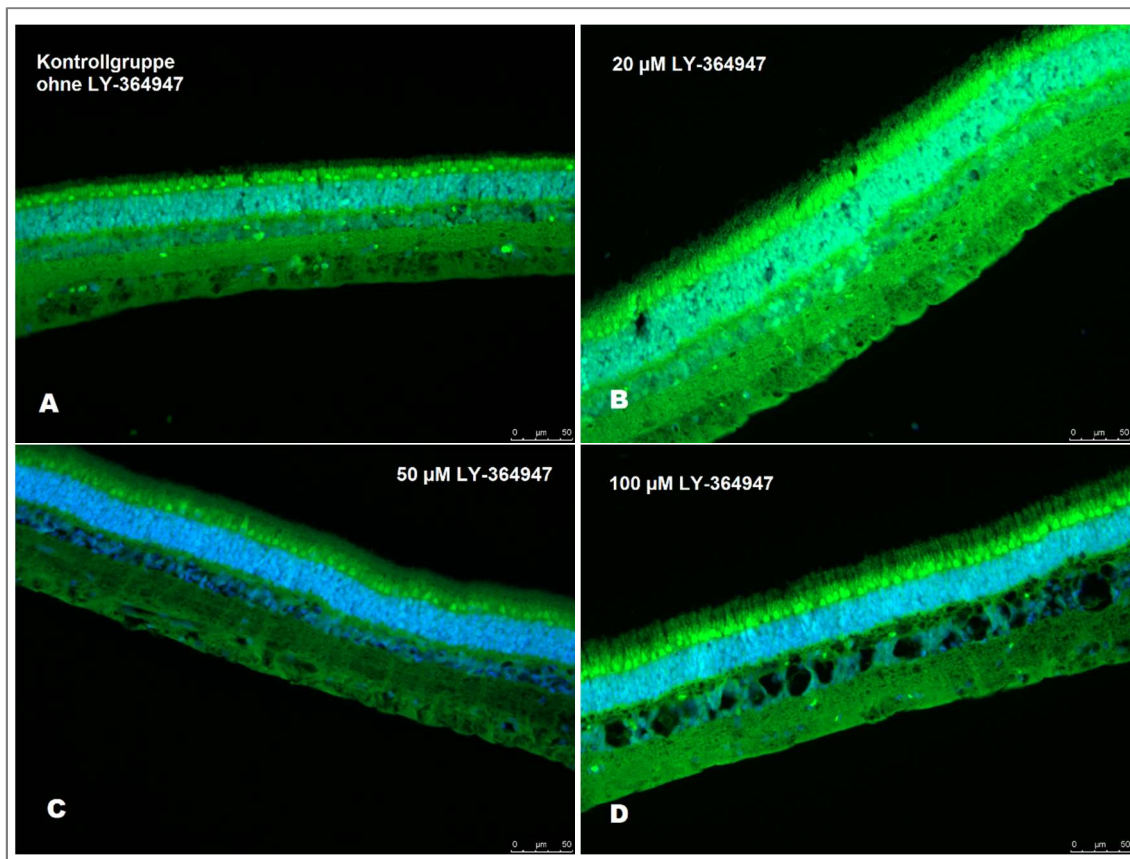
	<b>Kontrollgruppe (SD) n=6</b>	<b>20 <math>\mu\text{M}</math> LY- 364947 (SD) n=6</b>	<b>50 <math>\mu\text{M}</math> LY- 364947 (SD) n=6</b>	<b>100 <math>\mu\text{M}</math> LY- 364947 (SD) n=5</b>
Mittelwerte Q	0,521 (0,04)	0,510 (0,05)	0,507 (0,05)	0,542 (0,10)
p-Wert		0,791	0,674	0,444
95 % Konfidenzintervall	0,498; 0,54	0,481; 0,539	0,482; 0,533	0,477; 0,607

**Tabelle 1:** Zusammengefasste Ergebnisse der statistischen Auswertung der histologischen Untersuchung.

Frage nach der Signifikanz der Minderung von Ganglienzellschicht und Inneren Plexiformen Schicht nach Applikation verschiedener Konzentrationen von LY-364947. Signifikanzniveau von  $\alpha \leq 0,05$ .

### 3.6 Ergebnisse der immunhistologischen Auswertung

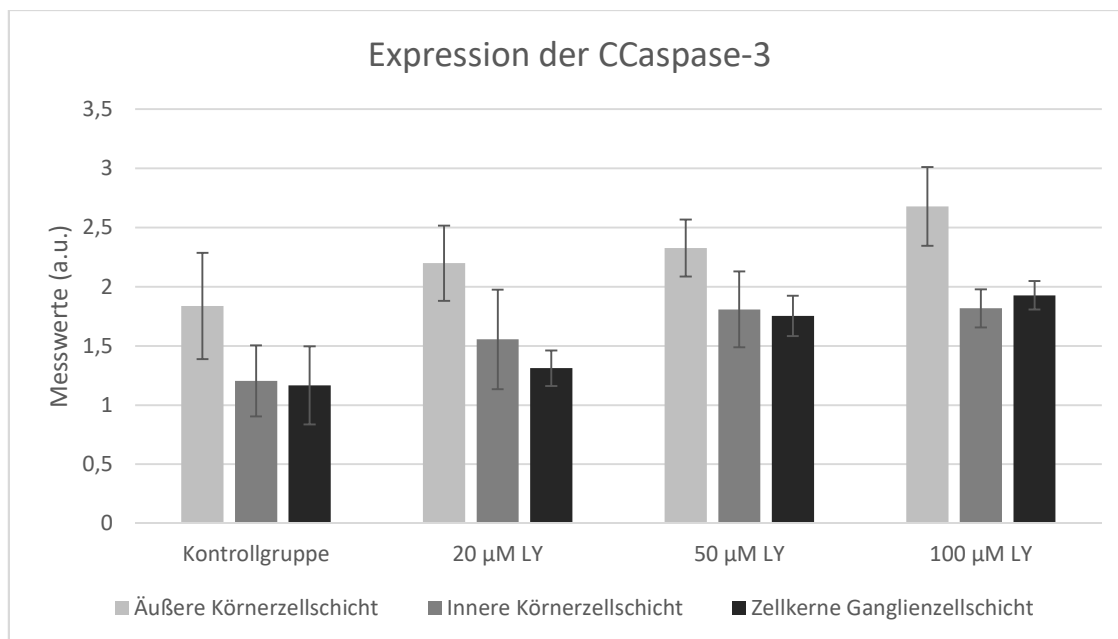
Im Rahmen der immunhistologischen Untersuchung wurde die Expression der Cleaved Caspase 3 (CCaspase3) in der Äußeren Körnerzellschicht, Inneren Körnerzellschicht und in fünf Zellkernen der Ganglienzellen in der Ganglienzellschicht gemessen. Es konnte für jeden Versuch aus der ERG Studie ein Schnitt eingefärbt und untersucht werden, sodass pro LY-Konzentration (0  $\mu\text{M}$  (Kontrolle), 20  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ ) sechs verwertbare Netzhautproben zur Verfügung standen (n=6).



**Abbildung 14:** Beispielhafte Aufnahmen von Netzhäuten aus jeder Konzentrationsgruppe mit dem Fluoreszenzmikroskop.

Der konjugierte Zweitantikörper stellt sich hier in blau dar. Gegenfärbung mit DAPI in grün.

Die Netzhäute, welche mit 20  $\mu\text{M}$  LY-364947 behandelt waren, zeigten in keiner der drei Schichten eine signifikant verstärkte Expression der CCaspase 3. Bei Netzhäuten, welche einer Applikation von 50  $\mu\text{M}$  LY-364947 ausgesetzt waren, konnte eine signifikant erhöhte Expression der CCaspase 3 in der Inneren Körnerzellschicht und in den Ganglienzellkernen der Ganglienzellschicht gemessen werden. Die Netzhäute, welche einer Exposition von 100  $\mu\text{M}$  LY-364947 ausgesetzt waren, hatten signifikant erhöhte Messwerte in allen drei betrachteten Netzhautschichten. Das Diagramm (Abbildung 15) stellt die Ergebnisse grafisch dar. Die Zunahme der CCaspase 3 mit steigender Konzentration des applizierten LY-364947 ist in allen Netzhautschichten auszumachen.



**Abbildung 15:** Expression der CCaspase 3 (a.u.) in drei Schichten der Retina.

Die Messwerte nehmen mit steigender LY-Konzentration in allen drei Schichten zu (n=6 je Konzentrationsgruppe). Die Indikatorlinien zeigen die jeweilige Standardabweichung an.

In den Tabellen 2 bis 4 sind die jeweiligen Mittelwerte der sechs Präparate (n=6), die Standardabweichung (SD), die p-Werte aus dem t-Test und die 95 % Konfidenzintervalle für alle Konzentrationsgruppen zusammengefasst.

	<b>Kontrollgruppe (SD)</b>	<b>20 µM LY- 364947 (SD)</b>	<b>50 µM LY- 364947 (SD)</b>	<b>100 µM LY- 364947 (SD)</b>
Äußere Körnerzellschicht	1,84 (a.u.) (0,45)	2,20 (a.u.) (0,32)	2,33 (a.u.) (0,24)	2,68 (a.u.) (0,33)
p-Wert		0,1717	0,0568	0,0071
95 % Konfidenzintervall	1,478; 2,196	1,944; 2,452	2,134; 2,529	2,412; 2,915

**Tabelle 2:** Ergebnisse nach Analyse der Expression der CCaspase 3 in der Äußeren Körnerzellschicht.

Die Signifikanz wurde im Vergleich zur Kontrollgruppe mit dem zweiseitigen, ungepaarten t-Test bestimmt. Signifikanzniveau von  $\alpha \leq 0,0167$ .

	<b>Kontrollgruppe (SD)</b>	<b>20 µM LY- 364947 (SD)</b>	<b>50 µM LY- 364947 (SD)</b>	<b>100 µM LY- 364947 (SD)</b>
Innere Körnerzellschicht	1,20 (a.u.) (0,30)	1,56 (a.u.) (0,42)	1,81 (a.u.) (0,32)	1,82 (a.u.) (0,16)
p-Wert		0,1567	0,0114	0,0024
95 % Konfidenzintervall	0,962; 1,444	1,222; 1,888	1,555; 2,062	1,690; 1,944

**Tabelle 3:** Ergebnisse nach Analyse der Expression der CCaspase 3 in der Inneren Körnerzellschicht.

Die Signifikanz wurde im Vergleich zur Kontrollgruppe mit dem zweiseitigen, ungepaarten t-Test bestimmt. Signifikanzniveau von  $\alpha \leq 0,0167$ .

	<b>Kontrollgruppe (SD)</b>	<b>20 <math>\mu</math>M LY- 364947 (SD)</b>	<b>50 <math>\mu</math>M LY- 364947 (SD)</b>	<b>100 <math>\mu</math>M LY- 364947 (SD)</b>
Zellkerne der Ganglienzellschicht	1,17 (a.u.) (0,33)	1,31 (a.u.) (0,15)	1,75 (a.u.) (0,17)	1,92 (a.u.) (0,12)
p-Wert		0,3885	0,0052	0,0006
95 % Konfidenzintervall	0,907; 1,428	1,193; 1,429	1,615; 1,892	1,834; 2,020

**Tabelle 4:** Ergebnisse nach Analyse der Expression der CCaspase 3 in den Zellkernen der Ganglienzellschicht.

Die Signifikanz wurde im Vergleich zur Kontrollgruppe mit dem zweiseitigen, ungepaarten t-Test bestimmt. Signifikanzniveau von  $\alpha \leq 0,0167$ .

## 4 Diskussion

Der Wirkstoff LY-364947 ist als TGF- $\beta$ -I Rezeptor-Blocker in der Lage Proliferation und Transdifferenzierung der RPE- und Müller-Zellen zu unterbinden. Damit könnte LY-364947 eine große Rolle in der Vorbeugung und Behandlung der proliferativen Vitreoretinopathie spielen.

Die Studie wurde mit dem Ziel durchgeführt, mögliche toxische Nebenwirkungen bei der Applikation von LY-364947 auszuschließen. Nur wenn sich der Wirkstoff als unbedenklich erweist, kann er für einen Einsatz in der klinischen Praxis in Erwägung gezogen werden.

### 4.1 Zur Methodik der elektrophysiologischen Untersuchung am ERG Modell

Das Modell der isolierten und umströmten Netzhaut ist ein standardisiertes und erprobtes Verfahren für Toxizitätsbestimmungen von Wirkstoffen (Lüke et al., 2005). Hintergrund der Studie war der geplante Einsatz von LY-364947 als intraoperative Eingabe im Rahmen einer Vitrektomie zur Vorbeugung einer PVR-Reaktion. Da bei einer intraoperativen Medikamenteneinbringung der Wirkstoff direkt auf die Retina gegeben wird, eignet sich das Modell der isolierten und umströmten Netzhaut in diesem Fall besonders gut. Denn hier ist die Gefahr der Toxizität in der neurosensorische Netzhaut besonders gegeben und kann durch genaue Funktionsanalysen der isolierten Netzhaut ausgeschlossen werden. Äußere Einflüsse werden durch das Modell der isolierten und umströmten Netzhaut minimiert (Sickel, 1966).

Die b-Welle ist der sensitivste Parameter im ERG und eignet sich zum Beurteilen der zellulären und funktionellen Eigenschaften der Netzhaut sehr gut. Da sowohl eine Schädigung der Photorezeptorzellen als auch eine Schädigung des höheren neuronalen Netzwerkes der Netzhaut Auswirkungen auf die Ausprägung der b-Welle haben, ist sie als Funktionsparameter bei Wirkstoffexposition geeignet. Für eine genauere Aussage über den Ort einer möglichen Schädigung gibt es die Möglichkeit Folgeuntersuchungen durchzuführen, wie beispielsweise ERG-Ableitungen unter Zugabe von Aspartat zur gezielten Analyse der a-Welle (Januschowski et al., 2014).

Das Modell der isolierten und umströmten Netzhaut erlaubt nur eine eingeschränkte Beurteilbarkeit der Langzeit-Toxizität, da nur die unmittelbaren Funktionseinschränkungen der Netzhaut aufgezeichnet wurden. Mögliche Funktionseinschränkungen, welche erst 120 Minuten nach Applikation auftreten, werden von dem Modell nicht erfasst. Auch eventuelle Defekte des Pigmentepithels konnten mit den Versuchen nicht erkannt werden. Um Langzeitschäden vollständig auszuschließen bedarf es weiterer Untersuchungen.

Alle Versuche wurden unter exakt den gleichen Voraussetzungen durchgeführt. Umgebungsbedingungen der Netzhäute, wie Sauerstoffpartialdruck, Temperatur und osmotischer Druck, wurden stets konstant gehalten, sodass Veränderungen im ERG auf das zu testende LY-364947 zurück zu führen waren.

Für die Tatsache, dass Veränderungen im ERG auf die Exposition mit LY-364947 zurück zu führen waren, spricht auch, dass die Absenkung der b-Welle zeitlich auf die Zugabe des Wirkstoffes folgt. Die Annahme wird durch die Tatsache untermauert, dass nach der Auswaschphase ein Rückgang auf Ausgangsniveau zu verzeichnen war.

Auch kann man davon ausgehen, dass es zu keiner Medikamenteninteraktion mit der Perfusionslösung kam. Die Inhaltsstoffe der Perfusionslösung wurden empirisch durch Sickel und Lüke zusammengestellt und entsprachen der Zusammensetzung, in welcher über den längsten Zeitraum konstante ERG-Ableitungen an bovinen Netzhäuten zu verzeichnen waren (Lüke et al., 2005). Die Zugabe von LY-364947 erfolgte stets in so geringen Konzentrationen, dass keine signifikanten Veränderungen der Ionenverhältnisse in der Perfusionslösung hervorgerufen wurden. LY-364947 war in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. DMSO ist ein organisches Lösungsmittel, welches in Konzentrationen von <10 % als vollkommen unbedenklich einzuschätzen ist (Da Violante et al., 2002). Auch wurde DMSO als Trägersubstanz am Modell der isolierten und umströmten Retina bereits auf Toxizität untersucht, wobei keine ERG-Veränderungen festzustellen waren (Siapich et al., 2015).

Durch die anatomische und physiologische Ähnlichkeit der Netzhäute von Wirbeltieren kann von einer hohen Übereinstimmung bei medikamenten-induzierten ERG-Veränderungen ausgegangen werden. Das Versuchsmodell wurde zwar an Froschnetzhäuten entworfen, wurde jedoch auch für höhere Vertebratennetzhäute etabliert (Hanitzsch and Dettmar, 1964; Haschke and Sickel, 1962). Außerdem ist das

Modell im hohen Maße standardisiert und im Vergleich mit in vivo Versuchen an Tieren deutlich freier von äußeren Einflüssen (Richter et al., 2009).

Das ERG ist ein geeignetes Instrument um die Netzhautfunktion zu evaluieren. Dabei ähneln sich die ERGs (Ganzfeld-ERG, Flicker-ERG, Pattern-ERG, Multifokales ERG) der Wirbeltiere bezüglich der Beurteilbarkeit der Netzhautfunktion. Somit ist eine Vergleichbarkeit der physiologischen und pathologischen Einflüsse auf die Wirbeltier-Netzhaut gewährleistet (Frishman and Wang, 2011).

Auch wenn sich ein Wirkstoff im Modell der isolierten und umströmten Netzhaut als toxisch unbedenklich erweist, sollte stets auch die Applikationsart betrachtet werden. Komplikationen, welche durch die intraoperativen Eingabe entstehen, wurden in dieser elektrophysiologischen und immunhistochemischen Toxizitätsanalyse nicht erfasst. Intraoperative Injektionen haben jedoch den Vorteil, dass die therapeutischen Konzentrationen leicht und direkt lokal im Auge erreicht werden können. Systemische Nebenwirkungen können so in weiten Teilen vermieden werden. Die Präzision und die Reproduzierbarkeit des eingebrachten Volumens hängen von der Größe der Injektionsnadel und der Erfahrung des Arztes ab (Meyer et al., 2015).

Eine individuelle Risiko-Nutzen-Abwägung vor jeder Vitrektomie mit und ohne intraoperativen Medikamenteneinbringung darf nicht ausbleiben.

## **4.2 Zur Methodik der histopathologischen und immunhistochemischen Untersuchung**

Die Funktion der Ganglienzellschicht wird durch das ERG-Modell nicht erfasst. Die Ganglienzellschicht ist die erste Schicht, welche bei einer intravitrealen Injektion mit dem Wirkstoff in Kontakt kommt, und sollte bei einer Toxizitätsanalyse nicht ausgelassen werden. Durch unsere histopathologischen und immunhistochemischen Untersuchungen konnten wir die Funktionalität und Vitalität der Ganglienzellschicht nach Wirkstoffexposition überprüfen.

Die histopathologische Untersuchung in Übersichtsfärbung erlaubte erste Rückschlüsse auf toxische Auswirkungen von LY-364947. Dazu wurden die Strecken von Ganglienzellschicht und Innere Plexiforme Schicht ausgemessen und ins Verhältnis zur Gesamtdicke der Retina gesetzt. Eine Verschmälerung der Ganglienzellschicht und Inneren Plexiformen Schicht wäre als Anzeichen für einen toxischen Gewebeschaden zu bewerten gewesen (Kim et al., 2013). Leider erlaubte es die Schnittführung der

Präparate nicht, immer an der exakt gleichen Stelle die Strecken auszumessen. Da die Netzhaut je nach Lokalisation am Augenhintergrund unterschiedlich stark ist, ist ein direkter Vergleich der Dicken von Ganglienzellschicht und Innerer Plexiformer Schicht so nicht möglich. Aus diesem Grund wurden die ausgemessenen Strecken ins Verhältnis zur Gesamtdicke gestellt. Zugleich wurden bei jedem Präparat an zwei verschiedenen Stellen die Verhältnisse ausgemessen um eine größere Stichprobe zu erhalten. Bei der Ausmessung der Gesamtdicke der Retina wurde die Schicht der Stäbchen und Zapfen ausgelassen, da sich diese Schicht als sehr fragil erwiesen hat und bei der Fixierung oft Läsionen erlitt. Unter diesen angepassten Rahmenbedingungen ist der Vergleich der Schichten realisierbar und auswertbar. Die Prüfung auf Verschmälerung von Ganglienzellschicht und Innerer Plexiformen Schicht ist somit durchaus zulässig.

Ziel der immunhistochemischen Untersuchung war es Toxizität in Form von Apoptose in den Netzhautschichten nachzuweisen bzw. auszuschließen. Die CCaspase 3 ist ein spezifischer und sensitiver Indikator für Apoptose in Zellen. Andere Methoden Apoptose in Zellen nachzuweisen wurden diskutiert und als nachrangig eingestuft. So ist beispielsweise der Nachweis von fragmentierten DNA Strängen mittels TUNEL-Technik (terminal-Desoxyribosyl-Transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling) unspezifisch, da sie auch in nekrotischen Zellen vorkommen (Negoescu et al., 1996). Viele andere Techniken zum Nachweis von Apoptose haben sich als ungeeignet für in Paraffin eingebettete Gewebe erwiesen (Barrett et al., 2001).

Die Caspase 3 spielt als Effektorprotease im programmierten Zelltod eine zentrale Rolle. Physiologisch besitzt sie eine Prädomäne, welche erst bei Aktivierung durch prä-apoptotische Stimuli gespalten wird. Aus diesem Grund eignet sich der Nachweis der Cleaved Caspase 3, also der gespaltenen Caspase 3, als ein eindeutiger und sensitiver Indikator für Apoptose. Die kommerziell erhältlichen Antikörper haben zudem den Vorteil, dass sie eine hohe Kreuzreaktivität mit den CCaspasen 3 der meisten Säugetiere haben und sich daher für Experimente mit beispielsweise bovinen oder menschlichen Gewebe gut einsetzen lassen (Gown and Willingham, 2002).

Dennoch bleibt anzumerken, dass die Caspaseaktivität in einzelnen Zellen sehr gering sein kann. Daher sollten für die meisten Nachweisverfahren Zellextrakte aus vielen Zellen gewonnen werden, oder, wie in dieser Arbeit beschriebenen Versuch, ganze Gewebeschnitte verwendet werden (Luttmann et al., 2008).

Möglicherweise funktionieren manche Antikörper weniger gut in konservierten Gewebeproben. Peptide oder andere Substrate können das Ergebnis verfälschen oder die Spezifität der Caspase zerstören. Das Epitop der Cleaved Caspase 3 hat sich jedoch in den meisten Zelltypen als ubiquitär und hinreichend vorhanden erwiesen. Es ist ein sehr nützliches und suffizientes Hilfsmittel um Apoptose in konservierten Gewebeproben zu detektieren und zu messen (Gown and Willingham, 2002).

### **4.3 Zum Wirkstoff LY-364947 und seiner Wirkungsweise**

LY-364947 ist ein selektiver TGF- $\beta$ -I Rezeptor-Blocker. Über TGF- $\beta$  werden viele zelluläre Prozesse wie Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Absonderung extrazellulärer Matrix gesteuert. Eine intrazelluläre Kinase-Domäne des TGF- $\beta$ -I Rezeptors bewirkt die selektive Phosphorylierung der Zielstrukturen. Bei der Inhibierung spielt eine Pyrazol Struktur von LY-364947 die entscheidende Rolle. Diese Pyrazole verfügen über eine ATP-Bindungsstelle, über welche sie mit hoher Bindungsenergie als ATP-kompetitiver Inhibitor wirken (Peng et al., 2005).

Im ERG-Versuch war auffällig, dass ein Abfall der b-Wellenamplitude erst mit einiger Verzögerung nach Exposition von 50 und 100  $\mu$ M LY-364947 zu verzeichnen war. Auch die lokalen Minima fanden sich erst nach Expositionsende (nach 105-120 Minuten), sodass der erneute Anstieg der b-Wellenamplitude erst gegen Ende der Auswaschphase erfolgte. Dies ist ungewöhnlich für das ERG-Modell und war bei vorangegangenen Toxizitätsanalysen nicht so eindeutig (Lüke et al., 2006, 2009; Ranjbar et al., 2014). Es ist unwahrscheinlich, dass dies an einer zu geringen Perfusionsgeschwindigkeit lag. Im Perfusionssystem befanden sich bis zur Perfusionskammer nicht mehr als 15 ml, sodass bei einer Perfusionsgeschwindigkeit von 1 ml/min nach 15 Minuten die Netzhaut erreicht wurde. Auch die Trägersubstanz, DMSO, kann nicht als Ursache für einen verzögerten Wirkungseintritt infrage kommen. Sie sorgt als nukleophiles und bipolares Lösungsmittel für eine rasche Aufnahme in die Zelle. Es kann eher angenommen werden, dass der verzögerte Effekt an der Struktur und Wirkungsweise von LY-364947 als ATP-kompetitiver Blocker der TGF- $\beta$  Type I receptor kinase liegt. Es muss untersucht werden, ob andere TGF- $\beta$  Rezeptor-Blocker einen ähnlichen verzögerten Wirkungseintritt zeigen.

#### 4.4 Interpretation der Versuchsergebnisse zur Wirkung von LY-364947

Wie die unter 1.5.1 und 1.5.2 beschriebene Studie zeigte, kann die intravitreale Injektion von LY-364947 als TGF- $\beta$  Rezeptor-Blocker einer proliferativen Vitreoretinopathie und traktiven retinalen Ablösung (TRD) vorbeugen. Eine PVR ist die Komplikation eines Reparaturprozesses in und auf der Netzhaut, bei welcher es zu unerwünschter epithelialer mesenchymaler Transformation mit Strang- und Membranbildung kommt. Man kann davon ausgehen, dass TGF- $\beta$  Rezeptoren eine entscheidende Rolle in diesem Prozess spielen (Winkler and Hoerauf, 2011). Daher wäre eine Behandlung und Prophylaxe der PVR mit LY-364947 durchaus sinnvoll.

Die in der Einleitung unter 1.5.1 dargestellte Studie zeigte auch, dass bereits geringe Konzentrationen von LY-364947 die PVR-Entstehung signifikant inhibieren. Daher wurden für die Toxizitätsuntersuchungen am Modell der isolierten und umströmten Netzhaut LY-Konzentrationen von 20  $\mu$ M, 50  $\mu$ M und 100  $\mu$ M gewählt.

Die Versuche am ERG zeigten, dass es für die Konzentration von 20  $\mu$ M zu keiner signifikanten Minderung der b-Welle während der Expositionsphase kam. Bei den höheren Konzentrationen von 50 und 100  $\mu$ M war zwar nach Exposition ein signifikanter Rückgang der Amplitudenhöhe zu verzeichnen, allerdings kam es während der Auswaschphase zu einer Regeneration der b-Welle. Aufgrund dieser Ergebnisse ist die Applikation von bis zu 20  $\mu$ M LY-364947 im Rahmen der Prävention von fibrosierenden Netzhauterkrankungen, wie der PVR, denkbar.

Die Ergebnisse der ERG-Versuche stimmen größtenteils mit den histologischen und immunhistologischen Versuchen überein:

Im Rahmen der histologischen Auswertung war für keine der untersuchten Konzentrationsgruppen eine signifikante Minderungen der Ganglienzellschicht und Inneren Plexiformen Schicht feststellbar. Eine Verschmälerung der Ganglienzellschicht und Inneren Plexiformen Schicht wäre als Anzeichen für einen toxischen Gewebeschaden zu bewerten gewesen (Kim et al., 2013). Eine Verschmälerung nach Exposition der oben genannten verschiedenen LY-Konzentrationen konnte mit den Versuchen allerdings ausgeschlossen werden.

Die immunhistochemischen Versuche konnten veranschaulichen, dass eine Exposition von 20  $\mu$ M LY-364947 zu keiner signifikant verstärkten Expression der CCaspase 3

führt. Dazu wurden die Schichten Äußere und Innere Körnerzellschicht und Ganglienzellschicht untersucht. Bei Netzhäuten, welche einer Applikation von 50  $\mu\text{M}$  LY-364947 ausgesetzt waren, konnte eine signifikant erhöhte Expression der CCaspase 3 in der Inneren Körnerzellschicht und in den Zellkernen der Ganglienzellschicht gemessen werden. Die Retinas, welche einer Exposition von 100  $\mu\text{M}$  LY-364947 ausgesetzt waren, hatten signifikant erhöhte Messwerte in allen drei betrachteten Netzhautschichten. Da die CCaspase 3 als Parameter für Apoptose zu bewerten ist (Kumar, 2007; Tewari et al., 1995), kann davon ausgegangen werden, dass verstärkt Apoptose durch die Applikation von 50 und 100  $\mu\text{M}$  LY-364947 in den Zellkernen stattgefunden hat. Dies deckt sich auch mit dem Rückgang der b-Wellenamplituden aus den vorausgegangenen ERG-Versuchen. Hier war ebenso eine leichte Funktionsminderung für die Konzentrationen von 50 und 100  $\mu\text{M}$  LY-364947 während der Exposition feststellbar, die sich allerdings gegen Ende der Auswaschphase wieder regenerierte. Eine vollständige Erholung der b-Welle auf Ausgangsniveau war im vorgegebenen Zeitrahmen jedoch noch detektierbar.

Somit muss die a priori formulierte Nullhypothese ( $H_0$ ) („Es gibt in allen hier verwendeten Analysen keinen Unterschied zwischen den Retinas der Kontrollgruppe zu den mit verschiedenen Konzentrationen von LY-364947 umspülten Retinas.“) verworfen werden. Lediglich für die Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  LY-364947 zeigte sich in allen hier verwendeten Analysen kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe.

Allerdings wurden in den oben beschriebenen Versuchen die unmittelbaren Schäden einer Anwendung des Wirkstoffes betrachtet. Mögliche Schäden, die sich durch eine häufige oder langfristige Anwendung ergeben könnten, konnten nicht erfasst werden. Auch eventuelle Defekte des Pigmentepithels konnten mit den Versuchen nicht erkannt werden. Um Langzeitschäden vollständig auszuschließen bedarf es weiterer Untersuchungen.

Die Versuchsergebnisse zeigen, dass die Applikation von 20  $\mu\text{M}$  LY-364947 am ehesten als unbedenklich eingestuft werden kann. Im ERG-Versuch konnte nach Absetzen des Medikamentes auch für höhere Konzentrationen keine bleibende Funktionsminderung in der oben beschriebenen Versuchsanordnung festgestellt werden. Allerdings zeigten sich in der immunhistologischen Untersuchung verstärkt apoptotische Zellkerne nach Exposition von 50 und 100  $\mu\text{M}$  LY-364947, sodass eine klinische Anwendung mit diesen Konzentrationen als kritisch zu bewerten ist. Da die

---

vorausgegangene Studie gezeigt hat, dass auch niedrige Konzentrationen von LY-364947 einen positiven Effekt in der Prävention der PVR haben (Nassar et al., 2014), kann die intraoperative Applikation von 20  $\mu\text{M}$  LY-364947 in der Therapie proliferativer Netzhauterkrankungen in Betracht gezogen werden.

## 5 Zusammenfassung

**Hintergrund:** Der Blocker des TGF- $\beta$  Rezeptors, LY-364947, scheint ein vielversprechender Wirkstoff in der Prophylaxe der Entstehung der proliferativen Vitreoretinopathie (PVR) zu sein. Voraussetzung für die intraokulare Applikation ist ein Ausbleiben von toxischen Schäden auf die Netzhaut.

**Methodik:** Rindernetzhäute wurden isoliert und mit einer sauerstoffgesättigten Perfusionslösung umspült. Nach Gabe eines Lichtreizes konnten über Silber-Silberchlorid-Elektroden Ableitungen des Elektretinogramms (ERG) aufgezeichnet werden. Verschiedene Konzentrationen von LY-364947 wurden über 45 Minuten der Perfusionslösung beigefügt, gefolgt von einer 75minütigen Auswaschphase. Die Veränderungen im ERG in Form von Amplitudensenkungen der b-Welle wurden analysiert und ausgewertet. Desweiteren wurden die Netzhäute direkt im Anschluss an die Auswaschphase fixiert und histologisch und immunhistochemisch (auf Expression des Apoptose-Parameters CCaspase-3) untersucht.

**Ergebnisse:** Bei den Versuchen mit 20  $\mu$ M LY-364947 wurden keine signifikanten ERG-Veränderungen beobachtet. Nur für die Konzentration von 50 und 100  $\mu$ M war eine signifikante Reduktion der b-Welle zu verzeichnen, welche sich nach der Auswaschphase allerdings wieder regenerierte. Histologisch waren keine Netzhautveränderungen zu finden. In der immunhistochemischen Untersuchung war signifikant verstärkt Apoptose im Sinne einer erhöhten CCaspase-3 Expression für die Konzentrationen von 50 und 100  $\mu$ M LY-364947 nachzuweisen.

**Fazit:** Die vorliegenden Untersuchungen konnten zeigen, dass die intraokulare Applikation von 20  $\mu$ M LY-364947 keine unmittelbaren Schäden auf die Netzhaut zu induzieren vermag. Eine klinische intraoperative Anwendung von LY-364947 bis zu einer Konzentration von 20  $\mu$ M zur Prävention einer PVR-Entwicklung und anderen proliferativen Netzhauterkrankungen kann in Betracht gezogen werden.

## Quellenverzeichnis

- Annes, J.P. (2003). Making sense of latent TGFbeta activation. *J. Cell Sci.* *116*, 217–224.
- Asaria, R.H.Y., and Charteris, D.G. (2006). Proliferative vitreoretinopathy: developments in pathogenesis and treatment. *Compr Ophthalmol Update* *7*, 179–185.
- Barcellos-Hoff, M.H., and Dix, T.A. (1996). Redox-mediated activation of latent transforming growth factor-beta 1. *Mol. Endocrinol.* *10*, 1077–1083.
- Barrett, K.L., Willingham, J.M., Garvin, A.J., and Willingham, M.C. (2001). Advances in Cytochemical Methods for Detection of Apoptosis. *J. Histochem. Cytochem.* *49*, 821–832.
- Behbehani, R.S., Affel, E.L., Sergott, R.C., and Savino, P.J. (2005). Multifocal ERG in ethambutol associated visual loss. *Br. J. Ophthalmol.* *89*, 976–982.
- Burk<sup>1</sup>, A., and Burk, R. (2014). "15.4 Proliferative Vitreoretinopathie (PVR)" in: *Checkliste Augenheilkunde, 5. Aufl., Thieme*, pp. 282-284.
- Burk<sup>2</sup>, A., and Burk, R. (2014). "16.1 Dystrophien/ Degeneration/ hereditäre Erkrankungen" in: *Checkliste Augenheilkunde, 5. Aufl., Thieme*, pp. 326.
- Burk<sup>3</sup>, A., and Burk, R. (2014). "19.1 Netzhaut- und Glaskörperchirurgie" in: *Checkliste Augenheilkunde, 5. Aufl., Thieme*, pp. 506.
- Cleary, P.E., Jarus, G., Ryan, S.J. (1980). Experimental posterior penetrating eye injury in the rhesus monkey eyes after a posterior penetrating ocular injury. *Am. J. Ophthalmol.* *90*, 829-845.
- Danial, N.N., and Korsmeyer, S.J. (2004). Cell Death: Critical Control Points. *Cell* *116*, 205–219.
- Da Violante, G., Zerrouk, N., Richard, I., Provot, G., Chaumeil, J.C., and Arnaud, P. (2002). Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 colon tumor cell cultures. *Biol. Pharm. Bull.* *25*, 1600–1603.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* *391*, 43–50.
- Frings, S., Müller F. (2012) "18.1.7 Netzhaut und primäre sensorische Prozesse" in: Behrends, J., Bischofberger, J., and Deutzmann, R., *Duale Reihe Physiologie, 2. Aufl., Thieme*, pp. 641-651.
- Frishman, L.J. and Wang, M.H. (2011). "Electroretinogram of human, monkey and mouse" in: Levin, L.A., Nilsson, S.F.E., Ver Hoeve, J., Wu, S.M., Kaufman, P.L., Alm, A., *Adler's Physiology of the Eye; 11. Aufl., Saunders Elsevier*, pp. 480-501.
- Gamulescu, M.A., Renner, A.B., and Helbig, H. (2009). Klinische Manifestationen von Funktionsstörungen des retinalen Pigmentepithels. *Ophthalmol.* *106*, 305–310.

- Gown, A.M., and Willingham, M.C. (2002). Improved Detection of Apoptotic Cells in Archival Paraffin Sections: Immunohistochemistry Using Antibodies to Cleaved Caspase 3. *J. Histochem. Cytochem.* 50, 449–454.
- Granit, R. (1933). The components of the retinal action potential in mammals and their relation to the discharge in the optic nerve. *J Physiol* 77, 207–239.
- Granit, R. (1967), "Ragnar Granit - Facts". Nobel Media AB 2014. <[http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1967/granit-facts.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1967/granit-facts.html)> (Tag des Zugriffs: 15.11.2015)
- Grehn, F. (2011). "15.3.3 Interaktionen zwischen Glaskörper und Netzhaut" in: *Augenheilkunde*, 31. Aufl., Springer, pp. 275-277.
- Hanitzsch, R., and Dettmar, P. (1964). Das Elektretinogramm der isolierten menschlichen Netzhaut bei einzel- und Flimmerreizen und Potentialverläufe aus verschiedenen Netzhauttiefen. *Doc. Ophthalmol.* 18, 412–418.
- Haschke, W., and Sickel, W. (1962). The electroretinogram in man in the absence of ganglionic cells and in partial lesions of the bipolar cells. *Acta Ophthalmol. Suppl.* 70, 164–167.
- Holmgren, F. (1879). Ueber die Retinaströme. *Untersuchungen Aus Dem Physiol. Inst. Univ. Heidelb.* 278–286.
- Hood, D.C., and Birch, D.G. (1992). A computational model of the amplitude and implicit time of the b-wave of the human ERG. *Vis Neurosci* 8, 107–126.
- Iandiev, I., Bringmann, A., and Wiedemann, P. (2010). Proliferative Vitreoretinopathie – Pathogenese und Therapie. *Klin. Monatsblätter Für Augenheilkd.* 227, 168–174.
- Jamison, J.A., Bush, R.A., Lei, B., and Sieving, P.A. (2001). Characterization of the rod photoresponse isolated from the dark-adapted primate ERG. *Vis Neurosci* 18, 445–455.
- Januschowski, K. (2010). Elektrophysiologische Toxizitätsuntersuchungen intravitrealer Pharmaka am Modell der isolierten und umströmten Vertebratennetzhaut. *Med. Diss. Eberhard-Karls Universität zu Tübingen.*
- Januschowski, K., Schnichels, S., Hagemann, U., Koch, V., Hofmann, J., Spitzer, M.S., Bartz-Schmidt, K.-U., Szurman, P., Lücke, M., and Aisenbrey, S. (2014). Electrophysiological toxicity testing of VEGF Trap-Eye in an isolated perfused vertebrate retina organ culture model. *Acta Ophthalmol* 92, e305–e311.
- Jerdan, J.A., Pepose, J.S., Michels, R.G., Hayashi, H., de Bustros, S., Sebag, M., and Glaser, B.M. (1989). Proliferative vitreoretinopathy membranes. An immunohistochemical study. *Ophthalmology* 96, 801–810.
- Kang Derwent, J.J., and Linsenmeier, R.A. (2001). Intraretinal analysis of the a-wave of the electroretinogram (ERG) in dark-adapted intact cat retina. *Vis. Neurosci.* 18, 353–363.

- Karkanová, M., Matusková, V., Vlková, E., Dosková, H., and Uhmánová, R. (2010). The ERG contribution in early diagnosis of chloroquine and hydroxychloroquine maculopathy. *Ceská Slov. Oftalmol. Spolecnosti* 66, 62–66.
- Kim, B.-J., Braun, T.A., Wordinger, R.J., and Clark, A.F. (2013). Progressive morphological changes and impaired retinal function associated with temporal regulation of gene expression after retinal ischemia/reperfusion injury in mice. *Mol. Neurodegener.* 8, 21.
- Kita, T., Hata, Y., Arita, R., Kawahara, S., Miura, M., Nakao, S., Mochizuki, Y., Enaida, H., Goto, Y., Shimokawa, H., et al. (2008). Role of TGF-beta in proliferative vitreoretinal diseases and ROCK as a therapeutic target. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 17504–17509.
- Kumar, S. (2007). Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ.* 14, 32–43.
- Lee Shirley Ding, S., Kumar, S., and Mok, P. (2017). Cellular Reparative Mechanisms of Mesenchymal Stem Cells for Retinal Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 1406.
- Lüke, M., Weiergräber, M., Brand, C., Siapich, S.A., Banat, M., Hescheler, J., Lüke, C., and Schneider, T. (2005). The isolated perfused bovine retina—A sensitive tool for pharmacological research on retinal function. *Brain Res. Protoc.* 16, 27–36.
- Lüke, M., Warga, M., Ziemssen, F., Gelisken, F., Grisanti, S., Schneider, T., Lüke, C., Partsch, M., Bartz-Schmidt, K.U., Szurman, P., et al. (2006). Effects of bevacizumab on retinal function in isolated vertebrate retina. *Br. J. Ophthalmol.* 90, 1178–1182.
- Lüke, M., Januschowski, K., Lüke, J., Peters, S., Wirtz, N., Yörük, E., Lüke, C., Bartz-Schmidt, K.U., Grisanti, S., and Szurman, P. (2009). The effects of ranibizumab (Lucentis) on retinal function in isolated perfused vertebrate retina. *Br. J. Ophthalmol.* 93, 1396–1400.
- Lüllmann-Rauch, R., and Paulsen, F. (2012). "26.6 Retina" in: *Taschenlehrbuch Histologie*, 5. Aufl., Thieme, pp. 649-657.
- Luttmann, W., Bratke, K., Kupper, M., and Myrtek, D. (2008). "8.5.6 Messung von Caspase- Aktivität" in: *Der Experimentator Immunologie*, 3. Aufl., Spektrum, pp. 233-234.
- Lyons, R.M. (1988). Proteolytic activation of latent transforming growth factor-beta from fibroblast-conditioned medium. *J. Cell Biol.* 106, 1659–1665.
- Massagué, J. (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67, 753–791.
- Meyer, C.H., Krohne, T.U., Charbel Issa, P., Liu, Z., and Holz, F.G. (2015). "Routes for Drug Delivery to the Eye and Retina: Intravitreal Injections" in: Q.D. Nguyen, E.B. Rodrigues, M.E. Farah, W.F. Mieler, and D.V. Do, *Retinal Pharmacotherapeutics*, S. Karger AG, pp. 63–70.
- Miyazono, K., ten Dijke, P., and Heldin, C.H. (2000). TGF-beta signaling by Smad proteins. *Adv. Immunol.* 75, 115–157.

- Munger, J.S., Harpel, J.G., Gleizes, P.-E., Mazzieri, R., Nunes, I., and Rifkin, D.B. (1997). Latent transforming growth factor- $\beta$ : Structural features and mechanisms of activation. *Kidney Int.* 51, 1376–1382.
- Murphy, K.M., Travers, P., and Walport, M. (2008). "6.25 The receptors that induce apoptosis activate specialized intracellular proteases called caspases" in: Janeway's Immunobiology, 7. Aufl., Taylor & Francis Ltd., pp. 247-248.
- Nassar, K., Grisanti, S., Tura, A., Lüke, J., Lüke, M., Soliman, M., and Grisanti, S. (2014). A TGF- $\beta$  receptor 1 inhibitor for prevention of proliferative vitreoretinopathy. *Exp. Eye Res.* 123, 72–86.
- Negoescu, A., Lorimier, P., Labat-Moleur, F., Drouet, C., Robert, C., Guillermet, C., Brambilla, C., and Brambilla, E. (1996). In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations. *J. Histochem. Cytochem.* 44, 959–968.
- Nicholson, D.W., Ali, A., Thornberry, N.A., Vaillancourt, J.P., Ding, C.K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P.R., Labelle, M., Lazebnik, Y.A., et al. (1995). Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376, 37–43.
- Oshima, Y., Sakamoto, T., Hisatomi, T., et al. (2009). Gene transfer of soluble TGF-beta type II receptor inhibits experimental proliferative vitreoretinopathy. *Gene Ther.* 9, 1214-20.
- Peng, S.-B., Yan, L., Xia, X., Watkins, S.A., Brooks, H.B., Beight, D., Herron, D.K., Jones, M.L., Lampe, J.W., McMillen, W.T., et al. (2005). Kinetic characterization of novel pyrazole TGF-beta receptor I kinase inhibitors and their blockade of the epithelial-mesenchymal transition. *Biochemistry (Mosc.)* 44, 2293–2304.
- Ranjbar, M., Alt, A., Nassar, K., Reinsberg, M., Schneider, T., Grisanti, S., Lüke, J., and Lüke, M. (2014). The concentration-dependent effects of indocyanine green on retinal function in the electrophysiological ex vivo model of isolated perfused vertebrate retina. *Ophthalmic Res.* 51, 167–171.
- Richter, S.H., Garner, J.P., and Würbel, H. (2009). Environmental standardization: cure or cause of poor reproducibility in animal experiments? *Nat. Methods* 6, 257–261.
- Rifkin, D.B. (2005). Latent Transforming Growth Factor- (TGF- ) Binding Proteins: Orchestrators of TGF- Availability. *J. Biol. Chem.* 280, 7409–7412.
- Siapich, S.A., Akhtar, I., Hescheler, J., Schneider, T., and Lüke, M. (2015). Low concentrations of ethanol but not of dimethyl sulfoxide (DMSO) impair reciprocal retinal signal transduction. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. Albrecht Von Graefes Arch. Für Klin. Exp. Ophthalmol.* 253, 1713–1719.
- Sickel, W. (1961). "Stoffwechsel und Funktion der isolierten Netzhaut" in: R. Jung, and H. Kornhuber, Neurophysiologie und Psychophysik des Visuellen Systems / The Visual System: Neurophysiology and Psychophysics, Springer, pp. 80–97.

- Sickel, W. (1966). The isolated retina maintained in a circulating medium; combined optical and electrical investigations of metabolic aspects of generation of the electroretinogram. Pergamon Press Oxford, 115–124.
- Silbernagl, S. (2012). "12 Zentralnervensystem und Sinne" in: Taschenatlas Physiologie, 7. Aufl., Thieme, pp. 354-358.
- Spranger, J., Meyer-Schwickerath, R., Klein, M., Schatz, H., and Pfeiffer, A. (1999). Deficient activation and different expression of transforming growth factor- $\beta$  isoforms in active proliferative diabetic retinopathy and neovascular eye disease. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 107, 21–28.
- Stalmans, I. (2005). Role of the vascular endothelial growth factor isoforms in retinal angiogenesis and DiGeorge syndrome. *Verh. - K. Acad. Voor Geneesk. Van Belg.* 67, 229–276.
- Steinberg, R.H., Linsenmeier, R.A., and Griff, E.R. (1983). Three light-evoked responses of the retinal pigment epithelium. *Vision Res.* 23, 1315–1323.
- Tamiya, S., Liu, L., and Kaplan, H.J. (2010). Epithelial-mesenchymal transition and proliferation of retinal pigment epithelial cells initiated upon loss of cell-cell contact. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51, 2755–2763.
- Tanimoto, N., Sothilingam, V., and Seeliger, M.W. (2013). Functional phenotyping of mouse models with ERG. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 935, 69–78.
- Tanimoto, N., Sothilingam, V., Kondo, M., Biel, M., Humphries, P., and Seeliger, M.W. (2015). Electroretinographic assessment of rod- and cone-mediated bipolar cell pathways using flicker stimuli in mice. *Sci. Rep.* 5, 10731.
- Tewari, M., Quan, L.T., O'Rourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beidler, D.R., Poirier, G.G., Salvesen, G.S., and Dixit, V.M. (1995). Yama/CPP32 $\beta$ , a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* 81, 801–809.
- Tian, N., and Slaughter, M.M. (1995). Correlation of dynamic responses in the ON bipolar neuron and the b-wave of the electroretinogram. *Vision Res.* 35, 1359–1364.
- Tura, A., Grisanti, S., Petermeier, K., and Henke-Fahle, S. (2007). The Rho-Kinase Inhibitor H-1152P Suppresses the Wound-Healing Activities of Human Tenon's Capsule Fibroblasts In Vitro. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* 48, 2152.
- Williams, R.G., Chang, S., Comaratta, M.R., and Simoni, G. (1996). Does the presence of heparin and dexamethasone in the vitrectomy infusate reduce re proliferation in proliferative vitreoretinopathy? *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 34, 496–503.
- Winkler, J., and Hoerauf, H. (2011). TGF- $\beta$  and RPE-derived cells in taut subretinal strands from patients with proliferative vitreoretinopathy. *Eur J Ophthalmol* 21, 422–426.
- Wipff, P., and Hinz, B. (2008). Integrins and the activation of latent transforming growth factor  $\beta$ 1 – An intimate relationship. *Eur. J. Cell Biol.* 87, 601–615.

Wrana, J.L., Attisano, L., Cárcamo, J., Zentella, A., Doody, J., Laiho, M., Wang, X.-F., and Massague, J. (1992). TGF $\beta$  signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* 71, 1003–1014.

Xu, X., and Karwoski, C.J. (1994). Current source density analysis of retinal field potentials. II. Pharmacological analysis of the b-wave and M-wave. *J Neurophysiol* 72, 96–105.

Zeno (1965) in: Volltext Philosophie: Theophrast Paracelsus: Werke. Bd. 2, S. 508-513.: Die dritte Defension wegen des Schreibens der neuen Recepte <<http://www.zeno.org/nid/20009261362>> (Tag des Zugriffs: 15.11.2015)

## Anhang

### Anhang 1: Protokolle für die Herstellung der Lösungen und Proben

Die gesamten Experimente und laborchemischen Verfahren wurden im Labor der Augenklinik der Universität zu Lübeck unter der Laborleitung von Prof. Dr. med. Matthias Lüke durchgeführt.

#### Protokoll für die Herstellung von 4 Liter Perfusionslösung

Lösung A:

- 2 l Aqua tridest.
- 28,052 g NaCl (Merck KGaA, Darmstadt, DE)
- 0,596 g KCl (Merck KGaA, Darmstadt, DE)
- 0,038 g MgCl<sub>2</sub> (Merck KGaA, Darmstadt, DE)
- 0,068 g CaCl<sub>2</sub> (Merck KGaA, Darmstadt, DE)

Lösung B:

- 2 l Aqua tridest.
  - 0,72 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Fluka Analytical, Buchs, CH)
  - 7,666 g NaHPO<sub>4</sub> (Merck KGaA, Darmstadt, DE)
- Beide Lösungen autoklavieren und bei Raumtemperatur lagern. Unmittelbar vor Versuch 1:1 vermischen unter Zugabe von 3,964 g Glucose (Merck KGaA, Darmstadt, DE).

#### Protokoll für die Herstellung von 500 ml Fixierlösung nach Margo

Lösung A: 2 % gepuffertes Formalin

- 236,48 ml Aqua dest.
- 1,055 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Fluka Analytical, Buchs, CH)
- 1,715 g NaHPO<sub>4</sub> (Merck KGaA, Darmstadt, DE)
- 13,52 ml Formalin 37%ig (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE)

Lösung B: 2,5 % Glutaraldehyd

- 225 ml Aqua dest.
  - 25 ml Glutaraldehyd 25 % (Merck KGaA, Darmstadt, DE)
- Beide Lösungen bei 4-8 °C lagern und vor Gebrauch 1:1 vermischen.

## **Protokoll für die Einbettung in Paraffin**

Entwässerung:

- 70 % Iso-Propylalk.: 3 x 30 Min
- 80 % Iso-Propylalk.: 30 Min
- 90 % Iso-Propylalk.: 30 Min
- 100 % Iso-Propylalk.: 3 x 30 Min

Einbettung:

- Iso-Propylalk. / Paraplast 1:1: 1 - 2 Std.
- Paraplast I: über Nacht
- Paraplast II: 6 Std.
- Paraplast III: über Nacht

Iso-Propylalk: Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, DE

Paraplast® Plus: Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, DE

## **Protokoll für die Entparaffinierung**

- Schnitte für 3 x 5 Min in Xylol (Mallinckrodt Baker BV, Deventer, NL)
- Rehydrierung:
  - 100 % Ethanol (BÜFA GmbH & Co. KG, Oldenburg, DE): 2 x 5 Min
  - 90 % Ethanol: 5 Min
  - 80 % Ethanol: 4 Min
  - 70 % Ethanol: 4 Min
  - 50 % Ethanol: 4 Min
- Wässern mit Aqua dest. für 5 Min

## **Protokoll für die HE-Färbung**

- Vorbehandlung/ Entparaffinierung wie oben beschrieben
- 7 – 10 Min Hämalan nach Mayer (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE)
- 10 Min fließend wässern mit Leitungswasser
- 2 Min Aqua dest.
- 30 – 60 s Eosin (0,5 % wässrig + 1 Tropfen 100 % Essigsäure) (Merck KGaA, Darmstadt, DE)
- 2 x 2 Min Aqua dest.

- Entwässerung:
  - 50 % Ethanol (BÜFA GmbH & Co. KG, Oldenburg, DE): 2 Min
  - 70 % Ethanol: 2 Min
  - 80 % Ethanol: 5 Min
  - 90 % Ethanol: 4 Min
  - 100 % Ethanol: 3 x 5 Min
  - Xylol (Mallinckrodt Baker BV, Deventer, NL): 3 x 5 Min
- Eindecken mit Entellan (Merck KGaA, Darmstadt, DE)

### **Protokoll für die Vorbehandlung mit dem Natriumcitratpuffer**

Citratpuffer:

- 1 l Aqua tridest.
- 2,94 g  $C_6H_5 Na_3O_7^{3-}$  (Sigma-Aldrich GmbH, München, DE)
- Objektträger in Natriumcitratpuffer für 30 Min mit Reiskocher (MultiGourmet FS20, BRAUN, Neu-Isenburg, DE)
- danach auf RT abkühlen
- pH von 6,0 mit 1 mM HCL (Merck KGaA, Darmstadt, DE) einstellen, 0,5 ml Tween 20 (Sigma- Aldrich GmbH, München, DE) dazu geben
- autoklavieren und bei 4 – 8 °C lagern

### **Protokoll für die phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)**

- 1 l Aqua tridest.
- 80 g NaCl (Merck KGaA, Darmstadt, DE)
- 2 g KCl (Merck KGaA, Darmstadt, DE)
- 11,5 g  $Na_2HPO_4$  (Merck KGaA, Darmstadt, DE)
- 2 g  $KH_2PO_4$  (Fluka Analytical, Buchs, CH)
- Lösung autoklavieren und bei 4 – 8 °C lagern. Vor Anwendung 10fach verdünnen

### **Protokoll für 200 ml iFISH Blocking Buffer**

- 1,7892 g KCl (Merck KGaA, Darmstadt, DE)
- 0,2338 g NaCl (Merck KGaA, Darmstadt, DE)
- 2 ml 0,5 M EDTA (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE)
- 2 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,5 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE)

- 200 µl 0,1 % Triton X-100 (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE)
  - 6 g 3 % Bovines Serumalbumin (Biocat GmbH, Heidelberg, DE)
  - 160 ml Aqua tridest.
- nach dem Lösen steril filtrieren mit 0.22 µm Syringe Filter (Sartorius AG, Göttingen, DE)

### **Protokoll für die Eindeckung mit Mowiol**

- 6,4 g Mowiol® 4 – 88 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE)
  - 16 g Glycerol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE)
- 1 Std bei RT rühren
- 16 ml Aqua tridest. hinzufügen, weiter 1 Std bei RT rühren
- 32 ml 0,2 M Tris- HCl (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE), pH 8,5, dazu geben, 2 Std bei 50 °C rühren
- über Nacht bei RT rühren
- 15 Min bei 5000 g zentrifugieren
- Überstand aliquotieren zu je 1,5 ml
- Sediment verwerfen

## Anhang 2: Auflistung der verwendeten Materialien und Software

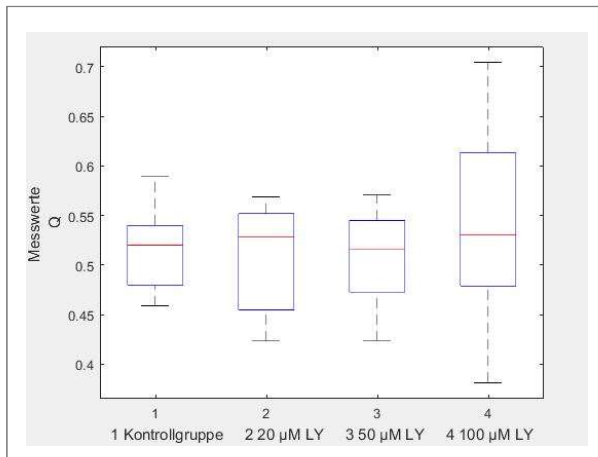
Reagenzien und Chemikalien		
	Anti Rabbit Caspase 3	EPITOMICS®, Burlingame, California, USA
	Anti Rabbit IgG Cy 3	DIANOVA GmbH, Hamburg, DE
	Aqua tridest	Herstellung im Haus mithilfe eines Bidestillators (Heraeus Quarzglas GmbH & Co. KG, Hanau, DE)
	Bovines Serumalbumin	Biocat GmbH, Heidelberg, DE
	CaCl <sub>2</sub>	Merck KGaA, Darmstadt, DE
	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> <sup>3-</sup>	Sigma-Aldrich GmbH, München, DE
	DAPI (4',6-Diamidino-2- Phenylindol, Dihydrochlorid)	Invitrogen, Darmstadt, DE
	EDTA	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
	Entellan	Merck KGaA, Darmstadt, DE
	Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt, DE
	Ethanol	BÜFA GmbH & Co. KG, Oldenburg, DE
	Formalin 37%ig	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
	Glucose	Merck KGaA, Darmstadt, DE
	Glutaraldehyd 25 %	Merck KGaA, Darmstadt, DE
	Glycerol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
	Hämalaun nach Mayer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
	HCL	Merck KGaA, Darmstadt, DE
	Iso-Propylalk	Otto Fischer GmbH & Co. KG, Saarbrücken, DE
	KCl	Merck KGaA, Darmstadt, DE
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fluka Analytical, Buchs, CH
	LY-364947 (L6289)	Sigma-Aldrich, München, DE
	MgCl <sub>2</sub>	Merck KGaA, Darmstadt, DE

	Mowiol® 4 – 88	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
	NaCl	Merck KGaA, Darmstadt, DE
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck KGaA, Darmstadt, DE
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fluka Analytical, Buchs, CH
	NaHPO <sub>4</sub>	Merck KGaA, Darmstadt, DE
	Paraplast® Plus	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, DE
	Sauerstoff	AIR LIQUIDE Deutschland GmbH, Düsseldorf, DE
	Tris-HCl, pH 7,5	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
	Triton X-100	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE
	Tween 20	Sigma- Aldrich GmbH, München, DE
	Xylol	Mallinckrodt Baker BV, Deventer, NL
<b>Instrumente und Laborgeräte</b>	Abzug	Captair Filtersysteme GmbH, Düsseldorf, DE
	A/D Wandler (NI USB- 6221)	National Instruments, Austin, TX, USA
	Autoklav DX-23	Systec GmbH, Linden, DE
	Destamat®	Heraeus Quarzglas GmbH & Co. KG, Hanau, DE
	Feinwaage (BP 121 S)	Sartorius AG, Göttingen, DE
	Fluoreszenzkamera (Leica DFC 350 FX)	Leica, Wetzlar, DE
	Fluoreszenzmikroskop (Leica DMI 6000 B)	Leica, Wetzlar, DE
	Grass CP 511 Verstärker	Sharp K.K. Corporation, Osaka, JPN
	Kühlschrank -20°C	Liebherr International GmbH, Bierbach, DE
	Kühlschrank 4°C	Liebherr International GmbH, Bierbach, DE

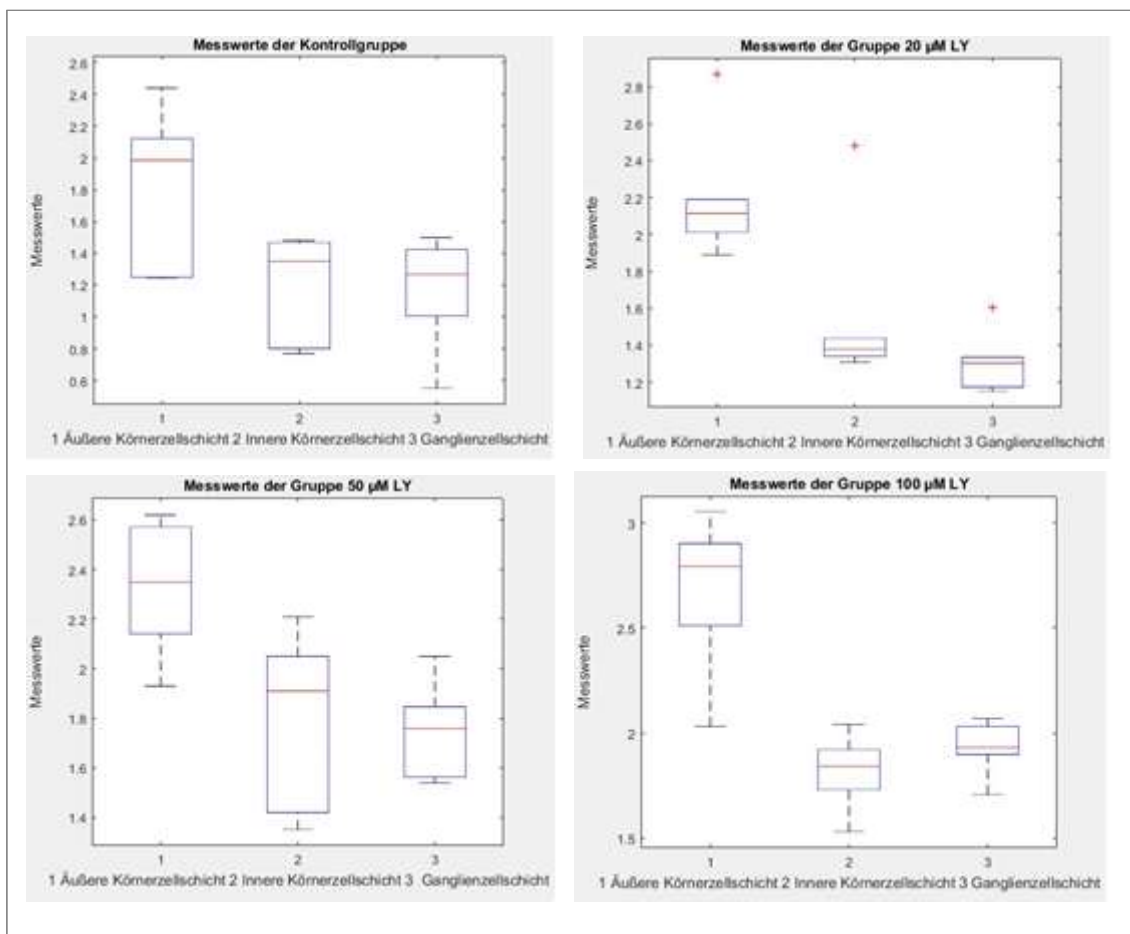
Labor Mixer (RS 2)	Werner Hasse GmbH, Lübeck, DE
Laborwaage (Sartorius portable)	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Magnetrührer	MR 3002; Heidolph, Schwabach, DE
Mikropipette 0,5-10 µl	Eppendorf Research (einstellbare Volumina), Wesseling-Berzdorf, DE
Mikropipette 10-100 µl	Eppendorf Research (einstellbare Volumina), Wesseling-Berzdorf, DE
Mikropipette 100-1000 µl	Eppendorf Research (einstellbare Volumina), Wesseling-Berzdorf, DE
Mikrozentrifuge mit Vortex	NeoLab, Ortenberg, DE
Reiskocher	MultiGourmet FS20, BRAUN, Neu-Isenburg, DE
Rührer (MR 3001)	Heildorph GmbH und Co KG, DE
Schüttler (Unimax 2010)	Heildorph GmbH und Co KG, DE
Senkrechtmikrotom	Leica RM2165, Wetzlar, DE
Zentrifuge, „benchtop“	Heraeus, Kleinostheim, DE
<b>Verbrauchsmaterialien</b> Aluminiumfolie	Lab logistics group, Meckenheim, DE
Deckgläser	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, DE
“Low protein binding” Mikropipette-Spitzen, 0.1-10 µl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
“Low protein binding” Mikropipette-Spitzen, 10-100 µl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
“Low protein binding” Mikropipette-Spitzen, 100-1000 µl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Objektträger	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
96-Well Platte	Falcon® 96-Well Cell Culture Plates, Sigma-Aldrich, München,

		DE
<b>Software</b>	Bildverarbeitung	Leica AF 6000, Wetzlar, DE
	Bildauswertung	Leica Application Suite LAS Software, Wetzlar, DE Image J (Image Processing and Analysis in Java), National Institute of Mental Health, Bethesda (MD), USA
	Elektrophysiologische Datenverarbeitung	DASYLab Professional Version 10.0.0, National Instruments, Austin (TX), USA
	Schaubilderstellung	Microsoft Office Word 2013, Microsoft Corporation, Redmond (WA), USA
	Statistische Auswertung	Microsoft Office Excel 2013, Microsoft Corporation, Redmond (WA), USA MATLAB® Mathworks, Natick (MA), USA Origin 6.0, Microcal, Northampton, MA, USA
	Textverarbeitung	Microsoft Office Word 2013, Microsoft Corporation, Redmond (WA), USA

### Anhang 3: Box-and-Whisker-Plots



**Abbildung 16:** Box-and-Whisker-Plots zur graphischen Darstellung der Messergebnisse aus der histopathologischen Analyse.



**Abbildung 17:** Box-and-Whisker-Plots zur graphischen Darstellung der Messergebnisse (a.u.) aus der immunhistochemischen Analyse.

Nach Erhebung der histologischen und immunhistochemischen Daten wurden Box-and-Whisker-Plots erstellt. Die Box wird durch das 25 %- und das 75 %-Quantil begrenzt. Der Median ist in der Mitte mit einer waagerechten roten Linie eingezeichnet. Die Whiskers zeigen den niedrigsten und höchsten Messwert an. Ausreißer sind mit einem

roten Plus-Zeichen gekennzeichnet. Als Ausreißer wurden Messwerte gesehen, welche mehr als 1,5 Quartilenabstand vom oberen oder unteren Rand der Box entfernt liegen.

Box-and-Whisker-Plots geben einen graphischen Überblick über die Symmetrie der Verteilungen. Aufgrund der vorliegenden Verteilung im histopathologischen und immunohistochemischen Versuch (siehe Abbildung 16 und Abbildung 17) kann von einer Normalverteilung ausgegangen werden.

## Danksagung

An erster Stelle gilt Dank und Anerkennung meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Matthias Lücke, für die Bereitstellung des Themas und die überragende Betreuung. Seine exzellente Unterstützung vor allem am ERG und die vielen aufschlussreichen und motivierenden Gespräche haben den größten Anteil an der Bewältigung dieser Dissertation.

Ich bedanke mich auch herzlich bei Frau PD Dr. Julia Lücke für die vielen hilfreichen Anmerkungen und Korrekturen.

Großer Dank gilt auch Frau Dr. Aysegül Tura. Mit ihrem immensen Wissen und Kenntnissen war sie eine unentbehrliche Hilfe.

Desweiteren möchte ich mich bei Frau Dr. Aizhan Alt für die hervorragenden Einführungen in die Arbeit am ERG und die sagenhafte Geduld im Beantworten all meiner Fragen bedanken.

Ich bedanke mich bei Herrn M.Sc. Markus Scheinhardt für seine geduldige und wertvolle statistische Beratung.

Frau Petra Hammermeister verdanke ich etliche hilfreiche Besprechungen und aufmunternde Worte.

Ich möchte mich bei Herrn Dr. Dr. Khaled Nassar für seine wertvolle Unterstützung bedanken.

Von ganzem Herzen danke ich auch Frau Anna Kraus für ihre unverzichtbare Hilfe und Freundschaft.

Äußerst dankbar bin ich auch Frau Christine Örün für die herzliche Aufnahme in das Labor und die großartige technische Unterstützung.

Ich möchte ich mich auch bei Herrn Jens Rehder für die Bereitstellung der Rinderaugen bedanken.

Großer Dank gebührt meinem Freund Arne für seinen motivierenden Glauben an mich. Selbstverständlich wäre diese Arbeit auch nicht möglich gewesen ohne die erhebliche Liebe und Unterstützung durch meine Familie. Diese Arbeit ist meinen Eltern gewidmet.

*Das Ganze ist mehr als die Summe seiner Teile. - Aristoteles*

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

Name	Kristin Hösel
Geburtsdatum	19.12.1988
Geburtsort	Schwerin
Adresse	Boninstraße 60, 24114 Kiel
E-Mail	kristin.hoesel@gmail.com



### Akademische Laufbahn

---

2008 - 2015	Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
2013 - heute	Promotionsstudentin an der Augenklinik der Universität zu Lübeck

### Berufliche Tätigkeiten

---

Seit März 2016	Assistenzärztin der Klinik für Ophthalmologie, Prof. Dr. Roeder, UKSH Kiel
----------------	---

Kiel, 01.09.2017

*Kristin Hösel*